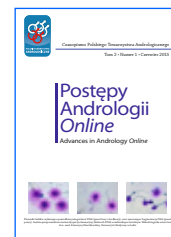




Czasopismo Polskiego Towarzystwa Andrologicznego

Postępy Andrologii Online

Advances in Andrology Online

<http://www.andrologia-pta.com.pl>

STRES OKSYDACYJNY A NIEPŁODNOŚĆ MĘSKA. CZĘŚĆ I: CZYNNIKI WYWOŁUJĄCE STRES OKSYDACYJNY W NASIENIU

OXIDATIVE STRESS AND MALE INFERTILITY.

PART I: FACTORS CAUSING OXIDATIVE STRESS IN SEMEN

Renata Walczak-Jędrzejowska

Zakład Endokrynologii Płodności, Katedra Andrologii i Endokrynologii Płodności, Uniwersytet Medyczny w Łodzi

Autor do korespondencji: Renata Walczak-Jędrzejowska (renata.walczak-jedrzejowska@umed.lodz.pl)



Renata Walczak-Jędrzejowska – dr n. med., absolwentka Uniwersytetu Łódzkiego, biolog, specjalność biologii molekularnej. Nauczyciel akademicki w Zakładzie Endokrynologii Płodności Katedry Andrologii i Endokrynologii Płodności Uniwersytetu Medycznego w Łodzi. Współwykonawca polskich i europejskich projektów badawczych. Pierwszy autor i współautor 93 publikacji naukowych. Skarbnik Polskiego Towarzystwa Andrologicznego, członek Międzynarodowego Towarzystwa Andrologicznego, Polskiego Towarzystwa Endokrynologicznego, Towarzystwa Histochemików i Cytochemików oraz Komisji Andrologii Komitetu Biologii Rozrodu PAN. Praca zawodowa i naukowa autorki związana jest z badaniami nad czynnością męskiego układu płciowego i jego zaburzeniami oraz diagnostyką andrologiczną.

Streszczenie

Reaktywne formy tlenu są produktami normalnego metabolizmu komórkowego i wytwarzane w niewielkich, kontrolowanych przez systemy antyoksydacyjne organizmu ilościach odgrywają istotną rolę w wielu procesach fizjologicznych. Jednakże zwiększona produkcja reaktywnych form tlenu, spowodowana zachwianiem równowagi między ich wytwarzaniem a działaniem ochronnego systemu antyoksydacyjnego, prowadzi nieuchronnie do wystąpienia stresu oksydacyjnego. Dochodzi wtedy do uszkodzenia głównych makromolekuł komórkowych, upośledzenia czynności i w konsekwencji śmierci komórki. Obecnie uważa się, że właśnie stres oksydacyjny występujący w nasieniu jest jedną z głównych przyczyn męskiej niepłodności, w tym niepłodności idiopatycznej, będącej konsekwencją zaburzenia czynności plemników, głównie na skutek utleniania lipidów błon komórkowych oraz uszkodzenia ojcowskiego DNA.

słowa kluczowe: plemniki, stres oksydacyjny, niepłodność męska

Abstract

Reactive oxygen species are products of normal cellular metabolism and when produced in small amounts, controlled by the antioxidant systems play an important role in many physiological processes. However, the increased production of reactive oxygen species, caused by imbalance between their generation and the protective effects of antioxidant system, inevitably leads to an oxidative stress. This causes damage to major cellular macromolecules, dysfunction and finally cell death. It is presently considered that oxidative stress is one of the main causes of male infertility, including idiopathic infertility, resulting from impairment of sperm function, mainly due to peroxidation of cell membrane's lipids and paternal DNA.

key words: sperm, oxidative stress, male infertility

Skróty / Abbreviations

ERC – nadmiar resztkowej cytoplazmy (ang. *excess residual cytoplasm*), G6PDH – dehydrogenaza glukozy-6-fosforanowa (ang. *glucose-6-phosphate dehydrogenase*), GPX – peroksydaza glutationowa (ang. *glutathione peroxidase*), GR – reduktaza glutationowa (ang. *glutathione reductase*), H_2O_2 – nadtlenek wodoru (ang. *hydrogen peroxide*), HO_2^{\bullet} – rodnik wodoronadtlenkowy (ang. *hydroperoxyl radical*), HOCl – kwas podchlorawy (ang. *hypochloric acid*), IL-1 β – interleukina 1 β (ang. *interleukin 1 β*), IL-6 – interleukina 6 (ang. *interleukin 6*), IL-8 – interleukina 8 (ang. *interleukin 8*), KT – katalaza (ang. *catalase*), MDA – dialdehyd malonowy (ang. *malondialdehyde*), NADH – dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy, forma zredukowana (ang. *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, reduced*), NADPH – fosforan dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego, forma zredukowana (ang. *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, reduced*), NO^{\bullet} – tlenek azotu (ang. *nitric oxide*), NO_2^{\bullet} – dwutlenek azotu (ang. *nitrogen dioxide*), $O_2^{\bullet-}$ – anionorodnik ponadtlenkowy (ang. *superoxide radical*), NOX – oksydaza NADPH (ang. *NADPH oxidase*), NOX1 – oksydaza NADPH typu 1 (ang. *NADPH oxidase 1*), NOX2 – oksydaza NADPH typu 2 (ang. *NADPH oxidase 2*), NOX3 – oksydaza NADPH typu 3 (ang. *NADPH oxidase 3*), NOX4 – oksydaza NADPH typu 4 (ang. *NADPH oxidase 4*), NOX5 – oksydaza NADPH typu 5 (ang. *NADPH oxidase 5*), 1O_2 – tlen singletowy (ang. *singlet oxygen*), O_3 – ozon (ang. *ozone*), OH^{\bullet} – rodnik hydroksylowy (ang. *hydroxyl radical*), ONOOH – kwas nadtlenoazotawy (ang. *peroxynitrous acid*), RFA – reaktywne formy azotu (ang. *reactive nitrogen species*), RF-ERM – promieniowanie elektromagnetyczne o częstotliwości radiowej (ang. *radiofrequency electromagnetic radiation*), RFT – reaktywne formy tlenu (ang. *reactive oxygen species*), RO^{\bullet} – rodnik alkoksylowy (ang. *alkoxyl radical*), RO_2^{\bullet} – rodnik peroksydowy (ang. *peroxyl radical*), SOD – dysmutaza ponadtlenkowa (ang. *superoxide dismutase*), TNF- α – czynnik martwicy nowotworów α (ang. *tumor necrosis factor α*), WHO – Światowa Organizacja Zdrowia (ang. *World Health Organization*)

Niepłodność według Światowej Organizacji Zdrowia (WHO, ang. *World Health Organization*) jest to niemożność uzyskania ciąży w czasie 12 miesięcy regularnego współżycia pary w celach koncepcyjnych (Rowe i wsp., 2000). Dotyka ona nawet do 20% par w Polsce i na świecie, bez względu na rasę czy przynależność etniczną i w wielu krajach uznana jest za chorobę społeczną (Bablok i wsp., 2011; Hull i wsp., 1985; Irvine, 1998; Kotzbach i Kotzbach, 2013). Ocenia się, że wśród par niepłodnych czynnik męski stanowi od 25% do nawet 60% (Bablok i wsp., 2011; Esteves i Agarwal, 2011; Safarinejad, 2008; Sharlip i wsp., 2002; Ursini i wsp., 1999). W większości przypadków przyczyny męskiej niepłodności objawiają się obniżeniem liczby i ruchliwości plemników oraz ich nieprawidłową morfologią. Wskazuje się także na zaburzenia czynności plemników, które w niektórych przypadkach mogą stanowić jedyną przyczynę niepłodności (Hull i wsp., 1985). Wśród czynników odpowiedzialnych za te zaburzenia wymienia się zwykle, obok czynników genetycznych, czynniki środowiskowe oraz związane ze stylem życia, takie jak: narażenie na działanie związków chemicznych, metali ciężkich, środków ochrony roślin, ksenoestrogenów, podwyższonej temperatury, napromieniowania, a także palenie tytoniu, nadużywanie alkoholu, chroniczny stres czy nieprawidłowa dieta (Jurewicz i wsp., 2014a; Jurewicz i wsp., 2014b; Lahdetie, 1995; Słowikowska-Hilczner, 2006; Thonneau i wsp., 1998). Z obniżeniem męskiej płodności związane są także, często lekceważone, zapalenia i zakażenia w męskim układzie płciowym (De Celis i wsp., 1996; Purvis i Christiansen, 1992). Jednakże, pomimo rozwoju nauki i coraz doskonalszych metod diagnostycznych, w dalszym ciągu w ok. 20–30% przypadków etiologia i patogeneza zaburzeń męskiej płodności pozostaje nieznaną, stanowiąc tzw. niepłodność idiopatyczną (Deng i wsp., 2008; Sanocka-Maciejewska i wsp., 2005). Obecnie uważa się, że stres oksydacyjny, będący konsekwencją działania większości wymienionych wyżej czynników, stanowi jedną z najbardziej prawdopodobnych przyczyn idiopatycznej niepłodności męskiej.

Reaktywne formy tlenu w nasieniu

Reaktywne formy tlenu (RFT, ang. *reactive oxygen species*) to związki tlenu wykazujące większą reaktywność niż tlen cząsteczkowy w stanie podstawowym (trypletowym). W każdej żywej komórce, a więc i w plemnikach, niewielkie ilości RFT powstają jako naturalne produkty metabolizmu komórkowego. Ich ilość jest ściśle kontrolowana przez mechanizmy antyoksydacyjne organizmu. Wiele badań wykazało, że niskie, kontrolowane (tzw. fizjologiczne) poziomy RFT odgrywają istotną rolę w prawidłowej czynności plemnika, biorąc udział w kluczowych procesach gwarantujących zapłodnienie, takich jak kapacytacja, hiperaktywacja, reakcja akrosomalna plemnika czy też jego fuzja z oocytem (Agarwal i Saleh, 2002; Amaral i wsp., 2013; Chen i wsp., 2013; Frączek i Kurpisz, 2013; Guerriero i wsp., 2014).

O stresie oksydacyjnym mówimy w sytuacji, gdy komórki czy też tkanki narażone są na dodatkowe źródła RFT, gdy zwiększa się tempo ich endogennej produkcji, czy też dochodzi do niewydolności ochronnych systemów antyoksydacyjnych. Jako cząsteczki bardzo reaktywne, RFT szybko wchodzi w reakcje, w tym reakcje łańcuchowe, i reagując z białkami, lipidami czy kwasami nukleinowymi, indukują powstanie kolejnych produktów wolnorodnikowych. Następstwem stresu oksydacyjnego są uszkodzenia najważniejszych makromolekuł komórkowych prowadzące do zaburzenia czynności komórki, a w konsekwencji do jej śmierci (Aitken i wsp., 2010).

Reaktywne formy tlenu możemy podzielić na dwie grupy: 1) wolne rodniki, mające jeden lub więcej niesparowanych elektronów na orbicie zewnętrznej, oraz 2) cząsteczki powstające w wyniku metabolizmu tlenu, niebędące jednak wolnymi rodnikami (tabela 1). Do głównych i najbardziej rozpowszechnionych RFT należy anionorodnik ponadtlenkowy ($O_2^{\bullet-}$, ang. *superoxide radical*), który jest wyjściową (pierwotną) formą RFT. Z niego powstają kolejne, znacznie bardziej reaktywne i toksyczne dla komórki RFT. I tak, jego dalsza redukcja w procesie

Tabela 1. Przykłady reaktywnych form tlenu (RFT) i azotu (RFA)
Table 1. Examples of reactive oxygen (RFT) and nitrogen (RFA) species

Wolnorodnikowe RFT i RFA / Radical RFT and RFA		RFT i RFA niebędące wolnymi rodnikami / Nonradical RFT and RFA	
rodnik wodoronadtlenkowy / hydroperoxyl radical	HO ₂ •	tlen singletowy / singlet oxygen	¹ O ₂
anionorodnik ponadtlenkowy / superoxide radical	O ₂ ^{•-}	nadtlenek wodoru / hydrogen peroxide	H ₂ O ₂
rodnik hydroksylowy / hydroxyl radical	OH•	ozon / ozone	O ₃
rodnik alkoksylowy / alkoxy radical	RO•	kwas azotawy / nitrous acid	HNO ₂
rodnik peroksydowy / peroxy radical	RO ₂ •	trinitlenek diazotu / dinitrogen trioxide	N ₂ O ₃
tlenek azotu / nitric oxide	NO•	kwas podchlorawy / hypochloric acid	HOCl
dwutlenek azotu / nitrogen dioxide	NO ₂ •	kwas nadtlenoazotawy / peroxyntous acid	ONOOH

enzymatycznym katalizowanym przez dysmutazę ponadtlenkową powoduje powstanie nadtlenku wodoru (H₂O₂, ang. *hydrogen peroxide*). Choć mało reaktywny, w przeciwieństwie do anionorodnika ponadtlenkowego, dyfunduje on łatwo przez błony komórkowe i w obecności metali przejściowych takich jak żelazo czy miedź może ulec przemianie do rodnika hydroksylowego (OH•, ang. *hydroxyl radical*). Rodnik hydroksylowy charakteryzuje się bardzo dużą reaktywnością i natychmiast po powstaniu reaguje z sąsiadującymi cząsteczkami, niezależnie od tego, czy są to białka, fragmenty DNA czy inne makromolekuły komórkowe. Innymi rodnikami powstającymi bezpośrednio w reakcjach z anionorodnikiem ponadtlenkowym są chociażby rodnik wodoronadtlenkowy (HO₂•, ang. *hydroperoxyl radical*) czy nadtlenoazotyn (ONOO•, ang. *peroxynitrite*), który jest wysoce reaktywną formą azotu. Do RFT należy także tlen singletowy (¹O₂, ang. *singlet oxygen*), powstający w wyniku wzbudzenia cząsteczek tlenu, ozon (O₃, ang. *ozone*), będący odmianą alotropową tlenu, czy też związki tworzące się w reakcjach metabolicznych komórki, np. kwas podchlorawy (HOCl, ang. *hypochloric acid*) czy kwas nadtlenoazotawy (ONOOH, ang. *peroxynitrous acid*), oraz wolne rodniki azotowe, takie jak tlenek azotu (NO•, ang. *nitric oxide*) czy dwutlenek azotu (NO₂•, ang. *nitrogen dioxide*). Dodatkowo, reakcje RFT ze związkami organicznymi prowadzą do powstania wolnych rodników substancji organicznych, np. rodnika peroksydowego (RO₂•, ang. *peroxy radical*) czy alkoksylowego – RO•, ang. *alkoxy radical* (Agarwal i wsp., 2003; Frączek i Kurpisz, 2005; Ługowski i wsp., 2011; Puzanowska-Tarasiewicz i wsp., 2008).

Mechanizmy antyoksydacyjne w nasieniu

Organizm rozwinął szereg systemów obronnych zabezpieczających przed stresem oksydacyjnym i związanymi z nim uszkodzeniami komórek i tkanek. Zarówno plazma nasienia, jak i plemniki zawierają wiele systemów antyoksydacyjnych, które pozwalają na wytwarzanie fizjologicznych ilości RFT i utrzymanie równowagi oksydo-redukcyjnej poprzez neutralizację i usuwanie nadmiaru RFT. Należą do nich systemy ochronne oparte na czynnikach enzymatycznych i nieenzymatycznych związkach niskocząsteczkowych o charakterze przeciwutleniaczy

(tabela 2). Czynniki obu systemów ściśle współdziałają ze sobą w celu zapewnienia optymalnej ochrony przed RFT i wydaje się, że niedobór jednego z nich może powodować obniżenie całkowitego potencjału antyoksydacyjnego organizmu.

Tabela 2. Przykłady enzymatycznych i nieenzymatycznych antyoksydantów w plemnikach i plazmie nasienia

Table 2. Examples of enzymatic and non-enzymatic antioxidants occurred in spermatozoa and seminal plasma

Antyoksydanty enzymatyczne / Enzymatic antioxidants
dysmutazy ponadtlenkowe / superoxide dismutases
katalaza / catalase
peroksydaza glutationowa / glutathione peroxidase
reduktaza glutationowa / glutathione reductase
Antyoksydanty nieenzymatyczne / Non-enzymatic antioxidants
glutation / glutathione
witaminy (A, E, C, B) / A, E, C, B vitamins
cysteina, homocysteina / cysteine, homocysteine
tauryna, hipotauryna / taurine, hipotaurine
flawonoidy / flavonoids
koenzym Q10 / koenzym Q10
laktoferyna / lactoferrin
mikroelementy (cynk, selen, miedź) / microelements (zinc, selenium, copper)

Podstawowym antyoksydacyjnym systemem enzymatycznym w nasieniu jest tzw. triada enzymatyczna, do której zaliczamy dysmutazę ponadtlenkową, katalazę oraz peroksydazę glutationową. Dysmutazy ponadtlenkowe (SOD, ang. *superoxide dismutase*) są metaloenzymami katalizującymi reakcję dysmutacji anionorodnika ponadtlenkowego do nadtlenku wodoru. W swoim centrum aktywnym, w zależności od typu, mają miedź, cynk lub mangan. Katalaza (KT, ang. *catalase*) jest selenoproteiną i katalizuje reakcję dysproporcjonowania nadtlenku wodoru prowadzącą do powstania tlenu cząsteczkowego i wody. Kolejnym enzymem systemu antyoksydacyjnego w nasieniu jest peroksydaza glutationowa (GPX, ang. *glutathione peroxidase*), która katalizuje reakcję redukcji nadtlenku wodoru oraz nadtlenków organicznych, w tym nadtlenków fosfolipidów (Frączek i Kurpisz, 2005; Gałęcka i wsp., 2008; Walczak-Jędrzejowska i wsp., 2013). Reakcja z udziałem GPX wymaga obecności zredukowanej formy

glutationu, który sam jest też ważnym antyoksydantem. Jego regeneracja zachodzi w wyniku enzymatycznej redukcji utlenionego glutationu, reakcji katalizowanej przez reduktazę glutationową (GR, ang. *glutathione reductase*). Oprócz enzymów neutralizujących nadprodukcję RFT istotną rolę w antyoksydacyjnym systemie ochronnym odgrywają tzw. niskocząsteczkowe, nieenzymatyczne antyoksydanty, które wspomagają aktywność ww. enzymów. W nasieniu zidentyfikowano obecność m.in. witaminy C (Colagar i Marzony, 2009; Thiele i wsp., 1995), witaminy E (Kutlubay i wsp., 2007), kwasu moczowego (Xu i wsp., 2004; Zhang i wsp., 2007), pirogronianu (Webb i Arns, 2006), glutationu (Giannattasio i wsp., 2002; Lenzi i wsp., 1993), tauryny i hipotauryny (Alvarez i Storey, 1983) czy latoferyny (Tomar i wsp., 2011). Inne znane antyoksydanty niskocząsteczkowe to cysteina, homocysteina, koenzym Q10, witamina A, karoten, witaminy z grupy B, flawonoidy, mikroelementy takie jak cynk, selen czy miedź (Aprrioku, 2013; Colagar i wsp., 2009; Frączek i Kurpisz, 2005; Walczak-Jędrzejowska i wsp., 2013).

Komórkowe źródła reaktywnych form tlenu w nasieniu

W ejakulacie oprócz plemników znajdują się także inne elementy komórkowe, takie jak komórki plemnikotwórcze wcześniejszych etapów spermatogenezy, leukocyty czy komórki nabłonkowe. Za główne endogenne, komórkowe źródło wytwarzania RFT uważa się leukocyty, głównie neutrofile i makrofagi, oraz plemniki o nieprawidłowej budowie.

Jednym z miejsc powstawania RFT w plemnikach jest mitochondrialny łańcuch oddechowy i zachodzący tam proces fosforylacji oksydacyjnej. Przepływ elektronów przez składowe łańcucha oddechowego nie jest szczelny i część elektronów „wycieka”, redukując cząsteczkę tlenu do anionorodnika ponadtlenkowego, w wyniku procesu jednoelektronowego, przy udziale głównie oksydoreduktazy NADH (ang. *NADH oxidoreductase*), a także koenzymu Q – ang. *coenzyme Q* (Potargowicz i wsp., 2005). Mechanizm ten wydaje się być głównym źródłem RFT w warunkach równowagi oksydoredukcyjnej w plemnikach prawidłowych (Aitken i De Iuliis, 2010), jak i przy nadprodukcji RFT w plemnikach o nieprawidłowej budowie, w których dochodzi do zwiększonego „wycieku” elektronów z łańcucha oddechowego (Koppers i wsp., 2008), prawdopodobnie w wyniku dysfunkcji samych mitochondriów (Wang i wsp., 2003). Dysfunkcja mitochondriów może być spowodowana wpływem już istniejącego stresu oksydacyjnego, który powoduje uszkodzenie błony mitochondriów, tym samym przyczyniając się do wzrostu wytwarzania w nich RFT. Zaobserwowano korelacje między wytwarzaniem nadmiaru RFT w mitochondriach a spadkiem ruchliwości plemników i wzrostem peroksydacji lipidów na terenie wstawki (Aitken i wsp., 2014; Evenson i wsp., 1982).

Drugim miejscem, w którym mogą być wytwarzane RFT w plemniku, jest błona komórkowa, gdzie powstają one głównie w wyniku działania zależnej od jonów wapnia oksydazy NADPH – powstaje anionorodnik ponadtlenkowy oraz syntazy tlenu azotu – powstaje tlenek azotu (Frączek i Kurpisz, 2013). Oksydazy NADPH są kompleksami enzymatycznymi¹, których budowa i funkcja oparte są na białkach NOX (ang. *NADPH oxidase*), będących podjednostkami katalitycznymi kompleksów aktywnych. Do tej pory wykryto kilka ich typów (NOX1, NOX2, NOX3, NOX4, NOX5). Ostatnie badania nad wytwarzaniem anionorodnika ponadtlenkowego wykazały, że w plemnikach obecna jest zależna od jonów wapnia NOX5 (Musset i wsp., 2012). W warunkach prawidłowych w dojrzałym plemniku pozbawionym znacznej części przestrzeni cytoplazmatycznej następuje wytwarzanie, głównie w mitochondriach, stałych, kontrolowanych przez systemy antyoksydacyjne ilości RFT niezbędnych do indukcji procesów przygotowujących plemnik do zapłodnienia komórki jajowej. Jednakże w uszkodzonych plemnikach (tzw. niedojrzałych), w których występuje nadmiar resztkowej cytoplazmy (ERC, ang. *excess residual cytoplasm*), następuje wzrost wytwarzania RFT jako wynik zwiększonej ilości/aktywności enzymów występujących w cytoplazmie, takich jak dehydrogenaza glukozy-6-fosforanowa (G6PDH, ang. *glucose-6-phosphate dehydrogenase*) czy SOD. Z wykorzystaniem szlaku pentozofosforanowego, G6PDH produkuje zwiększone ilości NADPH, którego większa dostępność w konsekwencji prowadzi do zwiększonego wytwarzania RFT (anionorodnika ponadtlenkowego) przez NOX5 w błonie komórkowej plemnika (Rengan i wsp., 2012). Anionorodnik ponadtlenkowy jest następnie przekształcany do nadtlenu wodoru przez SOD. Nadtlenek wodoru, jak już wspomniano wcześniej, może zostać przekształcony do najbardziej reaktywnej formy RFT, czyli rodnika hydroksylowego. Kiedy zwiększa się ilość RFT, tak jak to ma miejsce w przypadku plemników z ERC, systemy antyoksydacyjne plemnika nie są w stanie zneutralizować ich nadmiaru. Dodatkowo, RFT produkowane przez plemniki o nieprawidłowej budowie mogą powodować uszkodzenia oksydacyjne także w plemnikach prawidłowych podczas ich transportu z kanalików plemnikotwórczych do najądźrza (Gil-Guzman i wsp., 2001; Ollero i wsp., 2001).

W plemnikach, ale przede wszystkim w nasieniu, obecna jest także oksydaza ksantynowa, która bierze udział w przemianach metabolicznych zasad purynowych. Katalizuje ona między innymi reakcję utleniania hipoksantyny do ksantyny, a następnie ksantyny do kwasu moczowego. Jej aktywność jest związana z wytwarzaniem

¹ Oksydazy zależne od NADPH należące do rodziny oksydaz NOX (ang. *NOX oxidase family*) zbudowane są z 6 hydrofobowych transbłonowych α -heliks (NOX). Domena transbłonowa zawiera dwie grupy hemowe stanowiące nośnik dla elektronów, z kolei domena cytoplazmatyczna (-COOH) wiąże dinukleotyd flawinoadeninowy (FAD) oraz fosforan dinukleotydu niktynoamidoadeninowego (NADPH). W zależności od izoformy oksydazy domena cytoplazmatyczna (-NH₂) wiąże m.in. białka regulatorowe i stabilizujące oraz zawiera domenę wiążącą wapń (przyp. red.).

anionorodnika ponadtlenkowego i w konsekwencji nadtlenu wodoru w nasieniu. U niepełnych mężczyzn zaobserwowano wzrost aktywności tego enzymu (Kurpisz i wsp., 1996; Frączek i Kurpisz, 2005).

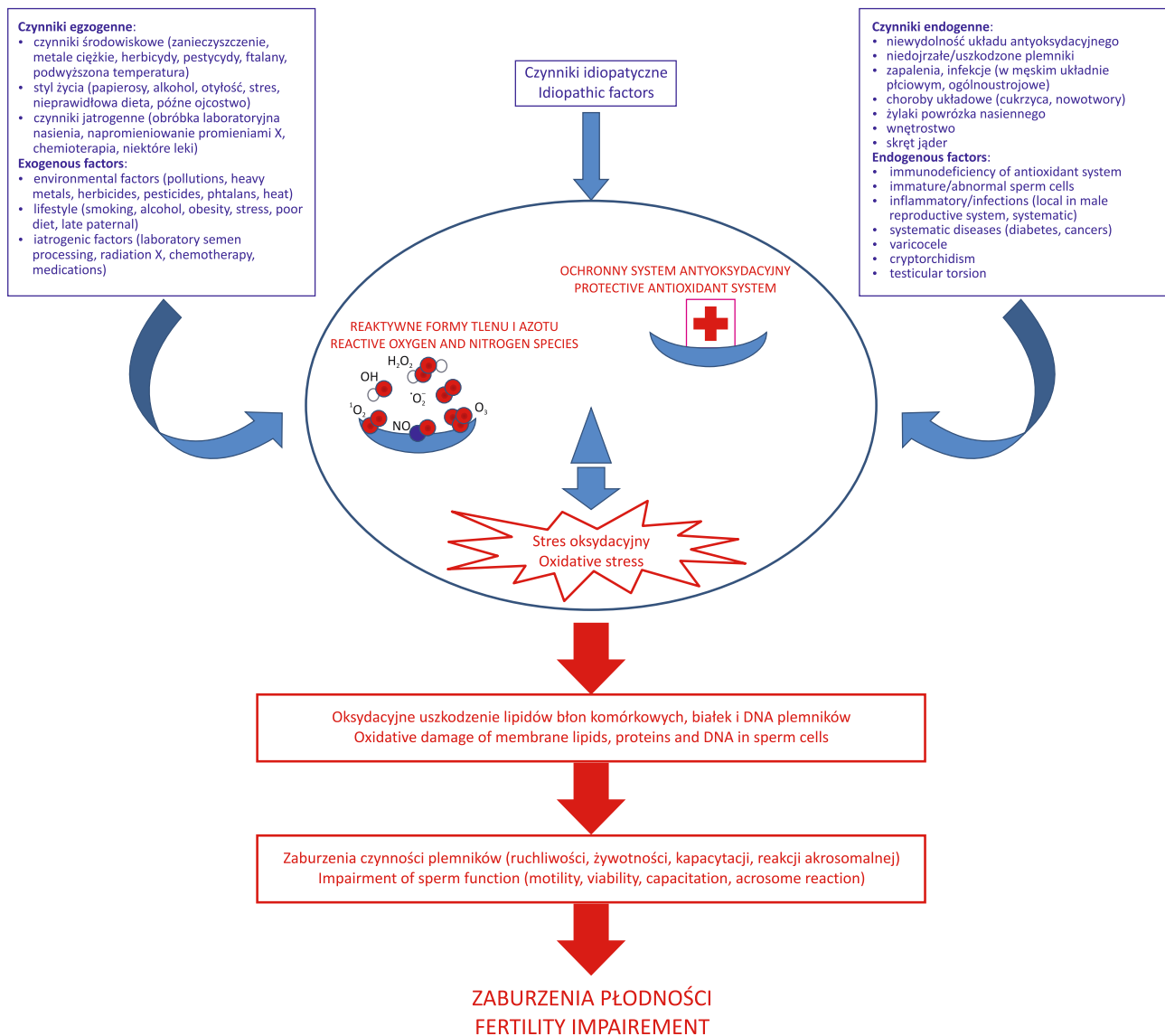
W nasieniu leukocyty, przede wszystkim granulocyty, stanowiące 50–60% wszystkich leukocytów, oraz makrofagi stanowiące 20–30%, pochodzą głównie z prostaty lub pęcherzyków nasiennych (Saleh i wsp., 2003). W momencie aktywacji, przy zakażeniach i stanach zapalnych, mogą one wytwarzać ponad 100 razy więcej RFT niż w warunkach prawidłowych i zwiększać produkcję NADPH z wykorzystaniem szlaku pentozofosforanowego (Agarwal i wsp., 2003; Lavranos i wsp., 2012). Istnieje silna korelacja między występowaniem stresu oksydacyjnego w nasieniu a obecnością zwiększonej liczby leukocytów (Alvarez i wsp., 2002; Henkel i wsp., 2005; Sharma i wsp., 2001). Wzrost liczby leukocytów w nasieniu związany jest także z zaburzeniami parametrów nasienia lub obniżeniem potencjału zapładniającego plemników (Alvarez i wsp., 2002; Vogelpoel i wsp., 1991; Wolff i wsp., 1990).

■ Czynniki wywołujące stres oksydacyjny

Do stresu oksydacyjnego dochodzi w momencie, gdy zachwiana zostaje równowaga między wytwarzaniem RFT a ich neutralizacją przez systemy antyoksydacyjne organizmu. Może to mieć miejsce w momencie zwiększenia wytwarzania ilości RFT przez czynniki zarówno endogenne, jak i egzogenne i/lub niewydolności systemów antyoksydacyjnych.

Czynniki wywołujące stres oksydacyjny możemy podzielić na dwie grupy: 1) egzogenne, do których zaliczymy m.in. styl życia, czynniki środowiskowe czy czynniki jatrogenne, oraz 2) czynniki endogenne, do których zaliczamy m.in. żyłki powrózków nasiennych, wnetrostwo, skręt jądra czy też zapalenia i zakażenia w męskim układzie płciowym, choroby ogólnoustrojowe oraz czynniki idiopatyczne (Agarwal i wsp., 2014; Frączek i Kurpisz, 2013; Tremellen, 2008) (rycina 1).

Wśród czynników związanych ze stylem życia wywołujących stres oksydacyjny w nasieniu przede wszystkim



Ryc. 1. Przyczyny i skutki stresu oksydacyjnego w nasieniu

Fig. 1. Causes and effects of oxidative stress in semen

wymienić należy palenie papierosów. Toksyny z dymu papierosowego przedostają się do układu płciowego i reagują ze składnikami plazmy nasienia (Kulikauskas i wsp., 1985; Pacifici i wsp., 1993; Sepaniak i wsp., 2004; Trummer i wsp., 2002). Wykazano, że u palaczy występuje wzrost poziomu RFT, liczby leukocytów oraz komórek okrągłych w nasieniu, obniżenie ruchliwości i żywotności plemników i wzrost nasilenia fragmentacji DNA (Ochędalski i wsp., 1994; Pacifici i wsp., 1993; Saleh i wsp., 2002; Sepaniak i wsp., 2004; Taha i wsp., 2012). Dodatkowo w nasieniu palaczy obniżony jest poziom takich antyoksydantów jak witamina E, C oraz cynk, co wzmacnia ryzyko uszkodzeń oksydacyjnych plemników (Fraga i wsp., 1996; Mostafa i wsp., 2006; Taha i wsp., 2012).

Kolejnym czynnikiem zwiększającym poziom RFT jest konsumpcja alkoholu. Ponadto wykazano, że nadużywanie alkoholu często związane jest z niedożywieniem i dietą ubogą w antyoksydanty (Koch i wsp., 2004). Z kolei nieprawidłowa dieta, bogata w tłuszcze i węglowodany oraz siedzący tryb życia mogą prowadzić do otyłości. Nagromadzenie tkanki tłuszczowej może powodować uwalnianie z niej cytokin prozapalnych i wzrost wytwarzania RFT w leukocytach. Dodatkowo, otyłość doprowadza także do przegrzewania jąder w wyniku nagromadzenia tkanki tłuszczowej w regionie pachwin (Khullar i wsp., 2012; Palmer i wsp., 2012; Singer i Granger, 2007). Z drugiej strony zbyt intensywne ćwiczenia fizyczne powodują wzrost RFT w wyniku zwiększonego metabolizmu tlenowego w mięśniach (Peake i wsp., 2007). Hipoteza stresu oksydacyjnego związanego ze starzeniem się organizmu jest jedną z najbardziej popularnych hipotez wyjaśniających molekularne podstawy tego procesu (Olinski i wsp., 2007). Siomek i wsp. (2007) zaobserwowali np. dodatnią korelację występującą między wiekiem a poziomem markerów oksydacyjnego uszkodzenia DNA badanych w leukocytach krwi obwodowej, a także zależny od wieku spadek poziomu witaminy C we krwi. Dodatkowo, wykazano istnienie bezpośredniego związku między ogólnoustrojowym stresem oksydacyjnym występującym w procesie starzenia się organizmu a wzrostem uszkodzeń DNA w plemnikach zarówno u mężczyzn płodnych, jak i niepłodnych (Junqueira i wsp., 2004). Udokumentowano także wzrost zaburzeń genetycznych u dzieci starszych ojców, w wyniku pogarszania się jakości DNA plemników, czego podłożem może być właśnie zwiększona produkcja RFT, a zarazem obniżona zdolność antyoksydacyjna organizmu (Crosnoe i Kim, 2013; Paul i Robaire, 2013). Jednakże, o ile z jednej strony ogólnoustrojowy stres oksydacyjny, związany np. ze starzeniem się organizmu, może wpływać na uszkodzenia DNA w plemnikach, to z drugiej strony Guz i wsp. (2013) nie znaleźli związku między istniejącym stresem oksydacyjnym w nasieniu niepłodnych mężczyzn a tym badaniem w leukocytach krwi obwodowej (tzn. ogólnoustrojowym), co sugeruje, że stan oksydoredukcyjny nasienia może występować niezależnie od tego w innych tkankach.

Kolejny czynnik środowiskowy związany ze stylem życia, którego wpływ na męską płodność jest ostatnio intensywnie badany, to promieniowanie elektromagnetyczne o częstotliwości radiowej (RF-ERM, ang. *radiofrequency electromagnetic radiation*) emitowane głównie przez telefony komórkowe. Istnieje wiele doniesień wskazujących na obniżenie parametrów badania nasienia, głównie ruchliwości plemników, oraz wzrost uszkodzeń zarówno jądrowego, jak i mitochondrialnego DNA, prawdopodobnie w wyniku stresu oksydacyjnego będącego konsekwencją ekspozycji na RF-ERM (Agarwal i wsp., 2009; De Iuliis i wsp., 2009; Mailankot i wsp., 2009). W jednym z pierwszych badań klinicznych wykazano, że w nasieniu mężczyzn noszących telefony komórkowe w kieszeni spodni lub przypięte do paska od spodni występuje obniżenie koncentracji plemników w porównaniu z mężczyznami, którzy w ogóle nie nosili telefonu lub trzymali go w innym miejscu (Kilgallon i Simmons, 2005). W kolejnych badaniach wykazano, że zarówno okres posiadania telefonu komórkowego, jak i dzienny, średni czas prowadzonych rozmów czy transmisji danych powoduje spadek liczby plemników, odsetka plemników żywych i wykazujących ruch postępowy oraz wzrost częstości występowania plemników o nieprawidłowej budowie (Agarwal i wsp., 2008; Fejes i wsp., 2005; Gorpinchenko i wsp., 2014; Wdowiak i wsp., 2007). Ostatnio przeprowadzona metaanaliza 10 publikacji dotyczących badań (*in vivo* i *in vitro*) nad wpływem RF-ERM na plemniki i męską płodność wskazuje, że telefony komórkowe wpływają ujemnie na jakość nasienia (Adams i wsp., 2014).

Ftalany, stosowane powszechnie jako środki zmiękczone (tzw. plastyfikatory) w przemyśle chemicznym i w produkcji tworzyw sztucznych, także są czynnikiem wywołującym stres oksydacyjny na poziomie jądra, prowadząc do zaburzenia procesu spermatogenezy, zwiększenia częstości uszkodzeń DNA komórek płciowych, a w konsekwencji obniżenia jakości nasienia (Duty i wsp., 2003a; Duty i wsp., 2003b; Hauser i wsp., 2007; Jurewicz i wsp., 2013; Kasahara i wsp., 2002). Udokumentowano także uszkodzenia oksydacyjne plemników wywołane przez pestycydy oraz metale ciężkie – głównie kadm, ołów (Chitra i wsp., 2001; Hsu i Guo, 2002; Sujatha i wsp., 2001; Taha i wsp., 2013; Xu i wsp., 2003).

Podawanie cyklofosfamidu, leku cytostatycznego, powoduje spadek poziomu katalazy (Sanocka i wsp., 1997; Zini i wsp., 2000) oraz wzrost poziomu dialdehydu malonowego (MDA, ang. *malondialdehyde*), wskazując na peroksydacyjne uszkodzenie lipidów błon komórkowych (Das i wsp., 2002; Ghosh i wsp., 2002). Z kolei używanie tak powszechnych leków jak aspiryna czy paracetamol powoduje zwiększenie aktywności cytochromu P450, skutkujące wzrostem produkcji wolnych rodników (Agarwal i Said, 2005). Zwiększenie wytwarzania RFT może wystąpić także *in vitro* podczas procedur przygotowywania plemników do technik wspomaganego rozrodu, przede wszystkim w wyniku oczyszczania plemników z plazmy nasienia, tym samym pozbawiania ich

naturalnego środowiska antyoksydacyjnego (*Tremellen*, 2008). Oprócz tego wirowanie, krioprezewacja i późniejsze rozmrażanie plemników oraz niska zawartość antyoksydantów w mediach zabezpieczających plemniki mogą generować w nich stres oksydacyjny (*Agarwal i wsp.*, 2006; *Olszewska-Słonina*, 2013; *Sikka*, 2004; *Walczak-Jędrzejowska i wsp.*, 2013; *Watson*, 2000).

Nadmiar wytwarzania RFT spowodowany jest także zakażeniami i stanami zapalnymi w męskim układzie płciowym. Zakażenie patogenami wywołuje naturalne mechanizmy obronne, tzw. „wybuch tlenowy”, czyli nagłe uwolnienie dużych ilości RFT przez leukocyty i makrofagi – głównie anionorodnika ponadtlenkowego i nadtlenku wodoru (*Frączek i Kurpisz*, 2007; *Kowalski i wsp.*, 1992; *Roos*, 1991). U pacjentów z pozytywnym wynikiem posiewu nasienia na bakterie tlenowe wykazano znaczny wzrost poziomu anionorodnika ponadtlenkowego w porównaniu z pacjentami zdrowymi (*Mazzilli i wsp.*, 1994). W modelu *in vitro* stanu zapalnego w nasieniu wykazano, że szczepy takich bakterii jak *Escherichia coli*, *Staphylococcus haemolyticus* i *Bacteroides ureolyticus* i/lub obecność leukocytów powodują zaburzenie ruchliwości plemników oraz peroksydacyjne uszkodzenie ich błony komórkowej (*Frączek i wsp.*, 2007; *Frączek i wsp.*, 2014). Także zakażenie chlamydiami czy też infekcje wirusowe (np. *herpes simplex virus*) związane są ze wzrostem uszkodzeń oksydacyjnych plemników (*Krause i Bohring*, 2003; *Krause i wsp.*, 2003; *Segnini i wsp.*, 2003). Wysoki poziom uszkodzeń oksydacyjnych plemników został także potwierdzony u mężczyzn ze zwiększoną skłonnością do zakażeń układu moczowo-płciowego z powodu np. paraliżu kończyn dolnych (*Brackett i wsp.*, 2008). Z kolei w przebiegu przewlekłego, niebakteryjnego zapalenia prostaty obserwuje się wzrost poziomu prozapalnych cytokin i aktywację produkcji RFT (*Batstone i wsp.*, 2002; *Motrich i wsp.*, 2005). *Sanocka i wsp.* (2003) wykazali, że prozapalne cytokiny takie jak interleukina 1 β (IL-1 β , ang. *interleukin 1 β*), interleukina 6 i 8 (IL-6, IL-8) i czynnik martwicy nowotworów α (TNF- α , ang. *tumor necrosis factor α*) mogą modulować aktywność pro- i antyoksydacyjną w przebiegu zapalenia dróg wyprowadzających nasienie. Wyniki badań *in vitro* sugerują, że podczas procesu zapalnego cytokiny wzmagają poziom stresu oksydacyjnego generowanego przez leukocyty, co może mieć poważne konsekwencje dla integralności błony komórkowej plemnika (*Frączek i wsp.*, 2008). Wzrost ilości leukocytów, prozapalnych cytokin i produkcji RFT w nasieniu był obserwowany np. po operacji rekonstrukcyjnej dróg wyprowadzających nasienie po wazektomii (*Kolettis i wsp.*, 1999; *Shapiro i wsp.*, 1998). Wykazano także, że u pacjentów z żyłakami powrózków nasienych istnieje ścisły związek między wzrostem poziomu RFT i uszkodzeniami DNA plemników (*Smith i wsp.*, 2006). Dodatkowo wzrost poziomu RFT w nasieniu i uszkodzeń DNA plemników zaobserwowano także przy skręcie jąder czy wewnątrz, przy czym w tym ostatnim przypadku nieprawidłowości te utrzymywały

się nawet po operacyjnym sprowadzeniu jąder do moszny (*Filho i wsp.*, 2004; *Smith i wsp.*, 2007).

Niskie tzw. fizjologiczne poziomy RFT w nasieniu, których produkcja znajduje się pod stałą kontrolą występujących tam systemów antyoksydacyjnych, odgrywają istotną rolę w prawidłowej czynności plemnika, biorąc udział w kluczowych procesach gwarantujących zapłodnienie (tj. kapacytacja, hiperaktywacja, reakcja akrosomalna plemnika, fuzja plemnika z oocytem). Jednakże, jakiegokolwiek zaburzenie istniejącej równowagi oksydo-redukcyjnej skutkuje wystąpieniem stresu oksydacyjnego. W ciągu ostatnich 25 lat pojawiło się wiele prac doświadczalnych i klinicznych na temat patofizjologii stresu oksydacyjnego i jego wpływu na męską płodność. Nie ma obecnie wątpliwości, że stres oksydacyjny zaburza czynność plemników, ograniczając tym samym szansę na uzyskanie zapłodnienia komórki jajowej i/lub rozwój zarodka. Istnieje wiele czynników wywołujących stres oksydacyjny w nasieniu. Wśród nich są czynniki egzogenne związane np. ze stylem życia (palenie, alkohol, otyłość, niezdrowa dieta), na które mężczyzna ma wpływ i poprzez zmianę swojego stylu życia może je w łatwy sposób wyeliminować. Niestety możliwości zmiany innych czynników egzogennych, tj. zanieczyszczenie środowiska czy ekspozycja na ftalany, często pozostają poza naszym zasięgiem. Z kolei czynniki endogenne związane m.in. z zaburzeniami układu płciowego czy też stanami zapalnymi w nim występującymi oraz tzw. niepłodność idiopatyczna wymagają interwencji medycznej. Chociażby w tych dwóch ostatnich przypadkach zasadnym wydaje się pytanie o możliwość wspomaganie leczenia niepłodności męskiej, u podłoża której leży stres oksydacyjny, substancjami o udokumentowanym działaniu antyoksydacyjnym.

■ Podziękowania

Praca napisana w ramach grantu Uniwersytetu Medycznego w Łodzi nr 503/1-089-03/503-01 i grantu NCN nr UMO-2012/05/B/NZ5/01308

■ Piśmiennictwo

- Adams J.A., Galloway T.S., Mondal D., Esteves S.C., Mathews F.*: Effect of mobile telephones on sperm quality: a systematic review and meta-analysis. *Environ Int.* 2014, 70, 106–112.
- Agarwal A., Deepinder F., Sharma R.K., Ranga G., Li J.*: Effect of cell phone usage on semen analysis in men attending infertility clinic: an observational study. *Fertil Steril.* 2008, 89, 124–128.
- Agarwal A., Desai N.R., Makker K., Varghese A., Mouradi R., Sabanegh E. i wsp.*: Effects of radiofrequency electromagnetic waves (RF-EMW) from cellular phones on human ejaculated semen: an in vitro pilot study. *Fertil Steril.* 2009, 92, 1318–1325.
- Agarwal A., Said T.M.*: Oxidative stress, DNA damage and apoptosis in male infertility: a clinical approach. *BJU Int.* 2005, 95, 503–507.

- Agarwal A., Said T.M., Bedaiwy M.A., Banerjee J., Alvarez J.G.: Oxidative stress in an assisted reproductive techniques setting. *Fertil Steril*. 2006, 86, 503–512.
- Agarwal A., Saleh R.A.: Role of oxidants in male infertility: rationale, significance, and treatment. *Urol Clin North Am*. 2002, 29, 817–827.
- Agarwal A., Saleh R.A., Bedaiwy M.A.: Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertil Steril*. 2003, 79, 829–843.
- Agarwal A., Virk G., Ong C., du Plessis S.S.: Effect of oxidative stress on male reproduction. *World J Mens Health*. 2014, 32, 1–17.
- Aitken R.J., De Iulius G.N.: On the possible origins of DNA damage in human spermatozoa. *Mol Hum Reprod*. 2010, 16, 3–13.
- Aitken R.J., De Iulius G.N., Finnie J.M., Hedges A., McLachlan R.I.: Analysis of the relationships between oxidative stress, DNA damage and sperm vitality in a patient population: development of diagnostic criteria. *Hum Reprod*. 2010, 25, 2415–2426.
- Aitken R.J., Smith T.B., Jobling M.S., Baker M.A., De Iulius G.N.: Oxidative stress and male reproductive health. *Asian J Androl*. 2014, 16, 31–38.
- Alvarez J.G., Sharma R.K., Ollero M., Saleh R.A., Lopez M.C., Thomas A.J., Jr. *i wsp.*: Increased DNA damage in sperm from leukocytospermic semen samples as determined by the sperm chromatin structure assay. *Fertil Steril*. 2002, 78, 319–329.
- Alvarez J.G., Storey B.T.: Taurine, hypotaurine, epinephrine and albumin inhibit lipid peroxidation in rabbit spermatozoa and protect against loss of motility. *Biol Reprod*. 1983, 29, 548–555.
- Amaral A., Lourenco B., Marques M., Ramalho-Santos J.: Mitochondria functionality and sperm quality. *Reproduction*. 2013, 146, 163–174.
- Aprioku J.S.: Pharmacology of free radicals and the impact of reactive oxygen species on the testis. *J Reprod Infertil*. 2013, 14, 158–172.
- Bablok L., Dziadecki W., Szymusik I., Wołczyński S., Kurzawa R., Pawelczyk L. *i wsp.*: Patterns of infertility in Poland – multicenter study. *Neuro Endocrinol Lett*. 2011, 32, 799–804.
- Batstone G.R., Doble A., Gaston J.S.: Autoimmune T cell responses to seminal plasma in chronic pelvic pain syndrome (CPPS). *Clin Exp Immunol*. 2002, 128, 302–307.
- Brackett N.L., Ibrahim E., Grotas J.A., Aballa T.C., Lynne C.M.: Higher sperm DNA damage in semen from men with spinal cord injuries compared with controls. *J Androl*. 2008, 29, 93–99; discussion 100–101.
- Chen S.J., Allam J.P., Duan Y.G., Haidl G.: Influence of reactive oxygen species on human sperm functions and fertilizing capacity including therapeutical approaches. *Arch Gynecol Obstet*. 2013, 288, 191–199.
- Chitra K.C., Sujatha R., Latchoumycandane C., Mathur P.P.: Effect of lindane on antioxidant enzymes in epididymis and epididymal sperm of adult rats. *Asian J Androl*. 2001, 3, 205–208.
- Colagar A.H., Marzony E.T.: Ascorbic Acid in human seminal plasma: determination and its relationship to sperm quality. *J Clin Biochem Nutr*. 2009, 45, 144–149.
- Colagar A.H., Marzony E.T., Chaichi M.J.: Zinc levels in seminal plasma are associated with sperm quality in fertile and infertile men. *Nutr Res*. 2009, 29, 82–88.
- Crosnoe L.E., Kim E.D.: Impact of age on male fertility. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 2013, 25, 181–185.
- Das U.B., Mallick M., Debnath J.M., Ghosh D.: Protective effect of ascorbic acid on cyclophosphamide-induced testicular gametogenic and androgenic disorders in male rats. *Asian J Androl*. 2002, 4, 201–207.
- De Celis R., Pedron-Nuevo N., Feria-Velasco A.: Toxicology of male reproduction in animals and humans. *Arch Androl*. 1996, 37, 201–218.
- De Iulius G.N., Newey R.J., King B.V., Aitken R.J.: Mobile phone radiation induces reactive oxygen species production and DNA damage in human spermatozoa in vitro. *PLoS One*. 2009, 4, e6446, doi: 10.1371/journal.pone.0006446.
- Deng Y., Zhang W., Su D., Yang Y., Ma Y., Zhang H. *i wsp.*: Some single nucleotide polymorphisms of MSY2 gene might contribute to susceptibility to spermatogenic impairment in idiopathic infertile men. *Urology*. 2008, 71, 878–882.
- Duty S.M., Silva M.J., Barr D.B., Brock J.W., Ryan L., Chen Z. *i wsp.*: Phthalate exposure and human semen parameters. *Epidemiology*. 2003a, 14, 269–277.
- Duty S.M., Singh N.P., Silva M.J., Barr D.B., Brock J.W., Ryan L. *i wsp.*: The relationship between environmental exposures to phthalates and DNA damage in human sperm using the neutral comet assay. *Environ Health Perspect*. 2003b, 111, 1164–1169.
- Esteves S.C., Agarwal A.: Novel concepts in male infertility. *Int Braz J Urol*. 2011, 37, 5–15.
- Evenson D.P., Darzynkiewicz Z., Melamed M.R.: Simultaneous measurement by flow cytometry of sperm cell viability and mitochondrial membrane potential related to cell motility. *J Histochem Cytochem*. 1982, 30, 279–280.
- Fejes I., Zavacki Z., Szollosi J., Koloszar S., Daru J., Kovacs L. *i wsp.*: Is there a relationship between cell phone use and semen quality? *Arch Androl*. 2005, 51, 385–393.
- Filho D.W., Torres M.A., Bordin A.L., Crezcynski-Pasa T.B., Boveris A.: Spermatic cord torsion, reactive oxygen and nitrogen species and ischemia-reperfusion injury. *Mol Aspects Med*. 2004, 25, 199–210.
- Fraga C.G., Motchnik P.A., Wyrobek A.J., Rempel D.M., Ames B.N.: Smoking and low antioxidant levels increase oxidative damage to sperm DNA. *Mutat Res*. 1996, 351, 199–203.
- Frączek M., Kurpisz M.: Inflammatory mediators exert toxic effects of oxidative stress on human spermatozoa. *J Androl*. 2007, 28, 325–333.
- Frączek M., Kurpisz M.: The redox system in human semen and peroxidative damage of spermatozoa. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*. 2005, 59, 523–534.
- Frączek M., Kurpisz M.: Stres oksydacyjny w nasieniu. W: *Układ płciowy męski. Badania kliniczne i doświadczalne*. Red.: M. Piasecka. Wydawnictwo Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie, Szczecin 2013.
- Frączek M., Sanocka D., Kamieniczna M., Kurpisz M.: Proinflammatory cytokines as an intermediate factor enhancing lipid sperm membrane peroxidation in in vitro conditions. *J Androl*. 2008, 29, 85–92.
- Frączek M., Szumala-Kakol A., Jędrzejczak P., Kamieniczna M., Kurpisz M.: Bacteria trigger oxygen radical release and sperm lipid peroxidation in in vitro model of semen inflammation. *Fertil Steril*. 2007, 88, 1076–1085.
- Frączek M., Wiland E., Piasecka M., Boksa M., Gączarzewicz D., Szumala-Kakol A. *i wsp.*: Fertilizing potential of ejaculated human spermatozoa during in vitro semen bacterial infection. *Fertil Steril*. 2014, 102, 711–719.e1.
- Galecka E., Jacewicz R., Mrowicka M., Florkowski A., Gatecki P.: Antioxidative enzymes – structure, properties, functions. *Pol Merkur Lekarski*. 2008, 25, 266–268.
- Ghosh D., Das U.B., Misro M.: Protective role of alpha-tocopherol-succinate (provitamin-E) in cyclophosphamide induced testicular gametogenic and steroidogenic disorders: a correlative approach to oxidative stress. *Free Radic Res*. 2002, 36, 1209–1218.
- Giannattasio A., De Rosa M., Smeraglia R., Zarrilli S., Cimmino A., Di Rosario B. *i wsp.*: Glutathione peroxidase (GPX) activity in seminal plasma of healthy and infertile males. *J Endocrinol Invest*. 2002, 25, 983–986.
- Gil-Guzman E., Ollero M., Lopez M.C., Sharma R.K., Alvarez J.G., Thomas A.J., Jr. *i wsp.*: Differential production of reactive oxygen species by subsets of human spermatozoa at different stages of maturation. *Hum Reprod*. 2001, 16, 1922–1930.

- Gorpinchenko I., Nikitin O., Banyra O., Shulyak A.: The influence of direct mobile phone radiation on sperm quality. *Cent European J Urol.* 2014, 67, 65–71.
- Guerrero G., Trocchia S., Abdel-Gawad F.K., Ciarcia G.: Roles of reactive oxygen species in the spermatogenesis regulation. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2014, 5, 56, doi: 10.3389/fendo.2014.00056.
- Guz J., Gackowski D., Foksinski M., Rozalski R., Zarakowska E., Siomek A. i wsp.: Comparison of oxidative stress/DNA damage in semen and blood of fertile and infertile men. *PLoS One.* 2013, 8, e68490, doi: 10.1371/journal.pone.0068490.
- Hauser R., Meeke J.D., Singh N.P., Silva M.J., Ryan L., Duty S. i wsp.: DNA damage in human sperm is related to urinary levels of phthalate monoester and oxidative metabolites. *Hum Reprod.* 2007, 22, 688–695.
- Henkel R., Kierspel E., Staf T., Mehnert C., Menkveld R., Timmeberg H.R. i wsp.: Effect of reactive oxygen species produced by spermatozoa and leukocytes on sperm functions in non-leukocytospermic patients. *Fertil Steril.* 2005, 83, 635–642.
- Hsu P.C., Guo Y.L.: Antioxidant nutrients and lead toxicity. *Toxicology.* 2002, 180, 33–44.
- Hull M.G., Glazener C.M., Kelly N.J., Conway D.I., Foster P.A., Hinton R.A. i wsp.: Population study of causes, treatment, and outcome of infertility. *Br Med J (Clin Res Ed).* 1985, 291, 1693–1697.
- Irvine D.S.: Epidemiology and aetiology of male infertility. *Hum Reprod.* 1998, 13 Suppl 1, 33–44.
- Junqueira V.B., Barros S.B., Chan S.S., Rodrigues L., Giavarotti L., Abud R.L. i wsp.: Aging and oxidative stress. *Mol Aspects Med.* 2004, 25, 5–16.
- Jurewicz J., Radwan M., Merezek-Kot D., Sobala W., Ligocka D., Radwan P. i wsp.: Occupational, life stress and family functioning: does it affect semen quality? *Ann Hum Biol.* 2014a, 41, 220–228.
- Jurewicz J., Radwan M., Sobala W., Ligocka D., Radwan P., Bochenek M. i wsp.: Lifestyle and semen quality: role of modifiable risk factors. *Syst Biol Reprod Med.* 2014b, 60, 43–51.
- Jurewicz J., Radwan M., Sobala W., Ligocka D., Radwan P., Bochenek M. i wsp.: Human urinary phthalate metabolites level and main semen parameters, sperm chromatin structure, sperm aneuploidy and reproductive hormones. *Reprod Toxicol.* 2013, 42, 232–241.
- Kasahara E., Sato E.F., Miyoshi M., Konaka R., Hiramoto K., Sasaki J. i wsp.: Role of oxidative stress in germ cell apoptosis induced by di(2-ethylhexyl) phthalate. *Biochem J.* 2002, 365, 849–856.
- Khullar K., Agarwal A., Du Plessis S.S.: A hormonal, physical, and proteomic view of obesity-induced effects on male infertility and possible lifestyle modifications. *Asian Pac J Reprod.* 2012, 1, 161–168.
- Kilgallon S.J., Simmons L.W.: Image content influences men's semen quality. *Biol Lett.* 2005, 1, 253–255.
- Koch O.R., Pani G., Borrello S., Colavitti R., Cravero A., Farre S. i wsp.: Oxidative stress and antioxidant defenses in ethanol-induced cell injury. *Mol Aspects Med.* 2004, 25, 191–198.
- Kolettis P.N., Sharma R.K., Pasqualotto F.F., Nelson D., Thomas A.J., Jr., Agarwal A.: Effect of seminal oxidative stress on fertility after vasectomy reversal. *Fertil Steril.* 1999, 71, 249–255.
- Koppers A.J., De Iuliis G.N., Finnie J.M., McLaughlin E.A., Aitken R.J.: Significance of mitochondrial reactive oxygen species in the generation of oxidative stress in spermatozoa. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008, 93, 3199–3207.
- Kotzbach R., Kotzbach M.: Niektóre współczesne problemy prokreacji. *Post Androl Online.* 2013, 1, 5–11.
- Kovalski N.N., de Lamirande E., Gagnon C.: Reactive oxygen species generated by human neutrophils inhibit sperm motility: protective effect of seminal plasma and scavengers. *Fertil Steril.* 1992, 58, 809–816.
- Krause W., Bohring C.: Male infertility and genital chlamydial infection: victim or perpetrator? *Andrologia.* 2003, 35, 209–216.
- Krause W., Bohring C., Gueth A., Horster S., Krisp A., Skrzypek J.: Cellular and biochemical markers in semen indicating male accessory gland inflammation. *Andrologia.* 2003, 35, 279–282.
- Kulikauskas V., Blaustein D., Ablin R.J.: Cigarette smoking and its possible effects on sperm. *Fertil Steril.* 1985, 44, 526–528.
- Kurpisz M., Miesel R., Sanocka D., Jędrzejczak P.: Seminal plasma can be a predictive factor for male infertility. *Hum Reprod.* 1996, 11, 1223–1226.
- Kutlubay R., Oguz E.O., Can B., Guven M.C., Sinik Z., Tuncay O.L.: Vitamin E protection from testicular damage caused by intraperitoneal aluminium. *Int J Toxicol.* 2007, 26, 297–306.
- Lahdetie J.: Occupation- and exposure-related studies on human sperm. *J Occup Environ Med.* 1995, 37, 922–930.
- Lavranos G., Balla M., Tzortzopoulou A., Syriou V., Angelopoulou R.: Investigating ROS sources in male infertility: a common end for numerous pathways. *Reprod Toxicol.* 2012, 34, 298–307.
- Lenzi A., Culasso F., Gandini L., Lombardo F., Dondero F.: Placebo-controlled, double-blind, cross-over trial of glutathione therapy in male infertility. *Hum Reprod.* 1993, 8, 1657–1662.
- Ługowski M., Saczko J., Kulbacka J., Baśas T.: Reactive oxygen and nitrogen species. *Pol Merkur Lekarski.* 2011, 31, 313–317.
- Mailankot M., Kunnath A.P., Jayalekshmi H., Koduru B., Valsalan R.: Radio frequency electromagnetic radiation (RF-EMR) from GSM (0.9/1.8GHz) mobile phones induces oxidative stress and reduces sperm motility in rats. *Clinics (Sao Paulo).* 2009, 64, 561–565.
- Mazzilli F., Rossi T., Marchesini M., Ronconi C., Dondero F.: Superoxide anion in human semen related to seminal parameters and clinical aspects. *Fertil Steril.* 1994, 62, 862–868.
- Mostafa T., Tawadrous G., Roaia M.M., Amer M.K., Kader R.A., Aziz A.: Effect of smoking on seminal plasma ascorbic acid in infertile and fertile males. *Andrologia.* 2006, 38, 221–224.
- Motrich R.D., Maccioni M., Molina R., Tissera A., Olmedo J., Riera C.M. i wsp.: Reduced semen quality in chronic prostatitis patients that have cellular autoimmune response to prostate antigens. *Hum Reprod.* 2005, 20, 2567–2572.
- Musset B., Clark R.A., DeCoursey T.E., Petheo G.L., Geiszt M., Chen Y. i wsp.: NOX5 in human spermatozoa: expression, function, and regulation. *J Biol Chem.* 2012, 287, 9376–9388.
- Ochędalski T., Lachowicz-Ochędalska A., Dec W., Czechowski B.: Evaluating the effect of smoking tobacco on some semen parameters in men of reproductive age. *Ginekol Pol.* 1994, 65, 80–86.
- Olinski R., Siomek A., Rozalski R., Gackowski D., Foksinski M., Guz J. i wsp.: Oxidative damage to DNA and antioxidant status in aging and age-related diseases. *Acta Biochim Pol.* 2007, 54, 11–26.
- Ollero M., Gil-Guzman E., Lopez M.C., Sharma R.K., Agarwal A., Larson K. i wsp.: Characterization of subsets of human spermatozoa at different stages of maturation: implications in the diagnosis and treatment of male infertility. *Hum Reprod.* 2001, 16, 1912–1921.
- Olszewska-Słonina D.: Sperm cryopreservation and oxidative damage. What does it mean? *Cent European J Urol.* 2013, 66, 50–51.
- Pacifici R., Altieri I., Gandini L., Lenzi A., Pichini S., Rosa M. i wsp.: Nicotine, cotinine, and trans-3-hydroxycotinine levels in seminal plasma of smokers: effects on sperm parameters. *Ther Drug Monit.* 1993, 15, 358–363.
- Palmer N.O., Bakos H.W., Fullston T., Lane M.: Impact of obesity on male fertility, sperm function and molecular composition. *Spermatogenesis.* 2012, 2, 253–263.
- Paul C., Robaire B.: Ageing of the male germ line. *Nat Rev Urol.* 2013, 10, 227–234.
- Peake J.M., Suzuki K., Coombes J.S.: The influence of antioxidant supplementation on markers of inflammation and the relationship to oxidative stress after exercise. *J Nutr Biochem.* 2007, 18, 357–371.

- Potargowicz E., Szerszenowicz E., Staniszevska M., Nowak D.: Mitochondria as an source of reactive oxygen species. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*. 2005, 59, 259–266.
- Purvis K., Christiansen E.: Male infertility: current concepts. *Ann Med*. 1992, 24, 259–272.
- Puzanowska-Tarasiewicz H., Starczewska B., Kuźmicka L.: Reaktywne formy tlenu. *Bromat Chem Toksykol*. 2008, 41, 1007–1015.
- Rengan A.K., Agarwal A., van der Linde M., du Plessis S.S.: An investigation of excess residual cytoplasm in human spermatozoa and its distinction from the cytoplasmic droplet. *Reprod Biol Endocrinol*. 2012, 10, 92.
- Roos D.: The involvement of oxygen radicals in microbicidal mechanisms of leukocytes and macrophages. *Klin Wochenschr*. 1991, 69, 975–980.
- Rowe P.J., Comhaire F.H., Hargreave T.B., Mahmoud A.M.A.: WHO manual for the standardized investigation, diagnosis and management of the infertile male. WHO, 2000
- Safarinejad M.R.: Infertility among couples in a population-based study in Iran: prevalence and associated risk factors. *Int J Androl*. 2008, 31, 303–314.
- Saleh R.A., Agarwal A., Nada E.A., El-Tonsy M.H., Sharma R.K., Meyer A. *i wsp.*: Negative effects of increased sperm DNA damage in relation to seminal oxidative stress in men with idiopathic and male factor infertility. *Fertil Steril*. 2003, 79 Suppl 3, 1597–1605.
- Saleh R.A., Agarwal A., Sharma R.K., Nelson D.R., Thomas A.J., Jr.: Effect of cigarette smoking on levels of seminal oxidative stress in infertile men: a prospective study. *Fertil Steril*. 2002, 78, 491–499.
- Sanocka-Maciejewska D., Ciupińska M., Kurpisz M.: Bacterial infection and semen quality. *J Reprod Immunol*. 2005, 67, 51–56.
- Sanocka D., Jędrzejczak P., Szumala-Kaekol A., Frączek M., Kurpisz M.: Male genital tract inflammation: The role of selected interleukins in regulation of pro-oxidant and antioxidant enzymatic substances in seminal plasma. *J Androl*. 2003, 24, 448–455.
- Sanocka D., Miesel R., Jędrzejczak P., Chelmońska-Soyta A.C., Kurpisz M.: Effect of reactive oxygen species and the activity of antioxidant systems on human semen; association with male infertility. *Int J Androl*. 1997, 20, 255–264.
- Segnini A., Camejo M.I., Proverbio F.: Chlamydia trachomatis and sperm lipid peroxidation in infertile men. *Asian J Androl*. 2003, 5, 47–49.
- Sepaniak S., Forges T., Fontaine B., Gerard H., Foliguet B., Guillet-May F. *i wsp.*: Negative impact of cigarette smoking on male fertility: from spermatozoa to the offspring. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)*. 2004, 33, 384–390.
- Shapiro R.H., Muller C.H., Chen G., Berger R.E.: Vasectomy reversal associated with increased reactive oxygen species production by seminal fluid leukocytes and sperm. *J Urol*. 1998, 160, 1341–1346.
- Sharlip I.D., Jarow J.P., Belker A.M., Lipshultz L.I., Sigman M., Thomas A.J. *i wsp.*: Best practice policies for male infertility. *Fertil Steril*. 2002, 77, 873–882.
- Sharma R.K., Pasqualotto A.E., Nelson D.R., Thomas A.J., Jr., Agarwal A.: Relationship between seminal white blood cell counts and oxidative stress in men treated at an infertility clinic. *J Androl*. 2001, 22, 575–583.
- Sikka S.C.: Role of oxidative stress and antioxidants in andrology and assisted reproductive technology. *J Androl*. 2004, 25, 5–18.
- Singer G., Granger D.N.: Inflammatory responses underlying the microvascular dysfunction associated with obesity and insulin resistance. *Microcirculation*. 2007, 14, 375–387.
- Siomek A., Gackowski D., Rozalski R., Dziaman T., Szpila A., Guz J. *i wsp.*: Higher leukocyte 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine and lower plasma ascorbate in aging humans? *Antioxid Redox Signal*. 2007, 9, 143–150.
- Słowikowska-Hilczner J.: Xenobiotics with estrogen or antiandrogen action – disruptors of the male reproductive system. *Centr Eur J Med*. 2006, 1, 205–227.
- Smith R., Kaune H., Parodi D., Madariaga M., Morales I., Rios R. *i wsp.*: Extent of sperm DNA damage in spermatozoa from men examined for infertility. Relationship with oxidative stress. *Rev Med Chil*. 2007, 135, 279–286.
- Smith R., Kaune H., Parodi D., Madariaga M., Rios R., Morales I. *i wsp.*: Increased sperm DNA damage in patients with varicocele: relationship with seminal oxidative stress. *Hum Reprod*. 2006, 21, 986–993.
- Sujatha R., Chitra K.C., Latchoumycandane C., Mathur P.P.: Effect of lindane on testicular antioxidant system and steroidogenic enzymes in adult rats. *Asian J Androl*. 2001, 3, 135–138.
- Taha E.A., Ez-Aldin A.M., Sayed S.K., Ghandour N.M., Mostafa T.: Effect of smoking on sperm vitality, DNA integrity, seminal oxidative stress, zinc in fertile men. *Urology*. 2012, 80, 822–825.
- Taha E.A., Sayed S.K., Ghandour N.M., Mahran A.M., Saleh M.A., Amin M.M. *i wsp.*: Correlation between seminal lead and cadmium and seminal parameters in idiopathic oligoasthenozoospermic males. *Cent European J Urol*. 2013, 66, 84–92.
- Thiele J.J., Friesleben H.J., Fuchs J., Ochsendorf F.R.: Ascorbic acid and urate in human seminal plasma: determination and interrelationships with chemiluminescence in washed semen. *Hum Reprod*. 1995, 10, 110–115.
- Thonreau P., Bujan L., Multigner L., Mieusset R.: Occupational heat exposure and male fertility: a review. *Hum Reprod*. 1998, 13, 2122–2125.
- Tomar A.K., Sood B.S., Raj I., Singh T.P., Yada S.: Isolation and identification of Concanavalin A binding glycoproteins from human seminal plasma: a step towards identification of male infertility marker proteins. *Dis Markers*. 2011, 31 (6), 379–386.
- Tremellen K.: Oxidative stress and male infertility – a clinical perspective. *Hum Reprod Update*. 2008, 14, 243–258.
- Trummer H., Habermann H., Haas J., Pummer K.: The impact of cigarette smoking on human semen parameters and hormones. *Hum Reprod*. 2002, 17, 1554–1559.
- Ursini F., Heim S., Kiess M., Maiorino M., Roveri A., Wissing J. *i wsp.*: Dual function of the selenoprotein PHGPx during sperm maturation. *Science*. 1999, 285, 1393–1396.
- Vogelpoel F.R., van Kooij R.J., te Velde E.R., Verhoef J.: Influence of polymorphonuclear granulocytes on the zona-free hamster oocyte assay. *Hum Reprod*. 1991, 6, 1104–1107.
- Walczak-Jędrzejowska R., Wolski J.K., Słowikowska-Hilczner J.: The role of oxidative stress and antioxidants in male fertility. *Cent European J Urol*. 2013, 66, 60–67.
- Wang X., Sharma R.K., Gupta A., George V., Thomas A.J., Falcone T. *i wsp.*: Alterations in mitochondria membrane potential and oxidative stress in infertile men: a prospective observational study. *Fertil Steril*. 2003, 80 Suppl 2, 844–850.
- Watson P.F.: The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim Reprod Sci*. 2000, 60-61, 481–492.
- Wdowiak A., Wdowiak L., Wiktor H.: Evaluation of the effect of using mobile phones on male fertility. *Ann Agric Environ Med*. 2007, 14, 169–172.
- Webb G.W., Arns M.: Effect of pyruvate and lactate on motility of cold stored stallion spermatozoa challenged by hydrogen peroxide. *J Equine Vet Sci*. 2006, 26, 406–411.
- Wolff H., Politch J.A., Martinez A., Haimovici F., Hill J.A., Anderson D.J.: Leukocytospermia is associated with poor semen quality. *Fertil Steril*. 1990, 53, 528–536.
- Xu D.X., Shen H.M., Zhu Q.X., Chua L., Wang Q.N., Chia S.E. *i wsp.*: The associations among semen quality, oxidative DNA damage in human spermato-

zoa and concentrations of cadmium, lead and selenium in seminal plasma. *Mutat Res.* 2003, 534, 155–163.

Xu K., Shang X., Chen Y., Zhao F., Zhu P., Huang Y.: Measurement of uric acid of seminal plasma in fertile and infertile males. *Zhonghua Nan Ke Xue.* 2004, 10, 900–901.

Zhang H.Y., Lu J.C., Zhang R.S., Xia Y.X., Huang Y.F.: Determination of uric acid in seminal plasma and correlation between seminal uric acid and semen parameters. *Zhonghua Nan Ke Xue.* 2007, 13, 1016–1019.

Zini A., Garrels K., Phang D.: Antioxidant activity in the semen of fertile and infertile men. *Urology.* 2000, 55, 922–926.