

# Povezanost životnih i okolišnih faktora, kvalitete sjemena i N-glikana sjemene tekućine u muškaraca

---

Marić, Tihana

Doctoral thesis / Disertacija

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:042326>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-20**



Repository / Repozitorij:

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Tihana Marić**

**Povezanost životnih i okolišnih  
faktora, kvalitete sjemena i N-glikana  
sjemene tekućine u muškaraca**

**DISERTACIJA**



**Zagreb, 2022.**

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Tihana Marić**

**Povezanost životnih i okolišnih  
faktora, kvalitete sjemena i N-glikana  
sjemene tekućine u muškaraca**

**DISERTACIJA**

**Zagreb, 2022.**

Disertacija je izrađena u Zavodu za medicinsku biologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Ovu disertaciju je financirala Europska unija putem Europskog fonda za regionalni razvoj, konkurentnost i koheziju, prema sporazumu o dodjeli bespovratnih sredstava br. KK.01.1.1.01.0008, Regenerativna i reproduktivna medicina – istraživanje novih platformi i potencijala.

Voditelj rada: izv. prof. dr. sc. Ana Katušić Bojanac

Suvoditelj rada: dr. sc. Aleksandra Fučić

## **ZAHVALE**

Zahvaljujem metoricama dr. sc. Aleksandri Fučić i izv. prof. dr. sc. Ani Katušić Bojanac na svom posvećenom vremenu, savjetima i pomoći pri izradi doktorske disertacije.

Zahvaljujem se svim dragim kolegicama i kolegi na ukazanoj potpori i pomoći.

Zahvaljujem se svojoj sestri Ivani, bratu Zvonimiru, roditeljima Ančici i Dariju, ostaloj obitelji i prijateljima na pruženoj podršci i razumijevanju tijekom cijelog obrazovanja.

Zahvaljujem se svim suradnicima na projektu što su pomogli unaprijediti rad.

## **Popis oznaka i kratica**

**DNA** – deoksiribonukleinska kiselina (engl. *deoxyribonucleic acid*)

**TP** – tranzicijski proteini

**P1/P2** – protamin 1/protamin 2

**MPO** – medicinski potpomognuta oplodnja

**RNA** – ribonukleinska kiselina (engl. *ribonucleic acid*)

**GlcNAc** – N-acetilglukozamin

**Asn** – asparagin

**Man** – manoza

**ER** – endoplazmatski retikulum

**GA** – Golgijev aparat

**Glc** – glukoza

**HH** – hipogonadotropni hipogonadizam

**SZO** – Svjetska zdravstvena organizacija

**FSH** – folikulostimulirajući hormon

**LH** – luteinski hormon

**IVF** – izvantjelesna oplodnja (engl. *in-vitro fertilization*)

**ICSI** – intracitoplazmatsko injektiranje spermija (engl. *intracytoplasmic sperm injection*)

**ROS** – reaktivni kisikovi radikali (engl. *reactive oxygen species*)

**SDF** – fragmentacija DNA spermija (engl. *sperm DNA fragmentation*)

**SCSA** – esej strukture kromatina spermija (engl. *sperm chromatin structure assay*)

**SCD** – kromatinska disperzija spermija (engl. *sperm chromatin dispersion*)

**TUNEL** – engl. *terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick-end labeling*

**ED** – endokrini disruptori

**CASA** – računalno potpomognuta analiza sjemena (engl. *computer-aided sperm analysis*)

**AB** – anilin-plavo (engl. *aniline blue*)

**PBS** – fosfatni pufer (engl. *phosphate buffered saline*)

**ACN** - acetonitril

**BMI** – indeks tjelesne mase (engl. *body mass index*)

**DFI** – indeks fragmentacije DNA (engl. *DNA fragmentation index*)

**HILIC-UPLC** – tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti temeljena na hidrofilnim interakcijama (engl. *hydrophilic interaction liquid chromatography - ultra-high-performance liquid chromatography*)

**rpm** – okretaji u minuti (engl. *revolutions per minute*)

**SPGP** – glikanski pik sjemene plazme (engl. *seminal plasma glycan peak*)

**N** – normozoospermija

**PAT** – skupina s patološkim parametrima sjemena

**A** – astenozoospermija

**O** – oligozoospermija

**OA** – oligoastenozoospermija

**CI** – interval pouzdanosti (engl. *confidence interval*)

**LC-MS** – tekućinska kromatografija spregnuta sa spektrometrijom masa (engl. *liquid chromatography–mass spectrometry*)

## SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Spermatogeneza	1
1.2. Spermioogeneza	3
1.2.1. Promjene kromatina tijekom spermioogeneze	3
1.2.2. Promjene citoplazme i organela tijekom spermioogeneze	8
1.3. Sjemena plazma	10
1.3.1. Molekularni sastav sjemene plazme	10
1.3.2. Uloga sjemene plazme	12
1.4. Glikozilacija	13
1.4.1. N-glikozilacija proteina	14
1.4.2. Biosinteza N-glikana	15
1.4.3. Uloga glikozilacije	17
1.4.4. Glikoproteini sjemene plazme	18
1.5. Muška neplodnost	19
1.5.1. Pre-testikularni čimbenici muške neplodnosti	19
1.5.2. Post-testikularni čimbenici muške neplodnosti	20
1.5.3. Testikularni čimbenici muške neplodnosti	21
1.5.3.1. Genetski poremećaji	21
1.5.3.2. Ostali uzročnici	22
1.5.4. Idiopatska muška neplodnost	23
1.6. Dijagnostika muške neplodnosti	23
1.6.1. Spermioogram	23
1.6.2. Analiza hormona	24
1.6.3. Genetičko testiranje	24
1.6.4. Ultrazvuk skrotuma	24
1.6.5. Mikrobiološka analiza ejakulata	25
1.6.6. Dodatne analize kvalitete sjemena	25
1.6.6.1. Fragmentacija DNA spermija	26
1.6.6.2. Procjena sažimanja kromatina spermija	29
1.7. Okolišni čimbenici koji utječu na muški reproduktivni sustav	30
1.7.1. Prehrana	31
1.7.2. Alkohol	32

1.7.3. Pušenje	33
1.7.4. Životna sredina	33
1.7.5. Radna sredina	34
2. HIPOTEZA	35
3. SVRHA I CILJEVI RADA	36
4. ISPITANICI I METODE	37
4.1. Ispitanici	37
4.2. Metode	40
4.2.1. Prikupljanje uzoraka i obrada	40
4.2.2. Računalno potpomognuta analiza sjemena	41
4.2.3. Test fragmentacije DNA spermija	43
4.2.4. Test bojanja anilin-plavim	44
4.2.5. Odvajanje staničnog dijela sjemena od sjemene plazme	45
4.2.6. Izolacija N-glikana iz ukupnih proteina sjemene plazme	46
4.2.6.1. Ispiranje slobodnih N-glikana sjemene plazme	46
4.2.6.2. Denaturacija glikoproteina i oslobađanje N-glikana	47
4.2.6.3. Označavanje oslobođenih N-glikana s glikoproteina	48
4.2.6.4. Ispiranje i čišćenje slobodnih N-glikana izoliranih s glikoproteina	48
4.2.7. Detekcija i mjerenje N-glikana	49
4.2.8. Strukturna karakterizacija N-glikana sjemene plazme	50
4.2.9. Statistička analiza	51
5. REZULTATI	52
5.1. Opće karakteristike populacije ispitanika	52
5.2. Parametri sjemena ispitanika	53
5.3. Fragmentacija DNA spermija	55
5.4. Sažimanje kromatina spermija	58
5.5. N-glikani sjemene plazme	61
5.5.1. Regresijski model N-glikana ukupnih proteina sjemene plazme i kliničkih dijagnoza ispitanika	64
5.6. Povezanost parametara sjemena i razine fragmentacije DNA spermija	66
5.7. Povezanost parametara sjemena i sažimanja kromatina spermija	67
5.8. Povezanost parametara sjemena i udjela N-glikana sjemene plazme	68
5.9. Povezanost razine fragmentacije DNA i sažimanja kromatina spermija	69
5.10. Povezanost udjela N-glikana sjemene plazme i razine fragmentacije DNA spermija	70



5.11. Povezanost udjela N-glikana sjemene plazme i sažimanja kromatina spermija	72
5.12. Povezanost životnih i okolišnih čimbenika, razine fragmentacije DNA i sažimanja kromatina spermija	72
5.12.1. Povezanost životnih i okolišnih čimbenika, fragmentacije DNA spermija i sažimanja kromatina kod ispitanika normalnih parametara sjemena	74
5.12.2. Povezanost životnih i okolišnih čimbenika, fragmentacije DNA i sažimanja kromatina spermija kod ispitanika patoloških parametara sjemena	75
5.13. Povezanost udjela N-glikana sjemene plazme, životnih i okolišnih čimbenika	76
5.14. Određivanje strukture značajnijih N-glikana ukupnih proteina sjemene plazme	78
6. RASPRAVA	82
6.1. Usporedba karakteristika ispitanika i parametra sjemena	83
6.2. Razina fragmentacije DNA spermija	84
6.3. Stupanj kondenzacije kromatina spermija	86
6.4. Povezanost fragmentacije DNA i stupnja kondenzacije kromatina spermija	87
6.5. Sastav N-glikana ukupnih proteina sjemene plazme	88
6.6. Povezanost N-glikana ukupnih proteina sjemene plazme i parametara sjemena	91
6.7. Povezanost N-glikana sjemene plazme, fragmentacije DNA i stupnja kondenzacije spermija	92
6.8. Povezanost okolišnih čimbenika, fragmentacije DNA i stupnja kondenzacije spermija	93
6.9. Povezanost okolišnih čimbenika i N-glikana ukupnih proteina sjemene plazme	95
7. ZAKLJUČAK	97
8. SAŽETAK	98
9. ABSTRACT	99
10. POPIS LITERATURE	100
11. ŽIVOTOPIS	113

# 1. UVOD

## 1.1. Spermatogeneza

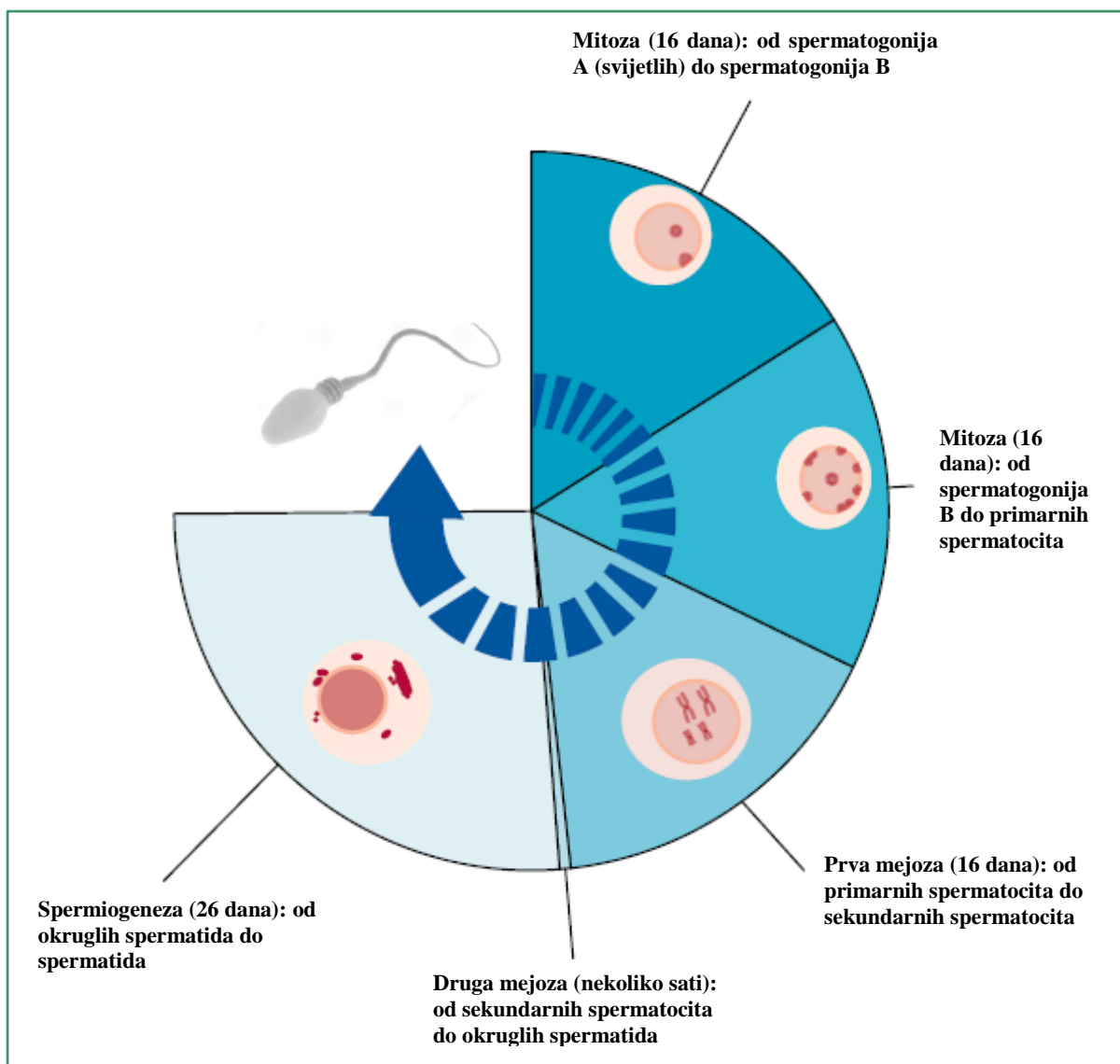
Testis je parni reproduktivni organ smješten u skrotumu koji ima endokrinu funkciju proizvodnje spolnih hormona te egzokrinu otpuštanja zrelih spermija ili spermatozoida. Sastoji se od sjemenih kanalića u kojima se odvija spermatogeneza te intersticijskog odjeljka građenog od rahlog vezivnog tkiva s mnogo krvnih i limfnih žila te živčanih vlakana. Unutar intersticijskog odjeljka nalaze se još i mnogobrojne Leydigove stanice, koje provode proces steroidogeneze odnosno proizvodnje glavnog muškog hormona testosterona.

S druge strane, sjemeni kanalići čine 60-80 % volumena testisa, a okružuju ih kolagenska vlakna i miofibroblasti zvani *lamina propria* te peritubularne stanice. Unutar kanalića nalaze se spolne stanice u svim fazama razvoja ako je spermatogeneza normalna te potporne somatske Sertolijeve stanice koje stupaju u izravan kontakt sa spolnim stanicama, odvojene bazalnom membranom od *lamine proprie* (1). Muška plodnost i reprodukcija su izravno ovisni o spermatogenezi koja predstavlja složen proces diobe i sazrijevanja muških spolnih stanica unutar sjemenih kanalića testisa.

Tijekom tog procesa, iz prekursorskih diploidnih matičnih stanica spermatogonija nastaju haploidne stanice spermija u tri faze: faza prije mejoze, mejoza i faza nakon mejoze (Slika 1). Mejoza je proces stanične diobe tijekom kojeg se broj kromosoma u novonastaloj stanici reducira na pola te je karakterističan za spolne stanice – spermije i jajne stanice. Ukratko, proces započinje replikacijom DNA, nakon čega dolazi do dvije diobe stanica, mejoze I koja je karakteristična za spolne stanice i stvara haploidni broj kromosoma te mejoze II, koja je sličnija klasičnoj diobi stanica, mitozu (2).

Spermatogonije su smještene uz rub bazalne membrane kanalića gdje proliferiraju procesom mitoze uz nepotpunu citokinezu tako da tvore lanac nediferenciranih spermatogonija. Postoje tri glavna pod-tipa spermatogonija s obzirom na izgled njihova heterokromatina; tip A tamni, tip A svijetli i spermatogonije B. Spermatogonije tipa A tamne su u mirovanju, služe kao rezerva matičnih spolnih stanica, dok su tip A svijetle aktivne, proliferirajuće i samoobnavljajuće ili proizvode spermatogonije tipa B (3, 4). Daljnjom mitozom spermatogonija tipa B nastaju primarni spermatociti. Te stanice su odvojene krvno-testisnom barijerom od ostalih stanica sjemenih kanalića koja im omogućuje izolaciju od imunološkog sustava. Primarni spermatociti zatim ulaze u proces mejoze kada se mogu razlikovati njihove 4

vrste sukladno fazama mejoze: preleptotenski, leptotenski, zigotenski i pahitenski (5). Tijekom navedenih faza mejoze I odvija se i proces razmjene genetičkog materijala između sličnih sljedova nukleotida kromatida dvaju homolognih kromosoma odnosno homologna rekombinacija DNA krosingoverom. Taj proces omogućuje stvaranje novih svojstava unutar spolnih stanica koja se prenose na potomke, stoga je mejoza izuzetno pažljivo regulirana. Mejozom I nastaju dva haploidna sekundarna spermataciti koji potom ulaze u mejozu II i daju četiri haploidne okrugle spermataciti. Nakon toga slijedi proces spermiogeneze tijekom kojega se okrugle spermataciti diferenciraju u spermatozoide (3).



**Slika 1. Shematski prikaz procesa spermatogeneze.** Kod čovjeka proces mitoze od svijetlih spermataciti tipa A do spermataciti tipa B traje 16 dana. Mitoza te nastanak primarnih spermataciti traje dodatnih 16 dana. Prva mejoza u kojoj nastaju sekundarni spermataciti također traje 16 dana, dok mejoza II koja daje okrugle spermataciti traje nekoliko sati. Zatim je potrebno 26 dana kako

bi se dovršio proces spermiogeneze u kojemu iz okruglih spermatida nastaju zrele spermatide. (Preuzeto i prilagođeno: *Tournaye i sur., The Lancet Diabetes & Endocrinology, 2017 (6)*)

## **1.2. Spermiogeneza**

Spermiogeneza je proces sazrijevanja, odnosno diferencijacije, haploidnih okruglih spermatida u zrele izdužene spermatide, spremne za otpuštanje iz lumena sjemenog kanalića. Ukratko, tijekom spermiogeneze dolazi do izduživanja okruglih spermatida te formiranja repa, vrata i glave spermija u kojoj se nalazi izuzetno kondenzirani kromatin s vrlo malo citoplazme. Nakon otpuštanja iz lumena spermatide dodatno sazrijevaju u spermije (3).

Histoni su bazični proteini koji u somatskim stanicama vežu molekulu DNA i tvore nukleosome. Nukleosomi su ponavljajuće podjedinice koje omogućuju pakiranje DNA u kromatin i njegovo sažimanje. Budući da je kromatin u zrelih spermatidama kompaktniji te drugačijih svojstava nego u somatskim stanicama, potrebna je zamjena histona proteinima koji omogućuju efikasniju kondenzaciju, odnosno sažimanje kromatina (7). Proteini koji omogućuju navedena svojstva se nazivaju protamini (3) te će u ovom poglavlju biti detaljnije opisane modifikacije i karakteristike kromatina koje nastaju sazrijevanjem okruglih spermatida uslijed procesa spermiogeneze.

### **1.2.1. Promjene kromatina tijekom spermiogeneze**

Proces zamjene histona protaminima ne odvija se izravno, već je olakšan tranzicijskim proteinima (TP). To su mali bazični proteini koji se nalaze u spermatidama tijekom prijelaznog stadija te olakšavaju zamjenu histona. Kod sisavaca razlikujemo tranzicijske proteine TP1, TP2 i TP4. Pojavom TP1 i TP2 u spermatidama, kromatin započinje sažimanje u jezgri od apikalnog do kaudalnog dijela. Tranzicijski proteini sudjeluju također u inicijaciji utišavanja transkripcije gena vežući se na regulatorne dijelove genoma, a pomažu i pri dodatnim popravcima DNA (8).

U kasnijoj fazi razvoja spermatida, tranzicijski proteini zamjenjuju se pozitivno nabijenim proteinima protaminima. Protamini se eksprimiraju neposredno nakon dovršetka mejoze u okruglim spermatidama nakon čega se transkript pohranjuje, a njegova se translacija odgađa do izduženih spermatida (9). Specifična svojstva zbog kojih su protamini ključni za ispravno sazrijevanje spermatida jesu mala molekulska masa i obilje aminokiselina arginina, cisteina lizina i histidina. Bočni ogranci navedenih aminokiselina su izrazito bogati pozitivnim nabojem pa čvrsto vežu molekulu DNA neutralizirajući negativan naboj uzvojnice. Također,

aminokiselina cistein omogućuje stvaranje disulfidnih mostova između protamina radi dodatnog učvršćivanja i sažimanja protamin-DNA strukture (10). Čvrsto vežući DNA, protamini u jezgri tvore super-uzvojne strukture zvane toroidi kromatina (Slika 2). Te strukture mogu biti do 6 puta kompaktnije od kromatina u somatskim stanicama što upućuje na efikasnije pakiranje DNA u glavu spermicide. Nadalje, protamini se mogu podijeliti u dvije skupine, protamin P1 kodiran genom PRM1 i protamin P2 kodiran genom PRM2 koji se nalaze na kromosomu 16 (8, 11). Iako obnašaju istu ulogu, između ove dvije skupine protamina postoje određene razlike. Tako je P1 evolucijski rašireniji te prisutan kod svih sisavaca, dok se P2 nalazi samo kod nekih podrazreda sisavaca poput primata, većine glodavaca i dijela viših sisavaca (10). Razlike se očituju i pri sintezi P1 i P2 gdje se P1 odmah sintetizira u funkcionalni, zreli protein, dok P2 sazrijeva nakon obrade prvotno sintetizirane prekursorske molekule. Također, omjer P1 i P2 je prilično varijabilan kod raznih vrsta, ali i kod čovjeka gdje omjer P1/P2 u zdravoj populaciji varira od 0,54 do 1,43 (12).

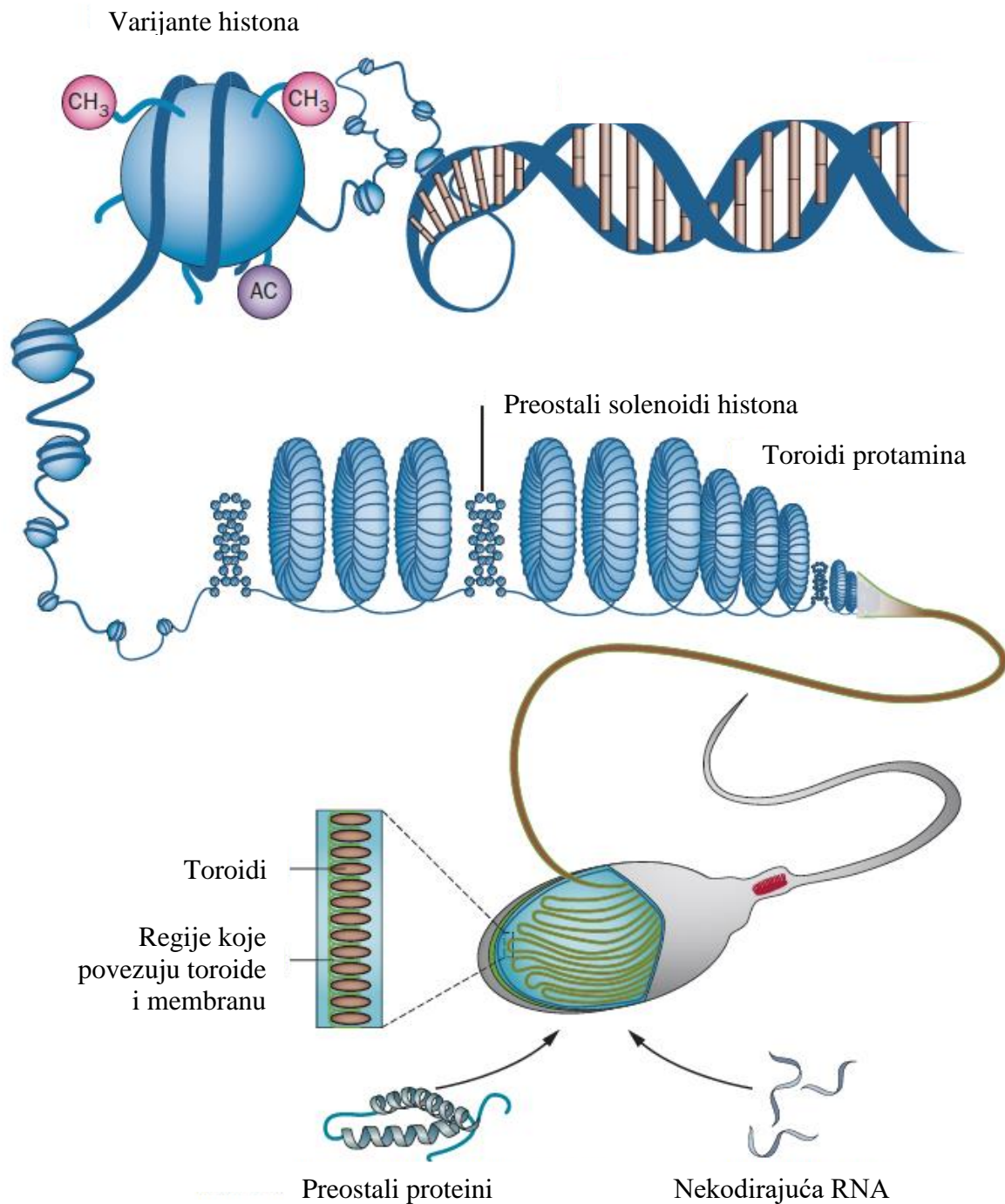
Prema svemu navedenom, protamini imaju jasno definiranu ulogu u pakiranju i sažimanju kromatina, dok ostale funkcije ovih proteina nisu razjašnjene u potpunosti. Ipak, predloženo je nekoliko vrlo važnih uloga sažimanja kromatina protaminima u oplodnji i očuvanju genetičkog materijala kod prijenosa na potomke. Jedna od predloženih uloga protamina je stvaranje manje, hidrodinamičke jezgre koja omogućuje brže i efikasnije kretanje spermija. Takvo kretanje doprinosi većoj vjerojatnosti da će spermij doputovati do jajne stanice i oploditi je. Također, kondenzacija kromatina štiti DNA spermija od fizičkih, vanjskih i unutarnjih kemijskih oštećenja u vrijeme kada popravak DNA nije moguć. U sažetom kromatinu do svojih veznih mjesta na DNA također teže dopiru proteini poput raznih enzima i transkripcijskih faktora koji sudjeluju u transkripciji i/ili aktivaciji gena. Stoga se genom spermija nalazi u transkripcijski utišanom stanju, kakvo je potrebno za ispravnu oplodnju i ponovnu aktivaciju gena u ranom razvoju embrija (13, 14). Kako bi se razjasnila važnost spermioogeneze i sažimanja kromatina spermija, provedene su studije gdje je jajna stanica oplodena okruglom spermicidom koja nije prošla proces spermioogeneze. Na mišjem modelu je pokazano kako je ovakva oplodnja moguća bez većih posljedica na zdravlje potomaka (15). S druge strane, studije na čovjeku ipak ukazuju na nisku uspješnost oplodnje i razvoj embrija dobivenih oplodnjom okruglim spermicidama (16). Također se kod čovjeka jako malo zna o ishodima ovakvog procesa na potomke te se postupak ne preporučuje u svrhu medicinski potpomognute oplodnje (MPO) (17).

Iako se otprilike 90 % histona u zrelim spermicidama čovjeka zamijeni protaminima, dio njih ipak ostane vezan na DNA u obliku tzv. solenoidnih nukleosoma (Slika 2). Histoni se zadržavaju i nakon otpuštanja spermicide u lumen kanalića te njihovog konačnog sazrijevanja

u spermije spremne za oplodnju. Regije bogate takvim nukleosomima se nerijetko nalaze u blizini regulatornih regija gena bitnih za rani razvoj embrija nakon oplodnje (18). Također, histoni ostaju vezani na dijelovima heterokromatina poput centromera i telomera (19).

Važnost prisutnosti histona u spermijima vezana je za njihove post-translacijske modifikacije poput metilacije bočnih ogranaka aminokiselina. Modifikacija histona 3 koja uključuje dodavanje metilne skupine na bočne ogranke aminokiseline lizin (K) na poziciji 4 i 27 (H3K4me, H3K27me) često se nalazi u spermijima (20). Varijante metiliranog histona H3K4me pronađene su u promotorskim regijama gena te se mogu zadržati na genomu u ranom razvoju embrija. Na mišjem modelu je pokazano kako narušeni obrazac H3K4me u spermijima može negativno utjecati na ekspresiju gena u embrijima, a time i na ishod razvoja potomka (21). Histonska varijanta H3K27me je također pronađena u spermijima blizu promotorskih regija gena koji imaju zatvoreni kromatin do kojeg transkripcijski enzimi teže dopiru. Takav obrazac je pronađen i u ranom embriju gdje se pretpostavlja da histonska oznaka H3K27 pridonosi regulaciji transkripcije određenih razvojnih gena (22).

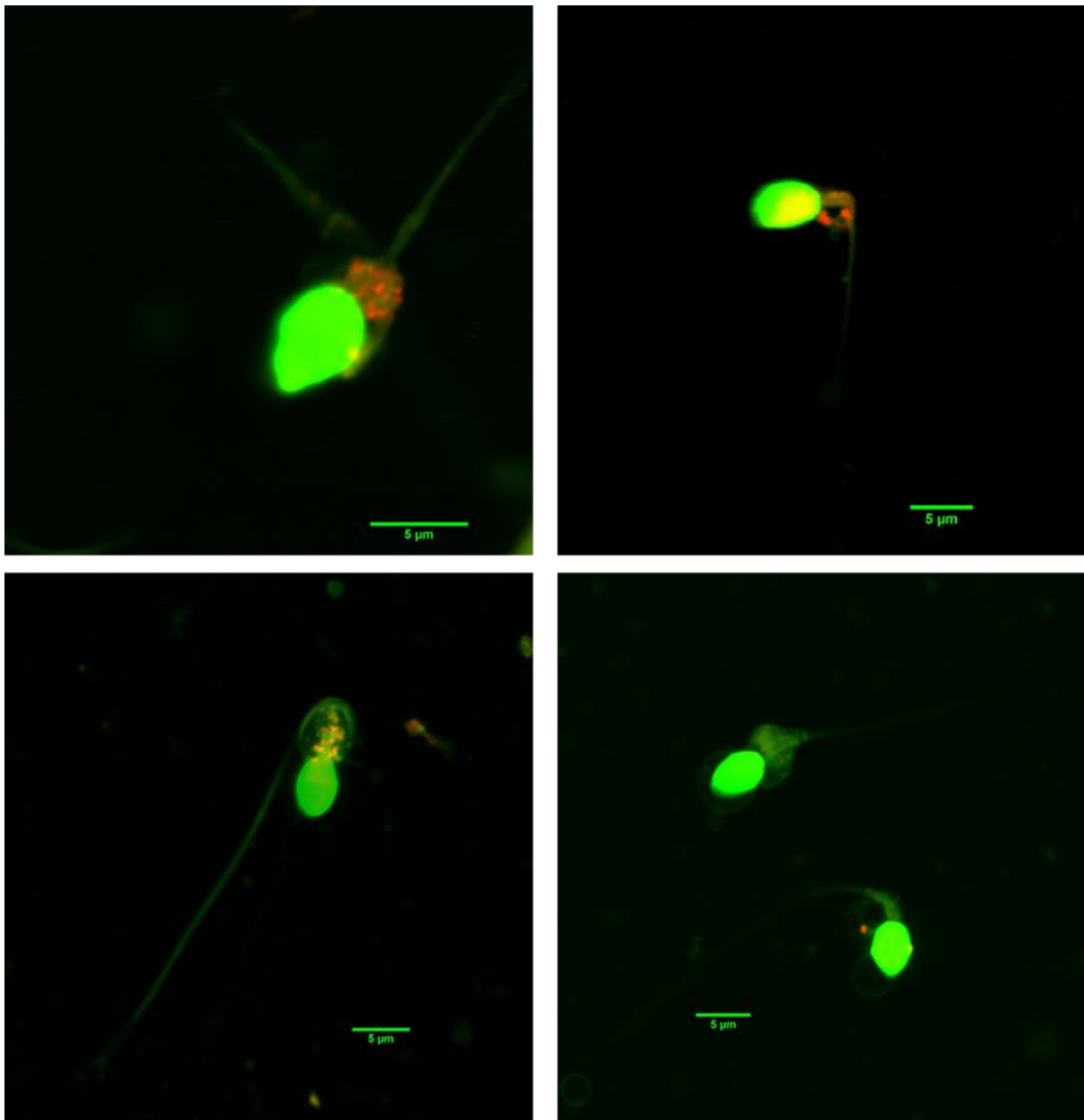
Organizacija kromatina unutar jezgre uslijed spermiogeneze ima također svoje specifičnosti. U jezgri zrelog spermija, kromatin je pričvršćen na proteinske nosače povezane s jezgrom ili na matriks jezgre. Matriks jezgre su gusto složena proteinska vlakna koja se vežu za periferiju jezgre zvanu lamina. Unutar jezgre, DNA je vezana u obliku omči za matriks preko posebnih regija kromatina koje se nazivaju nosači ili regije pridružene matriksu (engl. *matrix attachment region*) (Slika 2). Ova organizacija kromatina vjerojatno pridonosi transkripcijskoj regulaciji i DNA replikaciji prije spermiogeneze, u zreloj spermiji sažimanju DNA protaminima, a pri oplodnji ponovnoj brzom reaktivaciji genoma spermija (7, 22, 23).



**Slika 2. Shematski prikaz organizacije kromatina unutar spermija.** Kromatin spermija se sastoji od protamina vezanih na DNA i sažetog u toroide te preostalih histona vezanih na DNA koji čine solenoide. Toroidi su pričvršćeni za dijelove stanične membrane spermija kako bi se stabilizirala struktura. Spermiji sadrže još razne proteine, nekodirajuće RNA te mikro RNA kojima uloga još nije razjašnjena. (Preuzeto i prilagođeno: Schagdarsurengin i sur., *Nature Reviews Urology*, 2012 (23))

Vrijedno je spomenuti i preostale molekule RNA koje zaostaju u izduženim spermatidama, a kasnije i zrelih spermijima, usprkos tomu što je transkripcija sažimanjem kromatina utišana. Preostale molekule RNA nalaze se u raznim dijelovima zrelog spermija poput jezgre ili u

citoplazmatskim kapljicama (Slika 3). Većina preostalih molekula RNA su nekodirajuće te se pretpostavlja da sudjeluju u regulaciji ekspresije (24, 25).



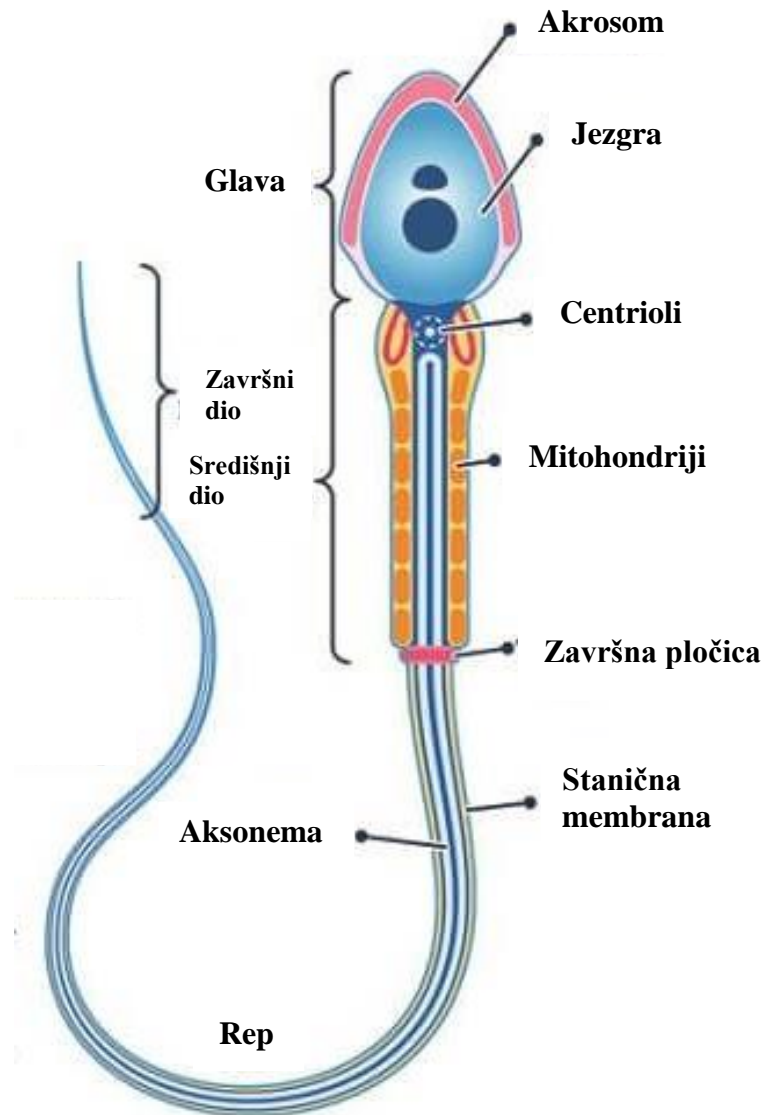
**Slika 3. Spermiji vizualizirani konfokalnim mikroskopom nakon bojenja bojom akridin oranž.** Zelena fluorescencija označava dvolančanu, ispravnu DNA, a crvena fluorescencija jednolančanu DNA ili RNA. Crvene točkice u predjelu vrata spermija prikazuju najvjerojatnije RNA (25). (Izvor: vlastite, nepublicirane slike).



### 1.2.2. Promjene citoplazme i organela tijekom spermiogeneze

Tijekom formiranja izduženog oblika glave spermatide Golgijevo tijelo se mijenja te formira strukturu zvanu akrosom. Struktura se smješta na vrh glave budućeg spermija te pokriva 50 – 75 % prednje strane jezgre koja se nalazi ispod njega. Akrosom na vrhu glave izdužene spermatide sadrži polisaharide kao zalihe stanične energije i enzime što služe spermiju da se dođe do jajne stanice te ju oplodi (26).

Na novoformiranu izduženu glavu spermatide nastavlja se središnji dio koji je ujedno karakteristika zrelog spermija. Nastaje od preostale citoplazme i staničnih organela okrugle spermatide tijekom njezina sazrijevanja. Centrioli, stanični organeli koji služe kao potpora staničnom skeletu, imaju važnu ulogu u stvaranju središnjeg dijela spermija. Oni migriraju od stanične membrane do stražnjeg dijela jezgre, gdje će nastati dio bogat filamentima koji povezuje glavu i središnji dio. Sa suprotne strane centriola će se inicirati formacija repa spermija. Mitohondriji, drugi važni organeli vrata, će migrirati zajedno s preostalom citoplazmom okrugle spermatide u središnji dio spermija. Tamo će tvoriti energetski pogon za pokretanje spermija. Centrioli također iniciraju i rast aksoneme, sastavljene od mikrotubula, koja prolazi centralnom osi središnjeg dijela spermija te nakon njega tvori bazu tzv. repa spermija (Slika 4). Mikrotubuli aksoneme organizirani su u formaciju u kojoj 2 središnja okružuje 9 vanjskih mikrotubula. Mikrotubule aksoneme okružuju vanjska gusta vlakna i ploča od fibroznog tkiva. Preostala citoplazma u stanici spermija migrira prema distalnom dijelu gdje tvori rezidualna tjelešca koja naposljetku fagocitiraju potporne Sertolijeve stanice. Tijekom cijelog procesa spermatogeneze i spermiogeneze spolne stanice su u kontaktu s potpornim Sertolijevim stanicama koje potpomažu cijeli proces. Nakon što je spermatida u potpunosti diferencirana, odvaja se od Sertolijeve stanice te se otpušta u lumen u procesu koji se naziva spermacija. Nakon otpuštanja iz lumena kanalića, prolaskom kroz ostale dijelove muškog reproduktivnog sustava završava konačno sazrijevanje spermija (3, 27, 28).



**Slika 4. Anatomija spermija.** Na slici je shematski prikaz glavnih dijelova spermija. Na prednjem dijelu glave spermija nalazi se akrosom, dok ostatak zauzima jezgra u kojoj se nalazi sažeti kromatin. Nakon glave se nastavlja središnji dio u kojem se nalaze mitohondriji i centrioli od kojih se pruža aksonema središnjim dijelom i repom spermija. Terminalna pločica odvaja središnji dio od repa, a cijelim repom se pruža aksonema sve do završnog dijela. (Preuzeto i prilagođeno: <https://biologydictionary.net/sperm-cell/> (29))

### 1.3. Sjemena plazma

Nakon otpuštanja zrelih spermatida u lumen sjemenih kanalića, one dalje putuju muškim reproduktivnim sustavom pri čemu završno sazrijevaju u spermije. Peristaltičkim kontrakcijama putuju u tubularni dio zvan rete testis iz kojeg kanalići vode u pasjemenik, odnosno epididimis. Na njega se nastavljaju sjemenovodi koji vode do sjemenih vezikula, iz kojih spermiji dalje ulaze u mokraćovod te se naposljetku ejakuliraju. U sklopu muškog reproduktivnog sustava nalaze se još i pomoćne žlijezde poput prostate, bulbouretralnih i periuretralnih žlijezda. Tijekom procesa ejakulacije, organi muškog reproduktivnog sustava luče kompleksnu biološku tekućinu zvanu sjemena plazma, koja služi kao medij za zaštitu, prijenos i hranidbu spermija u muškom, a kasnije i ženskom reproduktivnom sustavu. Sjemena plazma i spermiji zajedno čine ejakulat (sjeme) gdje sjemena plazma pridonosi 90 %, dok spermiji čine svega 10 % ejakulata (30).

#### 1.3.1. Molekularni sastav sjemene plazme

Molekularni sastav sjemene plazme je raznolik te obuhvaća razne lipide, glikane, anorganske ione, male molekule metabolita, ali i biopolimere poput peptida, proteina, oligosaharida, nestanične DNA i RNA, nekodirajuće RNA, itd. Sjemenu plazmu luči nekoliko organa muškog reproduktivnog sustava uključujući testise i epididimis (oko 10 %), sjemene vezikule (oko 65 %), prostatu (oko 25 %) te bulbouretralne i periuretralne žlijezde (oko 1 %) te time pridonosi njenom konačnom sastavu (Slika 5) (30).

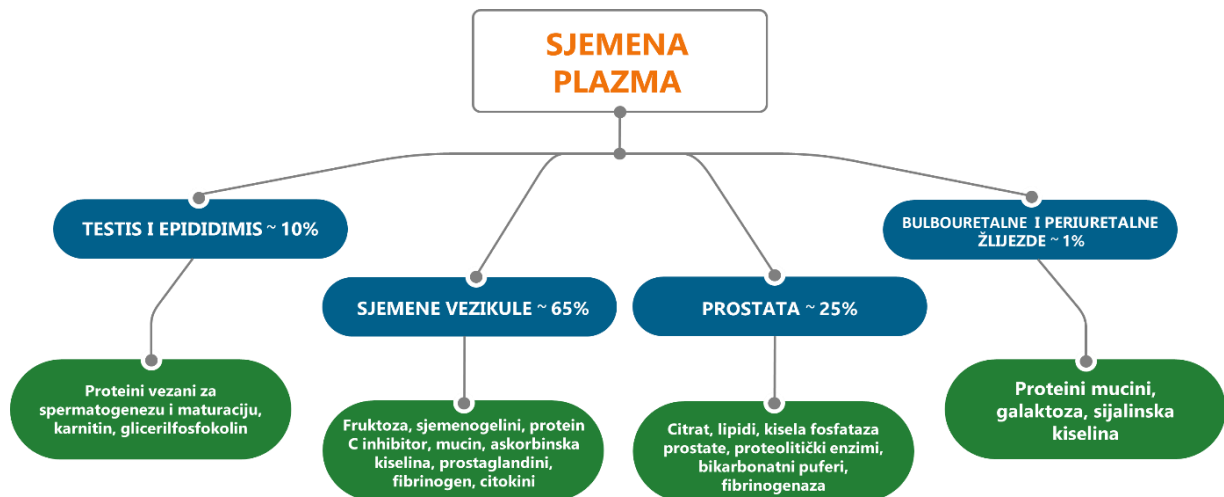
Detektirane molekularne sastavnice sjemene plazme porijeklom iz testisa su većinom proteini. Mogu imati ulogu u zaštiti spermija poput proteina epina, laktoferina i klasterina. Ovi proteini tvore kompleks u predjelu repa spermija, a uloga im je najvjerojatnije da sudjeluju u stvaranju površinske mreže koja štiti spermije od mikroba tijekom transporta kroz muški i ženski reproduktivni sustav (31). Nadalje, u sjemenjnoj plazmi su pronađeni proteini karakteristični za Leydigove, Sertolijeve i spolne stanice. Primjer je TEX101 (engl. *Testis Expressed 101*), membranski glikoprotein u staničnim membranama spolnih stanica koji doprije u sjemenu plazmu tijekom procesa sazrijevanja spermija nakon što napuste testis. Postoji i mnoštvo drugih primjera testikularnih proteina u sjemenjnoj plazmi, no većini uloga nije u potpunosti razjašnjena (32).

Za komponente sjemene plazme porijeklom iz epididimisa se smatra kako im je glavna uloga u završnom sazrijevanju spermija funkcionalnim modificiranjem membrane spermija. U epididimisu se luče izvanstanične vezikule zvane epididimosomi koji se mogu detektirati u sjemennoj plazmi nakon ejakulacije. Bogate su proteinima za koje je pretpostavljena uloga u zaštiti spermija od štetnih djelovanja tijekom njihova boravka i maturacije u epididimisu (33). Nadalje, metabolit karnitin porijeklom je iz epididimisa i nalazi se u sjemennoj plazmi, gdje ima važnu ulogu kao nutrijent spermijima. Epididimis u sjemenu plazmu luči i glicerilfosfatidilkolin, fosfolipid važan za pravilno sazrijevanje i kasniju pokretljivost spermija. U maternici enzim diesteraza hidrolizira ovaj fosfolipid koji potom služi kao dodatni nutrijent spermijima (30).

Sjemennoj plazmi većinski doprinose komponente koje luče sjemene vezikule. Njihova glavna izlučevina u sjemennoj plazmi je fruktoza, šećer koji služi kao supstrat za proces razgradnje glikolizom i dobivanje energije u spermijima. Nadalje, proteini poput semenogelina i fibronektina su također porijeklom iz sjemenih vezikula. Vrlo su obilni u sjemennoj plazmi, a nakon ejakulacije se koaguliraju i tvore gelozni matriks sjemena. Navedeni proteini koji tvore gelozni matriks se tijekom procesom likvefakcije dalje razgrađuju. Likvefakcija se odvija 30 – 60 minuta nakon ejakulacije pri čemu proteaze iz prostate razgrađuju ove proteine i ejakulat poprima više tekuću strukturu. Sjemene vezikule luče još i prostaglandine koji imaju ulogu u transportu spermija (30, 34, 35).

Prostata također doprinosi sastavu sjemene plazme, lučeći svoje produkte kada sjemenovodi potaknu otpuštanje spermija. U sjemennoj plazmi se tako nalaze izvanstanične vezikule prostate zvane prostasomi koji nose lipide, proteine, glikoproteine i molekule RNA (36). Ipak, glavni doprinos prostate sjemennoj plazmi jesu proteaze, enzimi koji cijepaju druge proteine, među kojima i antigen specifičan za prostatu (PSA), fosfataze poput prostatične kisele fosfataze (PAP) te fibrinolizin. Ovi proteini sudjeluju u procesu likvefakcije sjemena. Nadalje, prostata sadrži neuroendokrine stanice koje luče kalcitonin i neuropeptide u sjemenu plazmu, no uloga im nije u potpunosti razjašnjena. Poliamini se također mogu naći u sjemennoj plazmi u velikim količinama. Izrazito su pozitivno nabijeni te se pretpostavlja da štite spermije od kiselosti u ženskom reproduktivnom traktu. Prostata doprinosi i glavnini iona cinka izlučenih u sjemennoj plazmi. Ioni cinka su izrazito važni za očuvanje spermija te djeluju kao inhibitori proteolitičkih enzima uključenih u koagulaciju, likvefakciju i antibakterijsko djelovanje. Osim cinka, selen i bakar su također bitni elementi za funkciju spermija jer služe kao kofaktori antioksidacijskih enzima (37). Prostata još luči i citrate koji kelatiraju različite metale (38).

Bulbouretralne žlijezde u sjemenu plazmu luče proteine mucine, galaktozu i sijalinsku kiselinu čija uloga je olakšavanje prolaska sjemena kroz muški reproduktivni sustav. Uz sjemene vezikule i prostatu, ove žlijezde također luče lužnate pufere koji omogućavaju preživljenje spermija pri ulasku u ženski reproduktivni trakt. Bulbouretralne žlijezde još luče i proteaze koje sudjeluju u likvefakciji sjemene plazme (30).



Slika 5. Shematski prikaz komponenta sjemene plazme i organa koji ih luče. (Izvor: vlastita shema).

### 1.3.2. Uloga sjemene plazme

Budući da je sjemena plazma bogata raznim anorganskim, organskim i makromolekulama (Slika 4), ključna je u obavljanju raznih uloga u zaštiti spermija i olakšavanju oplodnje. Jedna od glavnih uloga sjemene plazme je osiguravanje energije odnosno nutrijenata za spermije tijekom boravka u muškom ili nakon ejakulacije u ženskom reproduktivnom sustavu (30). Nadalje, sjemena plazma pomaže pri održavanju funkcije spermija tijekom njihove pohrane u epididimisu gdje se odvija završno sazrijevanje spermija. Tu se dodatno koncentriraju te bivaju izloženi promjenama okolišnih uvjeta uslijed lučenja komponenti sjemene plazme uključujući povećanu kiselost okoline i pojačanu koncentraciju elektrolita (39).

Ostale uloge sjemene plazme su u samom reproduktivnom traktu žene gdje je potrebno osigurati kretanje i opstanak spermija. Jedna od uloga komponenti sjemene plazme je zaštita spermija od imunoloških odgovora u maternici koji bi mogli uzrokovati njihovo propadanje te time onemogućiti oplodnju. Stoga, spermiji i sjemena plazma moraju biti spremni izbjeći imunološku reakciju ženskog reproduktivnog trakta i osigurati pogodan okoliš za opstanak spermija. Pokazano je kako sjemena plazma obiluje citokinima, kemokinima i čimbenicima

rasta koji uzrokuju procese slične upalom u ženskom reproduktivnom traktu. Ovi procesi međutim ne uništavaju spermije i svrha im je potpomoći oplodnju i začće. Također, sukladno signalima sjemene plazme aktiviraju se one komponente imunološkog sustava koje imaju antimikrobno djelovanje kako bi se osiguralo preživljenje spermija i kasniji potencijalni razvoj embrija (40).

U sjemenoj plazmi se također nalaze čimbenici koji sprječavaju preuranjenu kapacitaciju, posljednji korak sazrijevanja spermija koji se odvija neposredno prije kontakta s jajnom stanicom. Omogućava spermijima prodor i oplodnju jajne stanice te je veoma bitno da se odvije u pravilnom vremenskom okviru. Kod čovjeka je definiran glikoprotein glikodelin koji sudjeluje i potpomaže navedeni proces. Postoji nekoliko izoformi ovog proteina i kod muškaraca i žena od kojih svaka ima specifičnu ulogu. Tako se izoforma glikodelin S nalazi u sjemenoj plazmi gdje se veže na svoje receptore koji se nalaze na spermijima te im pomaže prijeći mukus cerviksa. Nakon ulaska u maternicu, glikodelin S se cijepa što daje signal za početak procesa kapacitacije (41).

#### **1.4. Glikozilacija**

Ugljikohidrati su jednostavni ili kompleksni organski spojevi koji sadrže atome ugljika (C), vodika (H) i kisika (O). Zastupljeni su u obliku monosaharida, poput glukoze, oligosaharida koji uključuju npr. saharozu i laktozu te kompleksnih polisaharida kao što su škrob, celuloza, životinjski glikozaminoglikani, itd. Mogu se kovalentno vezati na proteine, peptide ili lipide glikozidnim vezama u procesu koji se naziva glikozilacija. Tako vezani ugljikohidrati nazivaju se glikani, a stvorena makromolekula glikokonjugat koji može biti proteinski - poput glikoproteina ili proteoglikana i lipidni koji daje glikolipide. Glikoproteini najčešće sadrže na svojim aminokiselinskim bočnim ograncima kovalentno vezane oligosaharide, odnosno duže lance monosaharida. Glikozilacija proteina vrši se tijekom ili nakon procesa translacije, odnosno sinteze proteina na ribosomima iz molekule RNA (42). Jedna je od najčešćih i vrlo raznovrsnih posttranslacijskih modifikacija proteina te je više od polovice proteina sisavaca glikozilirano. Broj glikana vezanih na glikoproteine iznosi od dva do pet, što tvori izrazito složen skup glikoproteina koji je nerijetko veoma karakterističan za pojedine vrste stanica, tipove tkiva, organe i organizme (43). Budući da glikani pojedine stanice nisu direktno kodirani genomom, izrazito su dinamični i podložni okolišnim utjecajima, što otežava njihovu potpunu

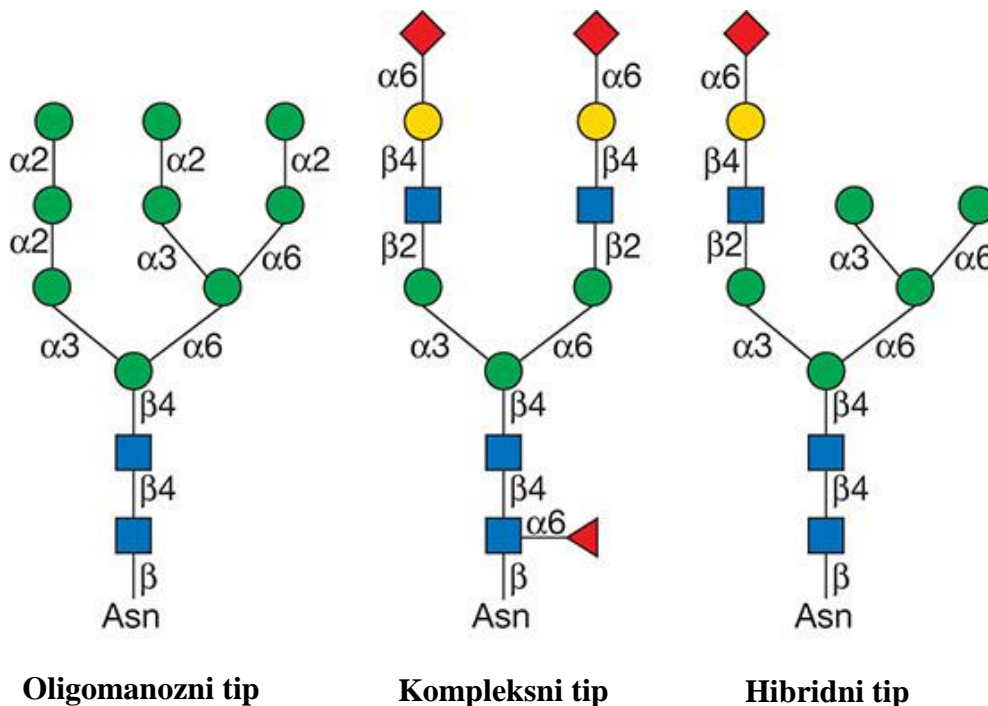
karakterizaciju (44). Razlikuje se nekoliko vrsta glikozilacije s obzirom na glikozidnu vezu: N-, O-, C- i P-glikozilacija, od kojih su O- i N-glikozidne veze najzastupljenije (42, 45, 46).

#### 1.4.1. N-glikozilacija proteina

N-glikozilacija proteina označava kovalentno dodavanje glikana N-acetilglukozamina (GlcNAc) na atom dušika (N) bočnog ogranka aminokiseline asparagin (Asn) glikozidnom  $\beta$ 1N vezom. Glikokonjugati vezani na Asn sadrže središnju zajedničku sekvencu glikana koja se sastoji od 2 molekule GlcNAc i 3 molekule manoze (Man) u slijedu  $\text{Man}\alpha$ 1-3( $\text{Man}\alpha$ 1-6) $\text{Man}\beta$ 1-4 $\text{GlcNAc}\beta$ 1-4 $\text{GlcNAc}\beta$ 1-Asn-X-Serin (Ser)/Treonin (Thr), gdje je X bilo koja aminokiselina osim prolina. Zbog interakcije glikana i aminokiselinskih bočnih ograna, identitet aminokiseline X iz središnjeg slijeda N-glikana može poboljšati ili smanjiti efikasnost N-glikozilacije. Tako prisustvo aromatske aminokiseline fenilalanina pospješuje N-glikozilaciju, dok aminokiseline negativnog naboja bočnog ogranka poput asparaginske ili glutaminske kiseline čine okoliš nepovoljnijim.

N-glikani se najčešće dodaju na membranske i sekretorne proteine, a oko 70 % proteina koji sadrže proteinski slijed Asn-X-Ser/Thr ima i modifikaciju N-glikanima. Svaki slijed Asn-X-Ser/Thr nije nužno glikoziliran zbog različitih svojstava proteina koja uzrokuju konformacijske ili druge smetnje prilikom smatanja glikoproteina u krajnju trodimenzionalnu strukturu. Glikoproteini mogu biti izrazito heterogeni, budući da jedan protein često ima više slijedova Asn-X-Ser/Thr te da svaki slijed može imati različiti N-glikan. Također, različite molekule iste populacije mogu sadržavati različite vezane glikane. Glikoproteini iste aminokiselinske sekvence koji se razlikuju jedino u sastavu N-glikana nazivaju se glikoforma. Moguće je još pronaći N-glikane vezane na slijed Asn-X-Cistein (Cys), dok iznimno rijetko na drugačiji aminokiselinski slijed (42).

Na navedenu središnju sekvencu glikana se dalje enzimski dodaju razni monosaharidi koji određuju klasifikaciju glikana u tri glavne skupine. One uključuju: 1) oligomanozni tip kod kojih se manozna (Man) nastavlja i nakon središnje sekvence, 2) kompleksni tip gdje antena, razgranati dio glikana, započinje glikanom GlcNAc i 3) hibridni u kojem Man produžuje nastavak središnjeg  $\text{Man}\alpha$ 1-6 te jedan ili dva GlcNAc na (Slika 6) (47).



**Slika 6. Shematski prikaz tri glavna tipa N-glikana na glikoproteinima eukariota.** S lijeva na desno: oligomanozni, kompleksni i hibridni. Svaki tip N-glikana sadrži središnju sekvencu od 3 manoze i 2 N-acetilglukoamina vezanih na aminokiselinu asparagin (Asn). (Preuzeto i prilagođeno: *Varki A i sur., Essentials of Glycobiology. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Pres, 2015-2017* (42))

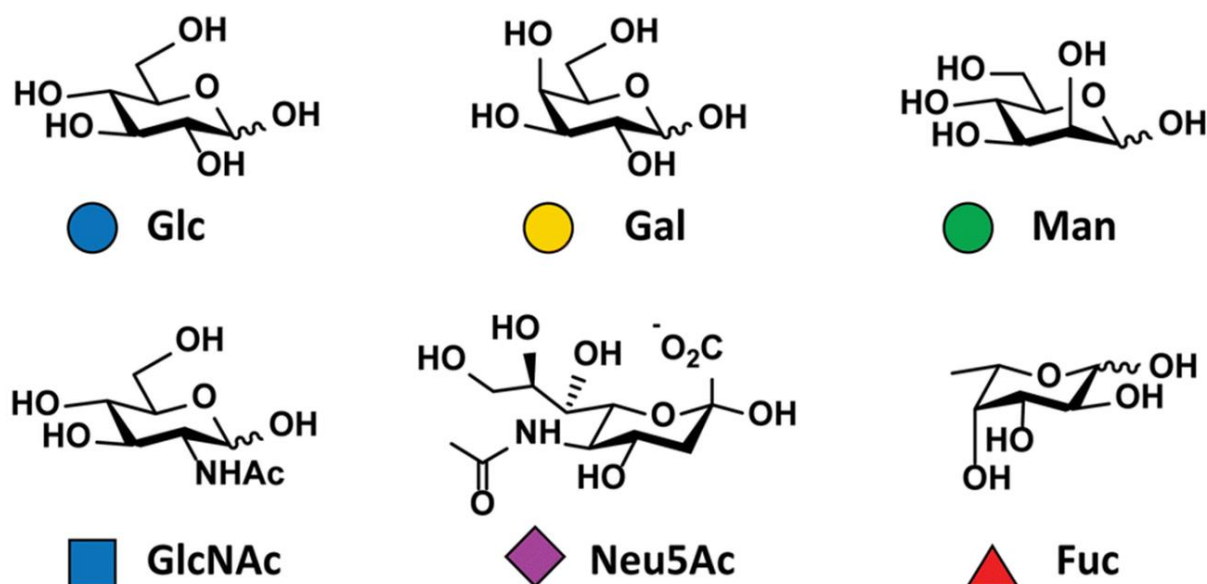
#### 1.4.2. Biosinteza N-glikana

Biosinteza N-glikana je izuzetno složen proces koji se može podijeliti u dva glavna koraka. Prvi korak je izuzetno evolucijski očuvan i smješten u endoplazmatskom retikulumu (ER), a drugi vrlo specifičan za svaki pojedini glikan i odvija se u Golgijevom aparatu (GA). Proces biosinteze započinje na citoplazmatskoj strani ER-a još tijekom translacije proteina. Na lipidni nosač lipid dolikol dodaju se šećerne jedinice pomoću nekoliko različitih enzima iz skupine monosaharidnih transferaza. Monosaharidne podjedinice koji sudjeluju u sintezi glikana moraju biti aktivirane što znači da su vezane na nukleotid i dolikolni nosač. Glavni nukleotidni šećeri sinteze su uridin-5'-difosfat-glukoza (UDP-Glc) i gvanozin-5'-difosfat-manoza (GDP-Man), dok ostali prekursori nastaju pretvorbom istih. Zatim se monosaharidne podjedinice na nosaču dolikolu prebacuju na luminalnu stranu ER-a pomoću enzima flipaze. Na luminalnoj strani ER-a se potom sintetizira prekursorska molekula svih N-glikana koja sadrži karakteristični slijed monosaharida od 3 Glu, 9 Man i 2 GlcNAc ( $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ ) vezan na nosač dolikol fosfat. Zatim se prekursorska molekula prebacuje na aminokiselinu asparagin u proteinskom



slijedu Asn-X-Ser/Thr enzimom oligosaharil-transferaza. Nakon prijenosa slijedi daljnja obrada N-glikana u ER-u nizom enzimskih reakcija. Molekularna provjera ispravnosti procesa sinteze prekursorskog N-glikana  $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$  uključuje enzimsko uklanjanje viška glukoznih i manoznih podjedinica iz slijeda. Dio N-glikana se zatim premješta u *cis*-GA na daljnju obradu, a dio ostaje u ER-u tvoreći oligomanozni tip glikana sa slijedom  $\text{Man}_{5-9}\text{GlcNAc}_2$  (42, 47, 48).

Glikoproteine premještene u *cis*-GA-a cijepa enzim manozidaza te nastaje glikanska jezgra monosaharidnog slijeda koji sadrži 5 Man i 2 GlcNAc jedinice ( $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ ). Daljnja obrada se odvija u središnjem dijelu GA zvanom *medial*-GA. Tu se N-glikani dodatno modificiraju i dobivaju karakteristične nastavke zvane antene kojih može biti od dvije do četiri. Završno sazrijevanje glikana u njihov krajnji oblik se odvija u dijelu GA koji se proteže prema plazmatskoj membrani, *trans*-GA. Ovdje se modificira glikanska jezgra, a terminalnom dijelu N-glikana se produžuju antene kojima se stavljaju završni šećeri. Ovim procesima proizvode se hibridni i kompleksni tipovi N-glikana, najčešće dodavanjem monosaharida GlcNAc, galaktoze (Gal), sijalinske kiseline (Neu5Ac) i fukoze (Fuc) (Slika 7). Konačni sastav N-glikana proteina ovisi o dostupnosti glikozilacijskog slijeda na proteinu, vremenu koje glikoprotein ostaje u ER i GA te razini i lokalizaciji glikoziltransferaza unutar podjedinica GA (42, 47, 48).



**Slika 7. Strukture i oznake monosaharida koji se najčešće nalaze u sastavu N-glikana sisavaca.** Glukoza (Glc), galaktoza (Gal), manozna (Man), N-acetilglukozamin (GlcNAc), sijalinska kiselina (Neu5Ac) i fukoza (Fuc). (Preuzeto i prilagođeno: Wang S i sur., *The Royal Society of Chemistry*, 2019 (49))

### 1.4.3. Uloga glikozilacije

Glikani mogu imati različite funkcije koje se mogu podijeliti u tri sveobuhvatne kategorije: strukturna i modulatorna uloga, prepoznavanje specifičnih sljedova glikana od strane drugih molekula te glikanska mimikrija i specifična interakcija glikana različitih vrsta, npr. patogen-domaćin (42).

Glikoproteini svoju konačnu trodimenzionalnu strukturu postižu nakon N-glikozilacije, gdje se očituje uloga glikana u postizanju pravilnog smatanja glikoproteina. Takvo pravilno smatanje glikoproteina nakon glikozilacije često pospješuje funkciju proteina. Međutim, kod nekih faktora rasta glikozilacija može i izravno utjecati na aktivnost glikoproteina pa je funkcija ovisna o glikozilaciji proteina unutar Golgijevog aparata (GA) (50). Također, glikani na proteinima mogu štiti sami protein od razgradnje proteazama, blokirati vezanje antitijela ili čak priječiti prodor patogena na tkivima (51, 52). Nadalje, stanične membrane svih eukariota obavijene su glikokaliksom, mrežom membranskih i izvanstaničnih molekula među kojima se nalaze i glikanske komponente, najčešće u sklopu raznih proteoglikana. Glikokaliks stanične membrane pomaže održavanju strukture, poroznosti i integriteta stanica odnosno tkiva (53). U glikokaliksu se očituje modulatorna uloga glikana koja se odnosi na zaštitu i pohranu biološki važnih molekula poput određenih faktora rasta. Naime, oni se vežu na glikozaminoglikane, duge polisaharide vezane na proteine izvanstaničnog matriksa, u blizini stanica na koje će djelovati. Ovakva pohrana sprječava difuziju faktora rasta od mjesta na kojem trebaju vršiti svoju ulogu te time glikani moduliraju stanični odgovor na njih (54, 55).

Glikani imaju važne uloge u međustaničnim interakcijama kao i interakcijama stanica i izvanstaničnog matriksa. Primjer je obitelj proteina selektina, adhezivnih molekula koje prepoznaju glikane na ligandima čime posreduju u interakciji krvnih stanica i stanica stijenke krvnih žila (56). Glikani mogu specifično stupiti u interakciju s molekulama matriksa, s drugim glikanima iste stanice kao i s glikanima drugih stanica te time potaknuti nizvodni stanični odgovor i signalizaciju (57).

Modifikacije šećernih podjedinica glikana mogu također djelovati mimikrirajuće, odnosno spriječiti prepoznavanje specifičnog glikana proteinima koji ih vežu. Sijalinska kiselina je primjer šećera koji djeluje kao površinska zaštita stanicama od imunološkog odgovora (58).

Glikani također mogu posredovati interakcije između različitih vrsta poput vezanja patogena, toksina ili simbionta na stanice domaćina. Primjerice, hemaglutinini virusa specifično prepoznaju sijalinsku kiselinu i njene modifikacije na glikanima domaćina, a neke vrste bakterija i parazita posredovanjem glikana napadaju stanice domaćina (59). Budući da samom

domaćinu ne pogoduje ovakva interakcija, razvijeni su biološki mehanizmi obrane gdje se maskiraju, odnosno sakrivaju glikani domaćina kako ih patogeni ne bi prepoznali (59). Glikani patogena se također često služe molekularnom mimikrijom, pri čemu patogen razvija strukture glikana vrlo slične domaćinskim kako bi izbjegli imunološki odgovor domaćina. Takve strukture kod patogena mogu i potencijalno modulirati imunološki odgovor domaćina što patogenu omogućuje efikasniji napad na domaćina (60, 61). S druge strane, glikani u organizmu mogu potaknuti toleranciju na simbiotske mikroorganizme, ali ne i patogene. Tako specifičnim glikanima posreduje se simbioza između mikroorganizma i domaćina (62).

#### **1.4.4. Glikoproteini sjemene plazme**

Tjelesne tekućine, poput krvi, sline ili sjemene plazme, bogate su proteinima s visokim stupnjem glikozilacije. Ti proteini obnašaju niz funkcionalnih uloga, a djeluju i kao tekući medij pridonoseći topivosti raznih bioloških makromolekula u plazmi (57). Sjemena plazma sadrži preko 2000 različitih proteina te mnogi od njih mogu biti potencijalni biomarkeri raznih urogenitalnih poremećaja muškarca (63). Biomarkeri su mjerljive biološke karakteristike koje sa sigurnošću mogu ukazati na određeni fiziološki i patološki proces ili služiti za praćenje farmakoloških odgovora organizma na terapiju (64). Nadalje, pronađeno je oko 70 proteina u sjemenoj plazmi koji imaju mogućnost vezanja glikozaminoglikana heparina, što upućuje na potencijalne interakcije tih proteina i ugljikohidrata (65). Mnogi od tih proteina su glikozilirani, što je inače česta karakteristika sekretornih proteina. Nedavna studija opširno je karakterizirala glikoproteine sjemene plazme uključujući utvrđivanje slijeda glikopeptida, mjesta glikozilacije, sastava glikana te su predložene strukture identificiranih glikana. Opisano je ukupno 243 glikopeptida koja imaju svom u slijedu 73 N-glikozilacijska mjesta, a nalaze se na ukupno 50 glikoproteina (66). Mnogi od identificiranih glikoproteina imaju važne uloge tijekom sazrijevanja spermija, u očuvanju pravovremene kapacitacije kao i kod same interakcije spermija i jajne stanice (67). Jedan od primjera je i glikodelin S koji sudjeluje u kapacitaciji, a opisan je u poglavlju 1.3.2. Važno je reći da njegova uloga izravno ovisi o sastavu glikana koji je uvjetovan porijeklom proteina, odnosno je li iz muškog ili ženskog reproduktivnog sustava (68).

## 1.5. Muška neplodnost

Prema smjernicama Svjetske Zdravstvene Organizacije (SZO, engl. *World Health Organization*), neplodnost se definira kao nemogućnost začeća unutar 1 godine nezaštićenog spolnog odnosa, a nakon tog perioda pacijenti se upućuju na obradu zbog neplodnosti (69). Neplodnost je danas rastući globalni problem koji prema zadnjim procjenama zahvaća ukupno 9 % parova (70). Muška neplodnost predstavljena je nemogućnošću začeća kod zdrave partnerice te zahvaća otprilike 7 % muške populacije, dok u nekim regijama može zahvatiti i do 30 % muške populacije (70). Prema podacima istraživačkog programa GBD (engl. *Global Burden of Disease*) skupljenim između 1990 i 2017 godine prevalencija neplodnosti raste godišnje oko 0,370 % kod žena te 0,291 % kod muškaraca (71). Otprilike 10 – 15 % neplodnih parova zahvaća idiopatska neplodnost, odnosno ne nalazi se adekvatno objašnjenje neplodnosti (69). Nadalje, smatra se da muškarci i žene podjednako doprinose problemu neplodnosti, koja je često uzrokovana s više čimbenika (72, 73). Čimbenici koji mogu uzrokovati neplodnost u oba spola uključuju dob, akutne ili kronične upale, okolišnu i/ili radnu izloženost toksinima, infektivne bolesti, nezdrave životne navike, genetske abnormalnosti i specifične reproduktivne poremećaje (74).

U muškaraca, neplodnost uzrokuju nepravilna proizvodnja i/ili funkcija spermija koja može biti posljedica urođenih ili stečenih čimbenika. Ti čimbenici mogu djelovati na spermije pre-testikularno, post-testikularno ili izravno na testise te će biti detaljnije opisani u narednim poglavljima (75).

### 1.5.1. Pre-testikularni čimbenici muške neplodnosti

Pre-testikularni uzroci neplodnosti najčešće odnose se na poremećaje hormonske signalizacije hipotalamusa i/ili hipofize. Uključuju patološko stanje hipogonadotropnog hipogonadizma (HH) ili probleme s ejakulacijom. Eretilna disfunkcija i poremećaji ejakulacije poput anejakulacije ili retrogradne ejakulacije, rijetko dovode do neplodnosti (75).

U patogenezi HH sudjeluju spolni hormoni gonadotropin-oslobađajući hormon (GnRH, engl. *Gonadotropin-releasing hormone*) kojeg otpuštaju neuroni hipotalamusa i gonadotropini FSH (folikulostimulirajući hormon) i LH (luteinizirajući hormon) koji se otpuštaju uslijed signalizacije hormonom GnRH iz neurona prednjeg režnja hipofize. Hormoni FSH i LH potom djeluju direktno na reproduktivni sustav muškarca, odnosno testise gdje potiču stvaranje

testosterona i spermatogenezu. Njihova nedovoljna razina vodi do nastanka HH, a može biti uzrokovana urođenim ili stečenim stanjima (76). Urođeni HH je iznimno rijetka i heterogena bolest, nastaje kao posljedica genetskih poremećaja te je pubertet često nepravilan i kasni. Genetske anomalije utječu na razvoj GnRH-otpuštajućih neurona te mogu izazvati tzv. Kallmannovim sindrom (77). Neki od gena koji uzrokuju urođeni HH su *KAL-1*, *KAL-2*, *PROK2/PROK2R*, *FGF8*, *KISS1*, *GPR54*, *TAC3* te *TAC3R*. Također, mutacije u genima koji kodiraju hormone FSH i LH mogu uzrokovati deficijenciju ovih hormona te time i HH. Iako popis gena uključenih u patologiju HH raste, veliki dio slučajeva ostane bez genetskog objašnjenja podloge bolesti (75).

Stečeni HH u odrasloj dobi utječe na lučenje gonadotropina u prekomjernoj ili premaloj količini. Simptomi su blaži no kod urođenog HH, a uključuju smanjen volumen ejakulata, sporiji rast brade, narušen libido ili iscrpljenost. Može nastati zbog operativnih zahvata, radioterapije, malignih i benignih tumora centralnog živčanog sustava, raznih infekcija, upala te autoimune bolesti hipofize. Nadalje, stečeni HH mogu inducirati endogeno unošeni pripravci poput anaboličkih steroida, nadomjesne terapije testosteronom te zloupotrebe opijata i njihovih analoga (75-80).

### **1.5.2. Post-testikularni čimbenici muške neplodnosti**

Post-testikularni uzroci neplodnosti obuhvaćaju sve proksimalne ili distalne opstrukcije sjemenih kanalića, infekcije i upale popratnih žlijezda muškog reproduktivnog sustava kao i neplodnost uzrokovanu autoimunim bolestima. Post-testikularne promjene se najčešće očituju kroz smanjen volumen, narušenu pH vrijednost i viskoznost ejakulata, povećan broj leukocita u ejakulatu te prisutnost smanjenog broja spermija ili čak nepostojanje spermija u ejakulatu što se naziva azoospermija (75). Nadalje, opstrukcija može biti i urođena gdje je uzrokovana anatomskim nedostatkom sjemenovoda i sjemenih vrećica u muškarca, a prepoznaje se po izrazito smanjenom volumenu ejakulata, kiselom pH te azoospermiji. Također, opstrukcija može biti genetskog porijekla gdje je jedan od najpoznatijih uzroka mutacija gena *CFTR*, i to najčešće delecija aminokiseline fenilalanin zvana delta F508 (p.Phe508del) (81). Namjerne ili slučajne ozljeda testisa, poput vazektomije, blokade epididimisa ili prethodnih operacija bruha, također mogu dovesti do opstrukcije sjemenih kanalića te zapriječiti izlazak ejakulata i time izazvati neplodnost (82).

### 1.5.3. Testikularni čimbenici muške neplodnosti

Testikularni čimbenici djeluju izravno na testis, odnosno na spermatogenezu, a time i na kvalitetu i kvantitetu nastalih spermija. Primarni uzročnici disfunkcije testisa mogu nastati zbog genetskih poremećaja, urođenih anomalija testisa, upale, traume i torzije testisa, gonadotoksičnih lijekova, kemo- ili radio- terapije i operacija u području prepona (75). Zbog njihove heterogenosti, te važnosti u procjeni muške neplodnosti, detaljnije će se opisati u sljedećim potpoglavljima.

#### 1.5.3.1. Genetski poremećaji

Najčešći genetski poremećaji koji uzrokuju teže oblike muške neplodnosti su mikrodelecije Y-kromosoma, Klinefelterov sindrom, 46,XX muški sindrom i izocentrični Y kromosom. Tako muškarci s izuzetno niskim brojem spermija u ejakulatu kao i oni azoospermični pokazuju najveću incidenciju genetskih aberacija odgovornih za neplodnost. Y kromosom je ključan za razvoj muških spolnih karakteristika, stoga je očekivano da će njegove anomalije uzrokovati neplodnost. Regija gena faktora azoospermije *AZF* na dugom kraku Y kromosom sadrži tri podregije, *AZFa*, *AZFb* i *AZFc* koje sadrže gene važne za pravilnu funkciju testisa. Ako dođe do delecije u jednoj ili više od podregija gena *AZF*, pojavit će se specifični fenotipi neplodnosti muškarca. Stoga se analiza navedenih regija koristi u rutinskoj kliničkoj obradi neplodnih pacijenata koji imaju izuzetno nisku koncentraciju spermija ili azoospermiju gdje posjeduje važnu dijagnostičku i prognostičku vrijednost (83). Ponekad, podregija *AZFc* može biti tek djelomično deletirana te je tada riječ je o klinički zasebnoj deleciji zvanoj *gr/gr*. Takva djelomična delecija utječe na gene koji se nalaze u više kopija, tako da su uslijed delecije eksprimirani u količinama nedostatnim za normalno odvijanje spermatogeneze. Ako se delecija *gr/gr* dalje prenese na potomke, može doći do pogoršanja fenotipa i potpune delecije podregije *AZFc* (84).

Klinefelterov sindrom je kromosomska anomalija koja utječe na razvoj i funkciju mnogih organskih sustava sve od embrionalnog razvoja do odrasle dobi. Odnosi se na muške osobe (46,XY) rođene s viškom X kromosoma, najčešćeg kariotipa 47,XXY. Simptomi uključuju visoki rast, smanjen udio mišićne mase, smanjene testise, hipogonadotropni hipogonadizam (HH), kašnjenje puberteta, ginekomastiju te gubitak sekundarnih muških spolnih karakteristika. Pogađa jednog na 660 novorođenih muškaraca, a često se dijagnosticira tek u odrasloj dobi što

može biti prekasno za adekvatno liječenje te uzrokovati nepovratni gubitak spermatogeneze (85, 86).

Jedna od patoloških dijagnoza muške neplodnosti može biti uzrokovana abnormalnošću gena na X kromosomu koji kodira androgeni receptor (AR). AR veže produkte steroidogeneze, pogotovo testosteron, a u jezgri signalizira transkripciju gena važnih za normalnu funkciju testisa. Tako mutacije u AR uzrokuju sindrom neosjetljivosti na androgen (AIS) koja može biti potpuna, djelomična ili nepotpuna. Ipak, frekvencija ovih mutacija je niska u neplodnoj muškoj populaciji (0 – 1,7 %) stoga se na testiranje šalju pacijenti ovisno o vrijednostima reproduktivnih hormona (87).

Rijetka genetska anomalija koja pridonosi neplodnosti je muški XX sindrom kod kojeg osoba razvije sekundarne muške karakteristike s kariotipom 46,XX. Učestalost sindroma je 1 na 20000 muške novorođenčadi. Ova anomalija najčešće nastaje tijekom spermatogeneze, u procesu mejoze, kada se homologna rekombinacija pseudoautosomne regije kromosoma X i Y neispravno odvije. Gen koji je primarni okidač razvoja testisa, *SRY*, se tako može translocirati na X kromosom. Iako u takvih pacijenata nije prisutan cijeli Y kromosom već samo gen *SRY*, dolazi do razvoja muškog fenotipa, ali ne i do pravilne funkcije testisa što naposljetku uzrokuje neplodnost (88).

Mogući su i razni drugi genetički uzroci neplodnosti, uključujući ostale strukturalne promjene Y kromosoma, kao i mnogi novi geni koji se otkrivaju brzim razvojem metoda NGS (engl. *next generation sequencing*) (89).

### **1.5.3.2. Ostali uzročnici**

Razni drugi čimbenici koji nemaju nužno poznatu genetičku podlogu, također uzrokuju ili djelomično utječu na pojavu neplodnosti.

Varikokela, proširenje vena skrotuma i unutarnje sjemenske vene, može biti povezana s neplodnošću i abnormalnostima spermatogeneze. Klinička slika pacijenata koji imaju dijagnosticiranu varikokelu nije uvijek jednoznačna jer ju mogu imati i pacijenti s normalnom funkcijom testisa. Stupanj jačine varikokele također utječe na funkciju testisa, a predstavlja veći problem u kombinaciji sa ženskim čimbenicima neplodnosti (90).

Nespušteni testisi ili kriptorhizam je čest pedijatrijski poremećaj, zahvaća 2 – 9 % muške populacije pri rođenju, te se smanjuje na 1 – 2 % u prvom tromjesečju života. Izvan skrotuma, odnosno nespušteni mogu biti jedan ili oba testisa. Utvrđeno je kako muškarci s obostranim nespuštenim testisima imaju značajno smanjenu plodnost naspram onih s jednostranim (91).

Nadalje, muškarci koji imaju kriptorhizam, često pokazuju manji broj spermija u ejakulatu od zdravih muškaraca (92). Predložena etiologija kriptorhizma je mješavina genetičkih i okolišnih čimbenika pojedinačno ili kombinirano (93).

Prethodna liječenja malignih bolesti citotoksičnom kemoterapijom ili radioterapijom također imaju negativan utjecaj na plodnost muškarca koji može biti kratkotrajan ili dugotrajan. Budući da su navedeni tretmani izuzetno toksični za spermatogenezu i ispravnu funkciju testisa, jedini način očuvanja plodnosti u ovom slučaju je prethodno smrzavanje reproduktivnog tkiva ili spermija (94).

#### **1.5.4. Idiopatska muška neplodnost**

Muška neplodnost nepoznate etiologije odnosno idiopatska neplodnost, zahvaća čak 30 – 40 % pacijenata koji dolaze na obradu radi nemogućnosti začeća zdrave partnerice. Takvi pacijenti često nemaju povijest bolesti povezanih s neplodnošću te pokazuju normalne parametre laboratorijskih, hormonskih, genetičkih testova. Parametri sjemena također mogu biti normalni. Ovakvi slučajevi zahtijevaju dodatne genetičke i molekularne analize kako bi se što preciznije dijagnosticirao uzrok i daljnja terapija (95).

### **1.6. Dijagnostika muške neplodnosti**

Prema smjernicama Američkog društva za reproduktivnu medicinu i Europskog društva za urologiju, osnovna evaluacija neplodnosti vrši se skupljanjem informacija o povijesti bolesti vezanih za reproduktivni sustav i barem jednom analizom sjemena, spermioigramom. Ako je rezultat spermiograma abnormalan, pacijent se šalje dalje na pregled kod specijalista te mu se uzima potpuna medicinska anamneza (96).

#### **1.6.1. Spermioigram**

Spermioigram je osnovna laboratorijska metoda analize sjemena kojom se procjenjuje kvaliteta spermija u muškarca. Spermioigram uključuje kvantitativnu analizu broja, pokretljivosti, morfologije i vitalnosti spermija u nativnom ejakulatu, prema smjernicama SZO. Na temelju spermiograma se tako postavljaju sljedeće dijagnoze: astenozoospermija - smanjen broj pokretnih spermija; oligozoospermija - smanjen broj spermija; teratozoospermija -



narušena morfologija spermija. Također je moguće postaviti i kombinaciju dvije ili sve tri navedene dijagnoze (oligoasteno-, oligoterato-, oligoastenoteratozoospermija) čemu se potonja definira kao sindrom oligoastenoteratozoospermije (OAT). Postoje i teže dijagnoze, kao nekrozoospermija, koja označava stanje kada je u ejakulatu vrlo mali broj živih, ali većinski nepokretnih spermija. Ako su spermiji prisutni u izuzetno malom broju, radi se o kriptozoospermiji, a potpuna odsutnost spermija naziva se azoospermija (97, 98). Sama analiza ejakulata nije dovoljna kako bi se objasnio muški čimbenik neplodnosti te predvidio ishod medicinski potpomognute oplodnje (MPO) (99).

### **1.6.2. Analiza hormona**

Kod muškaraca rizičnih za HH klinički se radi i analiza hormonskog profila koja najčešće uključuje određivanje vrijednosti spolnih hormona FSH, LH i testosterona. Hormonski profil je izuzetno važan kod azoospermičnih muškaraca budući da može imati prognostičku vrijednost. Ponekad se može raditi dodatna analiza hormona poput prolaktina, globulina koji veže spolne hormone, anti-Müllerovog hormona, inhibina B ili hormona štitnjače (100).

### **1.6.3. Genetičko testiranje**

Oko 15 % muške neplodnosti može se objasniti genetičkim anomalijama. Usprkos brzom rastu istraživanja i sve većem broju novootkrivenih gena koji uzrokuju mušku neplodnost, još uvijek se u kliničkoj obradi pacijenata koriste standardni genetski testovi. Ti testovi uključuju kariotipizaciju za određivanje numeričkih i strukturalnih abnormalnosti, ispitivanje mikrolelecija regije *AZF* i mutacija gena *CFTR*. Na genetički probir indiciraju se pacijenti s azoospermijom i teškom oligozoospermijom u kojoj se u nativnom ejakulatu nalazi manje od 5 milijuna spermija po mililitru (96, 101).

### **1.6.4. Ultrazvuk skrotuma**

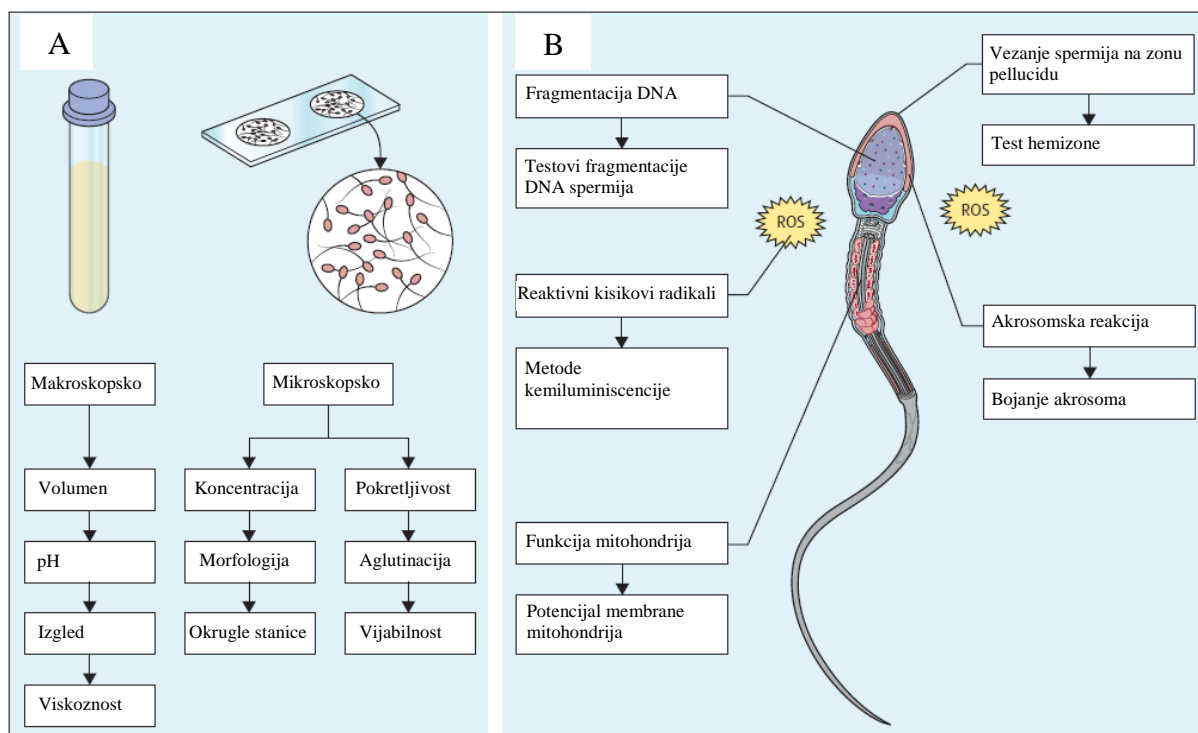
Muškarci kod kojih se sumnja na opstrukciju sjemenovoda se indiciraju na ultrazvuk skrotuma, neinvazivnu metodu kojom se određuju volumen i veličina testisa, prisutnost varikokele i anatomija epididimisa. Iako se i samim pregledom kod liječnika mogu utvrditi anatomske anomalije, ultrazvukom se takav nalaz potvrđuje (96).

### 1.6.5. Mikrobiološka analiza ejakulata

Indikacija za mikrobiološku analizu ejakulata uključuje abnormalan uzorak urina, infekcije urinarnog trakta, prostatitis, epididimitis, upalu muških spolnih žlijezda i seksualno prenosive bolesti. Ako muškarac ima smanjen volumen ejakulata, mikrobiološka analiza je korisna budući da uzrok može biti opstrukcija sjemenovoda uslijed infekcije. Inače, sama mikrobiološka analiza ima manju ulogu u dijagnostici neplodnosti, a pronalazak leukocita u ejakulatu nema u potpunosti razjašnjeno značenje (102).

### 1.6.6. Dodatne analize kvalitete sjemena

Uobičajeni parametri sjemena dobiveni spermogramom često ne daju informaciju vezanu za njihovu ispravnu funkciju, stoga su razvijeni dodatni testovi kvalitete sjemena (103). Velika važnost dodatnih testova funkcije spermija došla je do izražaja sve većim korištenjem postupaka medicinski potpomognute oplodnje (MPO) poput izvantjelesne oplodnje (engl. *in vitro fertilization*, IVF) i intracitoplazmatske injekcije spermija (engl. *intracytoplasmic sperm injection*, ICSI) koje se primjenjuju u liječenju muške neplodnosti (104). Sam spermogram ima ograničenu sposobnost predviđanja uspješnosti ishoda postupaka MPO ovisno o dijagnozi stupnja muške neplodnosti, a dodatni funkcionalni testovi bi mogli dati odgovor (104, 105). Iako su dodatni testovi prema smjernicama SZO još uvijek kategorizirani kao istraživački, njihova mogućnost predviđanja ishoda MPO i trudnoće usmjerava ih sve više prema kliničkoj primjeni u budućnosti (96, 105). Također, 2021. godine izašla je nova verzija priručnika SZO-a za obradu neplodnih pacijenata koja detaljno opisuje postupke dodatnih testova i kod kojih pacijenata bi se takvi testovi mogli primijeniti (106). Naglasak se trenutno stavlja na testove koji određuju kvalitetu kromatina spermija, odnosno integritet genoma spermija. Analizom integriteta genoma utvrđuje se postotak spermija koji su fragmentirani, odnosno imaju lomove ili modifikacije nukleotida DNA (105). Usporedba spermograma i dodatnih funkcionalnih testova prikazana je na slici 8.



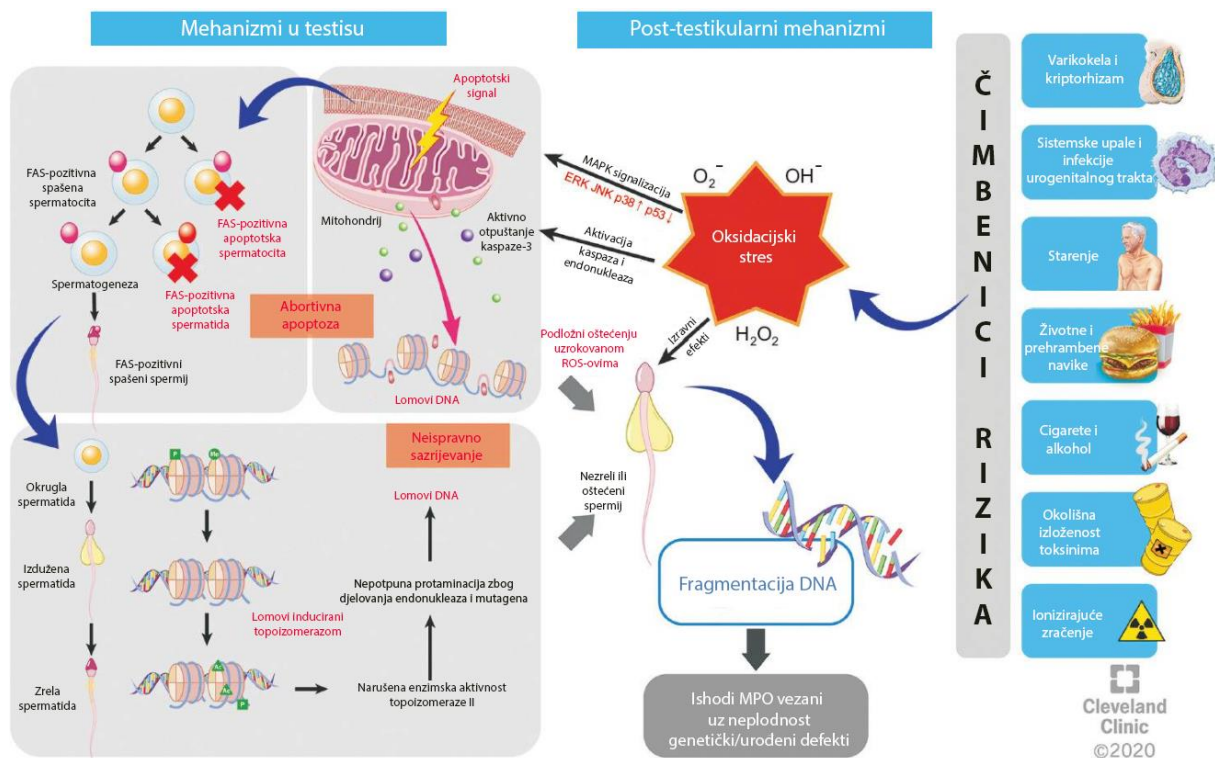
**Slika 8. Laboratorijske metode određivanja muške neplodnosti.** A) Shema prikazuje standardnu analizu sjemena spermigramom koja služi kao inicijalna provjera sjemena kod svakog muškarca kod kojeg postoji sumnja na mušku neplodnost. Analize uključuje određivanje makroskopskih svojstava volumena, pH, izgleda i viskoznosti sjemena te mikroskopska svojstva spermija koja uključuju koncentraciju, pokretljivost, morfologiju, aglutinaciju, vijabilnost i prisutnost okruglih stanica. B) Shema pokazuje dijelove spermija koji se mogu ispitivati funkcionalnim testovima. Fragmentacija DNA spermija se može testirati i govori o integritetu genoma. Također, može se odrediti prisutnost i količina reaktivnih kisikovih radikala (engl. *reactive oxygen species*, ROS) u spermijima testovima na bazi kemiluminiscencije, dok se funkcija mitohondrija spermija provodi testovima koji ispituju membranski potencijal mitohondrija. Može se ispitati i efikasnost vezanja spermija na zonu pelucidu jajne stanice testom hemizone te akrosomska reakcija specifičnim bojanjima. (Preuzeto i prilagođeno: Agarwal i sur., *The Lancet*, 2021 (96))

### 1.6.6.1. Fragmentacija DNA spermija

Glavna uloga spermija je prijenos ispravnog genetičkog materijala na potomke stoga narušeni integritet DNA spermija može utjecati na oplodnju, rani razvoj embrija kao i na vjerojatnost trudnoće prirodnim putem (107). Narušavanje integriteta DNA, odnosno oštećenje DNA spermija može biti uzrokovano različitim vanjskim i unutrašnjim čimbenicima. Neki od vanjskih čimbenika su izlaganje toplini, pušenje, kemoterapeutici i okolišno zagađenje, dok unutarnji uzroci uključuju nepravilno sazrijevanje spermija, apoptozu spolnih stanica,

poremećaje urogenitalnog trakta, ali i starosnu dob muškarca (Slika 9) (108). Navedeni čimbenici mogu u testisima ili čak post-testikularno potaknuti akumulaciju reaktivnih kisikovih radikala (engl. *reactive oxygen species*, ROS), odnosno proces oksidacijskog stresa koji dovodi do oštećenja bioloških makromolekula, pa tako i DNA u stanicama (109). Najčešći tipovi oštećenja DNA su neispravno sparivanje, gubitak ili modifikacije dušičnih baza, stvaranje adukta DNA i drugih molekula, dimeri pirimidinskih dušičnih baza te jednolančani i dvolančani lomovi molekule DNA. Sva navedena oštećenja mogu uzrokovati fragmentaciju DNA spermija, (engl. *sperm DNA fragmentation*, SDF) te utjecati na kvalitetu i ishod MPO-a (110).

Nekoliko različitih molekularnih mehanizama sudjeluje u nastanku oštećenja DNA i pojave SDF-a u spermijima unutar samih testisa (Slika 9). Oštećenja DNA su moguća tijekom svih faza spermatogeneze i spermiogeneze, a nekoliko je najčešćih uzroka. Tako tijekom procesa spermiogeneze može doći do oštećenja DNA budući da zamjenu histona protaminima, potpomaže enzim topoizomeraza II. Taj enzim stvara lomove na DNA kako bi se minimalizirao torzijski stres uslijed sažimanja kromatina. Ako ovi lomovi nisu sanirani mehanizmima popravka lomova, doći će do neispravnog sazrijevanja spermija i SDF-a (110, 111). Idući mehanizam koji može potaknuti SDF je prekinuta apoptoza stanica tijekom spermatogeneze. Naime, tijekom normalne spermatogeneze, apoptoza se fiziološki odvija kako bi se uklonile eventualne abnormalne spolne stanice. Ako se proces apoptoze poremeti ili aktivira zbog pojave oksidativnog stresa, moguća posljedica je pojava SDF-a (112). Nadalje, do oštećenja može doći i nakon što spermiji napuste testis, post-testikularno, zbog okolišnog oksidacijskog stresa. Oštećenje uslijed oksidacijskog stresa potiče stvaranja adukta DNA na mjestima gdje molekula nije zaštićena protaminima što dalje potiče lomove i fragmentaciju. Također, može doći i do aktivacije različitih molekularnih signalnih puteva koji potiču apoptozu i narušavaju proces sazrijevanja spermija te vode nastanku SDF-a (113, 114).



**Slika 9. Molekularni mehanizmi nastanka DNA fragmentacije spermija unutar i izvan testisa te najčešći čimbenici rizika.** Unutar testisa tijekom spermatogeneze može doći do prekinute apoptoze neispravnih spermatoocita aktivacijom Fas-liganda koji se zadrži na zreloom spermiju. Signalni put apoptoze može se pokrenuti u mitohondrijima što uzrokuje daljnje lomove DNA spermija. Neispravno sazrijevanje okrugle spermatide uslijed spermiogeneze može dovesti do lomova na molekuli DNA djelovanjem enzima topozimeraze II. Post-testikularno oštećenje genoma spermija najčešće je uzrokovano akumulacijom ROS-ova koji uzrokuju pojavu oksidacijskog stresa. Mehanizmi oksidacijskog stresa uključuju aktivaciju MAPK – signalnog puta koji preko kinaza ERK/JNK/MAPK-p38 upućuje stanicu u apoptozu. Također, oksidacijski stres može uzrokovati aktivaciju raznih kaspaza i endonukleaza, ali i izravno oštetiti kromatin spermija stvaranjem adukta molekule DNA i nusprodukata oksidacije. Svi navedeni mehanizmi uzrokuju fragmentaciju DNA spermija, a aktiviraju ih, osim starosne dobi i razni klinički poremećaji poput varikokele, kriptorhizma, sistemskih i urogenitalnih infekcija, dob, tumora, hormonalnih poremećaja, dijabetesa, kao i okolišni čimbenici (izlaganje toplini, okolišni toksini, radijacija, pušenje, alkohol, prehrana). (Preuzeto: Agarwal i sur., *The World Journal of Mens Health*, 2020 (110))

Najčešći dodatni testovi kojima se određuje postotak SDF-a jesu detekcija lomova DNA, test strukture kromatina spermija i test disperzije kromatina spermija (115). U kliničkoj praksi, parametar SDF se još uvijek ne koristi u rutinskoj obradi svakog pacijenta, ali je preporučeno testiranje u nekoliko specifičnih slučajeva. Kod pacijenata kojima je dijagnosticirana varikokela, ovisno o stupnju jačine dijagnoze preporučuje se testiranje pacijenata s

abnormalnim parametrima sjemena, te graničnih ali normozoospermičnih uzoraka. Zatim, preporučeno je testiranje SDF-a kod idiopatske muške neplodnosti, neuspješnih postupaka MPO-a te kod partnera žena koje su imale uzastopne gubitke trudnoće. Isto tako, kod muškaraca koji imaju rizik od narušavanja neplodnosti zbog okolišnih i životnih navika preporučena je analiza SDF-a (116).

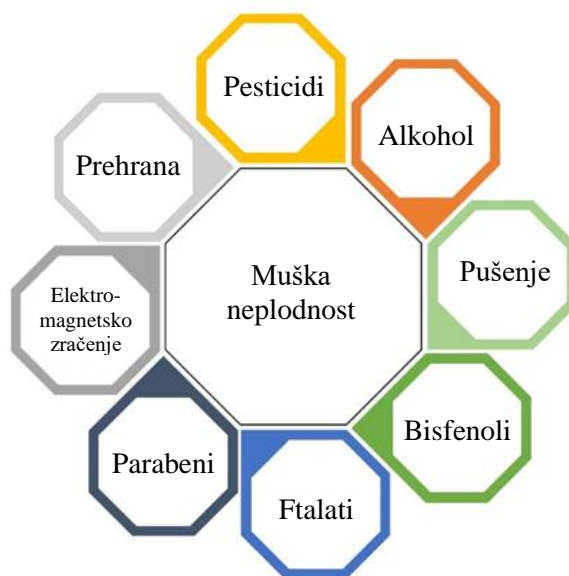
#### **1.6.6.2. Procjena sažimanja kromatina spermija**

Normalna struktura i sazrijevanje kromatina spermija ključni su za pravilnu oplodnju (117). Neispravno sažimanje tj. kondenzacija kromatina tijekom spermiogeneze uslijed kojeg dolazi do nepotpunog sazrijevanja spermija može dovesti do muške neplodnosti neovisno o konvencionalnim parametrima sjemena (117). Nadalje, spermiji s neispravno kondenziranim kromatinom se može tehnikama MPO-a, poput ICSI-ja, prenijeti dalje na potomstvo. Pokazana je i negativna povezanost između nepravilne strukture kromatina spermija i potencijala spermija za oplodnju (118, 119). Također, uslijed narušenog procesa spermiogeneze i nepravilnog sažimanja kromatina protaminima može doći do oštećenja DNA što pridonosi povećanju fragmentacije DNA spermija (120).

Procjena sažimanja kromatina spermija temelji se na svojstvu gusto kondenziranog kromatina protaminima u toroidima, koji ne dopuštaju polimerizaciju, odnosno vezanje drugih molekula na kromatin (121). S druge strane, ako spermiji nisu u potpunosti sazreli i na kromatinu ostane višak vezanih histona, DNA je rahlija što omogućava lakše vezanje i polimerizaciju drugim molekulama (122). Ta svojstva se također odnose na interkalirajuće ionske boje koje vežu DNA u rahlijim dijelovima, odnosno tamo gdje kromatin nije potpuno kondenziran. Na temelju toga, postoji nekoliko različitih vrsta testova kojima se procjenjuje status, odnosno sažimanje kromatina spermija. Neki od testova su detekcija preostalih histona u fiksiranih spermija bojom anilin plavo, bojanje bojom kromomicin A3 koji detektira protamine te bojanje bojama toluidin plavim, metil zelenim ili Giemsom (123-125).

## 1.7. Okolišni čimbenici koji utječu na muški reproduktivni sustav

Muška neplodnost, kao izuzetno heterogeno stanje, je često posljedica kombinacije različitih utjecaja na muški reproduktivni sustav, među kojima se nalaze i okolišni čimbenici. Čovjek je svakodnevno okružen raznim toksinima, kemikalijama i drugim utjecajima koji mogu imati negativan utjecaj na reproduktivno zdravlje (Slika 10) (93). Prvi puta je okolišni čimbenik uočen prije 40-ak godina u Sjedinjenim Američkim državama kada su radnici u tvornici pesticida i poljoprivrednici imali smanjenu plodnost i narušenu spermatogenezu zbog redovitog izlaganja insekticidu 1,2-dibromo-3-kloropropanu (DBCP) (126). Od tada je porastao interes za okolišnu i radnu izloženost te su provedene studije na animalnim modelima pokazale štetan utjecaj raznih pesticida, metala i kemikalija na muški reproduktivni sustav (127). Usprkos tomu, broj supstanci iz okoliša s eksperimentalno dokazanim negativnim utjecajem na spermatogenezu ostao je ograničen, kao i broj studija koje su pokazale učinke na ljudima. Budući da se mnoge toksične supstance i dalje nalaze ili otpuštaju u okoliš, kao takve predstavljaju opasnost reproduktivnom zdravlju (128). Također, unazad zadnjih nekoliko desetljeća uočeno je povećanje reproduktivnih poremećaja poput tumora testisa, razvojnih anomalija i smanjene proizvodnje spermija (129). Ovi poremećaji se povezuju s raširenim korištenjem supstanci koje stupaju u interakciju s hormonskom aktivnošću, a nazivaju se endokrini disruptori (ED). Izloženost ED stoga može predstavljati teret za zdravstveni sustav i same pacijente zbog troškova postupaka liječenja i MPO-a (93, 130). Osim okolišne izloženosti, negativan utjecaj na muški reproduktivni sustav može se očitovati kroz svakodnevne životne navike koje uključuju konzumaciju cigareta i alkohola, prekomjerno unošenje visokoprocenirane hrane pune šećera i masnoća, korištenje ilegalnih droga, psihološki stres te korištenje mobitela i sl. (131). Budući da su životne navike zapravo prva linija djelovanja kod narušenog zdravlja, potrebno je sagledati koji čimbenici imaju utjecaj na mušku neplodnost (132).



**Slika 10. Slikoviti prikaz životnih i okolišnih čimbenika koji mogu utjecati na smanjenu plodnost muškarca.** Životne navike koje mogu utjecati na plodnost su konzumacija alkohola te prekomjerna težina, hrana visoke energetske vrijednosti i nedostatak tjelesnih aktivnosti. Okolišni čimbenici poput života ili rada u blizini velikih industrijskih pogona, korištenje pesticida i insekticida te drugih materijala s negativnim utjecajem na plodnost poput parabena, ftalata i bisfenola. Također elektromagnetsko zračenje može također utjecati na plodnost. (Preuzeto i prilagođeno: *Maric i sur., Arh Hig Rada Toksikol, 2021 (133)*)

### 1.7.1. Prehrana

Prehrana je čimbenik koji utječe na zdravlje cijelog organizma te stoga može utjecati i na reproduktivni potencijal pojedinca. Konzumacijom namirnica siromašnih nutrijentima, a bogatih tvarima visokog glikemijskog indeksa, zasićenim mastima i trans-masnim kiselinama uz smanjenu fizičku aktivnost može doći do prekomjerne težine, a potom i do pretilosti. Prema podacima studije iz 2010. godine, pretilost je uzrokovala zdravstvene probleme koji su doveli do smrti više od 3,4 milijuna ljudi što je ukupno 3,9 % godišnje izgubljenih života (134). Također, ovakva prehrana može potaknuti oksidativni stres kao bazu nastanka pretilosti, dijabetesa, inzulinske rezistencije i disbioze u crijevima. Navedeni metabolički poremećaji su također povezani s narušenom muškom plodnošću jer oksidacijski stres može izravno utjecati na spermatogenezu, a time i kvalitetu sjemena. Prehrana može također utjecati na aktivnost reproduktivnih hormona i imunološki odgovor organizma (135). Stoga, nakupljanje bijelog masnog tkiva u organizmu vodi povećanju proizvodnje proupalnih citokina i nakupljanju ROS-ova, ali i povećanoj aktivnosti enzima aromataze koji je odgovoran za katalizaciju



pretvorbe testosterona u estradiol (136). Najčešće negativne posljedice pretilosti na muško reproduktivno zdravlje uočavaju se kroz pojavu hipogonadizma, apoptoze zbog toplinskog stresa u testisima ili hipoksije i djelovanja endokrinih disruptora (137).

Endokrini disruptori iz okoline mogu potencijalno djelovati simultano na pretilost i mušku neplodnost (138). U organizam se nerijetko unose putem prehrane zbog načina na koji je hrana uzgajana, mogu biti otpušteni iz ambalaže ili se nalaziti u određenim vrstama voća, povrća i žitarica. Tako na primjer mlijeko i mliječni produkti kao i neke vrste ribe mogu biti izvori raznih vrsta ED-a, zatim korištenje pesticida i dodatak raznih suplemenata i hormona rasta pri uzgoju goveda mogu dovesti do izlaganja ED. Nadalje, sama ambalaža poput plastike može biti izvor bisfenola A (BPA) čija upotreba je i zabranjena u Europskoj Uniji. Također, fitoestrogeni, supstance koje stupaju u interakciju s estrogenim i androgenim receptorima, su porijeklom iz biljaka, posebice soje (139). Takvi spojevi mogu imati negativan utjecaj na zdravlje i plodnost (140). Kadmij je teški metal koji se isto može nalaziti u raznim žitaricama i sjemenkama, a pokazan je njegov negativan utjecaj na mušku plodnost (141). Pretpostavlja se kako djelovanje ED ima izrazit utjecaj tijekom fetalnog i ranog neonatalnog razvoja te da isto tako može povećati sklonost pretilosti, neplodnosti i ostalim bolestima poput tumora (142).

### **1.7.2. Alkohol**

Konzumacija alkohola je još jedna životna navika koja može utjecati na zdravstveni status i uzrokovati razne poremećaje i bolesti poput hipertenzije, srčanih bolesti, bolesti jetre, gastrointestinalna krvarenja, tumore, demenciju, anksioznost i depresiju te socioekonomske probleme (143). S druge strane, umjerena konzumacija alkohola može imati pozitivan učinak na zdravlje žena i muškaraca (144). Za plodnost muškarca, pokazano je kako neumjerena konzumacija alkohola može negativno utjecati na proizvodnju hormona gonadotropina, atrofiju testisa, razinu testosterona i spermatogenezu (145). Također je pokazano kako muškarci koji konzumiraju alkohol, mogu imati veću razinu estradiola od onih koji ne piju (146). Utjecaj umjerene konzumacije alkohola nije od kliničke značajnosti prema dosadašnjim istraživanjima, ali je pokazano kako redovito ispijanje alkohola može dovesti do narušenih parametara sjemena (147).

### **1.7.3. Pušenje**

Poznato je da pušenje ima negativan utjecaj na cjelokupno zdravlje te na muški reproduktivni sustav. Usprkos tomu, oko 46 % od ukupnih pušača jesu muškarci u reproduktivnoj dobi (148). Dim cigarete sastoji se od oko 4000 različitih supstanci u obliku plinova, čestica i isparenih tekućina koje se otpuštaju procesima hidrogenacije, pirolize, oksidacije, dekarboksilacije i dehidracije, među kojima su razni toksini i mutageni (149). U cigaretama se nalazi i nikotin, glavni alkaloid duhana, koji može također imati ulogu u inhibiciji i smanjenju aktivnosti aromataze. U animalnim studijama, pokazano je kako muška mladunčad štakora može imati smanjenu aktivnost aromataze uslijed izlaganja nikotinu (150). Dosadašnjim studijama koje su proučavale utjecaj pušenja na parametre, kvalitetu sjemena i plodnost dobiveni su oprečni rezultati, gdje su neki pokazali kako pušenje ima utjecaja na kvalitetu (151, 152), dok drugi nisu uspjeli pokazati jasan učinak (153, 154). Pokazano je kako ovisno o količini konzumiranih cigareta, osnovni parametri sjemena mogu biti narušeni, odnosno veća konzumacija cigareta narušava parametre poput volumena ejakulata, broja i pokretljivosti spermija (155). Zatim, određene biološke funkcije spermija poput građe aksoneme kojom se spermij pokreće, mogu biti narušene čime pušenje izravno djeluje na smanjenje pokretljivosti spermija (156). Pušenje je također povezano s akumulacijom ROS-ova i pojavom oksidacijskog stresa u sjemenu koji mogu naštetiti normalnoj funkciji spermija (157). Pokazano je i kako pušači imaju veću vjerojatnost pojave leukocitospermije u uzorku, povišenog broja leukocita, koji također mogu biti unutrašnji izvor ROS-a (158). Budući da navike poput prehrane, konzumacije alkohola i cigareta mogu prema studijama imati utjecaj na muški reproduktivni sustav, neplodnost svakako treba sagledati iz gledišta povezanosti medicinskih parametara i životnih navika (159).

### **1.7.4. Životna sredina**

Životna sredina često određuje životne navike pojedinca, a one potom utječu na kvalitetu života i zdravlja. Tako je primjerice, karakteristika života u manjoj sredini ili izvan grada (ruralna okolina) nerijetko povezana s bavljenjem poljoprivredom i stočarstvom. Zbog toga, veća je vjerojatnost da se muškarac koji obitava u ruralnoj sredini bavi navedenim poslovima, nego muškarac u gradskoj, urbanoj sredini te da je stoga izložen i većoj koncentraciji pesticida (160). Pesticidi su kemijski spojevi i njihove mješavine koje se koriste za sprječavanje, uništavanje i kontrolu nametnika poput vektora bolesti, biljaka i životinja koje čine štetu

tijekom bilo kojeg stadija uzgoja hrane te nametnika koji napadaju životinje za uzgoj (161). Zbog svog potencijalnog štetnog djelovanja, postoje regulative unutar Europske Unije poput one propisane od strane Europske agencije za sigurnost hrane kolika je najveća dozvoljena u komercijalnim proizvodima u svrhu sigurnosti potrošača (162). Naime, pesticidi se mogu unijeti u organizam ili izravnom upotrebnom tijekom radne izloženosti i kućne upotrebe te indirektno preko hrane ili dojenjem (163). Studije su pokazale kako parametri sjemena muškaraca koji žive u ruralnoj okolini mogu imati narušene parametre sjemena naspram muškaraca koji žive u urbanoj sredini koji su manje izloženi ksenobioticima u sklopu poljoprivrednih djelatnosti. Stoga, procjena rizika životnog okruženja pojedinca, odnosno života u urbanoj ili ruralnoj sredini može biti važna radi boljeg razumijevanja zdravstvenog statusa, a time i problema neplodnosti (160, 163-165).

### **1.7.5. Radna sredina**

Svakodnevna radna izloženost različitim kemikalijama i toksinima također može utjecati na zdravlje muškarca i plodnost (166). Na primjer, poljoprivredni radnici i ribari mogu biti u većoj mjeri izloženi pesticidima nego osobe u drugim zanimanjima. Pokazano je i kako radnici izloženi različitim vrstama pesticida mogu imati veći rizik od pojave patoloških parametara sjemena (167-169). Nadalje, pronađena je povezanost između radnog izlaganja različitim otapalima i bojama, olovu, stresu na poslu te rada u smjenama s dijagnozom muške neplodnosti (170, 171). Tako je i učestalo korištenje materijala i proizvoda koji sadrže etilen-glikol poput raznih otapala i sredstava proziv zamrzavanja, povezano s narušenim parametrima sjemena u muškarca (172). Također, profesionalni vatrogasci mogu biti u riziku od pojave muške neplodnosti, ali i drugih bolesti, budući da intenzivno rade s mješavinama toksičnih kemikalija. Njihov rad karakteriziraju i noćne smjene, što dodatno može pridonijeti narušavanju zdravlja (173). Profesionalno izlaganje ftalatima uslijed rada u tvornicama koje proizvode materijale od polivinil-klorida, također može negativno utjecati na plodnost i razne parametre kvalitete sjemena (174).

Kao što se vidi iz Uvoda, muška neplodnost je izrazito heterogen poremećaj te je nerijetko osnovna analiza sjemena nedostatna za njezinu dijagnostiku i objašnjenje. Svrha ovog rada je korištenjem spermiograma, dodatnih analiza kvalitete spermija i proteomske analize N-glikana u muškaraca s određenim životnim i okolišnim čimbenicima sveobuhvatnije pristupiti muškoj neplodnosti i njezinoj dijagnostici.

## **2. HIPOTEZA**

Abnormalni parametri sjemena povezani su s povećanjem razine fragmentacije DNA kao i omjera histona/protamina, s promijenjenim sastavom N-glikana u sjemenoj tekućini te sa životnim i okolišnim faktorima (pušenje, alkohol, prehrana, urbana/ruralna sredina).

### **3. SVRHA I CILJEVI RADA**

#### **OPĆI CILJ:**

Odrediti povezanost parametara sjemena (pokretljivosti, broja i morfologije spermija), integriteta DNA, omjera histona/protamina i sastava N-glikana sjemene tekućine sa životnim i okolišnim faktorima (pušenje, alkohol, prehrana, urbana/ruralna sredina).

#### **SPECIFIČNI CILJEVI:**

- Odrediti povezanost parametara sjemena s razinom fragmentacije DNA spermija, kao i s omjerom histona/protamina u muškaraca s abnormalnim i normalnim parametrima sjemena
- Odrediti povezanost N-glikana s abnormalnim i normalnim parametrima sjemena
- Odrediti povezanost razine fragmentacije DNA spermija, te omjera histona/protamina, sa sastavom N-glikana u sjemenoj tekućini u muškaraca s abnormalnim i normalnim parametrima sjemena
- Odrediti povezanost životnih i okolišnih faktora s razinom fragmentacije DNA spermija, kao i s omjerom histona/protamina u muškaraca s abnormalnim i normalnim parametrima sjemena
- Odrediti povezanost životnih i okolišnih faktora sa sastavom N-glikana sjemene tekućine u muškaraca s abnormalnim i normalnim parametrima sjemena
- Procijeniti značajnost sastava N-glikana sjemene tekućine kao biomarkera životnih i okolišnih faktora i mjerenih parametara sjemena

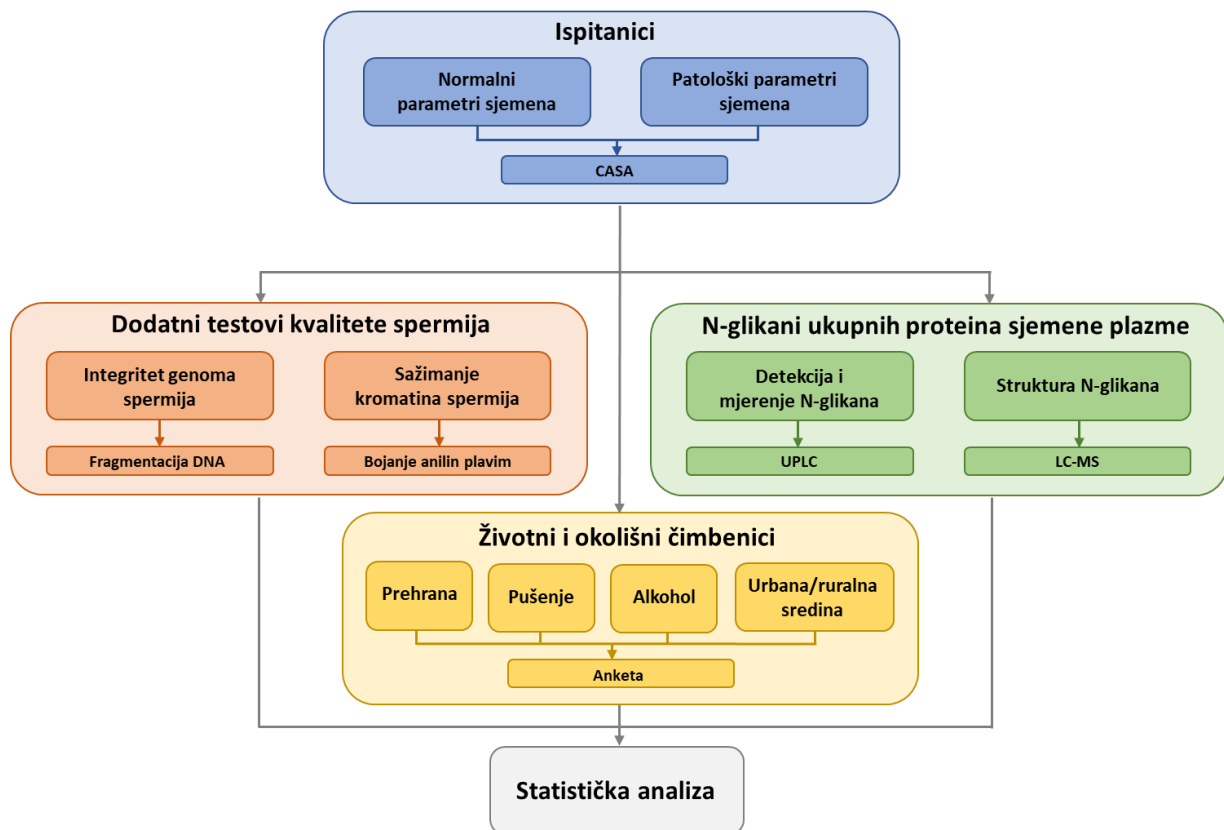
## 4. ISPITANICI I METODE

### 4.1. Ispitanici

Istraživanje je provedeno u skladu s Helsinškom deklaracijom, u sklopu projekta „Reproduktivna i regenerativna medicina – istraživanje novih platformi i potencijala“ pod projektnim kodom KK.01.1.1.01. Etičko povjerenstvo Klinike za ženske bolesti i porode Kliničkog bolničkog centra i Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu izdalo je dopusnicu za istraživanje dana 15.03.2018. pod brojem 021-1/41-18. U istraživanje je uključeno ukupno 166 ispitanika koji su nakon liječničkog pregleda imali indikaciju za analizu sjemena u Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku, Klinike za ženske bolesti i porode, KBC-a Zagreb. Svi ispitanici su dobrovoljno potpisali informirani pristanak nakon što im je obrazložena svrha istraživanja. Također su obaviješteni o tajnosti njihovih podataka sukladno Općoj uredbi o zaštiti podataka, namjenskom korištenju njihova biološkog i genetičkog materijala te mogućnosti svojevrijednog izlaska iz istraživanja u bilo kojem trenutku. Svi uzorci su numerirani, a osobni podaci poznati isključivo voditeljima studije, nigdje nisu objavljeni niti će se moći povezati s korištenim uzorcima. Ispitanici su muškarci starosne dobi između 20 i 55 godina, prosječne dobi 35,4 godine, a isključni kriteriji su bili odsustvo spermija u ejakulatu i prethodne radio- ili kemoterapije. Shematski prikaz dizajna istraživanja provedenog u ovom doktoratu prikazan je na slici 11.

Uz informirani pristanak, ispitanici su ispunili anketu uz mogućnost pojašnjavanja nejasnih pitanja. Anketa je preuzeta iz Okvirnih projekata EU COPHES i DEMOCOPHES, a trenutačno se koristi u projektu Horizon 2020 HBM4EU, te su pomoću nje objavljeni recentni radovi (175-177). Uz pitanja o osnovnim, općim podacima ispitanika, anketa sadrži pitanja koja pokrivaju preboljele bolesti, životne navike poput pušenja, konzumacije alkohola, prehrane te o životu u urbanoj ili ruralnoj sredini. Pomoću ankete su dalje načinjene procjene izloženosti okolišnim čimbenicima, odnosno životnim navikama te multivarijatnim statističkim modelima određena povezanost čimbenika i bioloških parametara sjemena. Upitnici svih ispitanika su jednoznačno kodirani brojevima, npr. ukoliko su pitanja binarnog karaktera (da/ne), kodirani su brojevima 1 i 2. Pitanja o prehrani su također binarno kodirana kako bi se pojednostavnila interpretacija rezultata s obzirom na broj ispitanika. Tako je konzumacija voća i povrća kodirana na svakodnevna konzumacija ili manje, konzumacija bijelog i crvenog mesa na više od 3 puta tjedno i 3 puta ili manje te konzumacija ribe na više ili 1 puta tjedno i manje. Konzumacija

mlijeka je također binarno kodirana (da/ne) kao i konzumacija alkohola. Potrošnja cigareta je dodatno raščlanjena na konzumaciju više od 15 cigareta dnevno ili manje. Ispitano je i nalazi li se osoba u urbanoj ili ruralnoj sredini. Anketa nije detaljno ulazila u ispitane parametre, već je služila kao robusni probir ispitanika za najčešće životne i okolišne izloženosti te su reprezentativna pitanja prikazana na slici 12.



**Slika 11. Shematski prikaz dizajna istraživanja.** CASA – računalno potpomognuta analiza sjemena, UPLC – tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti, LC-MS – tekućinska kromatografija spregnuta sa spektrometrijom masa.

- Kada ste rođeni? (dan, mjesec, godina rođenja)
- Da li ste oženjeni? a) oženjen, b) neoženjen, c) rastavljen, d) udovac, e) u zajednici
- Koje je Vaše obrazovanje? ( navedite najviši stupanj obrazovanja koji ste završili ili trenutno pohađate?)
- Gdje živite (do 500 000 stanovnika selo)? a) gradu b) selu
- Da li je vaša kuća, ili stan u blizini velikih prometnica?
- Da li živite blizu neke tvornice, tvorničkog pogona, elektrane, željezničke stanice, aerodroma ili slično?
- Koliko obroka povrća ili jela s povrćem (ne misli se na krumpir) prosječno jedete u tjednu?
- Koliko obroka voća ili jela s voćem prosječno jedete u tjednu?
- Koliko obroka crvenog mesa ili jela s crvenim mesom prosječno jedete tjedno, npr. teletina, janjetina, svinjetina? (Ukoliko ne jedete crveno meso napisati 0).
- Koliko obroka bijelog mesa ili jela s bijelim mesom prosječno jedete u tjednu, npr. piletina, puretina ili druga perad? (Ukoliko ne jedete bijelo meso napisati 0).
- Koliko obroka ribe ili jela s ribom prosječno jedete u tjednu? (Ako ne, napisati 0).
- Mliječni proizvodi
  - a) Tjedno konzumacija mlijeka
- Da li trenutno pušite?
- Ako da, koliko cigareta popušite tijekom dana?
- Da li konzumirate alkohol?
- Koliko ste trenutno teški i visoki?

**Slika 12. Prikaz pitanja postavljenih ispitanicima u anketi.**

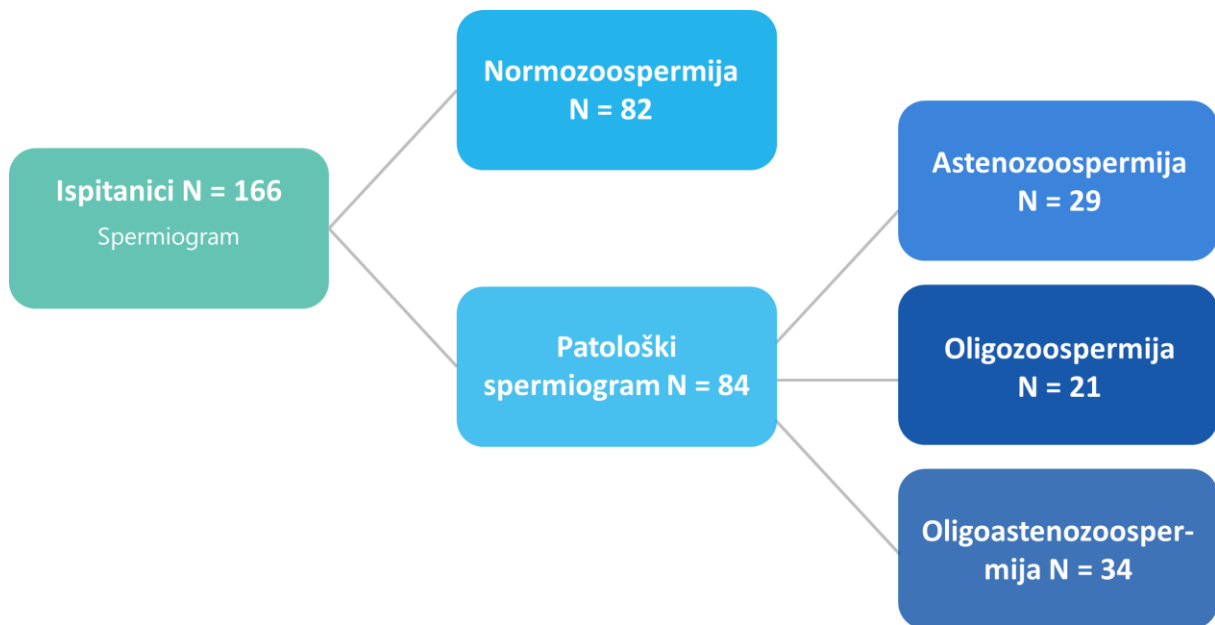


## 4.2. Metode

### 4.2.1. Prikupljanje uzoraka i obrada

Uzorci sjemena su prikupljeni nakon 2 – 7 dana apstinencije masturbacijom u sterilnu čašicu, o čemu je dan naputak svakom ispitaniku. Također, ispitanicima je rečeno kako je potrebno prikupiti cijeli uzorak bez gubitaka frakcije sjemena. Uzorci su ostavljeni na sobnoj temperaturi (engl. *room temperature*, RT) 30 – 60 min kako bi prošli proces likvefakcije tijekom kojeg gelozno sjeme postaje više tekuće uslijed enzimskih reakcija cijepanja proteina proteazama iz prostate (178). Nakon toga se pristupilo analizi spermioograma, odnosno parametara sjemena koja je uvjetovala daljnje postupke. Parametri sjemena utvrđeni su računalno potpomognutom analizom sjemena (engl. *computer aided sperm analysis*, CASA) koja je prema smjernicama SZO iz 2010. godine (97). Uzorci su klasificirani kao normozoospermični, odnosno normalnih parametara sjemena, ako je ukupni volumen sjemena bio iznad 1,5 mL, pokretljivost spermija veća od 40 %, progresivna pokretljivost veća ili jednaka 32 %. Kriterij koncentracije spermija je  $\geq 15 \times 10^6$  spermija po mililitru, dok broj spermija u ukupnom uzorku treba biti  $\geq 39 \times 10^6$  te pravilna morfologija spermija treba iznositi  $\geq 4$  %.

Ako je bilo koji od navedenih parametara spermioograma bio ispod navedenih graničnih vrijednosti, uzorak se klasificirao kao abnormalni, odnosno patoloških parametara sjemena zbog lakšeg snalaženja u daljnjem radu. Ispitanici su nakon analize sjemena svrstani u dvije skupine: oni s normalnim vrijednostima parametara sjemena i dijagnozom normozoospermije (N = 82) te oni s patološkim (abnormalnim) parametrima sjemena, odnosno patološkim spermioграмom (N = 84) (Slika 13). Broj ispitanika svake skupine je predviđen analizom statističke snage testa te je prema tome prikupljan navedeni broj. Kako bi se dodatno istražile razlike unutar heterogene skupine ispitanika s patološkim parametrima sjemena, ispitanici su razvrstani u podskupine sukladno vrijednostima koncentracije i pokretljivosti spermija u astenozoospermičnu (N = 29, smanjena ukupna pokretljivost ili progresivna pokretljivost spermija), oligozoospermičnu (N = 21, smanjen broj spermija po ml ili u ukupnom uzorku) i oligoastenozoospermičnu skupinu (N = 34, narušeni parametri broja i pokretljivosti spermija) (Slika 13) (97).



**Slika 13. Shematski prikaz skupina ispitanika nakon spermograma.**

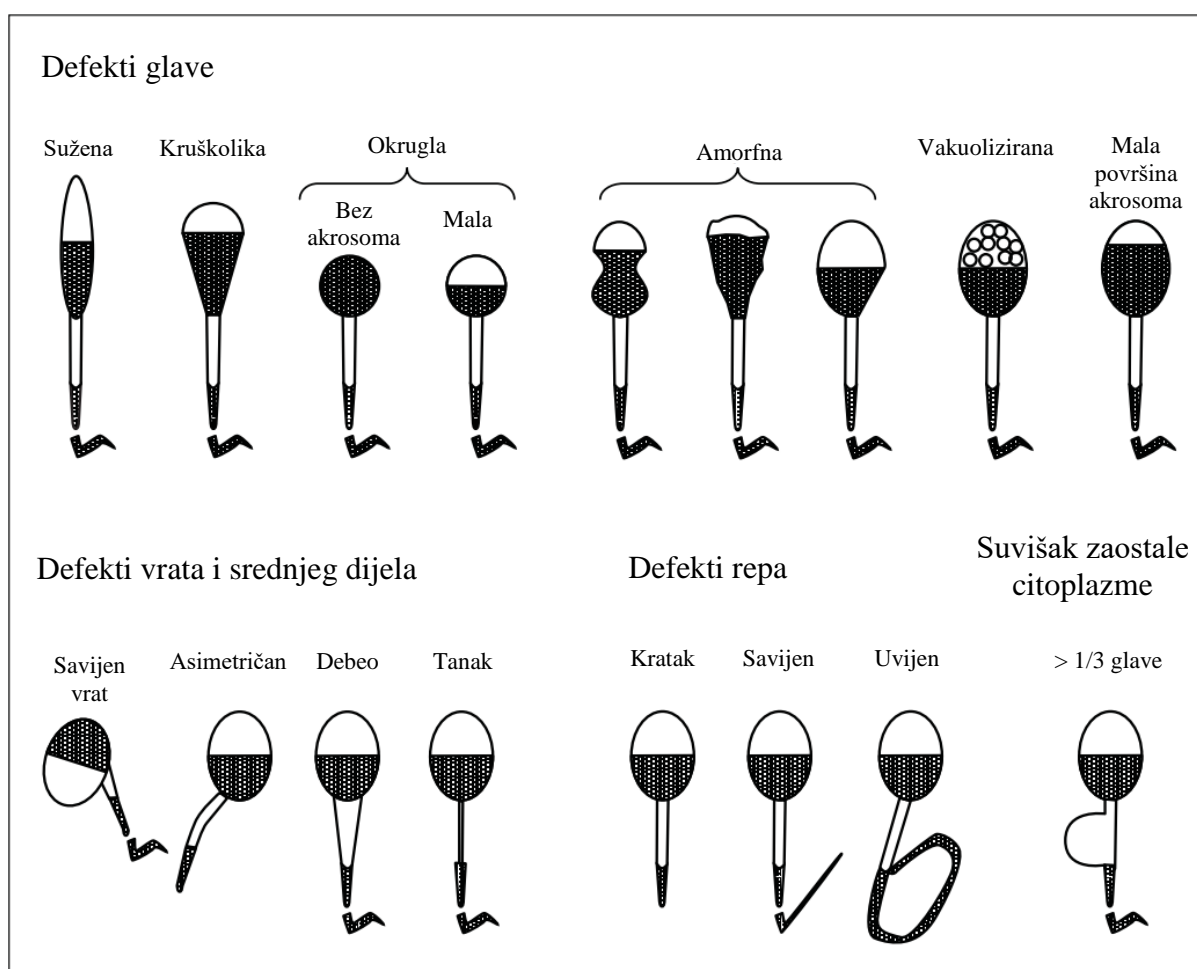
#### **4.2.2. Računalno potpomognuta analiza sjemena**

Nakon procesa likvefakcije, uzorak je dobro resuspendiran te mu je sterilnom špricom izmjeren volumen, dok je iz kapi sjemena izmjeren pH pomoću pH papira. Zatim je 10  $\mu$ L uzorka sjemena prebačeno na Makler komoricu za brojanje spermija (FujiFilm Irvine Scientific, Santa Ana, Kalifornija, SAD) i komorica je postavljena na fazno-kontrastni objektiv svjetlosnog mikroskopa (Zeiss Axio Scope A1, Jena, Njemačka). Provjereno je sadrže li agregirane, aglutinirane ili uništene spermije te druge stanice poput epitelnih i okruglih stanica (leukociti, nezrele spolne stanice).

Klasični parametri sjemena, odnosno koncentracija, pokretljivost i morfologija spermija određeni su pomoću automatiziranog SCA<sup>®</sup> sustava (Sperm Class Analyser, CASA System, Microptic SL, Barcelona, Španjolska). Podaci o koncentraciji i pokretljivosti su dobiveni koristeći modul *Motility* u programu *SCA evolution* (Microptic SL, Barcelona, Španjolska). Koncentracija je određena kao broj spermija po mL te kao ukupni broj spermija u ejakulatu. Pokretljivost je određena kao postotak spermija u uzorku koji se kreću brzo ili srednje progresivno, što znači aktivno kretanje u krug ili linearno; ne-progresivno - što se odnosi na kretanje koje nije aktivno poput kretanje u malim krugovima ili samo micanje repa; te potpuno nepokretni spermiji. Za određivanje morfologije, načinjeni su razmazi spermija dodatkom 10  $\mu$ L sjemena na predmetno stakalce, razmazi su osušeni na zraku i fiksirani 5 min na sobnoj temperaturi u metanolu. Nakon toga su uzorci inkubirani 20 min pri sobnoj temperaturi Giemsa

bojom koja se sastoji od boja metilen plavo, azuro i eozina te pokriveni pokrovnim medijem (Eukitt®, PanReac AppliChem, Darmstadt, Njemačka).

Morfologija je analizirana pomoću modula *Morphology* u programu *SCA evolution*. Spermijima pravilne morfologije se smatraju oni koji imaju jajoliku ovalnu glavu s dobro definiranim akrosomom koji zauzima 40 – 70 % glave, ako nema defekta vrata, srednjeg dijela i repa. Glava ne smije sadržavati velike vakuole i više od dvije male vakuole koje okupiraju najviše 20 % glave. Također, dimenzije glave koje uključuju duljinu 4 – 5 μm, promjer 2,5 – 3,5 μm, srednji dio duljine 7 – 8 μm i rep duljine 45 μm. Svi ostali spermiji su smatrani onima nepravilne morfologije (Slika 14).

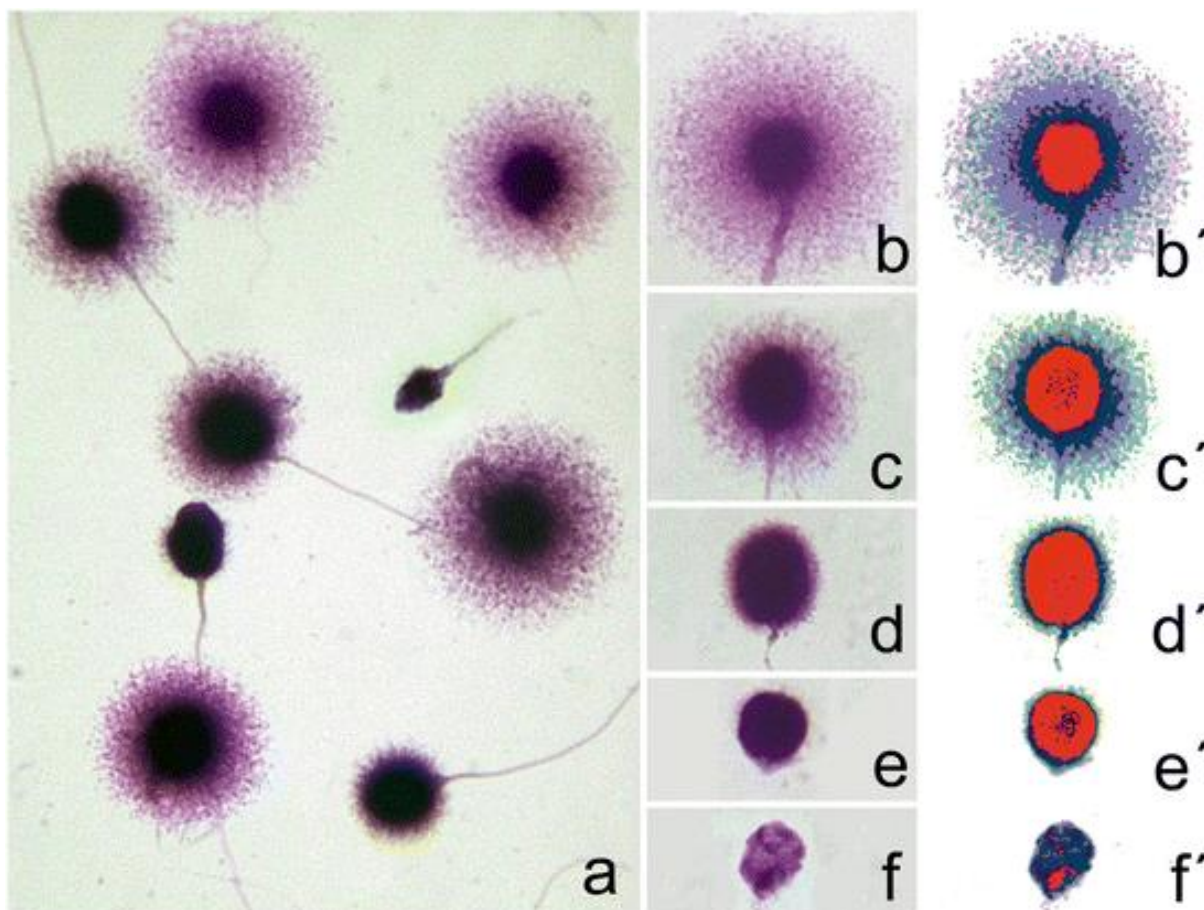


**Slika 14. Najčešći defekti glave, vrata, srednjeg dijela i repa te zaostale citoplazme spermija tijekom analize morfologije.** (Preuzeto: *World Health Organization laboratory manual for the examination and processing of human semen*, World Health Organization, 2010 (97))

### 4.2.3. Test fragmentacije DNA spermija

Postotak fragmentacije DNA spermija (engl. *Sperm DNA fragmentation*, SDF) određen je pomoću testa kromatinske disperzije spermija (engl. *Sperm chromatin dispersion*, SCD; GoldCyto Sperm<sup>®</sup> Kit, Goldcyto Biotech Corp., Guangzhou, China). Ovaj test se temelji na principu da se nakon koraka denaturacije spermija i uklanjanja jezgrenih proteina, neoštećena DNA proširi, dok fragmentirana DNA ne. Drugim riječima, neoštećena DNA se raspršuje, tj. dispergira i tvori takozvane aureole oko glave spermija koje su zapravo omče DNA (179) dok se oštećena DNA ne može raspršiti. Za potrebe ovog testa početni uzorci su razrijeđeni fosfatnim puferom (engl. *phosphate-buffered saline*, PBS) na koncentraciju 5 milijuna spermija po mL, ako je određena koncentracija spermija po mL bila veća od navedenog broja. Ukoliko je koncentracija bila manja, uzorak je korišten izravno, bez razrjeđivanja. Agarozna u tubicama je otopljena 5 min na 95 °C te ohlađena 5 min na 37 °C. Zatim je 30 µL uzorka pomiješano s otopljenom agarozom i 20 µL mješavine je dodano na predmetna stakalca na stranu koju je odredio proizvođač. Uzorak je potom poklopljen pokrovnim stakalcem te postavljen na prethodno ohlađenu staklenu ploču i inkubiran 10 min na +4 °C. Tijekom cijelog procesa predmetno stakalce se drži u horizontalnom smjeru. Nakon skrutnjavanja uzorka u agarozu, pokrovno stakalce je uklonjeno te inkubirano kiselom denaturacijskom otopinom 7 min. Nakon toga je dodana denaturacijska otopina kojom je inkubiran uzorak 25 min na sobnoj temperaturi. Predmetna stakalca su potom isprana destiliranom vodom 5 min te je uzorak fiksiran u nizu etanola od 70 %, 90 % i 100 %, u svakoj otopini 2 min pri sobnoj temperaturi. Nakon toga, uzorak je osušen 15 min na zraku te je tretiran komercijalnom otopinom *TA* (GoldCyto Sperm<sup>®</sup> Kit, Goldcyto Biotech Corp., Guangzhou, China), 500 µL, 1 min pri sobnoj temperaturi. Zatim je izravno na uzorak dodano 1500 µL komercijalne otopine *TB* (GoldCyto Sperm<sup>®</sup> Kit, Goldcyto Biotech Corp., Guangzhou, China), lagano promiješano i inkubirano dodatnih 10 min pri sobnoj temperaturi. Uzorak je ispran u horizontalnom položaju vodom iz slavine te ponovno osušen.

Postotak SDF je određen pomoću modula *DNA fragmentation* u programu *SCA evolution* na sustavu CASA te je prikazan u obliku indeksa DNA fragmentacije (engl. *DNA fragmentation index*, DFI). Za svaki uzorak analizirano je 30 vidnih polja nasumično po uzorku. Budući da je riječ o testu kromatinske disperzije spermija, oni spermiji čija DNA nije fragmentirana će imati veću aureolu oko predjela glave, dok oni koji jesu će imati malu aureolu ili je neće uopće imati (Slika 15) (180).

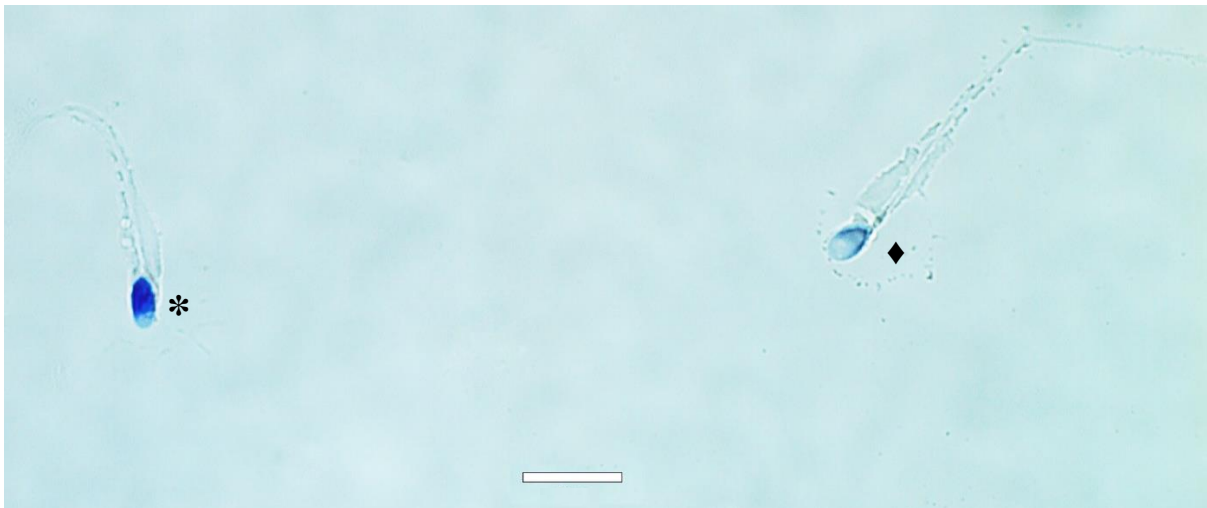


**Slika 15. Prikaz spermija nakon testa fragmentacije DNA.** A) spermiji različitog stupnja fragmentacije u uzorku, B) Spermij s velikom aureolom i C) spermij sa srednjom aureolom nemaju fragmentiranu DNA. D) spermij s malom aureolom, E) spermij bez aureole i F) spermij s degradiranom glavom se smatraju fragmentiranim. (Preuzeto: Johnston i sur. Springer Link, 2018 (181))

#### 4.2.4. Test bojanja anilin-plavim

Procjena sažimanja, odnosno kondenzacije kromatina spermija određena je bojanjem spermija kiselim bojom anilin-plavo (engl. *aniline blue*, AB). Boja AB se veže na preostale histone u spermijima, daje plavo obojenje koje ukazuje izravno na zaostale histone i neizravno na nepotpunu spermiogenezu, smanjenu količinu protamina te nepotpuno kondenzirani kromatin (Slika 16) (182). Za potrebe ove metode uzorci sjemena su razrijeđeni na koncentraciju 10 milijuna po mL u puferu PBS, ako je u uzorku bila veća koncentracija. Zatim je načinjen razmaz na predmetnom stakalcu od 20  $\mu$ L spermija i osušen na zraku pri sobnoj temperaturi. Razmazi su nakon toga fiksirani 30 min u 3 %-tnom glutaraldehidu (Merck, Kenilworth, New Jersey, SAD) razrijeđenom u PBS-u (pH = 7,4), sobna temperatura. Nakon fiksacije, stakalca s razmazima su isprana 10 min na tresilici u PBS-u, 10 min na tresilici u destiliranoj vodi te

osušena na zraku pri sobnoj temperaturi. Stakalca su potom uronjena u 5 %-tnu vodenu otopinu boje anilin-plavo u 4 %-tnoj otopini octene kiseline (pH 3,5), 5 min pri sobnoj temperaturi, nakon čega su osušena na zraku i pokrivena pokrovnim stakalcem i pokrovnim medijem (Eukitt<sup>®</sup>, PanReac AppliChem, Darmstadt, Njemačka). Stakalca su analizirana svjetlosnim mikroskopom (Olympus CX 41, Olympus, Tokio, Japan) pri povećanju x100 korištenjem anisola kao imerzijskog sredstva. Za svaki uzorak, 100 – 120 spermija na nasumičnim vidnim poljima je izbrojano kao obojeno (plavo) ili neobojeno (prozirno, svjetlo-plavo) (Slika 16). Obojeni spermiji su analizirani kao spermiji s neispravno sažetim, tj. kondenziranim kromatinom zbog povećanog udjela preostalih obojenih histona, a blago obojeni i neobojeni spermiji kao oni s ispravno sažetim kromatinom, bez viška histona zaostalih nakon spermiogeneze (182).



**Slika 16. Mikroskopska snimka uzorka spermija nakon bojenja bojom AB.** Primjer tamno-plavo obojenog spermija koji sadrži zaostale histone i ima smanjenu kondenzaciju kromatina (\*), a blago obojeni/neobojeni spermij pokazuje kondenzirani kromatin, bez suviška zaostalih histona (◆). Povećanje x1000, skala pokazuje 10  $\mu$ m.

#### 4.2.5. Odvajanje staničnog dijela sjemena od sjemene plazme

Sjemena plazma je odvojena od staničnog dijela sjemena procesom centrifugiranja. Preciznije, uzorci likvefakiranog sjemena su resuspendirani nakon odvajanja dijela uzorka za spermigram, test fragmentacije DNA spermija i bojanja anilin-plavim te podijeljeni u mikrotubice od 1,5 mL. Potom su uzorci centrifugirani 10 min na 650 rpm na sobnoj

temperaturi, nakon čega je odvojen supernatant plazme od taloga i još jednom centrifugiran na 3550 rpm pri sobnoj temperaturi. Ponovno je u sterilnu mikrotubicu od 1,5 mL odvojen supernatant u kojem se nalazi sjemena plazma bez staničnog dijela koji je zaostao u talogu. Sjemena plazma je pohranjena na -80 °C do daljnjeg korištenja.

#### **4.2.6. Izolacija N-glikana iz ukupnih proteina sjemene plazme**

Za izolaciju N-glikana iz ukupnih proteina, uzorci sjemene plazme su odležani na sobnoj temperaturi i kratko su centrifugirani pri niskoj brzini okretaja. Za potrebe ove analize također je pripremljen kućni standard tako da je pomiješano 5 µL svakog uzorka sjemene plazme zajedno. Ovaj standard je korišten kao unutrašnja kontrola kroz cijeli proces pripreme i analize uzoraka sjemene plazme te za određivanje strukture specifičnih N-glikanskih pikova.

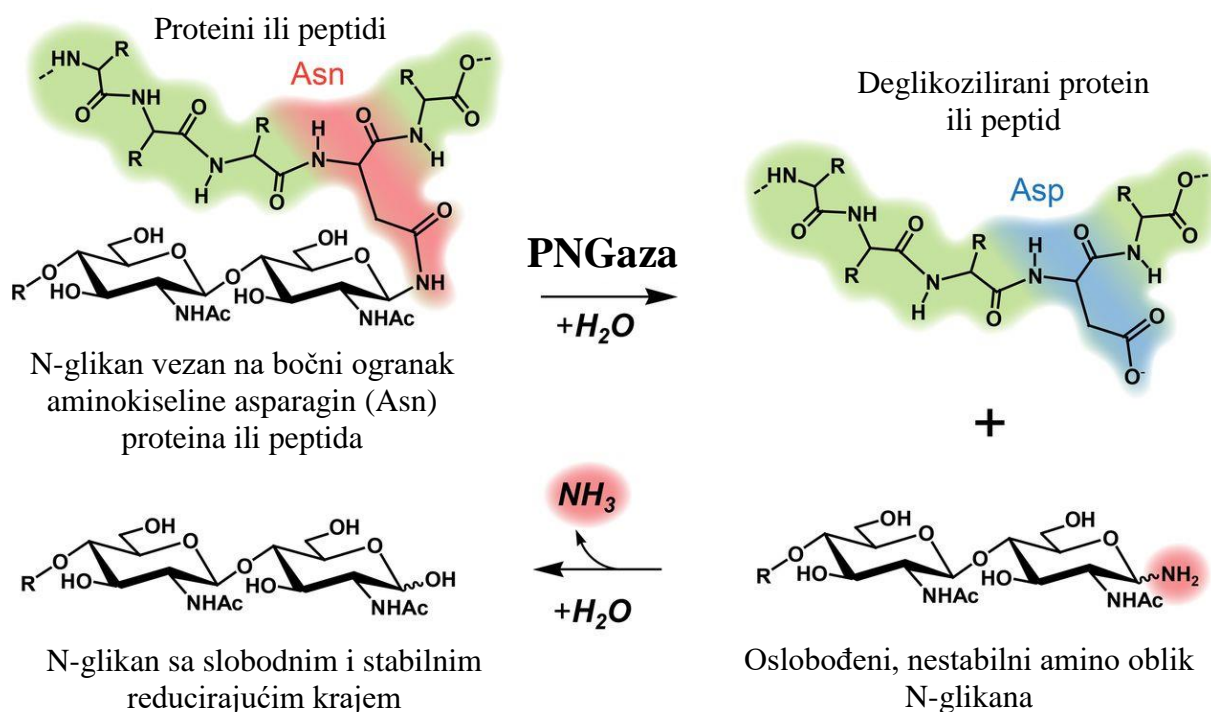
##### **4.2.6.1. Ispiranje slobodnih N-glikana sjemene plazme**

Protokol ispiranja, denaturacije, označavanja ispiranja, čišćenja i detekcije N-glikana ukupnih proteina sjemene plazme je uspostavljen i optimiziran za potrebe ovog istraživačkog rada. Temelji se na prethodnim analizama N-glikana imunoglobulina G iz uzoraka krvne plazme ili seruma (183).

Uzorci sjemene plazme svakog ispitanika su nasumično raspoređeni po ploči s 96 jažica, 5 µL uzorka po jažici. Nakon toga dodano je 200 µL *Cromabond* ugljikovih C-18 zrnaca (Marcherey-Nagel, Düren, Njemačka), koncentracije 50 mg mL<sup>-1</sup>, u otopini acetonitrila (ACN, Carlo Erba, Cornaredo, Italija) i 0,1 %-tne trifluoroctene kiseline (engl. *trifluoroacetic acid*, TFA, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD) u omjeru 80:20 u *Orochem* ploču (Orochem, Naperville, Illinois, SAD). Zrnca C-18 su potom isprana pomoću vakuum pumpe (Pall Corporation, New York, SAD), dodatno isprana tri puta s 200 µL ACN/0,1 % TFA u omjeru 80:20 te još dodatno tri puta s 200 µL ACN/0,1 % TFA u omjeru 5:95. Uzorci su razrijeđeni s 45 µL otopine ACN/0,1 % TFA u omjeru 5:95, prebačeni na ploču te je potom na njih dodano još 150 µL otopine ACN/0,1 % TFA (5:95). Zatim su uzorci inkubirani 2 min i centrifugirani 5 min na brzini koja se povećavala na 300, 400, 500, 600 i 800 rpm svaku minutu (centrifuge 5804 with a rotor A-2-DWP, Eppendorf, Hamburg, Njemačka) čime su isprani zaostali slobodni glikani iz otopine.

#### 4.2.6.2. Denaturacija glikoproteina i oslobađanje N-glikana

Nakon ispiranja slobodnih glikana, eluirani su glikoproteini sa zrnaca C-18. U svaku jažicu *Orochem* ploče dodano je 200  $\mu\text{L}$  80 %-tne otopine ACN-a, uzorci su inkubirani 2 min te su centrifugirani 5 min na 1000 rpm. Eluirani glikoproteini tijekom centrifugiranja su skupljeni u ploču za PCR (engl. *polymerase chain reaction*, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD) te osušeni preko noći na 37 °C. Idući dan, glikoproteini su denaturirani dodatkom 30  $\mu\text{L}$ , 1,33 %-tne otopine natrijevog dodecil-sulfata (engl. *sodium dodecyl sulfata*, SDS, Carl Roth, Karlsruhe, Njemačka) i inkubirani 10 min na 65 °C. Potom su uzorci tretirani 4 %-tnom otopinom neionizirajućim i ne-denaturirajućim deterdžentom Igepal-om CA-630 (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD), 10  $\mu\text{L}$ , 30 min, sobna temperatura. Na uzorke je zatim dodan enzim PNGaza F (Promega, Madison, Wisconsin, SAD), koji cijepa vezu N-acetilglukozaminoglikana i aminokiseline Asn na glikoproteinima (Slika 17). U svaku jažicu dodano je potom 1,25 mU enzima, pomiješanog s 10  $\mu\text{L}$  5 x koncentriranog PBS-a ( $c(\text{NaCl}) = 685 \text{ mmol L}^{-1}$ ,  $c(\text{KCl}) = 13,5 \text{ mmol L}^{-1}$ ,  $c(\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 50 \text{ mmol L}^{-1}$ ,  $c(\text{KH}_2\text{PO}_4) = 9 \text{ mmol L}^{-1}$ , titriran s NaOH do  $\text{pH} = 7,4$ ) te je takav uzorak inkubiran 18 h na 37 °C.



**Slika 17. Shematski prikaz enzimske reakcije otpuštanja N-glikana s bočnog ogranka aminokiseline asparagina (Asn) glikoproteina pomoću enzima N-glikozidaze F (PNGaza F).** (Preuzeto i prilagođeno: Wang i sur., *Bioscience Reports*, 2014, (184))



#### 4.2.6.3. Označavanje oslobođenih N-glikana s glikoproteina

N-glikani oslobođeni s glikoproteina su nakon inkubacije označeni s 25  $\mu$ L otopine prokainamida (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD), koja sadrži 4,32 mg prokainamida otopljenih u ledenoj octenoj kiselini (Honeywell, Charlotte, Sjeverna Karolina, SAD) i dimetilsulfoksidu (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD), u omjeru 30:70, po uzorku. Ploča s uzorcima je potom zatvorena s prijanjajućom folijom i inkubirana 1 h na 65 °C. Napravljena je otopina s reducirajućim agensom tako da je otopljeno 4,48 mg agensa 2-pikolin borana (J&K Scientific, Peking, Kina) u 25  $\mu$ L otopine ledene octene kiseline i dimetilsulfoksida (DMSO) u omjeru 30:70 po uzorku. Reducirajuća otopina je dodana na sve uzorke i inkubirana dodatnih 1,5 h na 65 °C. Uzorci su potom ohlađeni 30 min na sobnoj temperaturi.

#### 4.2.6.4. Ispiranje i čišćenje slobodnih N-glikana izoliranih s glikoproteina

Označeni N-glikani se potom trebaju isprati od ostatka proteina i reagensa kako bi bili spremni za daljnju analizu, za što se koristio modificirani protokol prema Trbojević-Akmačić i sur. (183). Za tu svrhu, ploča *Supor AcroPrep* s filterima promjera 0,2  $\mu$ m (Pall Corporation, New York, SAD) je korištena kao stacionarna faza. Prije izolacije isprana je s 200  $\mu$ L otopine 70 %-tnog etanola, 200  $\mu$ L ultračiste vode i 200  $\mu$ L otopine 96 %-tnog hladnog ACN-a napravljene u ultračistoj vodi. Nakon dodatka svake otopine, ostatak tekućine je ispran pomoću vakuumske pumpe. Zatim je dodano 700  $\mu$ L hladnog ACN-a u svaki uzorak, sve zajedno je lagano resuspendirano pipetom i pažljivo prebačeno na ploču *Supor AcroPrep*. Prebačeni uzorci su inkubirani 2 min, a ostatak tekućine je odstranjen na vakuum pumpi. Potom je ostatak reagensa na ploči *Supor AcroPrep* ispran četiri puta s 200  $\mu$ L hladne otopine 96 %-tnog ACN-a, nakon svakog puta je zaostala tekućina uklonjena vakuum pumpom. Zatim se ploča *Supor AcroPrep* prebacila na ploču za skupljanje te je još jednom isprana s 200  $\mu$ L 96 %-tnog hladnog ACN-a. Ploče su onda centrifugirane 5 min na 800 rpm te je zaostala tekućina odbačena. Ploča *Supor AcroPrep* je zatim prebačena na čistu ploču za PCR, na svaki uzorak je dodano 100  $\mu$ L ultračiste vode te su ploče inkubirane treskajući se 15 min pri sobnoj temperaturi. Ploče se zatim centrifugiraju 5 min na 800 rpm. Postupak dodavanja ultra-čiste vode, inkubacije i centrifugiranja je još jednom ponovljen. Uzorci su potom zatvoreni kapičama za PCR ploče u linijama i pohranjeni na -20 °C do daljnjih analiza (183).

#### 4.2.7. Detekcija i mjerenje N-glikana

Fluorescentno označeni N-glikani su razdvojeni metodom tekućinske kromatografije temeljene na hidrofilnim interakcijama (engl. *hydrophilic interaction liquid chromatography*, HILIC) na uređaju Waters Acquity na kojem se odvija tekućinska kromatografija ultra-visoke djelotvornosti H-klase (engl. *ultra-high-performance liquid chromatography*, UHPLC, Milford, Massachusetts, SAD). Uređaj se sastoji od modula za upravitelja otapalima (engl. *quaternary solvent manager*, QSM), modula za upravljanje uzorcima (engl. *sample manager*, SM) i fluorescencijskog (FLR) detektora koji ima ekscitacijsku valnu duljinu 310 nm i emisijsku valnu duljinu 370 nm. Uzorci su pripremani miješanjem s acetonitrilom u omjeru uzorak : ACN = 25 : 75, konačnog volumena 50  $\mu\text{L}$  od čega je injektirano 40  $\mu\text{L}$ . Razdvajanje N-glikana je provedeno na 25 °C na koloni *ACQUITY UPLC Glycan BEH Ami: 75de* (Waters, Milford, Massachusetts, SAD) unutarnjeg promjera 2,1 mm, duljine 150 mm, veličine čestica 1,7  $\mu\text{m}$  i veličine pora 130 Å. Odvijalo se pri brzini protoka 0,561 mL min<sup>-1</sup> na temperaturi 10 °C. Pokretnu fazu A činila je otopina amonijevog formata (HCOONH<sub>4</sub>) koncentracije 100 mM i pH 4,4 u vodi, dok je mobilna faza B bila 100 %-tni ACN. Uzorci su eluirani linearnim gradijentom otopine A koji se kreće od 30 %-tne do 47 %-tne otopine preko 23,34 min nakon početnog izokratskog koraka prolaska 30 %-tne otopine A u trajanju od 1,47 min (Tablica 1).

Uređaj i cijeli proces su kontrolirani programom Empower™ 3 (build 3471, Waters, Milford, Massachusetts, SAD). Kalibracija kromatografskog sustava provedena je korištenjem vanjskog standarda hidroliziranih i fluorescentno obilježenih oligomera glukoze, tj. prokainamidom obilježenim dekstranom. Korištena negativna kontrola je sadržavala ultra-čistu vodu i dodatni standard N-glikana imunoglobulina G (IgG) krvne plazme. Budući da je protokol sjemene plazme prvi put uspostavljen, N-glikani su koristili kao otprije poznata pozitivna kontrola cijelog postupka. Vrijeme zadržavanja (engl. *retention time*) glikana su prevedena u glukozne jedinice (engl. *glucose unit*, GU). Podaci su obrađeni koristeći automatsku metodu obrade s tradicionalnim algoritmom za integriranje. Svaki kromatogram je ručno pregledan i prepravljen kako bi se održao isti obrazac integracije u svim uzorcima. Svi kromatogrami N-glikana proteina sjemene plazme su razdvojeni u 37 zasebnih N-glikanskih pikova sjemene plazme (SPGP1 – SPGP37). Vrijednosti N-glikana su izraženi kao postotak ukupne integrirane površine.

**Tablica 1. Gradijent otapala za analizu N-glikana ukupnih proteina sjemene plazme metodom tekućinske kromatografije temeljene na hidrofilnim interakcijama (HILIC-UPLC).**

Vrijeme (min)	Protok (mL min <sup>-1</sup> )	Otapalo A (%)	Otapalo B (%)
00,00	0,561	30	70
1,47	0,561	30	70
24,81	0,561	47	53
25,50	0,250	100	0
27,00	0,250	100	0
28,00	0,250	30	70
31,50	0,561	30	70

#### 4.2.8. Strukturna karakterizacija N-glikana sjemene plazme

Radi strukturne karakterizacije N-glikana eluiranih u specifične N-glikanske pikove, oslobođeni i označeni N-glikani pripremljenih kućnih standarda sjemene plazme su analizirani metodom tekućinske kromatografije spregnutom sa spektrometrijom masa (engl. *liquid chromatography–mass spectrometry*, LC-MS) na uređaju *BioAccord LC-MS System* (Waters, Milford, Massachusetts, SAD). Uvjeti kromatografije su bili isti kao oni opisani u odlomku 4.2.7. Detektor masa RDa je korišten uz elektrosprej ionizaciju u pozitivnom načinu rada. Postavke uređaja su bile iduće: raspon pretraživanja od 50 – 2000  $m/z$ , napon kapilara 1,5 kV, napon konusa 45 V, temperatura desolvatacije 300 °C te stopa uzorkovanja 2 Hz. Dobiveni podaci su automatski procesuirani pomoću programa *UNIFI 1.9.9.3 Scientific Information System*. Podaci nakon LC-MS su preuzeti i dekonvoluirani kao datoteka .csv koja sadrži vrijeme zadržavanja, neutralnu masu i intenzitet. Zbog identifikacije strukture glikana, ukupan spektar masa je dobiven oko vremena zadržavanja odabranih kromatografskih pikova. Anotacije ukupnih spektara masa su određene prema  $m/z$  vrijednostima i zaključene pomoću računalnog programa GlycoMod (<https://web.expasy.org/glycomod/>, pristupljeno 07.07.2021.) (185). Interpretacija i objašnjenje dobivenih struktura, napravljeno je prema prethodno objavljenoj literaturi o strukturama N-glikana sjemene plazme te biosintetskih puteva N-glikana (186).

#### 4.2.9. Statistička analiza

Prikupljeni podaci su prikazani opisnom statistikom. Kategorijske vrijednosti su predstavljene postocima. Kvantitativne varijable su opisane aritmetičkom sredinom i standardnim devijacijama, odnosno medijanom i rasponom. Interval pouzdanosti od 95 % je također prikazan kod dijela analiza. Normalnost raspodjele podataka testirana je Kolmogorov-Smirnovim testom. Razlike između dvije nezavisne skupine, ispitanika normalnih i patoloških parametara sjemena, za kategorijske varijable je određena pomoću dvosmjernog Fisherovog egzaktnog testa ili  $\chi^2$  testa. Procjena kvantitativnih varijabli između normozoospermičnih muškaraca i muškaraca s patološkom dijagnozom napravljena je pomoću neparametrijskog testa Mann-Whitney. Analiza podataka između više skupina, odnosno normozoospermičnih muškaraca i tri patološke podskupine pacijenata – astenozoospermičnih, oligozoospermičnih i oligoastenozoospermičnih, napravljena je pomoću testa Kruskal-Wallis. Za interakciju mjerenih varijabli unutar predmnijevanog sustava (pušenje, alkohol, prehrana, urbano/ruralno područje te fragmentacija DNA, postotak spermija sa sažetim kromatinom i relativne površine N-glikana) korištena je multivarijatna logistička regresija. Model je prilagođen sukladno godinama, postotku spermija s fragmentiranom DNA i sažetim kromatinom. Ovaj statistički model dopustio je procjenu promjene prosječne frekvencije relativne površine N-glikana u svakoj pojedinoj patološkoj podskupini u usporedbi sa skupinom normozoospermičnih pacijenata. Kako bi se provjerilo jesu li pretpostavke logističkog regresijskog modela prekršene, napravljena je analiza rezidualnog naspram postavljenog plota te je napravljen test za heteroskedastičnost. Svih 37 pikova N-glikana proteina sjemene plazme su testirani istovremeno te je stoga korištena Bonferonijeva korekcija za višestruke usporedbe. Utjecaj okolišnih čimbenika na neplodnost određen je stupnjevitom obrnutom analizom. Sve analize su napravljene pomoću programa STATA (StataCorp. 2015. Stata: Release 14.2. Statistical Software, College Station, Teksas, SAD), pri čemu je razina značajnosti iznosila  $p < 0,05$ .

## 5. REZULTATI

### 5.1. Opće karakteristike populacije ispitanika

Istraživanje je provedeno u skladu s Helsinškom deklaracijom, u sklopu projekta „Reproduktivna i regenerativna medicina – istraživanje novih platformi i potencijala“ pod projektnim kodom KK.01.1.1.01. Sudjelovalo je ukupno 166 ispitanika od kojih je 82 dijagnosticirano s normalnim (N) i 84 s patološkim (PAT) parametrima sjemena nakon računalno potpomognute analize sjemena. Ispitanici s patološkim parametrima su smatrani oni kojima je bilo koji od osnovnih parametara sjemena (volumen, koncentracija/broj, pokretljivost, vijabilnost ili morfologija spermija) bila ispod granične vrijednost postavljene prema smjernicama SZO, 2010. godine (97).

U tablici 2 su prikazane opće karakteristike obje populacije ispitanika koje uključuju prosjek godina, indeks tjelesne mase (engl. *body mass index*, BMI), stupanj obrazovanja te postotak ispitanika u partnerstvu ili braku. Skupine ispitanika normalnih i patoloških parametara sjemena ne pokazuju statistički značajnu razliku u godinama kao niti razlike u BMI-ju. Ipak iako vrijednosti BMI-ja kod skupine N (19,79 – 44,98) imaju veću gornju granicu raspona, nego skupina PAT (18,90 – 41,35). Promatrajući obrazovanje, u skupini ispitanika s normalnim parametrima sjemena je veći udio onih koji imaju visoku stručnu i školsku spremu (VSS, VŠS), dok je kod ispitanika s patološkim karakteristikama sjemena veći udio srednje stručne spreme (SSS), iako nema statistički značajnih razlika u stupnju obrazovanja između skupina. Također, nema niti statistički značajne razlike u postotku ispitanika u partnerstvu ili braku između skupina N i PAT (Tablica 2).

**Tablica 2. Značajke ispitanika studije s normalnim (N) i patološkim (PAT) parametrima sjemena.**

P vrijednosti dobivene Mann-Whitney testom za kvantitativne varijable i Fisherovim egzaktnim testom za kategorijske varijable,  $p < 0,05$ , raspon označava minimalnu i maksimalnu vrijednost.

Karakteristika		N (N=82)		PAT (N=84)		p
		Medijan	Raspon	Medijan	Raspon	
Godine		35	19 – 55	36	22 – 54	0,178
BMI/kg m <sup>-2</sup>		26,30	19,79 – 44,98	26,32	18,90 – 41,35	0,754
		%		%		
Obrazovanje	VSS	34,9		32,6		0,686
	VŠS	14,5		9,3		
	SSS	47,0		53,4		
	Ostalo	3,6		4,7		
Partnerstvo/brak		74,7		75,9		1,000

SD – standardna devijacija; VSS – visoka stručna sprema; VŠS – visoka školska sprema;

SSS – srednja stručna sprema

## 5.2. Parametri sjemena ispitanika

Prije uključivanja u studiju, nije bio poznat status plodnosti ispitanika, čime se osigurala neselektivnost i nasumičnost pri uključivanju u studiju. Pomoću sustava CASA određeni su klasični parametri sjemena koji obuhvaćaju volumen uzorka, koncentraciju i broj, pokretljivosti i udio spermija ispravne morfologije (Tablica 3). Nakon analize, ispitanici su podijeljeni u dvije skupine sukladno graničnim vrijednostima parametara sjemena prema smjernicama SZO iz 2010. godine: oni s normalnim, normozoospermični (N) i patološkim (PAT) parametrima sjemena (97). Prosječni volumen uzorka nije se statistički značajno razlikovao između skupina ( $p=0,269$ ). Očekivano, parametri sjemena su bili statistički značajno različiti između skupine N i PAT, uključujući koncentraciju spermija, ukupan broj spermija u uzorku, pokretljivost spermija razvrstanu u brzo, srednje, neprogresivno pokretljive te nepokretne spermije, udio vitalnih spermija te udio spermija pravilne morfologije ( $p < 0,001$ ).

**Tablica 3. Kliničke značajke analize sjemena ispitanika s normalnim (N) i patološkim (PAT) parametrima sjemena.** P-vrijednosti su određene pomoću testa *Mann-Whitney*,  $p < 0,05$ .

	N (N=82)		PAT (N=84)		P
	$\bar{X}$	SD	$\bar{X}$	SD	
Koncentracija spermija ( $10^6/\text{mL}$ )	59,1	29,0	33,4	92,9	<0,001
Ukupan broj spermija ( $10^6/\text{uzorak}$ )	188,3	116,1	72,4	115,4	<0,001
Volumen (mL)	3,3	1,3	3,2	1,8	0,269
Brzo progresivni spermiji (%)	15,7	7,2	8,6	7,7	<0,001
Srednje progresivni spermiji (%)	35,7	11,1	17,1	11,0	<0,001
Ne-progresivni spermiji (%)	16,1	4,9	13,1	7,4	0,004
Ukupno pokretni spermiji (%)	67,4	10,8	37,9	16,8	<0,001
Nepokretni spermiji (%)	32,7	11,0	62,1	16,8	<0,001
Pravilna morfologija (%)	9,8	4,0	6,6	4,2	<0,001
Vitalnost spermija (%)	74,4	8,7	52,4	16,3	<0,001

$\bar{X}$  – aritmetička sredina; SD – standardna devijacija

Nadalje, ispitanici s patološkim parametrima sjemena su dodatno razvrstani u podskupine sukladno broju i pokretljivosti spermija u ejakulatu kako bi se ispitale razlike među pojedinim dijagnozama. Podskupine uključuju astenozoospermiju (A), oligozoospermiju (O) i oligoastenozoospermiju (OA). Analiza razlike u parametrima sjemena između podskupina prikazana je u tablici 4.

Volumen uzorka ponovno nije pokazao značajne razlike parametara sjemena između svih podskupina, dok ostali parametri jesu. Očekivano parametri broja spermija, koncentracija po mL i ukupan broj u uzorku su značajno manji u O i OA podskupinama, dok su parametri pokretljivosti značajno smanjeni u A i OA podskupinama. Postotak spermija ispravne morfologije značajno se smanjuje od N do A, O do najteže od dijagnoza OA (Tablica 4). Udio vitalnih spermija se također značajno razlikuje među normozoospermičnim ispitanicima i ostalim podskupinama. Tako najmanji udio imaju ispitanici u podskupini OA, zatim u A, dok je postotak vitalnih spermija u podskupini O bliži vrijednostima u normozoospermičnoj skupini normalnih parametara sjemena (Tablica 4).

**Tablica 4. Kliničke značajke analize sjemena ispitanika s normalnim (N) i patološkim (PAT) parametrima sjemena svrstanih u astenozoospermične (A), oligozoospermične (O) i oligoastenozoospermične (OA) podskupine.** P-vrijednosti su određene pomoću testa *Kruskal-Wallis*,  $p < 0,05$ .

	N (N=82)		A (N=29)		O (N=21)		OA (N=34)		P
	$\bar{X}$	SD	$\bar{X}$	SD	$\bar{X}$	SD	$\bar{X}$	SD	
Koncentracija spermija ( $10^6/\text{mL}$ )	59,1	29,0	52,7	29,8	12,1	10,6	30,2	142,3	<0,001
Ukupan broj spermija ( $10^6/\text{uzorak}$ )	188,3	116,1	165,1	158,4	26,3	19,2	21,8	21,2	<0,001
Volumen (mL)	3,3	1,3	3,0	1,3	2,7	1,4	3,7	2,2	0,229
Brzo progresivni spermiji (%)	15,7	7,2	6,1	5,0	15,8	8,8	6,3	6,2	<0,001
Srednje progresivni spermiji (%)	35,7	11,1	14,3	6,3	30,8	9,5	10,8	6,9	<0,001
Ne-progresivni spermiji (%)	16,1	4,9	16,2	5,7	12,2	6,1	10,8	8,5	<0,001
Ukupno pokretni spermiji (%)	67,4	10,8	36,5	10,6	58,2	9,7	26,6	12,7	<0,001
Nepokretni spermiji (%)	32,7	11,0	63,5	10,6	41,8	9,7	73,4	12,7	<0,001
Pravilna morfologija (%)	9,8	4,0	7,0	4,3	6,6	3,7	6,1	4,5	<0,001
Vitalnost spermija (%)	74,4	8,7	51,4	11,3	67,6	10,2	41,0	17,1	<0,001

$\bar{X}$  – aritmetička sredina; SD – standardna devijacija

### 5.3. Fragmentacija DNA spermija

Fragmentacija DNA spermija (SDF) određena je metodom kromatinske disperzije spermija i analizirana na sustavu CASA. Potom su statistički analizirane razlike SDF-a između N i PAT skupine (Tablica 5) kao i između N te podskupina astenozoospermija (A), oligozoospermija (O) i oligoastenozoospermija (OA) (Tablica 6). U ovoj analizi, promatrani su detaljniji parametri fragmentiranih spermija koji poboljšavaju preciznost interpretacije rezultata SDF-a. Parametri dijele spermije na ispravne, odnosno one s nefragmentiranom DNA koji imaju veliku i srednju aureolu oko glave. S druge strane, karakteristike spermija s fragmentiranom DNA su



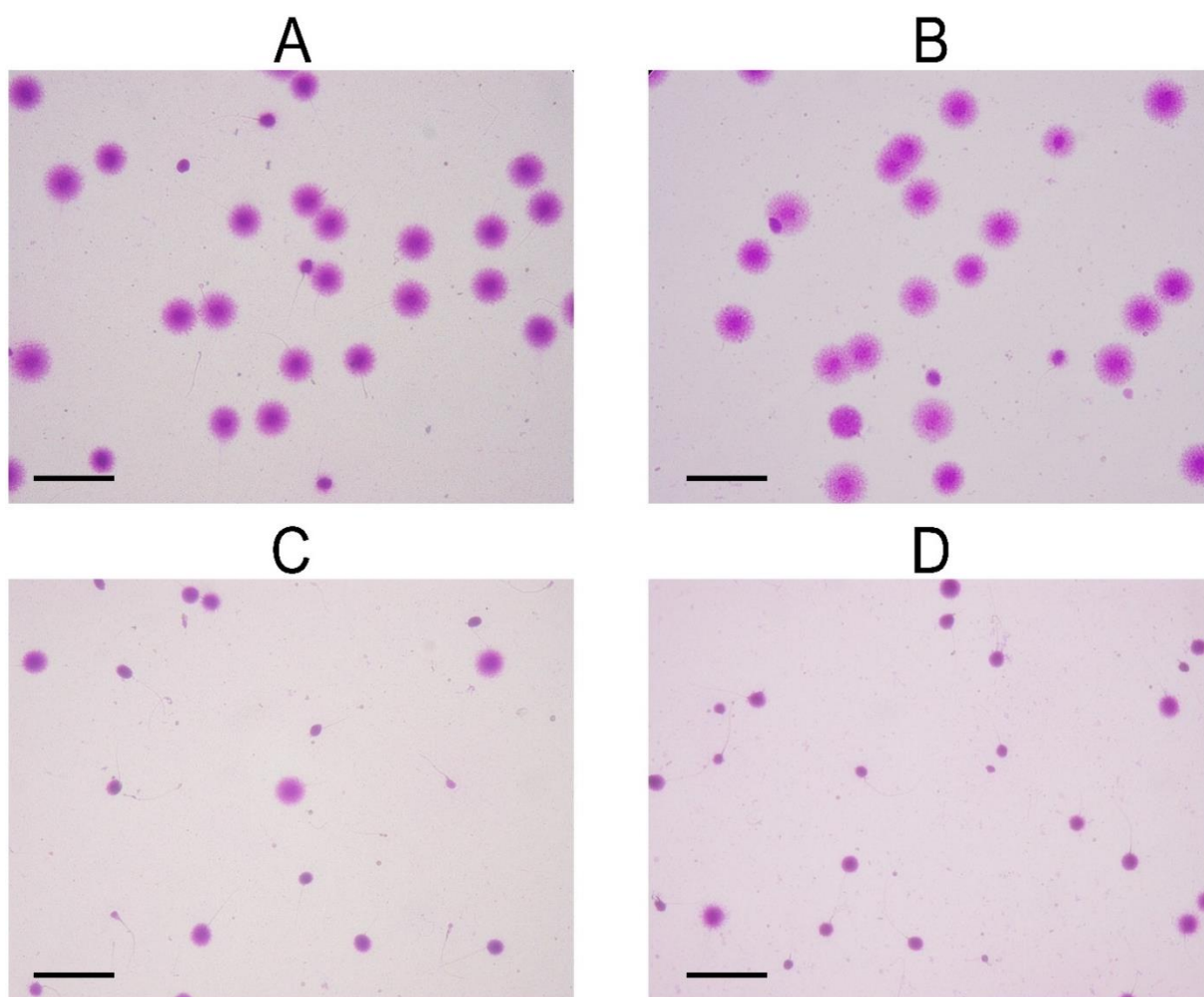
mala aureola oko glave, bez aureole ili spermiji s degradiranom glavom (180). Svi oblici su prikazani u odjeljku Materijali i metode, Slika 14.

Statistički značajna razlika DFI uočena je već kod osnovne raspodijele na N i PAT (Slika 18), koja je vidljiva u značajno većem udjelu spermija s velikom aureolom te manjem udjelu onih bez aureole kod ispitanika s normalnim parametrima sjemena, N ( $p < 0,001$ ).

**Tablica 5. Usporedba fragmentacije DNA spermija ispitanika s normalnim (N) i patološkim (PAT) parametrima sjemena.** P-vrijednosti su određene pomoću testa *Mann-Whitney*,  $p < 0,05$ .

	N (N=82)		PAT (N=84)		p
	$\bar{X}$	SD	$\bar{X}$	SD	
DFI (%)	17,8	9,2	30,7	17,5	<0,001
Velika aureola (%)	58,1	18,7	42,1	20,3	<0,001
Srednja aureola (%)	24,1	15,4	27,4	12,3	0,010
Mala aureola (%)	3,6	2,1	5,4	5,3	0,019
Bez aureole (%)	13,6	8,4	24,7	14,2	<0,001
Degradirani spermiji (%)	0,6	0,8	0,6	0,8	0,421

$\bar{X}$  – aritmetička sredina; SD – standardna devijacija; DFI – razina fragmentacije DNA (engl. *DNA fragmentation index*)



**Slika 18. Vizualizacija spermija svjetlosnim mikroskopom nakon testa kromatinske disperzije spermija za određivanje fragmentacije DNA.** A, B) Spermiji kod ispitanika čija DNA nije fragmentirana te C, D) spermiji ispitanika čija DNA je značajno fragmentirana. Povećanje x400, skala pokazuje 20  $\mu$ m. (Preuzeto iz: *Maric i sur. Life, 2021 (187)*)

Što se tiče razlike DFI kod podskupina ispitanika abnormalnih (patoloških) parametara sjemena, uočena je statistički značajna razlika između vrijednosti skupine N te A, O i OA kojoj su najviše pridonosile skupine narušene pokretljivosti i broja OA te narušene pokretljivosti A (Tablica 6). Shodno tomu, najmanji udio spermija s velikom aureolom ( $p < 0,001$ ) te najveći udio spermija bez aureole ( $p < 0,001$ ) ili s malom aureolom ( $p < 0,005$ ) je imala podskupina OA. Spermiji s velikom aureolom su podjednako bili zastupljeni kod A ( $49,3 \pm 20,4$ ) i O ( $49,6 \pm 15,8$ ) podskupine, gdje su ispitanici u skupini A imali statistički značajno veći udio spermija bez aureole ( $22,1 \pm 12,2$ ), a O skupina veći udio spermija sa srednjom aureolom ( $28,8 \pm 12,5$ ). Nije uočena statistički značajna razlika u skupinama za potpuno degradirane spermije.

**Tablica 6. Usporedba fragmentacije DNA spermija ispitanika s normalnim (N) i patološkim (PAT) parametrima sjemena svrstanih u astenozoospermične (A), oligozoospermične (O) i oligoastenozoospermične (OA) podskupine.** P-vrijednosti su određene pomoću testa *Kruskal-Wallis*,  $p < 0,05$ .

	N (N=82)		A (N=29)		O (N=21)		OA (N=34)		p
	$\bar{X}$	SD	$\bar{X}$	SD	$\bar{X}$	SD	$\bar{X}$	SD	
DFI (%)	17,8	9,2	27,6	15,3	21,6	7,2	38,9	20,3	<0,001
Velika aureola (%)	58,1	18,7	49,3	20,4	49,6	15,8	31,3	18,3	<0,001
Srednja aureola (%)	24,1	15,4	23,5	10,3	28,8	12,5	29,8	13,3	0,019
Mala aureola (%)	3,6	2,1	4,9	4,6	3,6	2,0	7,1	6,6	0,005
Bez aureole (%)	13,6	8,4	22,1	12,2	17,7	6,3	31,1	16,7	<0,001
Degradirani spermiji (%)	0,6	0,8	0,7	0,8	0,3	0,4	0,7	1,0	0,164

$\bar{X}$  – aritmetička sredina; SD – standardna devijacija; DFI – indeks fragmentacije DNA (engl. *DNA fragmentation index*)

#### 5.4. Sažimanje kromatina spermija

Bojanjem anilin-plavim određen je postotak spermija koji su pravilno sazreli odnosno imaju pravilno sažet (kondenziran) kromatin. Intenzivno plavo obojenje upućuje na boju vezanu na suvišak histona zaostalih nakon procesa spermiogeneze. Blago plavo obojenje i ne postojanje obojenja znači da je u uzorku prisutan manji udio histona (Slika 19) (106). Statistički značajna razlika nije pronađena između skupina N i PAT (Tablica 7). Nadalje, analizom razlika skupine s normalnim i podskupina narušenih parametra spermija A, O i OA ponovno nisu pronađene statistički značajna odstupanja među njima (Tablica 8).

**Tablica 7. Usporedba stupnja sažimanja kromatina spermija ispitanika s normalnim (N) i patološkim parametrima (PAT) sjemena.** P-vrijednosti su određene pomoću testa *Mann-Whitney*,  $p < 0,05$ .

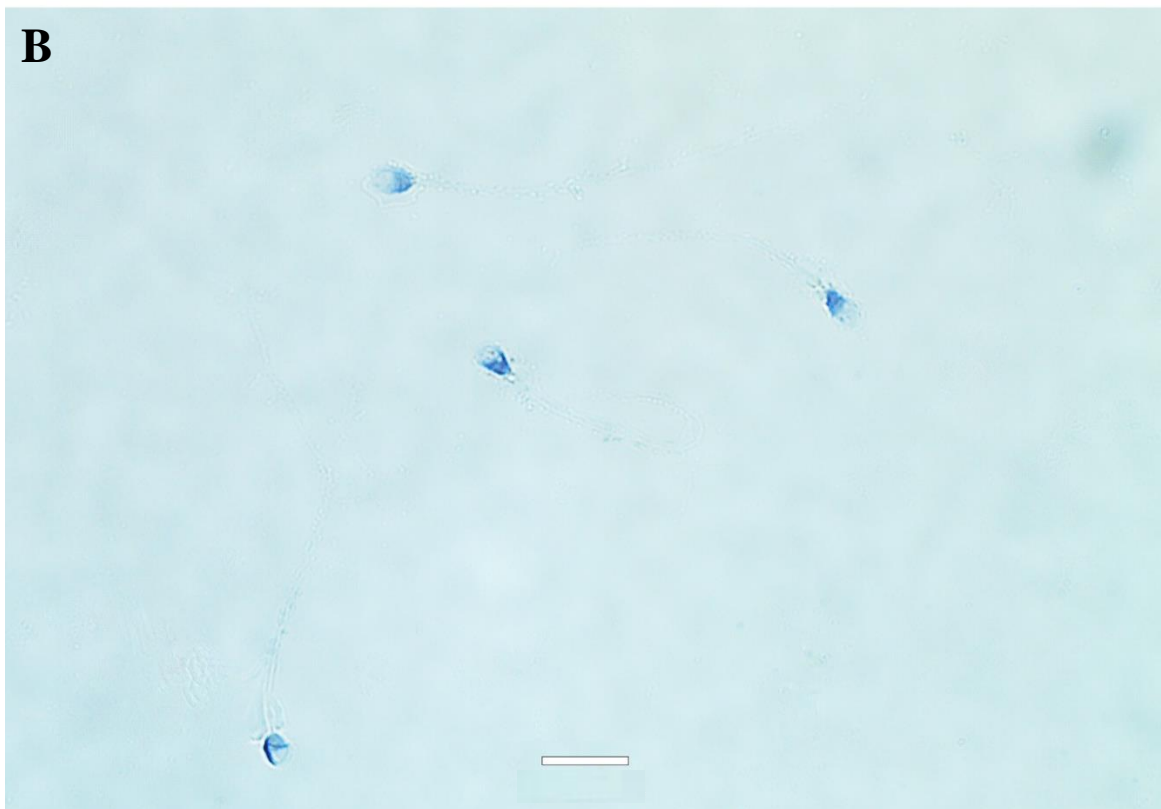
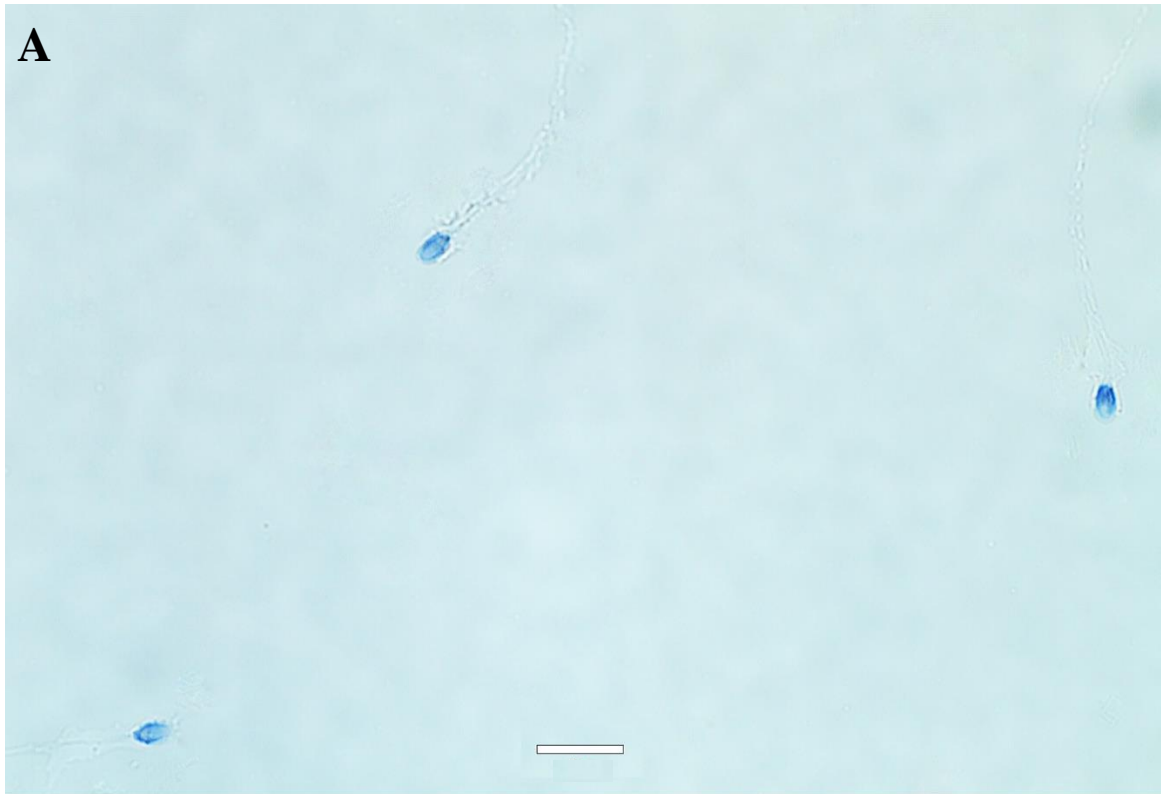
	N (N=82)		PAT (N=84)		p
	$\bar{X}$	SD	$\bar{X}$	SD	
Stupanj sažimanja kromatina spermija (%)	94,5	4,8	95,4	4,1	0,197

$\bar{X}$  – aritmetička sredina; SD – standardna devijacija

**Tablica 8. Usporedba stupnja sažimanja kromatina spermija ispitanika s normalnim (N) i patološkim parametrima (PAT) sjemena svrstanih u astenozoospermične (A), oligozoospermične (O) i oligoastenozoospermične (OA) podskupine. P-vrijednosti su određene pomoću testa *Kruskal-Wallis*,  $p < 0,05$ .**

	N (N=82)		A (N=29)		O (N=21)		OA (N=34)		P
	$\bar{X}$	SD	$\bar{X}$	SD	$\bar{X}$	SD	$\bar{X}$	SD	
Sažimanje kromatina spermija (%)	94,5	4,8	94,7	4,0	96,2	4,6	95,5	3,8	0,216

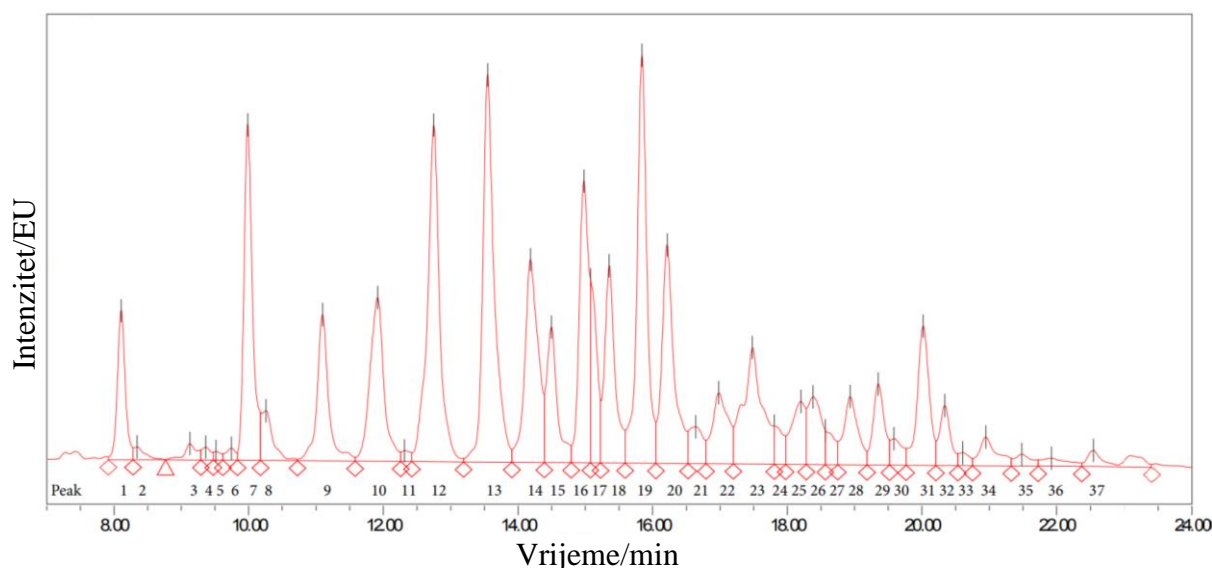
$\bar{X}$  – aritmetička sredina; SD – standardna devijacija



**Slika 19. Vizualizacija spermija svjetlosnim mikroskopom nakon bojenja anilin plavim za određivanje stupnja sažimanja kromatina spermija. Reprezentativni prikaz A) spermija normozoospermičnog ispitanika B) spermija ispitanika patoloških parametara sjemena. Povećanje x1000, skala pokazuje 10  $\mu\text{m}$ .**

## 5.5. N-glikani sjemene plazme

U svrhu otkrivanja specifičnih N-glikanskih obrazaca ukupnih proteina sjemene plazme, optimizirana i provedena je metoda otpuštanja N-glikana s glikoproteina sjemene plazme, obilježavanja, pročišćavanja i profiliranja metodom tekućinske kromatografije HILIC-UPLC. Budući da su pikovi porijeklom iz sjemene plazme, ne mogu se korelirati s N-glikanima drugih proteina ili tjelesnih tekućina, stoga će nadalje biti označeni kraticom SPGP (engl. *seminal plasma glycan peaks*). N-glikani su manualno integrirani čime je dobiveno 37 individualnih glikanskih pikova, SPGP1 – SPGP37, a reprezentativni prikaz kromatograma je na slici 20. Vrijednosti SPGP-a izražene su kao postotak (udio) relativne površine pojedinog pika.



**Slika 20. Reprezentativni prikaz kromatograma N-glikana izoliranih s ukupnih proteina sjemene plazme.** Kromatogram je dobiven nakon provedbe tekućinske kromatografije ultra visoke djelotvornosti, temeljenoj na hidrofilnim interakcijama (HILIC-UPLC), sastoji se od 37 individualnih N-glikanskih pikova čiji intenzitet je prikazan u jedinicama EU (engl. *emission units*).

Usporedbom vrijednosti relativne površine SPGP-a ispitanika s normalnim i patološkim parametrima sjemena, dobiveni su statistički značajni glikanski pikovi SPGP14 i SPGP27. Ostali SPGP-ovi nisu pokazali značajnost između ove dvije skupine te su vrijednosti njihovih relativnih površina prikazane u tablici 9. SPGP14 je značajno smanjen u skupini PAT naspram skupine N, dok je SPGP27 povećan kod skupine N. Međutim, nakon primjene Bonferronijeve korekcije za višestruke usporedbe, statistički značajno različit među N i PAT skupinom ostao je jedino pik SPGP14.

**Tablica 9. Usporedba relativne površine N-glikanskih pikova ukupnih proteina sjemene plazme kod ispitanika s normalnim (N) i patološkim parametrima (PAT) sjemena. P-vrijednosti su određene pomoću testa *Mann-Whitney*, podebljana  $p < 0,05$ .**

N-glikanski pikovi	N (N=82)		PAT (N=84)		P
	$\bar{X}$	SD	$\bar{X}$	SD	
SPGP1	2,27	0,40	2,35	0,65	0,989
SPGP2	0,23	0,09	0,23	0,10	0,406
SPGP3	0,32	0,12	0,34	0,11	0,307
SPGP4	0,21	0,08	0,22	0,10	0,887
SPGP5	0,11	0,07	0,12	0,06	0,336
SPGP6	0,16	0,08	0,14	0,07	0,085
SPGP7	4,94	1,95	4,98	2,24	0,957
SPGP8	0,85	1,03	0,71	0,27	0,384
SPGP9	2,87	0,85	2,90	1,10	0,992
SPGP10	3,03	0,66	3,07	0,93	0,744
SPGP11	0,19	0,43	0,16	0,18	0,961
SPGP12	7,18	1,70	7,26	2,16	0,906
SPGP13	6,93	1,21	6,80	1,26	0,579
<b>SPGP14*</b>	<b>3,85</b>	<b>0,89</b>	<b>3,46</b>	<b>1,24</b>	<b>&lt;0,001</b>
SPGP15	11,36	7,46	12,68	7,89	0,150
SPGP16	3,81	1,12	3,65	1,33	0,167
SPGP17	2,78	1,47	2,79	1,23	0,791
SPGP18	9,73	3,56	9,60	4,05	0,855
SPGP19	5,40	2,41	5,38	2,10	0,899
SPGP20	7,46	4,39	7,04	3,85	0,492
SPGP21	1,16	0,59	1,13	0,53	0,952
SPGP22	2,15	1,21	2,17	1,35	0,960
SPGP23	3,65	1,91	3,46	2,00	0,217
SPGP24	2,11	1,86	2,18	1,79	0,497
SPGP25	1,43	0,96	1,31	0,82	0,349
SPGP26	1,19	0,77	1,39	1,02	0,134
<b>SPGP27</b>	<b>1,38</b>	<b>0,61</b>	<b>1,59</b>	<b>0,64</b>	<b>0,018</b>
SPGP28	1,74	0,71	1,79	0,85	0,997
SPGP29	2,40	1,05	2,48	1,14	0,896
SPGP30	1,12	0,83	1,00	0,55	0,548
SPGP31	2,89	1,74	2,72	1,80	0,436
SPGP32	1,23	0,52	1,19	0,66	0,063
SPGP33	0,74	0,49	0,71	0,47	0,906
SPGP34	0,77	0,37	0,85	0,52	0,426

SPGP35	0,49	0,30	0,44	0,25	0,423
SPGP36	0,85	0,72	0,81	0,51	0,745
SPGP37	1,00	0,53	0,90	0,43	0,294

$\bar{X}$  – aritmetička sredina; \*:  $p < 0,05$  nakon Bonferronijeve korekcije; SD – standardna devijacija

Testiranje značajnosti razlike relativne površine N-glikana proteina sjemene plazme provedeno je između skupine ispitanika s normalnim parametrima sjemena N i patoloških podskupina A, O i OA, čije vrijednosti se nalaze u tablici 10. Ponovno je statistički značajna razlika među skupinama uočena za N-glikan SPGP14 ( $p < 0,001$ ), za koji se može uočiti trend opadanja. Najveću vrijednost relativne površine ima skupina s narušenim parametrima pokretljivosti A ( $3,89 \pm 0,86$ ), koja je čak nešto veća od normozoospermične skupine N ( $3,85 \pm 0,89$ ). Nakon njih je vrijednost skupine s narušenim brojem spermija O ( $3,39 \pm 1,50$ ), a najmanju relativnu površinu je pokazala skupina s oba narušena parametra OA ( $3,13 \pm 0,86$ ).

Nadalje, razvrstavanje u podskupine pokazalo je značajne razlike u dodatnim N-glikanima koje nisu bile vidljive u združenoj PAT skupini. Ti dodatni N-glikani su SPGP5, SPGP17, SPGP26 i SPGP32, a za njih nije uočen jasan trend. Nakon provedene Bonferronijeve korekcije za višestruke usporedbe, ponovno je statistički značajan ostao samo N-glikan SPGP14.

**Tablica 10. Usporedba relativne površine N-glikanskih pikova ukupnih proteina sjemene plazme ispitanika s normalnim (N) i patološkim parametrima (PAT) sjemena svrstanih u astenozoospermične (A), oligozoospermične (O) i oligoastenozoospermične (OA) podskupine.** P-vrijednosti su određene pomoću testa *Kruskal-Wallis*. Nominalna podebljana p-vrijednost ukazuje da je barem jedna skupina statistički značajno različita od ostalih ( $p < 0,05$ ).

N-glikanski pikovi	N (N=82)		A (N=29)		O (N=21)		OA (N=34)		p
	$\bar{X}$	SD	$\bar{X}$	SD	$\bar{X}$	SD	$\bar{X}$	SD	
SPGP1	2,27	0,40	2,30	0,52	2,35	0,89	2,40	0,60	0,676
SPGP2	0,23	0,09	0,22	0,10	0,25	0,09	0,22	0,10	0,183
SPGP3	0,32	0,12	0,35	0,14	0,36	0,09	0,31	0,09	0,112
SPGP4	0,21	0,08	0,23	0,13	0,25	0,10	0,19	0,07	0,117
<b>SPGP5</b>	<b>0,11</b>	<b>0,07</b>	<b>0,10</b>	<b>0,05</b>	<b>0,14</b>	<b>0,04</b>	<b>0,11</b>	<b>0,08</b>	<b>0,042</b>
SPGP6	0,16	0,08	0,16	0,09	0,14	0,05	0,13	0,06	0,168
SPGP7	4,94	1,95	4,31	1,95	5,34	2,53	5,33	2,23	0,135
SPGP8	0,85	1,03	0,64	0,21	0,72	0,28	0,75	0,30	0,314
SPGP9	2,87	0,85	3,00	1,22	3,04	1,43	2,73	0,72	0,851
SPGP10	3,03	0,66	2,95	0,64	3,37	1,52	2,99	0,61	0,386



SPGP11	0,19	0,43	0,13	0,08	0,22	0,33	0,16	0,07	0,244
SPGP12	7,18	1,70	7,68	2,36	7,31	2,62	6,87	1,60	0,670
SPGP13	6,93	1,21	6,70	1,37	6,82	1,14	6,87	1,26	0,655
<b>SPGP14*</b>	<b>3,85</b>	<b>0,89</b>	<b>3,89</b>	<b>1,33</b>	<b>3,39</b>	<b>1,50</b>	<b>3,13</b>	<b>0,86</b>	<b>&lt;0,001</b>
SPGP15	11,36	7,46	13,84	9,19	11,99	7,79	12,11	6,81	0,499
SPGP16	3,81	1,12	3,54	1,17	3,67	1,44	3,73	1,41	0,553
<b>SPGP17</b>	<b>2,78</b>	<b>1,47</b>	<b>3,12</b>	<b>1,30</b>	<b>3,19</b>	<b>1,47</b>	<b>2,27</b>	<b>0,78</b>	<b>0,032</b>
SPGP18	9,73	3,56	8,58	3,72	9,46	3,37	10,55	4,55	0,348
SPGP19	5,40	2,41	5,04	2,38	5,09	1,98	5,84	1,88	0,387
SPGP20	7,46	4,39	6,21	3,76	6,62	3,53	8,01	4,00	0,442
SPGP21	1,16	0,59	1,16	0,45	1,19	0,73	1,07	0,44	0,801
SPGP22	2,15	1,21	2,25	1,60	2,25	1,57	2,06	0,94	0,950
SPGP23	3,65	1,91	4,13	2,22	3,01	1,59	3,17	1,93	0,071
SPGP24	2,11	1,86	2,21	1,74	2,20	1,52	2,14	2,01	0,770
SPGP25	1,43	0,96	1,39	0,84	1,31	0,91	1,23	0,75	0,632
<b>SPGP26</b>	<b>1,19</b>	<b>0,77</b>	<b>1,51</b>	<b>0,76</b>	<b>1,70</b>	<b>1,66</b>	<b>1,09</b>	<b>0,54</b>	<b>0,012</b>
SPGP27	1,38	0,61	1,55	0,70	1,55	0,64	1,65	0,60	0,086
SPGP28	1,74	0,71	1,58	0,71	1,98	0,93	1,86	0,90	0,478
SPGP29	2,40	1,05	2,66	1,50	2,36	1,05	2,40	0,79	0,974
SPGP30	1,12	0,83	1,01	0,49	0,97	0,51	1,00	0,63	0,609
SPGP31	2,89	1,74	2,39	1,37	2,74	1,21	3,00	2,34	0,436
<b>SPGP32</b>	<b>1,23</b>	<b>0,52</b>	<b>1,38</b>	<b>0,69</b>	<b>1,07</b>	<b>0,46</b>	<b>1,09</b>	<b>0,72</b>	<b>0,035</b>
SPGP33	0,74	0,49	0,77	0,47	0,67	0,41	0,70	0,50	0,887
SPGP34	0,77	0,37	0,82	0,41	1,02	0,64	0,77	0,51	0,420
SPGP35	0,49	0,30	0,42	0,26	0,49	0,18	0,43	0,28	0,314
SPGP36	0,85	0,72	0,84	0,45	0,88	0,70	0,74	0,44	0,748
SPGP37	1,00	0,53	0,94	0,46	0,88	0,44	0,89	0,41	0,712

$\bar{X}$  – aritmetička sredina; \*:  $p < 0,05$  nakon Bonferronijeve korekcije; SD – standardna devijacija

### 5.5.1. Regresijski model N-glikana ukupnih proteina sjemene plazme i kliničkih dijagnoza ispitanika

Kako bi se detaljnije istražila promjena N-glikana ukupnih proteina sjemene plazme u ispitanika narušenih parametara sjemena naspram normozoospermičnih, načinjen je statistički regresijski log-normalni model. Model je prilagođen za potencijalne zbunjujuće čimbenike (engl. *confounding factors*) koji bi mogli utjecati na ishod analize, a uključuju godine, fragmentaciju DNA i sažimanje kromatina spermija. Rezultati statističkog modela su prikazani u tablici 11, a statistički značajne vrijednosti su podebljane. Statistički najznačajnija promjena

potvrđena je za N-glikan SPGP14 koji pokazuje 16 %-tno smanjenje ( $p=0,001$ ) u skupini ispitanika s patološkim parametrima sjemena. N-glikanski pikovi SPGP6 i SPGP26 također pokazuju statistički značajnu promjenu relativne površine kod ispitanika s abnormalnim parametrima sjemena naspram normalnih. N-glikan SPGP6 je pokazao 18 %-tno smanjenje ( $p=0,015$ ) u patološkoj skupini, dok je SPGP26 pokazao povećanje od 21 % ( $p=0,026$ ) naspram normozoospermične skupine (Tablica 11). Nadalje, SPGP14 je jedini N-glikan koji u multivarijantnoj statističkoj analizi ostaje značajan s prilagođenom p-vrijednosti manjom od 0,05. Također, njegova statistička značajnost ostaje i nakon Bonferronijeve korekcije za višestruke usporedbe.

**Tablica 11. Regresijski log-normalni model usporedbe relativne površine N-glikana kod ispitanika s patološkim parametrima sjemena u odnosu na normozoospermične. Model prilagođen prema godinama, fragmentaciji DNA i sažimanju kromatina spermija,  $p<0,05$ .**

N-glikanski pikovi	Promjena relativne površine N-glikana (%)	p
SPGP6	-18	0,015
SPGP14*	-16	0,001
SPGP26	+21	0,026

\*:  $p<0,05$  nakon Bonferronijeve korekcije

Gledajući trend smanjenja vrijednosti relativne površine N-glikana SPGP14, podskupina A nije pokazala značajno smanjenje naspram normozoospermične skupine N (-5 %,  $p=0,409$ ). S druge strane, statistički značajno smanjenje u multivarijantnom modelu jesu imale skupina O (-19 %,  $p=0,004$ ) i OA (-26 %,  $p<0,001$ ) (Tablica 12). Značajnu promjenu reativne površine u barem jednoj od patoloških podskupina naspram normozoospermične su SPGP2, SPGP4, SPGP6, SPGP18, SPGP26 i SPGP35, iako niti jedan od navedenih N-glikana nije pokazao jasan trend kao SPGP14. Nadalje, značajno smanjenje relativne površine u podskupini OA pokazali su N-glikani SPGP2 ( $p=0,008$ ), SPGP4 ( $p=0,003$ ) i SPGP6 ( $p=0,002$ ). N-glikan SPGP26 je pokazao značajno povećanje u skupini A ( $p=0,009$ ) i O ( $p=0,043$ ), ali ne i u patološki kombiniranoj skupini OA gdje nema uočene razlike ( $p=0,978$ ). Značajno smanjenje relativne površine uočeno je za N-glikan SPGP35 samo u podskupinama koje imaju narušenu pokretljivost – A ( $p=0,035$ ) i OA ( $p=0,033$ ) (Tablica 12).

Nadalje, ispitano je postoje li značajne razlike relativne površine N-glikana unutar patoloških podskupina. Primijenjena je uparena usporedba između svih podskupina kao i Bonferronijeva korekcija za višestruke usporedbe razlika relativnih površina svih N-glikana

koji su pokazali značajne razlike prema tablici 12. Uočena je značajno povećana relativna površina N-glikana SPGP14 kod podskupine A u odnosu na podskupinu OA. Također, N-glikani SPGP2 i SPGP4 su bili značajno povećani u podskupini O u odnosu na OA. Značajno povećanje u skupini OA u odnosu na A pokazao je jedino N-glikan SPGP18.

**Tablica 12. Regresijski log-normalni modeli usporedbe relativne površine N-glikana ukupnih proteina sjemene plazme normozoospermičnih naspram ispitanika s patološkim parametrima sjemena svrstanih u astenozoospermične (A), oligozoospermične (O) i oligoastenozoospermične (OA) podskupine.** Postoci promjene su prilagođeni prema godinama, fragmentaciji DNA i sažimanju kromatina spermija,  $p < 0,05$ .

N-glikanski pikovi	Promjena relativne površine N-glikana (%)					
	A (N=29)	p	O (N=21)	p	OA (N=34)	p
SPGP2	-14	0,079	+8	0,399	<b>-22</b>	<b>0,008</b>
SPGP4	-2	0,818	+11	0,258	<b>-22</b>	<b>0,003</b>
SPGP6	-8	0,406	-18	0,105	<b>-30</b>	<b>0,002</b>
SPGP14*	-5	0,409	<b>-19</b>	<b>0,004</b>	<b>-26</b>	<b>&lt;0,001</b>
SPGP18	-7	0,433	+3	0,769	<b>+29</b>	<b>0,012</b>
SPGP26	<b>+33</b>	<b>0,009</b>	<b>+28</b>	<b>0,043</b>	0	0,978
SPGP35	<b>-25</b>	<b>0,035</b>	+10	0,524	<b>-27</b>	<b>0,033</b>

\*:  $p < 0,05$  nakon Bonferronijeve korekcije

## 5.6. Povezanost parametara sjemena i razine fragmentacije DNA spermija

U radu je također ispitana povezanost parametara sjemena i razine fragmentacije DNA (SDF) pomoću Spearmanovog koeficijenta korelacije. Pronađen je Spearmanov koeficijent korelacije  $\geq 0,50$  između indeksa DNA fragmentacije (DFI) te pokretljivosti i vitalnosti. DFI i pokretljivosti spermija (-0,509) pokazuju negativnu povezanost, te shodno tome izravna povezanost DFI i nepokretljivosti spermija (0,517). Nadalje, negativna povezanost je uočena i s vitalnošću spermija (-0,509), dok je DFI izravno povezan s nevitarnim spermijima (-0,509). Rezultati su prikazani u tablici 13.

**Tablica 13. Određivanje povezanosti parametra sjemena i fragmentacije DNA spermija.** Prikazan je Spearmanov koeficijent korelacije  $r \geq 0,50$ ,  $p < 0,05$ .

Parametri sjemena	r
Ukupno pokretni spermiji (%)	-0,509
Nepokretni spermiji (%)	0,517
Vitalni spermiji (%)	-0,509
Ne vitalni spermiji (%)	0,509

U svrhu potvrde analize povezanosti, napravljeni su regresijski log-normalni modeli. Model je prilagođen za godine, parametre sjemena i stupanj sažimanja kromatina spermija. Potvrđena je statistički značajna povezanosti između SDF-a te pokretljivosti i vitalnosti spermija ( $p < 0,001$ ). Model je pokazao kako povećanje udjela pokretljivih spermija za 10 % vodi ka smanjenju DFI-ja za 12,4 % ( $p < 0,001$ ), dok povećanje udjela vitalnih spermija vodi do smanjenja DFI za 16,8 %. Shodno tome, povećanje udjela nepokretnih i mrtvih spermija za 10 % je povezano s povećanjem DFI za 12,9 % kod nepokretnih spermija, odnosno 17,1 % za mrtve spermije (Tablica 14). Vrijednosti ovog modela su ostale statistički značajne nakon primjene Bonferronijeve korekcije za višestruke usporedbe.

**Tablica 14. Regresijski log-normalni modeli u kojima je fragmentacija DNA spermija zavisna varijabla.** Pokretljivost i vitalnost spermija su pojedinačno uneseni u model te je određena nominalna p-vrijednost. Postoci promjene su prilagođeni prema godinama ispitanika, normalnim ili patološkim parametrima sjemena i stupanj sažimanja kromatina spermija.

Parametar povećan za 10 %	Promjena DFI (%)	p
Udio pokretnih spermija*	-12,4	<0,001
Udio nepokretnih spermija*	12,9	<0,001
Udio vitalnih spermija*	-16,8	<0,001
Udio mrtvih spermija*	17,1	<0,001

\*:  $p < 0,05$  nakon Bonferronijeve korekcije

## 5.7. Povezanost parametara sjemena i sažimanja kromatina spermija

Ispitana je povezanost parametra sjemena i sažimanja kromatina spermija Spearmanovim koeficijentom korelacije kako bi se dodatno provjerilo ima li povezanosti ova dva parametra, budući da nisu pronađene razlike u vrijednostima sažimanja kromatina između

normozoospermičnih i patološkim podskupinama ispitanika (Tablica 8). Sukladno navedenim opažanjima, nisu pronađene dodatne statistički značajne povezanosti između parametara sjemena i sažimanja kromatina spermija (Tablica 15).

Nadalje, ispitani su i regresijski log-normalni modeli povezanosti parametara sjemena i sažimanja kromatina, kako bi se dodatno provjerilo postoji li ovim statističkim modelom povezanost. Ponovno, povezanost sažimanja kromatina i parametara sjemena nije pronađena te rezultati nisu prikazani.

**Tablica 15. Određivanje povezanosti parametra sjemena i sažimanja kromatina spermija.** Prikazan je Spearmanov koeficijent korelacije  $r \geq 0,50$ ,  $p < 0,05$ .

Parametri sjemena	r
Koncentracija spermija ( $10^6/\text{mL}$ )	0,1194
Ukupan broj spermija ( $10^6/\text{uzorak}$ )	0,1108
Volumen (mL)	0,0204
Ukupno pokretni spermiji (%)	0,0954
Nepokretni spermiji (%)	-0,0962
Pravilna morfologija (%)	0,0245
Nepravilna morfologija (%)	-0,0245
Vitalni spermiji (%)	0,0796
Nevitalni spermiji (%)	-0,0796

## 5.8. Povezanost parametara sjemena i udjela N-glikana sjemene plazme

Ispitana je i povezanost glavnih parametara sjemena i relativne površine N-glikana ukupnih proteina sjemene plazme pomoću Spearmanovog koeficijenta korelacije. Povezanost nije uočena između N-glikana te niti jednog parametra sjemena uključujući ukupan broj spermija, broj spermija po ml, volumen sjemena, pokretljivosti, morfologije i vitalnosti spermija. Budući da nisu dobivene značajne razlike ovim statističkim testom, rezultati nisu tablično prikazani.

Iduće su napravljeni regresijski log-normalni modeli kako bi se dodatno istražila povezanost parametara sjemena i N-glikana u ukupnoj populaciji pacijenata te zasebno u skupini pacijenata s normalnim i patološkim parametrima sjemena. U tablici 16 su prikazani dobiveni značajni N-glikanski pikovi te njihova povezanost s pojedinim parametrima. Nakon prilagodbe modela za višestruke usporedbe, značajna pozitivna povezanost ostala je samo između N-glikana SPGP2 i srednje progresivnih spermija.

**Tablica 16. Regresijski log-normalni modeli za opisivanje povezanosti N-glikana ukupnih proteina sjemene plazme i detaljnih parametara sjemena.** Prikazane su povezanosti koje imaju nominalnu  $p < 0,05$ , (+) označava pozitivnu, a (-) negativnu povezanost. Podebljano je označen N-glikan značajan ( $p < 0,05$ ) nakon prilagodbe za višestruke usporedbe.

Parametri sjemena	Značajno povezani N-glikani (SPGP)		
	Ukupno	N	PAT
Koncentracija spermija ( $10^6/\text{mL}$ )	11(-)	6(+), 8(+), 21(+)	11(-)
Ukupan broj spermija ( $10^6/\text{uzorak}$ )	6(+), 7(-), 19(-)	8(+), 19(-)	6(+), 7(-), 8(-)
Volumen (mL)	2(-), 3(-), 4(-), 9(-), 11(-), 14(-), 17(-), 18(+)	5(-), 13(-), 19(-), 22(-)	4(-), 10(-), 11(-), 14(-), 17(-), 18(+)
Progresivno pokretni spermiji (%)	-	1(-), 13(-), 34(+)	5(+), 32(-), 33(-)
Srednje progresivni spermiji (%)	1(+), 2(+), 5(+), 8(+), 11(+)	8(+), 11(+)	1(+), 2(+), 4(+), 5(+), 35(+)
Ne-progresivni spermiji (%)	23(+), 32(+)	15(+)	14(+), 18(-), 32(+)
Nepokretni spermiji (%)	8(-), 35(-)	8(-)	2(-), 3(-), 4(-), 5(-), 35(-)
Nepravilna morfologija (%)	20(+), 21(-), 27(+), 28(-), 29(+)	8(-), 20(+), 21(-), 28(-), 29(+), 36(+)	-
Nevitalni spermiji (%)	-	3(+), 8(-)	5(-), 11(-)

N – normalni, PAT – patološki parametri sjemena

### 5.9. Povezanost razine fragmentacije DNA i sažimanja kromatina spermija

Ispitano je i postojanje povezanosti razine fragmentacije DNA (SDF)-a iskazane indeksom fragmentacije DNA (DFI) i sažimanja kromatina spermija, regresijskim log-normalnim modelima. Statistički značajna povezanost između ova dva parametra nije uočena u univarijatnim postavkama modela, kao niti u postavkama prilagodbe prema godinama i skupinama ispitanika. Dobivene vrijednosti su prikazane u tablici 17.

**Tablica 17. Regresijski log-normalni modeli u kojima je fragmentacija DNA spermija zavisna varijabla.**

	<b>Promjena DFI (%)</b>	<b>p</b>
Sažimanje kromatina spermija*	-5	0,582
Sažimanje kromatina spermija**	+1	0,946

DFI – indeks fragmentacije DNA (engl. *DNA fragmentation index*), \*univarijatna analiza i \*\*prilagođeno prema godinama i skupinama ispitanika,  $p < 0,05$

### **5.10. Povezanost udjela N-glikana sjemene plazme i razine fragmentacije DNA spermija**

Regresijski log-normalni model prilagođen na zbunjujuće čimbenike je primijenjen kako bi se ispitala povezanost promjene relativne površine pikova N-glikana ukupnih proteina sjemene plazme i fragmentacije DNA spermija. Detaljno su ispitani N-glikani koji su pokazali najveću značajnost razlike relativne površine kod normozoospermične i patološke skupina ispitanika. Statistički značajnu povezanost sa razinom fragmentacije DNA (SDF) su pokazali N-glikani SPGP5, SPGP17 i SPGP26 kod skupine N. Kada se vrijednost indeksa fragmentacije DNA (DFI) poveća za 10 %, relativna površina N-glikana SPGP5 se smanji za 16 % ( $p=0,006$ ), SPGP17 za 11 % ( $p=0,025$ ) te SPGP26 za 11 % ( $p=0,038$ ). Kod skupine ispitanika patoloških parametara sjemena statistički značajna povezanost je pronađena samo za N-glikan SPGP18. U ovom slučaju kod povećanja postotka DFI za 10 % relativna površina N-glikana SPGP18 se značajno smanji za 9 % ( $p=0,001$ ). Ostali N-glikani nisu pokazali statistički značajnu razliku, a vrijednosti su im prikazane u tablici 18 za skupinu N i u tablici 19 za skupinu PAT.

**Tablica 18. Regresijski log-normalni model za određivanje povezanosti specifičnih N-glikana i fragmentacije DNA spermija kod ispitanika normalnih parametara sjemenja.** Promjene relativnih površina N-glikanskih pikova prate povećanje indeksa fragmentacije DNA (DFI) za 10 %. Prilagodba za odabrane zbunjujuće čimbenike,  $p < 0,05$ .

N-glikanski pikovi	Promjena relativne površine N-glikana (%)	p
SPGP2	+8	0,082
SPGP4	0	0,907
SPGP5	-16	<b>0,006</b>
SPGP6	+11	0,071
SPGP14	+3	0,262
SPGP17	-11	<b>0,025</b>
SPGP18	-1	0,861
SPGP26	-11	<b>0,038</b>
SPGP32	+3	0,515
SPGP35	+12	0,108

**Tablica 19. Regresijski log-normalni model za određivanje povezanosti specifičnih N-glikana i fragmentacije DNA spermija kod ispitanika patoloških parametara sjemenja.** Promjene relativnih površina N-glikanskih pikova prate povećanje indeksa fragmentacije DNA (DFI) za 10 %. Prilagodba za odabrane zbunjujuće čimbenike,  $p < 0,05$ .

N-glikanski pikovi	Promjena relativne površine N-glikana (%)	p
SPGP2	+2	0,319
SPGP4	+5	0,068
SPGP5	-1	0,655
SPGP6	+2	0,412
SPGP14	+2	0,240
SPGP17	-2	0,323
SPGP18	-9	<b>0,001</b>
SPGP26	-3	0,316
SPGP32	-1	0,867
SPGP35	+4	0,259



## 5.11. Povezanost udjela N-glikana sjemene plazme i sažimanja kromatina spermija

Ispitana je povezanost N-glikana i sažimanja kromatina spermija multivarijatnom analizom, odnosno regresijskim log-normalnim modelima. Analiza je pokazala statistički značajnu povezanost stupnja sažimanja kromatina i relativne površine N-glikana SPGP17 i SPGP25. Pronađeno je smanjenje relativne površine SPGP17 kada postotak spermija sa sažetim kromatinom raste za 10 % ( $p=0,037$ ). Nadalje, za isti porast postotka spermija sa sažetim kromatinom, pronadeno je povećanje u relativnoj površini SPGP25 od 25 % ( $p=0,034$ ) (Tablica 20). Nadalje, primijenjeni su dodatni dijagnostički testovi kako bi se potvrdila učinkovitost korištenog statističkog modela te nisu pokazali nikakvo kršenje pretpostavki regresijskog log-normalnog modela.

**Tablica 20. Regresijski log-normalni modeli ispitivanja povezanosti sažimanja kromatina spermija i N-glikana sjemene plazme.** Promjene relativnih površina N-glikanskih pikova prate povećanje postotka sažetog kromatina spermija za 10 %. Model je prilagođen prema godinama ispitanika i fragmentaciji DNA spermija.

N-glikanski pikovi	Promjena relativne površine N-glikana (%)	p
SPGP17	-14	0,037
SPGP25	+25	0,034

## 5.12. Povezanost životnih i okolišnih čimbenika, razine fragmentacije DNA i sažimanja kromatina spermija

Životni i okolišni čimbenici su procijenjeni na temelju ankete preuzete iz Okvirnih projekata EU COPHES, DEMOCOPHES i Horizon 2020 HBM4EU. U tablici 21 prikazani su rezultati ankete u obliku postotaka koji govore koliki udio ispitanika je izložen pojedinom okolišnom i životnom čimbeniku. Statistički značajne razlike u životnim navikama i okolišnim čimbenicima nisu utvrđene između ispitanika s normalnim parametrima i patološkim parametrima sjemena.

**Tablica 21. Prikaz i razlika u životnim čimbenicima između ispitanika s normalnim (N) i patološkim (PAT) parametrima sjemena. P-vrijednosti dobivene  $\chi^2$  testom,  $p < 0,05$ .**

Čimbenici	N (N=82) / %	PAT (N=84) / %	p
Urbano okruženje	70,73	63,53	0,409
Život blizu ceste	27,71	32,53	0,612
Život blizu tvornice	19,28	21,69	0,848
Svakodnevna konzumacija povrća	39,28	39,02	1,000
Svakodnevna konzumacija voća	23,75	21,95	0,932
Konzumacija crvenog mesa > 3 puta tjedno	54,76	44,57	0,246
Konzumacija peradi > 3 puta tjedno	30,12	34,94	0,619
Konzumacija ribe > 1 puta tjedno	25,61	19,75	0,481
Konzumacija mlijeka	89,55	86,57	0,790
Cigarete	N>15/dan	19,05	0,499
	N≤15/dan	16,67	
Konzumacija alkohola	63,10	59,04	0,705

Statistički značajne povezanosti određene su pomoću regresijskih log-normalnih modela. Tablica 22 prikazuje popis najčešćih zdravstvenih, životnih i okolišnih čimbenika povezanih sa SDF-om u sveukupnoj ispitanoj populaciji, gdje je također navedena statistička značajnost korelacije navedenih parametara. Značajna povezanost uočena je za konzumaciju cigareta, pri čemu je pojava SDF-a značajno povećana u ispitanika koji konzumiraju više od 15 cigareta dnevno (CI 1,03 – 1,52;  $p=0,022$ ).

Uzimajući u obzir sažimanje kromatina spermija, dobivena je značajna povezanost za pojačanu konzumaciju peradi, mlijeka, život u urbanom okruženju (Tablica 23). Statistički značajno smanjena kondenziranost kromatina je povezana s učestalom konzumacijom peradi (CI 0,57 – 0,96;  $p=0,022$ ), dok je povećana pri konzumaciji mlijeka (CI 1,12 – 2,53;  $p=0,012$ ). Nadalje, statistički značajno smanjena kondenzacija kromatina je povezana sa životom u urbanom okruženju (CI 0,50 – 0,91;  $p=0,009$ ).

**Tablica 22. Regresijski log-normalni modeli povezanosti fragmentacije DNA spermija i najčešćih životnih i okolišnih faktora u ukupnoj ispitanoj populaciji.**

Fragmentacija DNA spermija	N	Prosječni omjer	[95 % CI]	p
Broj cigareta/dan				
N>15	28/166	1,25	1,03 – 1,52	0,022
N≤15	34/166	1,11	0,89 – 1,38	0,375

CI – interval pouzdanosti (engl. *confidence interval*)

**Tablica 23. Regresijski log-normalni modeli povezanosti sažimanja kromatina spermija i najčešćih životnih i okolišnih faktora u ukupnoj ispitanoj populaciji.**

Sažimanje kromatina spermija	N	Prosječni omjer	[95 % CI]	p
Konzumacija peradi > 3 puta tjedno	59/166	0,74	0,57 – 0,96	0,022
Konzumacija mlijeka	126/166	1,68	1,12 – 2,53	0,012
Urbano okruženje	116/166	0,67	0,50 – 0,91	0,009

CI – interval pouzdanosti (engl. *confidence interval*)

### 5.12.1. Povezanost životnih i okolišnih čimbenika, fragmentacije DNA spermija i sažimanja kromatina kod ispitanika normalnih parametara sjemena

Povezanost životnih i okolišnih čimbenika sa SDF i sažimanja kromatina spermija ispitana je regresijskim log-normalnim modelom i samo u populaciji ispitanika s normalnim parametrima sjemena kako bi se utvrdilo ima li samo u ovoj skupini povezanosti koje nisu uočene u ukupnoj populaciji ispitanika. Gledajući SDF u tablici 24, dobivena je značajnost za faktore različite nego kod združenih skupina. Dobivena povezanost se odnosi na prehrambene navike, odnosno konzumaciju mlijeka, pri čemu SDF raste pri povećanoj konzumaciji mlijeka (CI 1,15 – 2,33; p=0,007).

**Tablica 24. Regresijski log-normalni modeli povezanosti fragmentacije DNA spermija i najčešćih životnih i okolišnih faktora kod ispitanika normalnih parametara sjemena.**

Fragmentacija DNA spermija	N	Prosječni omjer	[95 % CI]	p
Konzumacija mlijeka	63/82	1,63	1,15 – 2,33	0,007

CI – interval pouzdanosti (engl. *confidence interval*)

Što se tiče sažimanja kromatina spermija, također su dobiveni različiti čimbenici kod skupine ispitanika normalnih parametara sjemena (Tablica 25). Kondenziranost kromatina spermija je tako statistički značajno povezana sa svakodnevnom konzumacijom voća, tako da kondenzacija kromatina opada ukoliko se svakodnevno konzumira voće (CI 0,36 – 0,78;  $p=0,001$ ). Idući značajan čimbenik je pušenje pri čemu kondenzacija kromatina raste ako se smanjuje konzumacija cigareta. Za više od 15 cigareta dnevno je statistički značajno smanjena kondenzacija kromatina (CI 0,33 – 0,62;  $p<0,001$ ), koja je uočena i kod konzumacije manje od 15 cigareta na dan (CI 0,48 – 1,03;  $p=0,070$ ) makar nije bila statistički značajna. Život u urbanom okruženju je također značajno povezan s kondenzacijom kromatina, pri čemu se kondenzacija kromatina smanjuje ukoliko se udio življenja u urbanom okruženju povećava kod ispitanika (CI 0,36 – 0,74;  $p<0,001$ ).

**Tablica 25. Regresijski log-normalni modeli povezanosti sažimanja kromatina spermija i najčešćih životnih i okolišnih faktora kod ispitanika normalnih parametara sjemena.**

Sažimanje kromatina spermija	N	Prosječni omjer	[95 % CI]	p
Svakodnevna konzumacija voća	20/82	0,53	0,36 – 0,78	0,001
Broj cigareta/dan				
N>15	16/82	0,45	0,33 – 0,62	<0,001
N≤15	16/82	0,70	0,48 – 1,03	0,070
Urbano okruženje	61/82	0,52	0,36 – 0,74	<0,001

CI – interval pouzdanosti (engl. *confidence interval*)

### 5.12.2. Povezanost životnih i okolišnih čimbenika, fragmentacije DNA i sažimanja kromatina spermija kod ispitanika patoloških parametara sjemena

Okolišni i životni čimbenici su ispitani i samo kod skupine pacijenata patoloških parametara sjemena, kako bi se uočilo koji čimbenici najviše utječu na SDF i kondenziranost kromatina spermija ove skupine. Statistički značajna povezanost je uočena između SDF i parametara okoliša koji su u ovom istraživanju promatrani (prehrana, pušenje, konzumacija alkohola, život u urbanom/ruralnom okruženju), nije pronađena.

Kondenzacija kromatina spermija i okolišni i životni čimbenici su također ispitani. Pokazano je u tablici 26, kako je značajna povezanost između kondenzacije kromatina spermija i prehrane, točnije povećane konzumacije crvenog mesa te svakodnevne konzumacije povrća. Kondenzacija kromatina spermija je smanjena ako je konzumacija crvenog mesa bila veća od

3 puta (CI 0,48 – 0,87; p=0,004). Nadalje, statistički značajno je povećana kondenzacija kromatina, ako je konzumacija povrća bila svakodnevna (CI 1,02 – 1,85; p=0,036).

**Tablica 26. Regresijski log-normalni modeli povezanosti sažimanja kromatina spermija i najčešćih životnih i okolišnih faktora kod ispitanika patoloških parametara sjemena.**

Sažimanje kromatina spermija	N	Prosječna vrijednost	[95 % CI]	p
Konzumacija crvenog mesa >3 tjedno	39/84	0,65	0,48 – 0,87	0,004
Svakodnevna konzumacija povrća	34/84	1,37	1,02 – 1,85	0,036

CI – interval pouzdanosti (engl. *confidence interval*)

### 5.13. Povezanost udjela N-glikana sjemene plazme, životnih i okolišnih čimbenika

Određena je povezanost udjela N-glikana ukupnih proteina sjemene plazme i okolišnih i životnih faktora regresijskim log-normalnim modelom. Ispitani su N-glikani koji su pokazali najznačajnije promjene relativne površine između ispitanika s normalnim i patološkim parametrima sjemena (rezultati prikazani u tablici 12). Pri analizi povezanosti N-glikanskih pikova i okolišnih čimbenika kod normozoospermičnih ispitanika, osim SPGP6 i SPGP18, svi ostali N-glikani su pokazali značajnu povezanost s nekim životno-okolišnim čimbenikom istraživanim u ovoj studiji (Tablica 27). Tako je pušenje negativno povezano s N-glikanima SPGP2, SPGP4, SPGP5, a pozitivno s SPGP26, SPGP32 i SPGP35. Život u blizini tvornice je značajno pozitivno povezan s SPGP2 i SPGP17 te je pozitivna povezanost uočena između SPGP14 i života u blizini ceste. Također, pronađena je pozitivna povezanost konzumacije ribe i glikana SPGP32.

Nadalje, analiza povezanosti N-glikana i okolišnih čimbenika u skupini ispitanika s patološkim parametrima sjemena, je pokazala kako N-glikani SPGP2, SPGP5, SPGP17 i SPGP26 nisu povezane niti s jednim promatranim okolišnim čimbenikom u ovoj studiji (Tablica 28). Ponovno, povezanosti su dobivene za pušenje pri čemu je ova navika pozitivno povezana sa SPGP18 i SPGP32. Pretilost je pokazala negativnu povezanost s N-glikanom SPGP6, dok je pozitivno povezana uz glikanski pik SPGP14. SPGP6 je također pokazao pozitivnu povezanost s konzumacijom alkohola. Život u blizini tvornice ili ceste su pozitivno povezani s glikanima SPGP4, odnosno glikanom SPGP35.

**Tablica 27. Regresijski log-normalni modeli povezanosti N-glikanskih pikova ukupnih proteina sjemene plazme i najčešćih životnih i okolišnih faktora kod ispitanika koji imaju normalne parametre sjemena.** Model je prilagođen na odabrane zbunjujuće čimbenike. Pozitivna povezanost (+), negativna povezanost (-). Prikazani čimbenici za koje je  $p < 0,05$ .

<b>N-glikanski pikovi</b>	<b>Povezani životni i okolišni čimbenici</b>
SPGP2	Život u blizini tvornice (+), pušenje (-)
SPGP4	Pušenje (-)
SPGP5	Pušenje (-)
SPGP6	-
SPGP14	Život blizu ceste (+)
SPGP17	Život u blizini tvornice (+)
SPGP18	-
SPGP26	Pušenje (+)
SPGP32	Pušenje (+), konzumacija ribe (+)
SPGP35	Pušenje (+)

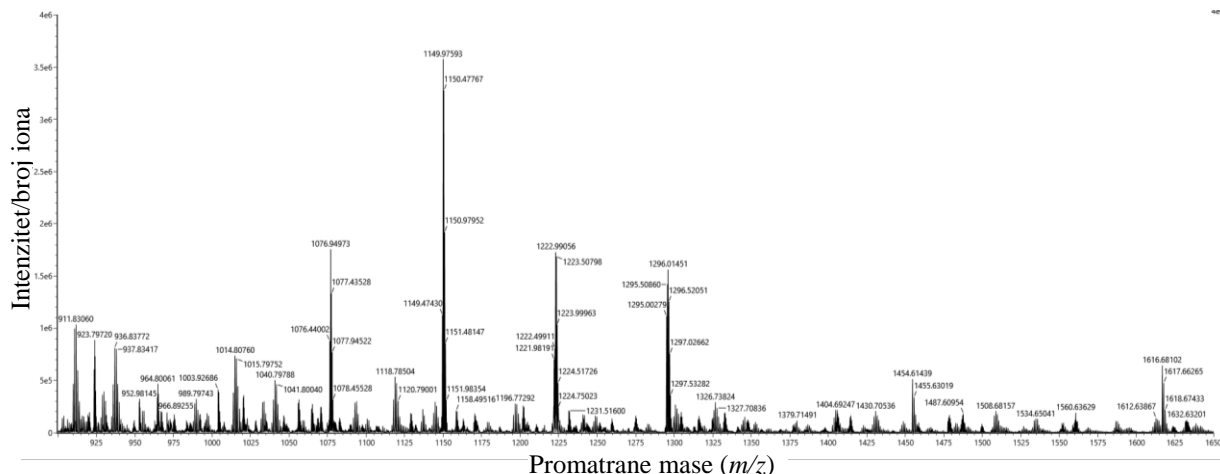
**Tablica 28. Regresijski log-normalni modeli povezanosti N-glikanskih pikova ukupnih proteina sjemene plazme i najčešćih životnih i okolišnih faktora kod ispitanika koji imaju patološke parametre sjemena.** Model je prilagođen na odabrane zbunjujuće čimbenike. Pozitivna povezanost (+), negativna povezanost (-). Prikazani čimbenici za koje je  $p < 0,05$ .

<b>N-glikanski pikovi</b>	<b>Povezani životni i okolišni čimbenici</b>
SPGP2	-
SPGP4	Život u blizini tvornice (+)
SPGP5	-
SPGP6	Alkohol (+), pretilost (-)
SPGP14	Pretilost (+)
SPGP17	-
SPGP18	Pušenje (+)
SPGP26	-
SPGP32	Pušenje (+)
SPGP35	Život blizu ceste (+)

## **5.14. Određivanje strukture značajnijih N-glikana ukupnih proteina sjemene plazme**

Kako bi se dodatno utvrdila svojstva, olakšalo razumijevanje i interpretacija rezultata N-glikana koji su pokazali značajnu razliku između pacijenata normalnih i patoloških parametara sjemena, provedena je njihova strukturna karakterizacija. Nakon provedenog profiliranja N-glikana tekućinskom kromatografijom HILIC-UPLC, skupljeni su N-glikani pikova od interesa uključujući SPGP2, SPGP4, SPGP6, SPGP14, SPGP17, SPGP18, SPGP25, SPGP26, SPGP32 i SPGP35. Potom su pikovi analizirani metodom tekućinske kromatografije spregnute sa spektrometrijom masa (LC-MS). Shodno dobivenim informacijama o sastavu značajnih pikova N-glikana uz dosad objavljenu literaturu, zaključeno je o konačnim strukturama N-glikana ukupnih proteina sjemene plazme. Reprezentativni prikaz ukupnog spektra dobivenog nakon LC-MS prikazan je na slici 21. Sastav i predložena struktura odabranih pikova N-glikana detaljno su opisani u tablici 29.

U svim istraženim pikovima prevladava kompleksni tip N-glikana koji su monoantenski (SPGP2, SPGP5, SPGP6), biantenski (SPGP4, SPGP5, SPGP14, SPGP17, SPGP18), triantenski (SPGP25, SPGP26) te dva tetaraantenska glikana (SPGP32, SPGP35). Jedino glikanski pik SPGP2, uz kompleksni, sadrži i hibridni tip glikana. Većina istraženih glikana, poput SPGP5, SPGP6, SPGP14, SPGP17, SPGP25, SPGP26 i SPGP32, sadrži sijaliniziranu kapu. Također veliki broj identificiranih glikana sadrži fukozu vezanu u samoj jezgri glikana (SPGP2, SPGP4, SPGP5, SPGP14, SPGP18, SPGP25, SPGP32 i SPGP35). Glikani SPGP18 i SPGP35 sadrže također fukozne jedinice i na predjelu antene. Nadalje, nakon analize spektara masa, za nekoliko glikanskih pikova je predložena mješavina struktura poput glikana SPGP2, SPGP5, SPGP14 i SPGP32. Glikanski pik SPGP5 je najraznolikija mješavina koja sadrži pet predloženih struktura kompleksnog tipa.

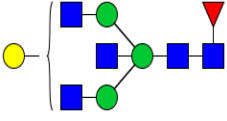
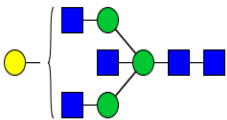
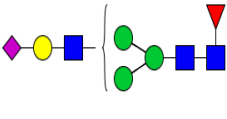
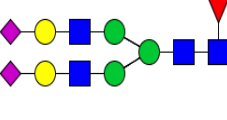
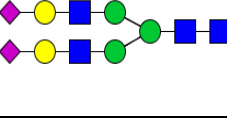
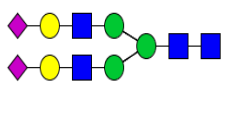
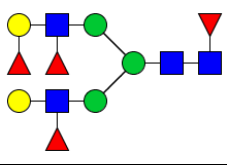
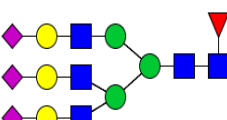
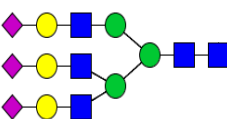


**Slika 21. Reprezentativni sumirani spektar masa svih N-glikana ukupnih proteina sjemene plazme nakon analize LC-MS. Vrijeme zadržavanja je u rasponu od 7,2 – 24,0 min, uhvaćeno je 2009 spektara, a raspon omjera mase i naboja ( $m/z$ ) je od 900 – 1650.**

**Tablica 29. Sastav i predloženi opis strukture značajnih N-glikana ukupnih proteina sjemene plazme dobivenih nakon tekućinske kromatografije spregnute sa spektrometrijom masa.**

N-glikanski pikovi	Sastav N-glikana	Ukupni promatrani $m/z$	Ukupni z	Predložena struktura	Opis strukture
SPGP2	<b>H4N3F1</b>	1641,701	1		Kompleksni tip glikana, monoantenski, monogalaktozilirani s fukozom u jezgri ili Hibridni tip glikana, monoantenski, agalaktozilirani sa fukozom u jezgri i jednom terminalnom manozom
	<b>H4N4</b>	1698,713	1		Kompleksni tip glikana, biantenarni, monogalaktozilirani bez fukoze
SPGP4	<b>H4N4F1</b>	922,898 1844,769	2 1		Kompleksni tip glikana, biantenski, monogalaktozilirani s fukozom u jezgri
SPGP5	<b>H4N3F1S1</b>	966,893 1932,782	2 1		Kompleksni tip glikana, monoantenski monogalaktozilirani, monosijalinski bez gukoze u jezgri



	<b>H4N5F1</b>	1024,421	2		Kompleksni tip glikana, biantenski, monogalaktoziliran sa biseciranim N-acetilglukozaminom i fukozom u jezgri ili kompleksni tip glikana, triantenski monogalaktoziliran s fukozom u jezgri
	<b>H4N5</b>	951,407	2		Kompleksni tip glikana, biantenski, monogalaktoziliran sa biseciranim N-acetilglukozaminom ili kompleksni tip glikana, triantenski monogalaktoziliran
SPGP6	<b>H4N3F1S1</b>	966,893 1932,782	2 1		Kompleksni tip glikana, monoantenski monogalaktozilirani, monosijalinski bez fukoze u jezgri
SPGP14	<b>H5N4F1S2</b>	1295,003	2		Kompleksni tip glikana, biantenarni digalaktozilirani, disijalinizirani sa fukozom u jezgri
	<b>H5N4S2</b>	1221,982	2		Kompleksni tip glikana, biantenarni digalaktozilirani, disijalinizirani bez fukoze u jezgri
SPGP17	<b>H5N4S2</b>	1221,982	2		Kompleksni tip glikana, biantenarni digalaktozilirani, disijalinizirani bez fukoze u jezgri
SPGP18	<b>H5N4F4</b>	1223,016	2		Kompleksni tip glikana, biantenarni digalaktozilirani, sa jezgrenom i antenskom fukozom
SPGP25	<b>H6N5F1S3</b>	1082,418	3		Kompleksni tip glikana, triantenarni, trigalaktozilirani, trisijalinizirani sa fukozom u jezgri
		1623,112	2		
SPGP26	<b>H6N5S3</b>	1033,746	3		Kompleksni tip glikana, triantenarni, trigalaktozilirani, trisijalinizirani bez fukoze u jezgri

SPGP32	<b>H7N6F1S4</b>	1301,159	3		Kompleksni tip glikana, tetraantenarni tetragalaktozilirani, tetrasijalinizirani s fukozom u jezgri
	<b>H6N5F6</b>	1551,620	2		Kompleksni tip glikana, triantenarni trigalaktozilirani, s jezgrenom i antenskom fukozom
SPGP35	<b>H7N6F5</b>	1107,778	3		Kompleksni tip glikana, tetraantenarni, tetragalaktozilirani, s jezgrenom i antenskom fukozom

*m/z* – omjer mase i naboja

## 6. RASPRAVA

Spermatogeneza je izuzetno složen te vremenski i prostorno strogo reguliran proces sazrijevanja muških spolnih stanica tijekom kojeg iz nediferencirane spermatogonije nastaju zrele stanice spermija sa sposobnošću stvaranja potomstva. Ako dođe do narušavanja spermatogeneze u bilo kojem razvojnom stadiju muške spolne stanice, posljedice mogu biti nepovratne te potaknuti reproduktivne probleme i mušku neplodnost (3, 187). Nadalje, nedavni sveobuhvatni sistematski revijalni članak je ukazao na godišnji porast prevalencije muške neplodnosti diljem svijeta unazad zadnjih 30 godina (71). Stoga, reproduktivni poremećaji muškog spolnog sustava predstavljaju jedan od globalnih istraživačkih prioriteta u svrhu ranog otkrivanja, liječenja neplodnosti, odnosno primjene optimalnog tretmana medicinski potpomognute oplodnje (MPO).

Osim u samim testisima, spermiji završno sazrijevaju u epididimisu i ostalim dijelovima muškog reproduktivnog sustava. Ukoliko i tijekom puta kroz ostale organe reproduktivnog sustava dođe do poremetnje, potencijal spermija za oplodnju također može biti narušen i voditi muškoj neplodnosti. Poremetnjama muškog reproduktivnog sustava pridonose endogeni utjecaji nastali zbog raznih patoloških stanja organizma, ali i egzogeni uslijed izlaganja okolišnim čimbenicima rizika. Navedeni čimbenici utječu na izuzetno složene fiziološke i molekularne mehanizme nastanka muške neplodnosti. Iako su znanstvena istraživanja iz područja andrologije, grane znanosti koja se bavi fiziološkom i patološkom funkcijom muškog reproduktivnog sustava, u zadnjem desetljeću izrazito uznapredovala, još uvijek je riječ o relativno mladoj znanstvenoj disciplini s mnogo neodgovorenih pitanja. Sama analiza sjemena, odnosno spermioigram koji je standardna laboratorijsko-dijagnostička metoda procjene muške neplodnosti, često ne može dati potpunu sliku narušenih funkcija reproduktivnog sustava (93). Prema tome, potrebno je prošiti raspon analiza kojima bi se mogli bolje opisati poremećaji u spermatogenezi i funkciji testisa. Stoga su ciljevi ovog istraživanja bili odrediti povezanost klasičnih parametara sjemena, uključujući pokretljivost, broj i morfologiju dobivenih spermioigramom i dodatnih analiza spermija. Dodatne analize uključile su fragmentaciju DNA spermija i određivanje stupnja sažetosti kromatina. Ono što je značaj ovog rada je da je i prvi puta provedena analiza povezanosti N-glikozilacije slobodnih proteina sjemene plazme, no ne samo s klasičnim analiziranim parametrima sjemena, nego i s najčešćim rizičnim okolišnim čimbenicima koji mogu imati utjecaj na plodnost. Ovo istraživanje stoga daje kompleksan,

jedinstveni uvid u dijagnostiku muške neplodnosti putem povezivanja parametara sjemena s dodatnim analizama na nekoliko različitih razina. Također, istraživanje daje uvid u važnost okolišnih parametara pri dijagnostici neplodnosti.

### **6.1. Usporedba karakteristika ispitanika i parametra sjemena**

U ovo istraživanje je uključeno 166 ispitanika koji su podijeljeni u dvije glavne skupine nakon analize spermograma – oni s normalnim (N) parametrima (N = 82) te oni s patološkim (PAT) parametrima sjemena (N = 84). Uspoređene su opće karakteristike ispitanika te je pokazano da između dviju promatranih skupina nema značajnih razlika u godinama niti vrijednosti BMI-a. Nadalje, postotak ispitanika u odnosu na stupanj obrazovanja sličan je između dvije skupine, kao i onih koji su u braku ili partnerstvu. Sličnost osnovnih karakteristika između normozoospermičnih i ispitanika patoloških parametara sjemena ukazala je na izjednačenost raspodjele ispitanika što dalje pridonosi kvalitetnijoj statističkoj obradi. Tako, na primjer, starosna dob muškarca koja ima utjecaj na smanjenu funkciju muškog reproduktivnog sustava (188), ne bi trebala utjecati na biološke parametre određene ovim istraživanjem. Također, ni vrijednost BMI-ja kao mjera pretilosti ne bi trebala utjecati na biološke parametre određene ovim istraživanjem iako je u prethodnom istraživanju povezan s narušenim parametrima spermija (189).

Usporedba parametara sjemena pokazala je kako su kod ispitanika s patološkim parametrima sjemena svi promatrani parametri uključujući broj, koncentraciju, pokretljivost, morfologiju i vitalnost spermija, izuzev volumena sjemena, značajno smanjeni u odnosu na normozoospermičnu grupu. Kako bi se detaljnije testirale razlike i povezanosti u heterogenoj patološkoj skupini ispitanika, ona je podijeljena u podgrupe sukladno broju i pokretljivosti spermija korištenjem kriterija osnovnih parametara sjemena prema smjernicama SZO (97). Tako su dobivene tri podskupine ispitanika s patološkim parametrima sjemena – astenozoospermična (A) (N = 29), oligozoospermična (O) (N = 21) i oligoastenozoospermična (OA) (N = 34). Kod usporedbe patoloških podskupina i normozoospermične skupine, također su svi parametri osim volumena sjemena bili značajno različiti među skupinama. Budući da je podskupina AO kombinacija narušene pokretljivosti i broja, slijedi da je većina parametara snižena u odnosu na druge dvije patološke skupine, A i O. Nadalje, rezultati pokazuju kako vrijednosti vitalnosti prate vrijednosti pokretljivosti spermija, odnosno kod podskupine A i OA vrijednosti pokretljivosti i vitalnosti su manje u odnosu na podskupinu O koja ima oba

parametra veća. Prema izdanju smjernica SZO za analizu sjemena iz srpnja 2021. godine (106), analiza vitalnosti se niti ne preporučuje kod pacijenata koji imaju urednu pokretljivost, odnosno ukupnu iznad 40 %, kao što je slučaj kod skupina N i O. Također, analiza vitalnosti ukazuje kako nisu nužno svi nepokretni spermiji ujedno i mrtvi (190).

## 6.2. Razina fragmentacije DNA spermija

Studije su pokazale kako oštećenje genoma spermija, koje se može odrediti pomoću različitih testova fragmentacije DNA, nije izravno povezana s ostvarivanjem trudnoće, ali može utjecati na rani razvoj embrija tijekom postupaka MPO-a (191, 192). Povezanost smanjene mogućnosti ostvarenja trudnoće nakon postupka MPO i fragmentacije DNA spermija uočena je kod muškaraca normalnih parametara sjemena koji imaju idiopatsku ili mušku neplodnost (193). U ovom istraživanju također je pronađena statistički značajna razlika u razini fragmentacije DNA spermija (SDF), izraženoj kao postotak fragmentacijskog indeksa DNA (DFI), već pri podjeli u dvije glavne skupine, N i PAT. Pri tome je DFI bio značajno povećan kod pacijenata patoloških parametara sjemena, što se slaže s prethodno provedenim istraživanjima (194, 195). Ono što priječi uvođenje ove analize u standardnu kliničku uporabu je nedostatak univerzalno definirane granične vrijednosti DFI koja označava patološko stanje. Osim toga, različiti laboratoriji koriste pristupe bazirane na različitoj metodologiji poput testova TUNEL (engl. *terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick-end labeling*), elektroforeze pojedinačnih stanica (Comet test), SCSA (engl. *sperm chromatin structure assay*) i SCD (engl. *sperm chromatin dispersion*), pri određivanju SDF i DFI od kojih svaki ima pojedine mane i prednosti (105). Međutim, recentna meta-analiza u kojoj su analizirani plodni i neplodni muškarci i SDF ukazala je na graničnu vrijednost DFI od 20 % kao visoko osjetljivu (79 %) i specifičnu (86 %) za predikciju muške neplodnosti, bez obzira na korišteni test SDF (105). Zanimljivo, rezultati ove studije također ulaze u graničnu vrijednost određenu u toj meta-analizi gdje normozoospermični ispitanici imaju prosječnu vrijednost DFI ispod 20 % ( $17,8 \pm 9,2$ ), dok ispitanici s patološkim parametrima sjemena imaju DFI iznad navedene vrijednosti ( $30,7 \pm 17,5$ ).

Nakon što su ispitanici razdijeljeni u podskupine patoloških dijagnoza A, O i AO, ponovno je u srednja vrijednost postotka DFI ostala iznad 20% u patoloških skupina, te ispod 20 % u normozoospermičnoj skupini. Nadalje, ispitanici podskupine OA su imali najveću vrijednost

DFI-ja, koje je slijedila podskupina A te naposljetku podskupina O. Budući da je srednja vrijednost DFI povećana kod skupina s narušenom pokretljivošću (OA, A), ispitala se korelacija pojedinih parametara sjemena kako bi se utvrdilo je li pokretljivost uistinu povezana s DFI spermija. Spearmanov test korelacije potvrdio je ovo opažanje, pri čemu je DFI negativno povezana s pokretljivošću (-0,509) i pozitivno povezana s nepokretljivošću spermija (0,517). Osim toga, uočena je povezanost između DFI i vitalnosti spermija gdje je povećana DFI negativno povezana s vitalnošću spermija (-0,509). Također, regresijski log normalni linearni model je pokazao kako povećanje pokretljivosti spermija za 10 % vodi smanjenju DFI za 12,4 % te povećanje udjela vitalnih spermija vodi smanjenju DFI za 16,8 %. Rezultati povezanosti SDF i pokretljivosti spermija slažu se s prethodno objavljenim istraživanjima gdje je SDF češće povezan s pokretljivošću, nego s brojem i koncentracijom spermija (196-198). Jedan od mogućih razloga povezanost SDF, smanjene pokretljivosti i vitalnosti leži u njihovom zajedničkom porijeklu tijekom sazrijevanja spermija, budući da se tijekom spermiogeneze kondenzira kromatin i u isto vrijeme spermatida sazrijeva iz okrugle u izduženu i dobiva rep. Također, pretpostavlja se kako uslijed pojave oksidacijskog stresa kod muškaraca abnormalnih parametara sjemena dolazi do oštećenja DNA kao i oštećenja plazmatske membrane spermija što vodi smanjenoj pokretljivosti (198).

S druge strane, autori meta-analize u kojoj je analizirana povezanost SDF-a kao prediktivnog čimbenika postupka MPO ustvrdila je kako ovaj test trenutno ne može predvidjeti ishode IVF-a ili ICSI-ja. Jedan od mogućih razloga su izrazito heterogene skupine ispitanika analiziranih studija, ali i različiti testovi kojima se ovaj parametar opisuje te nedostatak univerzalno definirane granične vrijednosti (199). Budući da ova metoda nije još uvijek standardizirana za rutinska klinička testiranja, može doći do nesrazmjera rezultata i metodologije u različitim androloškim laboratorijima (200). Nadalje, rezultati ovog istraživanja su pokazali povezanost vitalnosti spermija i postotka DFI što upućuje na potencijalno malu dijagnostičku i prediktivnu vrijednost analize SDF-a kod pacijenata s narušenom vitalnošću. Međutim, nekoliko revijalnih članaka je ukazalo kako povećane razine SDF-a mogu utjecati na rani razvoj embrija, implantaciju embrija u maternici te ishod trudnoće prirodnim putem ili putem MPO (201, 202). Prema tome, najnovije smjernice SZO kao i Europsko udruženje urologa upućuju na testiranje SDF-a kod normozoospermičnih muškaraca koji ne mogu ostvariti trudnoću partnerice i kod ponovljenih gubitaka trudnoće partnerice (106, 203). Potrebno je svakako provesti dodatna istraživanja s većim brojem ispitanika te nastaviti analizirati dosadašnje podatke kako bi se učvrstila potencijalna klinička uporaba te ustvrdili

dodatni reproduktivni poremećaji čiju dijagnostiku i liječenje bi ova dodatna metoda analize sjemena mogla olakšati.

### **6.3. Stupanj kondenzacije kromatina spermija**

Ispravna kondenzacija kromatina tijekom spermiogeneze, od ključne je važnosti za pravilnu zaštitu genoma spermija, rani razvoj i kvalitetu embrija kao i uspješnost ostvarivanje trudnoće pomoću MPO-a (204, 205). Stoga bi metode kojima se određuje stupanj kondenzacije kromatina, mogle biti veoma informativne i dodatno ukazati na kvalitetu spermija te potencijal za oplodnju. U ovom istraživanju stupanj kondenzacije kromatina, određen je jednostavnom metodom bojanja fiksiranih spermija anilin-plavim pri čemu se boja veže na višak zaostalih histona i ukazuje na neispravno kondenzirani kromatin (106). Ipak, ovom analizom nisu dobivene statistički značajne razlike u postotku preostalih histona između skupina N i PAT. Također, nisu dobivene razlike niti nakon podjele ispitanika u podskupine A, O i AO. Također, računanjem Spearmanovog koeficijenta korelacije, nije pronađena povezanost klasičnih parametara sjemena i sažimanja kromatina spermija. Rezultati studija koje su prethodno promatrale razlike sažimanja kromatina spermija između plodnih i neplodnih pacijenata kao i povezanost s pojedinim klasičnim parametrima sjemena nerijetko su oprečni. Prema istraživanju iz 2001. godine, pronađene su razlike u kondenzaciji kromatina nakon bojenja anilin-plavim između plodnih i neplodnih pacijenata, ali nije pronađena povezanost s klasičnim parametrima sjemena (206). Neslaganje u razlici kondenziranosti kromatina spermija u ovom istraživanju i navedenoj studiji moglo je potencijalno nastati zbog same raspodjele ispitanika u skupine. Naime, u ovom istraživanju, ispitanici su svrstani prema vrijednostima klasičnih parametara sjemena, dok su u drugoj studiji raspodijeljeni na neplodne i zdrave kontrole koje nisu bile u potpunosti definirane (206). Nedostatak povezanosti klasičnih parametara sjemena i kondenzacije kromatina spermija slaže se u obje studije. Tako su Kim i sur, 2013., promatrali razliku u kondenzaciji kromatina između pacijenata normalne i abnormalne morfologije te nisu pronašli značajne razlike. Ipak, pronašli su međusobnu povezanost ispravne kondenzacije kromatina i morfologije (207), što je potvrđeno u još jednoj studiji (208). Povezanost ostalih klasičnih parametara sjemena poput pokretljivosti, vitalnosti i broja spermija i ispravne kondenzacije kromatina ponovno nije pronađena (208). Ponovno, ovakva odstupanja rezultata ove studije te ostalih, vjerojatno nastaju zbog korištenja različitih kriterija pri svrstavanju

ispitanika u skupine. Stoga se može uvidjeti važnost samog uzorkovanja i raspodjele ispitanika kao i toga kako je rezultate potrebno interpretirati u okviru ciljeva pojedine studije.

#### **6.4. Povezanost fragmentacije DNA i stupnja kondenzacije kromatina spermija**

Budući da su se dodatne analize fragmentacija DNA i stupanja kondenzacije kromatina spermija u prethodnim istraživanjima pokazale povezanima s ishodima MPO-a (106, 201, 204), ispitala se potencijalna povezanost ova dva parametra na populaciji ispitanika uključenih u istraživanje. U tu svrhu napravljen je regresijski model podataka na podacima log-normalne distribucije u kojemu je promjena indeksa fragmentacije DNA (DFI) postavljena kao zavisna varijabla. Navedeni model nije pokazao statistički značajnu povezanost promjene DFI pri univarijantnoj analizi niti u postavkama gdje je analiza prilagođena godinama i skupinama ispitanika. Dio dosadašnjih istraživanja je također pokazao kako povezanosti fragmentacije DNA i bojenja anilin-plavim nema (207, 209), dok su Simon i sur., 2014, ipak pokazali povezanosti ova dva parametra (204). Nekoliko je potencijalnih razloga zbog kojih fragmentacija DNA i kondenzacija kromatina spermija mogu biti nepovezani te može doći do razilaženja opažanja u različitim studijama. Jedan razloga je sam mehanizam nastanka fragmentacije DNA i neispravno kondenziranog kromatina. Iako SDF može nastati uslijed neispravne spermiogeneze koja ujedno može narušiti i kondenzaciju kromatina, također može nastati i tijekom same spermatogeneze, ali i post-testikularno pojavom oksidacijskog stresa (108, 112, 113). Prema tome, nije neočekivano da promatrana dva parametra nisu povezani jedan s drugim te da mogu služiti kao neovisni čimbenici procjene kvalitete spermija (210). Također, sama spermiogeneza, a time i kondenzacija kromatina, ovisi o udjelu protamina P1 i P2, broju disulfidnih mostova koje međusobno tvore, kao i o dostupnosti iona cinka koji koordiniraju disulfidne mostove protamina (12, 211). Tako je pokazano da omjer P1/P2 u spermijima, bez analize kondenzacije kromatina, može biti povezan sa SDF-om (212), što bi moglo sugerirati analizu omjera P1/P2 kao informativniji parametar zaštite genoma spermija i povezanosti s fragmentacijom DNA od analize kondenzacije kromatina.



## 6.5. Sastav N-glikana ukupnih proteina sjemene plazme

Sjemena plazma, tekući medij koji potpomaže kretanje spermija kroz dio muškog i ženski reproduktivni sustav, sadrži brojne makromolekule što ukazuje na njen potencijal za pronalazak novih informativnih biomarkera muške neplodnosti i ostalih poremećaja reproduktivnog sustava (30). Osobito je bogata glikoproteinima koji imaju jednu od najčešćih post-translacijskih modifikacija, N-glikozilaciju. Zbog svojstava dobivenih N-glikozilacijom, glikoproteini imaju važnu ulogu u interakcijama sa staničnom membranom te glikozilacija ima ulogu pri smatanju proteina u konačnu strukturu, čime neposredno može utjecati i na njihovu funkciju (42). Pokazano je kako obrazac glikozilacije može biti narušen u raznim bolestima (47), između ostalih i kod muške neplodnosti (65), te time mogu biti potencijalni kandidati za nove biomarkere neplodnosti (213).

U ovom istraživanju identificirano je čak 37 specifičnih N-glikana izoliranih s ukupnih proteina sjemene plazme te razdvojenih pomoću metode HILIC-UPLC. Statistički značajna razlika u relativnoj površini N-glikanskih pikova SPGP27 i SPGP14 dobivena je između skupine ispitanika patoloških parametara sjemena naspram normozoospermičnih. Raspodjelom u podskupine A, O i AO, statistički značajnim su se pokazali opet pik SPGP14 ali i pikovi SPGP17, SPGP26 i SPGP32, iako je nakon Bonferronijeve korekcije za višestruke usporedbe, kao statistički značajan N-glikan ostao samo SPGP14. Također, značajan je ostao i nakon raspodjele u podskupine, gdje je uočen trend opadanja njegove vrijednosti s najnižom relativnom površinom u podskupini OA, zatim O, pa A. Pomoću regresijskog modela za log-normalnu distribuciju podataka pokazano je 16 %-tno smanjenje ( $p=0,001$ ) površine SPGP14 kod skupine s patološkim parametrima sjemena, te smanjenje i u njenim podskupinama koje se povećavalo s ozbiljnošću dijagnoze - O (-19 %,  $p=0,004$ ) i OA (-26 %,  $p<0,001$ ). Nadalje, regresijskim modelima dobiveno je još glikanskih pikova poput SPGP2, SPGP4, SPGP6, SPGP14, SPGP18, SPGP26, SPGP35 koji su se pokazali značajno različiti, no među njima samo za SPGP6 i SPGP26 dobiveni su trendovi opadanja, odnosno porasta relativne površine u skupini s patološkim parametrima sjemena. Međutim, nakon Bonferronijeve korekcije za višestruke usporedbe, ponovno je značajan ostao samo SPGP14. Prethodne studije su pokazale kako šećerne skupine na glikanima, kao i specifične glikozidne veze, mogu do određene mjere razlikovati patološke skupine ispitanika i one normalnih parametara sjemena (214-216). Tako je između O, A i OA pacijenata pokazan trend smanjene sijalinizacije glikana koji je

najuočljiviji u skupini astenozoospermičnih ispitanika (215). Kod tih ispitanika je također detektirana potpuna odsutnost glikana koji sadrže više od 2 sijalinske kiseline, dok je uočen porast fukoznih podjedinica na glikanima (215). Kod skupine ispitanika definiranih kao muškarci normalnih parametara sjemeni s idiopatskom neplodnošću, bio je povećan udio visoko razgranatih i sijaliniziranih glikana (215). Još jedna studija pokazala je snižen udio sijalinske kiseline vezane  $\alpha$ -2,3-vezom kod A skupine prema kojoj se mogla raspoznati u odnosu na N, O i OA (216). Prema tome, promjene N-glikana dobivene u ovoj studiji mogu ukazati na to da narušen obrazac N-glikozilacije proteina može utjecati na homeostazu molekularnih procesa u spermijima i sjemenoj plazmi. Osim toga, može značiti narušavanje procesa glikozilacije u reproduktivnim organima koji sjemenu plazmu luče, poput sjemenih vezikula, prostate i ostalih sekretornih organa (217).

Budući da je riječ o nepoznatom i nestandardnom uzorku, izolacijom N-glikana ukupnih proteina sjemene plazme i razdvajanjem metodom HILIC-UPLC nije bilo moguće dobiti točne informacije o njihovom sastavu te njihovoj biološko-kemijskoj pozadini. Iz tog razloga, napravljena je strukturna karakterizacija onih N-glikana koji su pokazali statistički značaj prije ili nakon Bonferronijeve korekcije, između skupine N i PAT te N i podskupina A, O i OA. Prethodna sveobuhvatna dva istraživanja odredila su strukture N-glikana u sjemenoj plazmi normozoospermičnih, plodnih dobrovoljaca (66, 186). U studiji koju su proveli Pang i sur. 2009, utvrđeno je nekoliko najzastupljenijih tipova glikana koji uključuju glikane bogate manozom, kompleksne N-glikane čije antene završavaju tzv. Lewisovim x ili Lewisovim y epitopima i kompleksne tipove N-glikana koji imaju sijalinsku kapu na završecima antena (186). Rezultati se djelomično slažu s ovim istraživanjem gdje su također najčešći tipovi N-glikana kompleksni te nerijetko završavaju sijalinskom kapom poput sastava glikana H4N3F1S1 iz pika SPGP5 te glikana pikova SPGP6, SPGP14, SPGP17, SPGP25, SPGP26 i SPGP32. Nešto drugačiji epitopi, Lewis x i a, su pronađeni u drugoj sveobuhvatnoj studiji gdje su Saraswat i sur. 2016, karakterizirali N-glikane, njihova glikozilacijska mjesta i peptide, odnosno proteine sjemene plazme na kojima se nalaze. Oni međutim nisu pronašli sijalinizirane Lewisove epitope (66), koji su s druge strane detaljno opisani u studiji Pang i sur. 2009 (186). Lewisovi epitopi su inače završni sljedovi antena glikana, bogati fukozom i ponekad sijalinizirani te su podobnije istraženi budući da imaju važnu ulogu u nekoliko fizioloških procesa. Jedna od uloga je pri oplodnji, gdje je pronađeno kako je zona pellucida jajne stanice obogaćena upravo prisutnošću sijaliniziranih Lewisovih x epitopa (217). Također, Lewisovi epitopi specifično sudjeluju u raspoznavanju signala imunološkog sustava pri čemu suprimiraju

adaptivni imunološki odgovor (186). U ovom radu su pronađeni Lewisovi x epitopi kod N-glikana SPGP18, SPGP32 i SPGP35 što je u skladu s prethodnim studijama (66, 186).

Važan rezultat ovog rada je i pronalazak visokog udjela fukozilacije u jezgri glikana što je potvrđeno i u 9 od ukupno 11 glikana karakteriziranih u ovom istraživanju, poput glikana u pikovima SPGP2, SPGP4, SPGP5, SPGP6, SPGP14, SPGP18, SPGP25, SPGP32 i SPGP35, a slaže se s rezultatima prethodnih istraživanja (66, 186, 214). Iako sama uloga fukozilacije u jezgri glikana proteina sjemene plazme još uvijek nije razjašnjena kao što je uloga u predjelu antene, ipak ostaje jedna od karakteristika ovih glikoproteina koju je potrebno istražiti (214). Također, pokazano je kako muškarci smanjene plodnosti pokazuju tendenciju prema još većoj fukozilaciji no plodni (214), što ne možemo izravno povezati s ovim istraživanjem, ali ukazuje na zanimljiv aspekt gdje bi detekcija određenih svojstava glikana proteina sjemene plazme mogla ukazati na zdravstveni status muškog reproduktivnog sustava. Karakterizirani glikani velikim dijelom sadrže sijalinizirane kape koje često prati jedna fukoza u jezgri uključujući glikan H4N3F1S1 iz glikanskog pika SPGP5, glikan H5N4F1S2 iz pika SPGP14 te strukture pikova SPGP6, SPGP25 i glikan sastava H7N6F1S4 iz pika SPGP32. S druge strane, isključivo kod glikana koji ne sadrže sijaliniziranu kapu, pronađena je bogata fukozilacija u predjelu antene poput pika SPGP18, sastava glikana karakteriziranog kao H6N5F6 iz glikanskog pika SPGP32 te SPGP35. Ovi rezultati se slažu s rezultatima drugih studija koje su također pokazale kako su razgranati glikani koji ne sadrže sijalinsku kapu, izrazito bogati fukozom u antenarnom dijelu strukture (186, 214). Nadalje, pokazano je kako N-glikani sjemene plazme mogu biti visoko razgranati i sijalinizirani (218) što se slaže s rezultatima ove studije gdje je također većina glikana razgranata i sadrži sijaliniziranu kapu.

Istraživanja glikana kao potencijalnih biomarkera odnosno prediktora poremećaja muškog reproduktivnog sustava su relativno novo područje. Među analiziranim N-glikanima u ovoj studiji kao potencijalni biomarker muške (ne)plodnosti po prvi puta istaknut je bio upravo SPGP14 koji je pokazan značajnim u nekoliko korištenih statističkih modela. Analizom njegove kompozicije identificirana je struktura kompleksnog tipa te se pokazalo da je SPGP14 biantenarni digalaktozilirani, disijalinizirani N-glikan s fukozom u jezgri (H5N4F1S2) ili bez fukoze u jezgri (H5N4S2). U dosadašnjim, mada rijetkim studijama, ovaj glikan nije bio uočen kao biomarker muške plodnosti (219), što upućuje na kompleksnost detekcije ovih post-translacijskih modifikacija u sjemennoj plazmi (66, 186, 213). Obrazac glikozilacije istraživan je i kod specifičnih glikoproteina sjemene plazme poput PSA (engl. *prostate specific antigen*)

u neplodnih i plodnih muškaraca. Budući da je PSA ujedno i jedan od najčešćih glikoproteina u sjemennoj plazmi, dio detektiranih glikana vjerojatno i potječe s ovih proteina. Tako su Wang i sur. 2021, ustanovili kako je glikan H5N4F1S2 jedan od najobilnijih dok  $\alpha$ -2,6-sijalinizacija najčešći oblik glikozidne veze na PSA (220). Zanimljivo, isti N-glikan je pronađen u glikanskom piknu SPGP14 što bi moglo ukazati kako je za promjene u površini SPGP14 barem djelomično odgovoran PSA. Ipak, autori rada nisu pronašli razliku glikozilacije PSA kod plodnih i neplodnih muškaraca, za što bi razlog mogao biti suviše heterogena skupina neplodnih ispitanika. S druge strane, utvrdili su kako su glikani PSA također visoko fukozilirani i sijalinizirani (220, 221), što je karakteristika N-glikana dobivena u ostalim studijama (66, 186, 213).

## **6.6. Povezanost N-glikana ukupnih proteina sjemene plazme i parametara sjemena**

U radu je regresijskim modelom podataka log-normalne distribucije, istražena povezanost pojedinih parametara sjemena (broj, pokretljivost, morfologija, vitalnost) i N-glikanskih pikova kod ispitanika normalnih i patoloških parametara sjemena. Iako je ovaj statistički model pokazao širok spektar povezanosti, nakon primjene prilagodbe za višestruke usporedbe, jedina značajna povezanost ostala je između N-glikanskog pika SPGP2 i kategorije srednje progresivno pokretnih spermija u skupini ispitanika s patološkim parametrima sjemena. Strukturna karakterizacija ovog glikana upućuje na nekoliko potencijalnih struktura uključujući kompleksni tip glikana, biantenarni, monogalaktozilirani s fukozom u jezgri (H4N3F1), monoantenski, monogalaktozilirani s fukozom u jezgri ili hibridni tip koji je monoantenski, agalaktozilirani sa fukozom u jezgri i jednom terminalnom manozom (H4N4). Prethodne studije glikozilacije sjemene plazme dale su određeni uvid, iako šturi, u povezanost N-glikana i specifičnih parametara sjemena. Tako je pronađena povezanost glikanskih profila i parametara sjemena pri čemu je udio visoko razgranatih glikana pozitivno povezan s brojem spermija. Ovo opažanje je uočeno budući da je skupina oligozoospermičnih ispitanika imala smanjenu reaktivnost pri detekciji razgranatih glikana (218). No druge analize glikoproteina sjemene plazme pokazale su veoma slabu povezanost fukozilacije i parametara sjemena, bez značajnih razlika između istraživanih skupina neplodnosti kao na primjeru glikoproteina klasterina. Njegova glikozilacija, odnosno fukozilacija jezgre i fukoze vezane glikanskom  $\alpha$ -1,2-vezom nije pokazala povezanost u odnosu na klasične parametre sjemena (222). Iz ovoga se može

zaključiti da povezanost i među-utjecaj glikana proteina sjemene plazme i svojstava spermija dobivenih standardnim spermioqramom, ostaje područje s mnogo nepoznanica za daljnja istraživanja s potrebom za izradom standardnog protokola za analizu.

## **6.7. Povezanost N-glikana sjemene plazme, fragmentacije DNA i stupnja kondenzacije spermija**

Budući da je muška neplodnost izrazito heterogen poremećaj te da sam spermioqram često ne daje prognostičku vrijednost postupcima MPO-a, potrebno je raditi na razvijanju složenijih modela predikcije ishoda (223). Stoga je u ovom radu po prvi puta ispitana povezanost N-glikana sjemene plazme s dodatnim testovima za analizu kvalitete spermija uključujući test fragmentacije DNA i kondenzacije kromatina. Načinjen je ponovno regresijski model za log-normalnu distribuciju podataka te je pronađena povezanost odabranih N-glikana i oba analizirana testa. N-glikani SPGP5, SPGP17 i SPGP26 se značajno smanjuju kada se indeks fragmentacije DNA (DFI) poveća za 10% kod ispitanika s normalnim spermioqramom. Zanimljivo, ovi N-glikani su kompleksnog tipa, sijalinizirani, bez fukoze u jezgri, osim SPGP5 koji je karakteriziran kao mješavina nekoliko glikana. S druge strane, kod pacijenata s patološkim parametrima sjemena se visoko fukozilirani N-glikan SPGP18 značajno smanjuje kada se DFI poveća za 10 %. SPGP18 je bez sijalinske kape, visoko fukoziliran na predjelu antene i jezgre. Jedno od mogućih objašnjenja je sama promjena u sastavu glikoproteina sjemene plazme muškaraca čija DNA spermija je oštećena uslijed post-teststikularnih utjecaja. Tako primjerice pojava oksidacijskog stresa osim što može uzrokovati oštećenje DNA, može također negativno djelovati na sintezu glikana unutar endoplazmatskog retikuluma (ER) i Golgijevog aparata (GA). Budući da je za sintezu prekursora sekretornih proteina potreban velik oksidativni potencijal, oksidativni stres ga može narušiti te time utjecati i na promjenu identiteta glikana u glikoproteinima (224). Nadalje, pokazano je kako sastav proteina sjemene plazme ispitanika kod kojih je detektirano prisustvo ROS-ova naspram onih koji im nisu bili izloženi, može biti različit. Među njima je pronađen i glikoprotein fibronektin, jedan od najzastupljenijih proteina sjemene plazme, koji je bio prisutan samo kod ispitanika koji nisu bili izloženi ROS-ovima (225). Također, uočena je povezanost razine još jednog glikoproteina kojim sjemena plazma obiluje, klasterina i narušenih parametara sjemena, kao i povećane pojave SDF-a (226). Prema tome, jedno od objašnjenja povezanost promjene određenih N-glikana i razine SDF-a potječe najvjerojatnije od same promjene razine glikoproteina

sjemene plazme koja je nastala uslijed oksidacijskog stresa ili drugih čimbenika neplodnosti. Za buduća istraživanja od interesa bi bilo odrediti i same glikoproteine koji su odgovorni za promjene koje se odražavaju na N-glikane ukupnih proteina sjemene plazme.

Osim povezanosti SDF-a i N-glikana, ispitana je i pronađena povezanost kondenzacije kromatina i N-glikana ukupnih proteina sjemene plazme. Ta povezanost utvrđena je za smanjenje, odnosno povećanje relativne površine glikanskih pikova SPGP17, tj. SPGP25 te je prvi puta pronađena i ispitana u ovom istraživanju. Molekularna podloga ove povezanosti razine histona tj. protamina i N-glikana, nije u potpunosti jasna. U studiji koju su proveli Girouard i sur., 2008, na spermijima goveda pokazali su kako dijelovi plazmatske membrane spermija mogu biti prepoznati različitim proteinima sjemene plazme (227). Budući da su N-glikani proteina izuzetno dinamične modifikacije (224), moguće da u jednom trenutku na njih utječe i histonska odnosno protaminska kompozicija na kromatinu izravno ili nekim drugim zajedničkim mehanizmima. Zanimljivo je kako u ovom radu nema značajne povezanosti kondenzacije kromatina i analiziranih parametra sjemena, kao ni povezanosti kondenzacije kromatina s SDF-om. Ipak, statistički značajna povezanost je uočena sa specifičnim N-glikanskim pikovima ali ona ne mora nužno opisivati povezanost bioloških procesa koji se odvijaju u spermijima i sjemenjnoj plazmi. Možda bi se na većem broju ispitanika takva povezanost mogla potvrditi.

## **6.8. Povezanost okolišnih čimbenika, fragmentacije DNA i stupnja kondenzacije spermija**

Čimbenici koji mogu utjecati na plodnost muškarca su i oni okolišni kojima je osoba izložena kroz svoje svakodnevne životne navike poput prehrane, pušenja, konzumaciju alkohola te život u urbanoj ili ruralnoj sredini (228). U ovoj studiji je stoga regresijskim modelima ispitana povezanost dodatnih analiza parametara sjemena (SDF i sažimanje kromatina) i značajnih N-glikana s parametrima životnih navika dobivenih anketom. Ranija istraživanja su pokazala kako pušenje nepovoljno utječe na mušku plodnost te je povezano s patološkim parametrima spermija na animalnim modelima, ali i kod ljudi (150, 229). U ovom istraživanju, oštećenje genoma, odnosno povećana fragmentacija DNA je povezana s povećanom konzumacijom cigareta kada se istraže povezanosti na ukupnoj populaciji. Ovi rezultati se slažu s dosadašnjim rezultatima gdje je pokazano kako pušači imaju veću stopu

SDF-a (229-231). Neki od predloženih mehanizama kojima pušenje oštećuje DNA jesu povećani oksidacijski stres uslijed izlaganja nikotinu, kao i povećana disfunkcija spolnih hormona. Također, drugi sastojci dima poput teških metala olova i kadmija te benzopirena, kao endokrino aktivnih tvari, mogu nepovoljno utjecati na kvalitetu spermija i raznim mehanizmima dovesti do oštećenja DNA spermija (229). Predložen je i mehanizam putem enzima CHK1 (engl. *checkpoint kinase 1*), koji koordinira odgovor na oštećenje DNA tako da aktivira zaustavljanje staničnog ciklusa, popravak DNA ili staničnu smrt (230). Pokazano je kako je razina ovog enzima značajno snižena u pušača naspram nepušača. Pronađena je i povezanost ekspresije CHK1 u spermijima i SDF-a što bi moglo upućivati kako odgovor ovog enzima također može sudjelovati u odgovoru na oštećenja izazvana pušenjem (230).

U ovom radu pronađena je i povezanost povećanja kondenzacije kromatina spermija kod ispitanika s normalnim parametrima sjemena kako opada njihova konzumacija cigareta. Ovi rezultati se također slažu s rezultatima dobivenim u prethodnim studijama (231-233). Naime, Hammadeh i sur. 2010. su predložili mehanizam kojim pušenje utječe na kondenzaciju kromatina pri čemu kod pušača zaostaje povećana razina histona H2B što uzrokuje slabiju kondenzaciju kromatina. Takav slabije kondenzirani kromatin je podložan oštećenjima uzrokovanim oksidacijskim stresom kojeg može izazvati i pušenje (233).

Prehrana također može utjecati na kvalitetu spermija pogotovo ako je riječ zapadnjačkoj prehrani koja uključuje konzumaciju prerađenih proizvoda visokog glikemijskog indeksa, crvenog mesa, mliječnih proizvoda, zasićenih masti i *trans*-masnih kiselina (136). S druge strane, mediteranska prehrana uz koju ide konzumacija prehrane bogate cjelovitim žitaricama, povrćem, voćem, peradi, ribom i morskim plodovima te orašastim plodovima je također povezana s boljom kvalitetom sjemena (136). U ovom istraživanju tražene su regresijskom modelima povezanosti prehrane, odnosno konzumacije crvenog mesa, peradi, ribe, voća, povrća i mlijeka s dodatnim testovima analize kvalitete spermija. U ukupnoj ispitanoj populaciji povećana kondenzacija kromatina je povezana sa smanjenom konzumacijom peradi i povećanom konzumacijom mlijeka. S povećanom konzumacijom mlijeka je povezana i fragmentacija DNA spermija kod ispitanika normalnih parametara sjemena, dok je smanjena konzumacija voća povezana s kondenzacijom kromatina kod normalnih parametara sjemena. S druge strane, s kondenzacijom kromatina je povezana manja konzumacija crvenog mesa i svakodnevna konzumacija povrća kod ispitanika patoloških parametara sjemena. Navedena opažanja govore u prilog kako prehrana koja naginje mediteranskoj pridonosi boljoj kvaliteti

spermija procijenjenoj na temelju SDF-a i kondenzacije kromatina. Također, izlaganje endokrinim disruptorima kroz prehranu poput ksenoestrogena koji se nalaze u soji, mlijeku ili govedu može narušiti kvalitetu sjemena. Kako prehrambene namirnice u kombinaciji s navikama pušenja, konzumiranja alkohola i izloženošću drugim okolišnim ksenobioticima predstavljaju složenu mješavinu mogućih genotoksika i endokrino aktivnih tvari iznimno je teško kod ljudi odrediti učinak samo jedne vrste namirnica i njihov utjecaj na plodnost (234). Ipak većina istraživačkih i preglednih radova u području prehrane i neplodnosti ipak sugerira mediteransku prehranu kao izbor za poboljšanje funkcije cjelokupnog organizma te tako i reproduktivnog sustava (136, 234).

Samo životno okruženje pojedinca, ovisno živi li u urbanoj ili ruralnoj okolini također može imati utjecaja na reproduktivni status. Studija na miševima je pokazala kako su muške spolne stanice osjetljive na oštećenja koja mogu nastati uslijed izlaganju zagađenju zraka kakvo se često nalazi u urbanim i industrijskim sredinama (235). S druge strane, život u ruralnoj sredini također nosi opasnosti po reproduktivne zdravlje, budući da je veća vjerojatnost korištenja raznih pesticida kroz bavljenje poljoprivredom u takvom okruženju (160). U ovom istraživanju, urbano okruženje je negativno povezano s kondenzacijom kromatina u ukupnoj populaciji kao i kod ispitanika normalnih parametara sjemena. Istraživanje koje su proveli Lim i sur., 2018, pokazalo je kako je dugotrajno zagađenje zraka, kakvo nerijetko vlada u većim gradovima, povezano s rizikom nastanka dijabetesa (236). Prema tome muškarci koji žive u okolini s većim zagađenjem, zbog takvog okoliša potencijalno imaju veću mogućnost poremetnji. Također, kondenzacija kromatina iako nije izravno povezana s klasičnim parametrima sjemena i SDF-om, potencijalno može biti senzor okolišnih čimbenika poput životnog okoliša ili prehrane.

## **6.9. Povezanost okolišnih čimbenika i N-glikana ukupnih proteina sjemene plazme**

Budući da su N-glikani proteina izrazito dinamičan sustav koji je osjetljiv na vanjske promjene, na njih mogu utjecati i određeni okolišni čimbenici (44). U ovoj studiji su stoga po prvi puta regresijskim modelom ispitane povezanosti odabranih životnih i okolišnih faktora (prehrana, pušenje, konzumacija alkohola i urbana/ruralna sredina) s N-glikanima koji su pokazali značaj pri analizama u normozoospermičnih ispitanika i različitim skupinama



ispitanika s patološkim parametrima sjemena. Dobivene su razne povezanosti, pri čemu se navika pušenja pokazala kao navika koja je najčešće povezana s promjenama u sastavu N-glikana. Povezanost pušenja i promjena N-glikana je detaljnije istražena u krvnom serumu pacijenata oboljelih od karcinoma pluća (237, 238). Nadalje pokazano je kako pušači imaju povećanu razinu tetraantenarnih i tetragalaktoziliranih struktura, dok smanjenu biantenarnih struktura na proteinima krvne plazme (239). U ovoj studiji koja je provedena na N-glikanima proteina sjemene plazme, kod normozoospermičnih ispitanika pozitivna povezanost je uočena s tri- ili tetra-antenarnim glikanom sa, odnosno bez sijalinske kape. S druge strane, glikani bez sijalinske kape su negativno povezani s pušenjem u ovoj promatranoj skupini. Kod ispitanika patoloških parametara sjemena uočena je pozitivna povezanost s bi- ili triantenarnim glikanom bez sijalinske kape te sa tetraantenarnim glikanom sa sijalinskom kapom. Ipak, dodatne studije su potrebne kako bi se dalje ispitala i potvrdila ova povezanost, potencijalno na većoj populaciji ispitanika. Osim pušenja, povezanosti N-glikana su pronađene i s još nekoliko okolišnih čimbenika uključujući život u industrijskom okruženju (tvornice i prometnice), konzumaciju alkohola te konzumaciju ribe kao i pretilost. Ovi rezultati su iznimno zanimljivi te dalje upućuju na N-glikane kao potencijalne biomarkere izloženosti čimbenicima okoliša, što je pokazano u prijašnjim studijama provedenim na nekim drugim bolestima poput N-glikanima imunoglobulina G krvne plazme (240, 241). Budući da je ispitivani uzorak i populacija u drugim studijama drugačiji no u ovoj, rezultati nisu izravno usporedivi.

Može se zaključiti da je hipoteza ovog istraživanja djelomično potvrđena, budući da su patološki parametri sjemena povezani s povećanjem fragmentacije DNA i promijenjenim sastavom N-glikana ukupnih proteina sjemene plazme, iako nisu povezani s kondenzacijom kromatina spermija, koja se pokazala kao njima neovisna analiza. Ovaj rad pridonosi razumijevanju složenosti dijagnostike muške neplodnosti te donosi uvid u povezanost dodatnih analiza kvalitete spermija i sjemene plazme, koje su po prvi puta ispitane. Također, ovaj rad predstavlja bazu za nova istraživanja koja će podobnije ispitati same mehanizme povezanosti parametara poput stupnja sažetosti kromatina ili fragmentacije DNA sa sastavom N-glikana sjemene plazme. Povezanost provedenih analiza s okolišnim čimbenicima rizika za razvoj neplodnosti, ukazuje na potencijal pojedinih analiza kao biomarkera tih utjecaja.

## 7. ZAKLJUČAK

Dobiveni rezultati ukazuju na nekoliko najvažnijih zaključaka:

1. Fragmentacija DNA spermija u ovom istraživanju definira prag od DFI 20 % kao granični, korelira s pokretljivošću i vitalnošću spermija te kod pacijenata koji imaju narušene navedene parametre nije pogodan nezavisni biomarker.
2. Stupanj kondenzacije kromatina spermija ne korelira s parametrima sjemena i fragmentacijom DNA spermija te se ponaša kao zaseban parametar. Zbog statistički značajne povezanosti s N-glikanima SPGP17 i SPGP25, ipak je moguća njegova korelacija s analizom N-glikana.
3. N-glikan SPGP14 pokazuje statistički značajan trend opadanja u astenozoospermičnim ispitanicima koje slijede oligozoospermični te naposljetku oligoastenozoospermični pa je potencijalni indikator stupnja neplodnosti.
4. N-glikani proteina sjemene plazme koreliraju s parametrima dobivenim dodatnim analizama kvalitete spermija (fragmentacija DNA i stupanj sažimanja kromatina) što ukazuje na važnost kombiniranja više analiza pri procjeni kvalitete sjemena.
5. Ispitani okolišni čimbenici - pušenje, alkohol, prehrana i život u urbanoj ili ruralnoj sredini negativno su povezani s fragmentacijom DNA i stupnjem kondenzacije kromatina što ukazuje kako nepravilnost stukture genoma može biti dijelom uzrokovana vanjskim utjecajima.
6. Utjecaj okolišnih čimbenika vidljiv je na N-glikanima sjemene plazme, što upućuje na kombinacije N-glikana kao potencijalne biomarkere vanjskih utjecaja na muški reproduktivni sustav.
7. Statistički značajna povezanost kvalitete spermija sa sastavom N-glikana ukupnih proteina sjemene plazme ukazuje na važnost razvoja i uključivanja novih dijagnostičkih metoda u analizu muške neplodnosti.

## 8. SAŽETAK

Muška neplodnost je izrazito heterogen poremećaj te je nerijetko osnovna analiza sjemena nedostatna za njezinu dijagnostiku i objašnjenje. Cilj istraživanja je bio po prvi put odrediti povezanost kvalitete spermija i životnih i okolišnih čimbenika sa sastavom N-glikana ukupnih proteina sjemene plazme. U studiju je uključeno 166 ispitanika s normalnim (N = 82) i patološkim (PAT = 84) parametrima sjemena (koncentracija/broj, pokretljivost, vijabilnost, morfologija spermija tj. astenozoospermija, oligozoospermija, oligoastenozoospermija). Fragmentacija DNA spermija (SDF) bila je statistički značajno veća kod skupine PAT te negativno povezana s pokretljivošću i vitalnošću spermija. N-glikan SPGP14 se pokazao statistički najznačajnijim za razlikovanje skupine N i PAT, kao i za statistički značajan trend opadanja u skupini PAT od astenozoospermije prema oligozoospermiji do oligoastenozoospermije. Parametri sjemena i N-glikana nisu pokazali značajne povezanosti, osim kod srednje progresivne pokretljivosti spermija i SPGP2 u skupini PAT. Specifični N-glikani su pokazali statistički značajnu povezanost s SDF i sažimanja kromatina. Okolišni čimbenici (prehrana, pušenje, alkohol, urbana/ruralna sredina) pokazali su značajnu povezanost sa SDF, sažimanjem kromatina i promjenom sastava N-glikana čija konačna struktura je također istražena. Ovaj doktorski rad daje doprinos sveobuhvatnijem uvidu u mušku neplodnost, a N-glikani iskazuju potencijal kao biomarkeri za dijagnostiku muške neplodnosti.

## 9. ABSTRACT

### **Association of life habits and environmental factors, sperm quality and seminal fluid N-glycans in men, Tihana Marić, 2022**

Male infertility is a highly heterogeneous disorder and often basic semen analysis is insufficient for its diagnosis and explanation. The aim of the study was to determine for the first time the relationship between sperm quality and life and environmental factors with the seminal plasma total protein N-glycans. The study included 166 subjects with normal (N = 82) and pathological (PAT = 84) semen parameters (concentration/number, motility, viability, sperm morphology i.e. asthenozoospermia, oligozoospermia, oligoasthenozoospermia). Sperm DNA fragmentation (SDF) was statistically significantly higher in the PAT group and negatively associated with sperm motility and vitality. The N-glycan SPGP14 was statistically the most significant for distinguishing the N and PAT group, and for a statistically significant decreasing trend in the PAT group from asthenozoospermia to oligozoospermia and oligoasthenozoospermia. Semen parameters and N-glycans showed no significant association, except for medium progressive sperm motility and SPGP2 in the PAT group. Specific N-glycans showed a statistically significant association with SDF and chromatin condensation. Environmental factors (diet, smoking, alcohol, urban/rural living) showed a significant association with SDF, chromatin condensation and changes in N-glycans which final structures were also investigated. This doctoral thesis contributes to a more comprehensive insight into male infertility, and N-glycans express potential as biomarkers in male infertility diagnostics.

## 10. POPIS LITERATURE

1. Simoni M, Huhtaniemi IT. Endocrinology of the testis and male reproduction. Cham: Springer international publishing; 2017.
2. Bolcun-Filas E, Handel MA. Meiosis: the chromosomal foundation of reproduction. *Biol Reprod.* 2018;99(1):112-26.
3. Neto FT, Bach PV, Najari BB, Li PS, Goldstein M. Spermatogenesis in humans and its affecting factors. *Semin Cell Dev Biol.* 2016;59:10-26.
4. Goossens E, Tournaye H. Adult stem cells in the human testis. *Semin Reprod Med.* 2013;31(1):39-48.
5. Clermont Y. The cycle of the seminiferous epithelium in man. *Am J Anat.* 1963;112:35-51.
6. Tournaye H, Krausz C, Oates RD. Novel concepts in the aetiology of male reproductive impairment. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2017;5(7):544-53.
7. Clermont Y, Leblond CP. Spermiogenesis of man, monkey, ram and other mammals as shown by the periodic acid-Schiff technique. *Am J Anat.* 1955;96(2):229-53.
8. Zini A, Agarwal A. Sperm Chromatin Biological and Clinical Applications in Male Infertility and Assisted Reproduction. New York: Springer New York; 2011.
9. Steger K. Transcriptional and translational regulation of gene expression in haploid spermatids. *Anat Embryol.* 1999;199(6):471-87.
10. Balhorn R. The protamine family of sperm nuclear proteins. *Genome Biol.* 2007;8(9):227.
11. Hao SL, Ni FD, Yang WX. The dynamics and regulation of chromatin remodeling during spermiogenesis. *Gene.* 2019;706:201-10.
12. Nanassy L, Liu L, Griffin J, Carrell DT. The clinical utility of the protamine 1/protamine 2 ratio in sperm. *Protein Pept Lett.* 2011;18(8):772-7.
13. Oliva R. Protamines and male infertility. *Hum Reprod Update.* 2006;12(4):417-35.
14. Oliva R, Dixon GH. Vertebrate protamine genes and the histone-to-protamine replacement reaction. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* 1991;40:25-94.
15. Tamashiro KL, Kimura Y, Blanchard RJ, Blanchard DC, Yanagimachi R. Bypassing spermiogenesis for several generations does not have detrimental consequences on the fertility and neurobehavior of offspring: a study using the mouse. *J Assist Reprod Genet.* 1999;16(6):315-24.
16. Benkhalifa M, Kahraman S, Biricik A, Serteyl S, Domez E, Kumtepe Y, i sur. Cytogenetic abnormalities and the failure of development after round spermatid injections. *Fertil Steril.* 2004;81(5):1283-8.
17. Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine, Practice Committee of Society for Assisted Reproductive Technology. Round spermatid nucleus injection (ROSN). *Fertil Steril.* 2004;82 Suppl 1:S87-9.
18. Boskovic A, Torres-Padilla ME. How mammals pack their sperm: a variant matter. *Genes Dev.* 2013;27(15):1635-9.
19. Govin J, Escoffier E, Rousseaux S, Kuhn L, Ferro M, Thévenon J, i sur. Pericentric heterochromatin reprogramming by new histone variants during mouse spermiogenesis. *J Cell Biol.* 2007;176(3):283-94.
20. Hammoud SS, Nix DA, Zhang H, Purwar J, Carrell DT, Cairns BR. Distinctive chromatin in human sperm packages genes for embryo development. *Nature.* 2009;460(7254):473-8.

21. Lismer A, Dumeaux V, Lafleur C, Lambrot R, Brind'Amour J, Lorincz MC, i sur. Histone H3 lysine 4 trimethylation in sperm is transmitted to the embryo and associated with diet-induced phenotypes in the offspring. *Dev Cell*. 2021;56(5):671-86.e6.
22. Oikawa M, Simeone A, Hormanseder E, Teperek M, Gaggioli V, O'Doherty A, i sur. Epigenetic homogeneity in histone methylation underlies sperm programming for embryonic transcription. *Nat Commun*. 2020;11(1):3491.
23. Schagdarsurengin U, Paradowska A, Steger K. Analysing the sperm epigenome: roles in early embryogenesis and assisted reproduction. *Nat Rev Urol*. 2012;9(11):609-19.
24. Zhang Y, Shi J, Rassoulzadegan M, Tuorto F, Chen Q. Sperm RNA code programmes the metabolic health of offspring. *Nat Rev Endocrinol*. 2019;15(8):489-98.
25. Fucic A, Maric T, Vicic Bockor V, Jezek D. In vivo acridine orange human spermatozoa staining-A new perspective for RNA detection and spermatozoa morphology evaluation. *Anat Histol Embryol*. 2021;50(1):102-7.
26. Berruti G, Paiardi C. Acrosome biogenesis: Revisiting old questions to yield new insights. *Spermatogenesis*. 2011;1(2):95-8.
27. Linck RW, Chemes H, Albertini DF. The axoneme: the propulsive engine of spermatozoa and cilia and associated ciliopathies leading to infertility. *J Assist Reprod Genet*. 2016;33(2):141-56.
28. Fawcett DW. The mammalian spermatozoon. *Dev Biol*. 1975;44(2):394-436.
29. Biologydictionary.net Editors. Sperm Cell - The Definitive Guide | Biology Dictionary [Internet]. Biologydictionary.net Editors. 2021 May - [pristupljeno 15.10.2021.]. Dostupno na: <https://biologydictionary.net/sperm-cell/>.
30. Drabovich AP, Saraon P, Jarvi K, Diamandis EP. Seminal plasma as a diagnostic fluid for male reproductive system disorders. *Nat Rev Urol*. 2014;11(5):278-88.
31. Wang Z, Widgren EE, Richardson RT, O'Rand MG. Characterization of an eppin protein complex from human semen and spermatozoa. *Biol Reprod*. 2007;77(3):476-84.
32. Drabovich AP, Jarvi K, Diamandis EP. Verification of male infertility biomarkers in seminal plasma by multiplex selected reaction monitoring assay. *Mol Cell Proteomics*. 2011;10(12):M110.004127.
33. Sullivan R. Epididymosomes: a heterogeneous population of microvesicles with multiple functions in sperm maturation and storage. *Asian J Androl*. 2015;17(5):726-9.
34. Owen DH, Katz DF. A review of the physical and chemical properties of human semen and the formulation of a semen simulant. *J Androl*. 2005;26(4):459-69.
35. Lilja H, Oldbring J, Rannevik G, Laurell CB. Seminal vesicle-secreted proteins and their reactions during gelation and liquefaction of human semen. *J Clin Invest*. 1987;80(2):281-5.
36. Aalberts M, Stout TA, Stoorvogel W. Prostatosomes: extracellular vesicles from the prostate. *Reproduction*. 2014;147(1):R1-14.
37. Jones RE, Lopez KH. Human reproductive biology. Amsterdam: Elsevier/Academic Press; 2014.
38. Jonge CJ, De Barratt CLR. The sperm cell: production, maturation, fertilization, regeneration. Cambridge: Cambridge University Press; 2017.
39. Amann RP, Hammerstedt RH, Veeramachaneni DN. The epididymis and sperm maturation: a perspective. *Reprod Fertil Dev*. 1993;5(4):361-81.
40. Schjenken JE, Robertson SA. The Female Response to Seminal Fluid. *Physiol Rev*. 2020;100(3):1077-117.
41. Chiu PC, Chung MK, Tsang HY, Koistinen R, Koistinen H, Seppala M, i sur. Glycodelin-S in human seminal plasma reduces cholesterol efflux and inhibits capacitation of spermatozoa. *J Biol Chem*. 2005;280(27):25580-9.
42. Varki A, Cummings RD, Esko JD, Stanley P, Hart GW, Aebi M, i sur. Essentials of glycobiology [Internet] 3. izd. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press;

2015–2017 - [ažurirano 2017.; pristupljeno 30.10.2021.]. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK310274/>.

43. Apweiler R, Hermjakob H, Sharon N. On the frequency of protein glycosylation, as deduced from analysis of the SWISS-PROT database. *Biochim Biophys Acta*. 1999;1473(1):4-8.
44. Spiro RG. Protein glycosylation: nature, distribution, enzymatic formation, and disease implications of glycopeptide bonds. *Glycobiology*. 2002;12(4):43r-56r.
45. Furmanek A, Hofsteenge J. Protein C-mannosylation: facts and questions. *Acta Biochim Pol*. 2000;47(3):781-9.
46. Haynes PA. Phosphoglycosylation: a new structural class of glycosylation? *Glycobiology*. 1998;8(1):1-5.
47. Reily C, Stewart TJ, Renfrow MB, Novak J. Glycosylation in health and disease. *Nat Rev Nephrol*. 2019;15(6):346-66.
48. Schjoldager KT, Narimatsu Y, Joshi HJ, Clausen H. Global view of human protein glycosylation pathways and functions. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2020;21(12):729-49.
49. Wang S, Edmunds GA, Li L, Chen C, Wang PG. CHAPTER 1 Introduction: Glycome and the Glyco-toolbox. U: Guan W, Li L, Wang PG, ur. *Synthetic Glycomes*. London: The Royal Society of Chemistry; 2019. Str. 1-14.
50. Ulloa-Aguirre A, Timossi C, Damián-Matsumura P, Dias JA. Role of glycosylation in function of follicle-stimulating hormone. *Endocrine*. 1999;11(3):205-15.
51. Ishino T, Wang M, Mosyak L, Tam A, Duan W, Svenson K, i sur. Engineering a monomeric Fc domain modality by N-glycosylation for the half-life extension of biotherapeutics. *J Biol Chem*. 2013;288(23):16529-37.
52. Nishiyama T, Kimura N, Jitsuhara Y, Uchida M, Ochi F, Yamaguchi H. N-Glycans protect proteins from protease digestion through their binding affinities for aromatic amino acid residues. *J Biochem*. 2000;127(3):427-33.
53. Tecele E, Gagneux P. Sugar-coated sperm: Unraveling the functions of the mammalian sperm glycocalyx. *Mol Reprod Dev*. 2015;82(9):635-50.
54. Rahmoune H, Chen HL, Gallagher JT, Rudland PS, Fernig DG. Interaction of heparan sulfate from mammary cells with acidic fibroblast growth factor (FGF) and basic FGF. Regulation of the activity of basic FGF by high and low affinity binding sites in heparan sulfate. *J Biol Chem*. 1998;273(13):7303-10.
55. Inatani M, Irie F, Plump AS, Tessier-Lavigne M, Yamaguchi Y. Mammalian brain morphogenesis and midline axon guidance require heparan sulfate. *Science*. 2003;302(5647):1044-6.
56. Moore KL. Structure and function of P-selectin glycoprotein ligand-1. *Leuk Lymphoma*. 1998;29(1-2):1-15.
57. Varki A. Biological roles of glycans. *Glycobiology*. 2016;27(1):3-49.
58. Schauer R. Sialic acids and their role as biological masks. *Trends Biochem Sci*. 1985;10(9):357-60.
59. Lin B, Qing X, Liao J, Zhuo K. Role of Protein Glycosylation in Host-Pathogen Interaction. *Cells*. 2020;9(4):1022.
60. Heise T, Langereis JD, Rossing E, de Jonge MI, Adema GJ, Büll C, i sur. Selective Inhibition of Sialic Acid-Based Molecular Mimicry in *Haemophilus influenzae* Abrogates Serum Resistance. *Cell Chem Biol*. 2018;25(10):1279-85.
61. Chatterjee M, Chava AK, Kohla G, Pal S, Merling A, Hinderlich S, i sur. Identification and characterization of adsorbed serum sialoglycans on *Leishmania donovani* promastigotes. *Glycobiology*. 2003;13(5):351-61.
62. Mazmanian SK, Liu CH, Tzianabos AO, Kasper DL. An immunomodulatory molecule of symbiotic bacteria directs maturation of the host immune system. *Cell*. 2005;122(1):107-18.

63. Batruch I, Lecker I, Kagedan D, Smith CR, Mullen BJ, Grober E, i sur. Proteomic analysis of seminal plasma from normal volunteers and post-vasectomy patients identifies over 2000 proteins and candidate biomarkers of the urogenital system. *J Proteome Res.* 2011;10(3):941-53.
64. Naylor S. Biomarkers: current perspectives and future prospects. *Expert Rev Mol Diagn.* 2003;3(5):525-9.
65. Kumar V, Hassan MI, Tomar AK, Kashav T, Nautiyal J, Singh S, i sur. Proteomic analysis of heparin-binding proteins from human seminal plasma: a step towards identification of molecular markers of male fertility. *J Biosci.* 2009;34(6):899-908.
66. Saraswat M, Joenväärä S, Tomar AK, Singh S, Yadav S, Renkonen R. N-Glycoproteomics of Human Seminal Plasma Glycoproteins. *J Proteome Res.* 2016;15(3):991-1001.
67. Lan R, Xin M, Hao Z, You S, Xu Y, Wu J, i sur. Biological Functions and Large-Scale Profiling of Protein Glycosylation in Human Semen. *J Proteome Res.* 2020;19(10):3877-89.
68. Seppälä M, Koistinen H, Koistinen R, Chiu PC, Yeung WS. Glycosylation related actions of glycodefin: gamete, cumulus cell, immune cell and clinical associations. *Hum Reprod Update.* 2007;13(3):275-87.
69. Niederberger C. WHO manual for the standardized investigation, diagnosis and management of the infertile male. *Urology.* 2001;57(1):208.
70. Ombelet W, Cooke I, Dyer S, Serour G, Devroey P. Infertility and the provision of infertility medical services in developing countries. *Hum Reprod Update.* 2008;14(6):605-21.
71. Sun H, Gong TT, Jiang YT, Zhang S, Zhao YH, Wu QJ. Global, regional, and national prevalence and disability-adjusted life-years for infertility in 195 countries and territories, 1990-2017: results from a global burden of disease study, 2017. *Aging.* 2019;11(23):10952-91.
72. Agarwal A, Mulgund A, Hamada A, Chyatte MR. A unique view on male infertility around the globe. *Reprod Biol Endocrinol.* 2015;13:37.
73. Zegers-Hochschild F, Adamson GD, de Mouzon J, Ishihara O, Mansour R, Nygren K, i sur. International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) and the World Health Organization (WHO) revised glossary of ART terminology, 2009. *Fertil Steril.* 2009;92(5):1520-4.
74. Cunningham J. Infertility: A primer for primary care providers. *JAAPA.* 2017;30(9):19-25.
75. Krausz C. Male infertility: pathogenesis and clinical diagnosis. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2011;25(2):271-85.
76. Bouvattier C, Maione L, Bouligand J, Dodé C, Guiochon-Mantel A, Young J. Neonatal gonadotropin therapy in male congenital hypogonadotropic hypogonadism. *Nat Rev Endocrinol.* 2011;8(3):172-82.
77. Maione L, Dwyer AA, Francou B, Guiochon-Mantel A, Binart N, Bouligand J, i sur. Genetics in Endocrinology: Genetic counseling for congenital hypogonadotropic hypogonadism and Kallmann syndrome: new challenges in the era of oligogenism and next-generation sequencing. *Eur J Endocrinol.* 2018;178(3):55-80.
78. Nieschlag E, Vorona E. Doping with anabolic androgenic steroids (AAS): Adverse effects on non-reproductive organs and functions. *Rev Endocr Metab Disord.* 2015;16(3):199-211.
79. Morales A, Johnston B, Heaton JP, Lundie M. Testosterone supplementation for hypogonadal impotence: assessment of biochemical measures and therapeutic outcomes. *J Urol.* 1997;157(3):849-54.
80. Vuong C, Van Uum SH, O'Dell LE, Lutfy K, Friedman TC. The effects of opioids and opioid analogs on animal and human endocrine systems. *Endocr Rev.* 2010;31(1):98-132.



81. de Souza DAS, Faucz FR, Pereira-Ferrari L, Sotomaior VS, Raskin S. Congenital bilateral absence of the vas deferens as an atypical form of cystic fibrosis: reproductive implications and genetic counseling. *Andrology*. 2018;6(1):127-35.
82. Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine in collaboration with the Society for Male Reproduction and Urology. Evaluation of the azoospermic male: a committee opinion. *Fertil Steril*. 2018;109(5):777-82.
83. Navarro-Costa P, Plancha CE, Gonçalves J. Genetic Dissection of the AZF Regions of the Human Y Chromosome: Thriller or Filler for Male (In)fertility? *J Biomed Biotechnol*. 2010;2010:936569.
84. Zhang F, Lu C, Li Z, Xie P, Xia Y, Zhu X, et al. Partial deletions are associated with an increased risk of complete deletion in AZFc: a new insight into the role of partial AZFc deletions in male infertility. *J Med Genet*. 2007;44(7):437-44.
85. Pacenza N, Pasqualini T, Gottlieb S, Knoblovits P, Costanzo PR, Stewart Usher J, et al. Clinical Presentation of Klinefelter's Syndrome: Differences According to Age. *Int J Endocrinol*. 2012;2012:324835.
86. Aksglaede L, Juul A. Therapy of endocrine disease: Testicular function and fertility in men with Klinefelter syndrome: a review. *Eur J Endocrinol*. 2013;168(4):67-76.
87. Ferlin A, Vinanzi C, Garolla A, Selice R, Zuccarello D, Cazzadore C, et al. Male infertility and androgen receptor gene mutations: clinical features and identification of seven novel mutations. *Clin Endocrinol*. 2006;65(5):606-10.
88. Wu QY, Li N, Li WW, Li TF, Zhang C, Cui YX, et al. Clinical, molecular and cytogenetic analysis of 46, XX testicular disorder of sex development with SRY-positive. *BMC Urol*. 2014;14:70.
89. Patel DP, Jenkins TG, Aston KI, Guo J, Pastuszak AW, Hanson HA, et al. Harnessing the full potential of reproductive genetics and epigenetics for male infertility in the era of "big data". *Fertil Steril*. 2020;113(3):478-88.
90. World Health Organization. The influence of varicocele on parameters of fertility in a large group of men presenting to infertility clinics. *Fertil Steril*. 1992;57(6):1289-93.
91. Kolon TF, Herndon CD, Baker LA, Baskin LS, Baxter CG, Cheng EY, et al. Evaluation and treatment of cryptorchidism: AUA guideline. *J Urol*. 2014;192(2):337-45.
92. Hart RJ, Doherty DA, McLachlan RI, Walls ML, Keelan JA, Dickinson JE, et al. Testicular function in a birth cohort of young men. *Hum Reprod*. 2015;30(12):2713-24.
93. Hauser R, Skakkebaek NE, Hass U, Toppari J, Juul A, Andersson AM, et al. Male reproductive disorders, diseases, and costs of exposure to endocrine-disrupting chemicals in the European Union. *J Clin Endocrinol Metab*. 2015;100(4):1267-77.
94. Vakalopoulos I, Dimou P, Anagnostou I, Zeginiadou T. Impact of cancer and cancer treatment on male fertility. *Hormones (Athens, Greece)*. 2015;14(4):579-89.
95. Bracke A, Peeters K, Punjabi U, Hoogewijs D, Dewilde S. A search for molecular mechanisms underlying male idiopathic infertility. *Reprod Biomed Online*. 2018;36(3):327-39.
96. Agarwal A, Baskaran S, Parekh N, Cho CL, Henkel R, Vij S, et al. Male infertility. *Lancet*. 2021;397(10271):319-33.
97. World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. Geneva: World Health Organization; 2010.
98. Jungwirth A, Giwercman A, Tournaye H, Diemer T, Kopa Z, Dohle G, et al. European Association of Urology guidelines on Male Infertility: the 2012 update. *Eur Urol*. 2012;62(2):324-32.
99. Nicopoullos J, Vicens-Morton A, Lewis SEM, Lee K, Larsen P, Ramsay J, et al. Novel use of COMET parameters of sperm DNA damage may increase its utility to diagnose male infertility and predict live births following both IVF and ICSI. *Hum Reprod*. 2019;34(10):1915-23.

100. Weber RF, Dohle GR, Romijn JC. Clinical laboratory evaluation of male subfertility. *Adv Clin Chem.* 2005;40:317-64.
101. Oud MS, Volozonoka L, Smits RM, Vissers L, Ramos L, Veltman JA. A systematic review and standardized clinical validity assessment of male infertility genes. *Hum Reprod.* 2019;34(5):932-41.
102. La Vignera S, Vicari E, Condorelli RA, D'Agata R, Calogero AE. Male accessory gland infection and sperm parameters (review). *Int J Androl.* 2011;34(5 Pt 2):e330-47.
103. Wang C, Swerdloff RS. Limitations of semen analysis as a test of male fertility and anticipated needs from newer tests. *Fertil Steril.* 2014;102(6):1502-7.
104. Oehninger S, Franken DR, Ombelet W. Sperm functional tests. *Fertil Steril.* 2014;102(6):1528-33.
105. Santi D, Spaggiari G, Simoni M. Sperm DNA fragmentation index as a promising predictive tool for male infertility diagnosis and treatment management - meta-analyses. *Reprod Biomed Online.* 2018;37(3):315-26.
106. World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen (sixth edition). Geneva: World Health Organization; 2021.
107. Borges E, Jr., Zanetti BF, Setti AS, Braga D, Provenza RR, Iaconelli A, Jr. Sperm DNA fragmentation is correlated with poor embryo development, lower implantation rate, and higher miscarriage rate in reproductive cycles of non-male factor infertility. *Fertil Steril.* 2019;112(3):483-90.
108. Aitken RJ, De Iuliis GN. Origins and consequences of DNA damage in male germ cells. *Reprod Biomed Online.* 2007;14(6):727-33.
109. Agarwal A, Parekh N, Panner Selvam MK, Henkel R, Shah R, Homa ST, i sur. Male Oxidative Stress Infertility (MOSI): Proposed Terminology and Clinical Practice Guidelines for Management of Idiopathic Male Infertility. *World J Mens Health.* 2019;37(3):296-312.
110. Agarwal A, Majzoub A, Baskaran S, Panner Selvam MK, Cho CL, Henkel R, i sur. Sperm DNA Fragmentation: A New Guideline for Clinicians. *World J Mens Health.* 2020;38(4):412-71.
111. McPherson S, Longo FJ. Chromatin structure-function alterations during mammalian spermatogenesis: DNA nicking and repair in elongating spermatids. *Eur J Histochem.* 1993;37(2):109-28.
112. Shukla KK, Mahdi AA, Rajender S. Apoptosis, spermatogenesis and male infertility. *Front Biosci (Elite Ed).* 2012;4:746-54.
113. Aitken RJ, Koppers AJ. Apoptosis and DNA damage in human spermatozoa. *Asian J Androl.* 2011;13(1):36-42.
114. Rashki Ghaleno L, Alizadeh A, Drevet JR, Shahverdi A, Valojerdi MR. Oxidation of Sperm DNA and Male Infertility. *Antioxidants (Basel).* 2021;10(1):97.
115. Majzoub A, Agarwal A, Cho CL, Esteves SC. Sperm DNA fragmentation testing: a cross sectional survey on current practices of fertility specialists. *Transl Androl Urol.* 2017;6(Suppl 4):S710-9.
116. Agarwal A, Cho CL, Majzoub A, Esteves SC. The Society for Translational Medicine: clinical practice guidelines for sperm DNA fragmentation testing in male infertility. *Transl Androl Urol.* 2017;6(Suppl 4):S720-33.
117. Sakkas D, Tomlinson M. Assessment of sperm competence. *Semin Reprod Med.* 2000;18(2):133-9.
118. Sakkas D, Urner F, Bizzaro D, Manicardi G, Bianchi PG, Shoukir Y, i sur. Sperm nuclear DNA damage and altered chromatin structure: effect on fertilization and embryo development. *Hum Reprod.* 1998;13(Suppl 4):S11-9.

119. Asmarinah, Syaury A, Umar LA, Lestari SW, Mansyur E, Hestiantoro A, i sur. Sperm chromatin maturity and integrity correlated to zygote development in ICSI program. *Syst Biol Reprod Med.* 2016;62(5):309-16.
120. Agarwal A, Said TM. Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility. *Hum Reprod Update.* 2003;9(4):331-45.
121. Erenpreisa J, Freivalds T, Selivanova G. Influence of chromatin condensation on the absorption spectra of nuclei stained with toluidine blue. *Acta Morphol Hung.* 1992;40(1-4):3-10.
122. Evenson D, Darzynkiewicz Z, Jost L, Janca F, Ballachey B. Changes in accessibility of DNA to various fluorochromes during spermatogenesis. *Cytometry.* 1986;7(1):45-53.
123. Liu DY, Baker HW. Sperm nuclear chromatin normality: relationship with sperm morphology, sperm-zona pellucida binding, and fertilization rates in vitro. *Fertil Steril.* 1992;58(6):1178-84.
124. Manicardi GC, Bianchi PG, Pantano S, Azzoni P, Bizzaro D, Bianchi U, i sur. Presence of endogenous nicks in DNA of ejaculated human spermatozoa and its relationship to chromomycin A3 accessibility. *Biol Reprod.* 1995;52(4):864-7.
125. Bianchi PG, Manicardi GC, Bizzaro D, Bianchi U, Sakkas D. Effect of deoxyribonucleic acid protamination on fluorochrome staining and in situ nick-translation of murine and human mature spermatozoa. *Biol Reprod.* 1993;49(5):1083-8.
126. Whorton D, Krauss RM, Marshall S, Milby TH. Infertility in male pesticide workers. *Lancet.* 1977;2(8051):1259-61.
127. Auger J, Eustache F, Rouiller-Fabre V, Canivenc-Lavier MC, Livera G. Integrative rodent models for assessing male reproductive toxicity of environmental endocrine active substances. *Asian J Androl.* 2014;16(1):60-70.
128. Oliva A, Spira A, Multigner L. Contribution of environmental factors to the risk of male infertility. *Hum Reprod.* 2001;16(8):1768-76.
129. Bergman A, Heindel JJ, Kasten T, Kidd KA, Jobling S, Neira M, i sur. The impact of endocrine disruption: a consensus statement on the state of the science. *Environ Health Perspect.* 2013;121(4):A104-6.
130. Brehm E, Flaws JA. Transgenerational Effects of Endocrine-Disrupting Chemicals on Male and Female Reproduction. *Endocrinology.* 2019;160(6):1421-35.
131. Kumar S, Murarka S, Mishra VV, Gautam AK. Environmental & lifestyle factors in deterioration of male reproductive health. *Indian J Med Res.* 2014;140(Suppl 1):S29-35.
132. Freisling H, Viallon V, Lennon H, Bagnardi V, Ricci C, Butterworth AS, i sur. Lifestyle factors and risk of multimorbidity of cancer and cardiometabolic diseases: a multinational cohort study. *BMC Med.* 2020;18(1):5.
133. Marić T, Fučić A, Aghayanian A. Environmental and occupational exposures associated with male infertility. *Arh Hig Rada Toksikol.* 2021;72(3):101-13.
134. Ng M, Fleming T, Robinson M, Thomson B, Graetz N, Margono C, i sur. Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet.* 2014;384(9945):766-81.
135. Walczak-Jedrzejowska R, Wolski JK, Slowikowska-Hilczer J. The role of oxidative stress and antioxidants in male fertility. *Cent European J Urol.* 2013;66(1):60-7.
136. Skoracka K, Eder P, Łykowska-Szuber L, Dobrowolska A, Kreła-Kaźmierczak I. Diet and Nutritional Factors in Male (In)fertility-Underestimated Factors. *J Clin Med.* 2020;9(5).
137. Phillips KP, Tanphaichitr N. Mechanisms of obesity-induced male infertility. *Expert Rev Endocrinol Metab.* 2010;5(2):229-51.

138. Petrakis D, Vassilopoulou L, Mamoulakis C, Psycharakis C, Anifantaki A, Sifakis S, i sur. Endocrine Disruptors Leading to Obesity and Related Diseases. *Int J Environ Res Public Health*. 2017;14(10).
139. Mantovani A. Endocrine Disrupters and the Safety of Food Chains. *Horm Res Paediatr*. 2016;86(4):279-88.
140. Giwercman A. Estrogens and phytoestrogens in male infertility. *Curr Opin Urol*. 2011;21(6):519-26.
141. Benoff S, Jacob A, Hurley IR. Male infertility and environmental exposure to lead and cadmium. *Hum Reprod Update*. 2000;6(2):107-21.
142. Newbold RR, Padilla-Banks E, Jefferson WN, Heindel JJ. Effects of endocrine disruptors on obesity. *Int J Androl*. 2008;31(2):201-8.
143. World Health Organization. Global status report on alcohol and health [Internet]. World Health Organization [pristupljeno 05.12.2021.]. Dostupno na: [https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/112736/9789240692763\\_eng.pdf](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/112736/9789240692763_eng.pdf)
144. Van Heertum K, Rossi B. Alcohol and fertility: how much is too much? *Fertil Res Pract*. 2017;3:10.
145. Grover S, Mattoo SK, Pendharkar S, Kandappan V. Sexual dysfunction in patients with alcohol and opioid dependence. *Indian J Psychol Med*. 2014;36(4):355-65.
146. Rao M, Zuo LD, Fang F, Martin K, Zheng Y, Zhang HP, i sur. Association of Alcohol Consumption with Markers of Prostate Health and Reproductive Hormone Profiles: A Multi-Center Study of 4,535 Men in China. *PLoS One*. 2015;10(11):e0142780.
147. Condorelli RA, Calogero AE, Vicari E, La Vignera S. Chronic consumption of alcohol and sperm parameters: our experience and the main evidences. *Andrologia*. 2015;47(4):368-79.
148. Trummer H, Habermann H, Haas J, Pummer K. The impact of cigarette smoking on human semen parameters and hormones. *Hum Reprod*. 2002;17(6):1554-9.
149. Hammond D, Fong GT, Cummings KM, O'Connor RJ, Giovino GA, McNeill A. Cigarette yields and human exposure: a comparison of alternative testing regimens. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2006;15(8):1495-501.
150. von Ziegler NI, Schlumpf M, Lichtensteiger W. Prenatal nicotine exposure selectively affects perinatal forebrain aromatase activity and fetal adrenal function in male rats. *Brain Res Dev Brain Res*. 1991;62(1):23-31.
151. Lewin A, Gonen O, Orvieto R, Schenker JG. Effect of smoking on concentration, motility and zona-free hamster test on human sperm. *Arch Androl*. 1991;27(1):51-4.
152. Adelusi B, al-Twajjiri MH, al-Meshari A, Kangave D, al-Nuaim LA, Younnus B. Correlation of smoking and coffee drinking with sperm progressive motility in infertile males. *Afr J Med Med Sci*. 1998;27(1-2):47-50.
153. Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Smoking and infertility: a committee opinion. *Fertil Steril*. 2018;110(4):611-8.
154. Sergerie M, Ouhilal S, Bissonnette F, Brodeur J, Bleau G. Lack of association between smoking and DNA fragmentation in the spermatozoa of normal men. *Hum Reprod*. 2000;15(6):1314-21.
155. Ramlau-Hansen CH, Thulstrup AM, Aggerholm AS, Jensen MS, Toft G, Bonde JP. Is smoking a risk factor for decreased semen quality? A cross-sectional analysis. *Hum Reprod*. 2007;22(1):188-96.
156. Yeung CH, Tüttelmann F, Bergmann M, Nordhoff V, Vorona E, Cooper TG. Coiled sperm from infertile patients: characteristics, associated factors and biological implication. *Hum Reprod*. 2009;24(6):1288-95.
157. La Maestra S, De Flora S, Micale RT. Effect of cigarette smoke on DNA damage, oxidative stress, and morphological alterations in mouse testis and spermatozoa. *Int J Hyg Environ Health*. 2015;218(1):117-22.

158. Saleh RA, Agarwal A, Sharma RK, Nelson DR, Thomas AJ, Jr. Effect of cigarette smoking on levels of seminal oxidative stress in infertile men: a prospective study. *Fertil Steril.* 2002;78(3):491-9.
159. Harlev A, Agarwal A, Gunes SO, Shetty A, du Plessis SS. Smoking and Male Infertility: An Evidence-Based Review. *World J Mens Health.* 2015;33(3):143-60.
160. Clementi M, Tiboni GM, Causin R, La Rocca C, Maranghi F, Raffagnato F, i sur. Pesticides and fertility: an epidemiological study in Northeast Italy and review of the literature. *Reprod Toxicol.* 2008;26(1):13-8.
161. Bergesen HO, Parmann G, Thommessen OB. *FAO International Code of Conduct on the Distribution and Use of Pesticides.* U: Bergesen HO, Parmann G, Thommessen OB, ur. *Yearbook of International Cooperation on Environment and Development.* London: Routledge; 1998–99. Str. 78-80.
162. European Food Safety Authority (EFSA), Carrasco Cabrera L, Medina Pastor P. The 2019 European Union report on pesticide residues in food. *EFSA J.* 2021;19(4):6491.
163. Swan SH, Brazil C, Drobnis EZ, Liu F, Kruse RL, Hatch M, i sur. Geographic differences in semen quality of fertile U.S. males. *Environ Health Perspect.* 2003;111(4):414-20.
164. Cremonese C, Piccoli C, Pasqualotto F, Clapauch R, Koifman RJ, Koifman S, i sur. Occupational exposure to pesticides, reproductive hormone levels and sperm quality in young Brazilian men. *Reprod Toxicol.* 2017;67:174-85.
165. Fucic A, Duca RC, Galea KS, Maric T, Garcia K, Bloom MS, i sur. Reproductive Health Risks Associated with Occupational and Environmental Exposure to Pesticides. *Int J Environ Res Public Health.* 2021;18(12).
166. Claman P. Men at risk: occupation and male infertility. *Fertil Steril.* 2004;81(Suppl 2):S19-26.
167. Wang HX, Li HC, Lv MQ, Zhou DX, Bai LZ, Du LZ, i sur. Associations between occupation exposure to Formaldehyde and semen quality, a primary study. *Sci Rep.* 2015;5:15874.
168. Daoud S, Sellami A, Bouassida M, Kebaili S, Ammar Keskes L, Rebai T, i sur. Routine assessment of occupational exposure and its relation to semen quality in infertile men: a cross-sectional study. *Turk J Med Sci.* 2017;47(3):902-7.
169. Miranda-Contreras L, Gómez-Pérez R, Rojas G, Cruz I, Berrueta L, Salmen S, i sur. Occupational exposure to organophosphate and carbamate pesticides affects sperm chromatin integrity and reproductive hormone levels among Venezuelan farm workers. *J Occup Health.* 2013;55(3):195-203.
170. El-Helaly M, Awadalla N, Mansour M, El-Biomy Y. Workplace exposures and male infertility - a case-control study. *Int J Occup Med Environ Health.* 2010;23(4):331-8.
171. Cherry N, Labrèche F, Collins J, Tulandi T. Occupational exposure to solvents and male infertility. *Occup Environ Med.* 2001;58(10):635-40.
172. Cherry N, Moore H, McNamee R, Pacey A, Burgess G, Clyma JA, i sur. Occupation and male infertility: glycol ethers and other exposures. *Occup Environ Med.* 2008;65(10):708-14.
173. Petersen KU, Hansen J, Ebbelhoej NE, Bonde JP. Infertility in a Cohort of Male Danish Firefighters: A Register-Based Study. *Am J Epidemiol.* 2019;188(2):339-46.
174. Huang LP, Lee CC, Hsu PC, Shih TS. The association between semen quality in workers and the concentration of di(2-ethylhexyl) phthalate in polyvinyl chloride pellet plant air. *Fertil Steril.* 2011;96(1):90-4.
175. Fucic A, Katic J, Fthenou E, Kogevinas M, Plavec D, Koppe J, i sur. Increased frequency of micronuclei in mononucleated lymphocytes and cytome analysis in healthy

- newborns as an early warning biomarkers of possible future health risks. *Reprod Toxicol*. 2013;42:110-5.
176. Fucic A, Guszak V, Keser T, Wagner J, Juretić E, Plavec D, i sur. Micronucleus, cell-free DNA, and plasma glycan composition in the newborns of healthy and diabetic mothers. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*. 2017;815:6-15.
177. Fucic A, Starcevic M, Dessardo NS, Batinic D, Kralik S, Krasic J, i sur. The Impact of Mother's Living Environment Exposure on Genome Damage, Immunological Status, and Sex Hormone Levels in Newborns. *Int J Environ Res Public Health*. 2020;17(10):3402.
178. Anamthathmakula P, Winuthayanon W. Mechanism of semen liquefaction and its potential for a novel non-hormonal contraception†. *Biol Reprod*. 2020;103(2):411-26.
179. Muratori M, Pellegrino G, Mangone G, Azzari C, Lotti F, Tarozzi N, i sur. DNA Fragmentation in Viable and Non-Viable Spermatozoa Discriminates Fertile and Subfertile Subjects with Similar Accuracy. *J Clin Med*. 2020;9(5):1341.
180. Fernández JL, Muriel L, Goyanes V, Segrelles E, Gosálvez J, Enciso M, i sur. Simple determination of human sperm DNA fragmentation with an improved sperm chromatin dispersion test. *Fertil Steril*. 2005;84(4):833-42.
181. Fernández JL, Johnston S, Gosálvez J. Sperm Chromatin Dispersion (SCD) Assay. U: Zini A, Agarwal A, ur. *A Clinician's Guide to Sperm DNA and Chromatin Damage*. New York: Springer International Publishing AG; 2018. Str. 137-152.
182. Sati L, Huszar G. Methodology of aniline blue staining of chromatin and the assessment of the associated nuclear and cytoplasmic attributes in human sperm. *Methods Mol Biol*. 2013;927:425-36.
183. Trbojević-Akmačić I, Ugrina I, Lauc G. Comparative Analysis and Validation of Different Steps in Glycomics Studies. *Methods Enzymol*. 2017;586:37-55.
184. Wang T, Cai ZP, Gu XQ, Ma HY, Du YM, Huang K, i sur. Discovery and characterization of a novel extremely acidic bacterial N-glycanase with combined advantages of PNGase F and A. *Biosci Rep*. 2014;34(6):e00149.
185. Cooper CA, Gasteiger E, Packer NH. GlycoMod--a software tool for determining glycosylation compositions from mass spectrometric data. *Proteomics*. 2001;1(2):340-9.
186. Pang PC, Tissot B, Drobnis EZ, Morris HR, Dell A, Clark GF. Analysis of the human seminal plasma glycome reveals the presence of immunomodulatory carbohydrate functional groups. *J Proteome Res*. 2009;8(11):4906-15.
187. Cannarella R, Condorelli RA, Mongioi LM, La Vignera S, Calogero AE. Molecular Biology of Spermatogenesis: Novel Targets of Apparently Idiopathic Male Infertility. *Int J Mol Sci*. 2020;21(5):1728.
188. Harris ID, Fronczak C, Roth L, Meacham RB. Fertility and the aging male. *Rev Urol*. 2011;13(4):e184-e90.
189. Keszthelyi M, Gyarmathy VA, Kaposi A, Kopa Z. The potential role of central obesity in male infertility: body mass index versus waist to hip ratio as they relate to selected semen parameters. *BMC Public Health*. 2020;20(1):307.
190. Agarwal A, Sharma RK, Gupta S, Boitrelle F, Finelli R, Parekh N, i sur. Sperm Vitality and Necrozoospermia: Diagnosis, Management, and Results of a Global Survey of Clinical Practice. *World J Mens Health*. 2021.
191. Ni W, Xiao S, Qiu X, Jin J, Pan C, Li Y, i sur. Effect of Sperm DNA Fragmentation on Clinical Outcome of Frozen-Thawed Embryo Transfer and on Blastocyst Formation. *PLOS One*. 2014;9(4):e94956.
192. Bach PV, Schlegel PN. Sperm DNA damage and its role in IVF and ICSI. *Basic Clin Androl*. 2016;26(1):15.

193. Saleh RA, Agarwal A, Nada EA, El-Tonsy MH, Sharma RK, Meyer A, i sur. 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):S1597-605.
194. Wiweko B, Utami P. Predictive value of sperm deoxyribonucleic acid (DNA) fragmentation index in male infertility. *Basic Clin Androl.* 2017;27:1.
195. Evgeni E, Lymberopoulos G, Touloupidis S, Asimakopoulos B. Sperm nuclear DNA fragmentation and its association with semen quality in Greek men. *Andrologia.* 2015;47(10):1166-74.
196. Giwercman A, Richthoff J, Hjøllund H, Bonde JP, Jepson K, Frohm B, i sur. Correlation between sperm motility and sperm chromatin structure assay parameters. *Fertil Steril.* 2003;80(6):1404-12.
197. Lu JC, Jing J, Chen L, Ge YF, Feng RX, Liang YJ, i sur. Analysis of human sperm DNA fragmentation index (DFI) related factors: a report of 1010 subfertile men in China. *Reprod Biol Endocrinol.* 2018;16(1):23.
198. Belloc S, Benkhalifa M, Cohen-Bacrie M, Dalleac A, Chahine H, Amar E, i sur. Which isolated sperm abnormality is most related to sperm DNA damage in men presenting for infertility evaluation. *J Assist Reprod Genet.* 2014;31(5):527-32.
199. Cissen M, Wely MV, Scholten I, Mansell S, Bruin JP, Mol BW, i sur. Measuring Sperm DNA Fragmentation and Clinical Outcomes of Medically Assisted Reproduction: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One.* 2016;11(11):e0165125.
200. Agarwal A, Majzoub A, Esteves SC, Ko E, Ramasamy R, Zini A. Clinical utility of sperm DNA fragmentation testing: practice recommendations based on clinical scenarios. *Transl Androl Urol.* 2016;5(6):935-50.
201. Robinson L, Gallos ID, Conner SJ, Rajkhowa M, Miller D, Lewis S, i sur. The effect of sperm DNA fragmentation on miscarriage rates: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod.* 2012;27(10):2908-17.
202. Tan J, Taskin O, Albert A, Bedaiwy MA. Association between sperm DNA fragmentation and idiopathic recurrent pregnancy loss: a systematic review and meta-analysis. *Reprod Biomed Online.* 2019;38(6):951-60.
203. Salonia A, Bettocchi C, Boeri L, Capogrosso P, Carvalho J, Cilesiz NC, i sur. European Association of Urology Guidelines on Sexual and Reproductive Health-2021 Update: Male Sexual Dysfunction. *Eur Urol.* 2021;80(3):333-57.
204. Simon L, Liu L, Murphy K, Ge S, Hotaling J, Aston KI, i sur. Comparative analysis of three sperm DNA damage assays and sperm nuclear protein content in couples undergoing assisted reproduction treatment. *Hum Reprod.* 2014;29(5):904-17.
205. Irez T, Dayioglu N, Alagöz M, Karatas S, Güralp O. The use of aniline blue chromatin condensation test on prediction of pregnancy in mild male factor and unexplained male infertility. *Andrologia.* 2018;50(10):e13111.
206. Hammadeh ME, Zeginiadov T, Rosenbaum P, Georg T, Schmidt W, Strehler E. Predictive value of sperm chromatin condensation (aniline blue staining) in the assessment of male fertility. *Arch Androl.* 2001;46(2):99-104.
207. Kim HS, Kang MJ, Kim SA, Oh SK, Kim H, Ku SY, i sur. The utility of sperm DNA damage assay using toluidine blue and aniline blue staining in routine semen analysis. *Clin Exp Reprod Med.* 2013;40(1):23-8.
208. Sellami A, Chakroun N, Ben Zarrouk S, Sellami H, Kebaili S, Rebai T, i sur. Assessment of chromatin maturity in human spermatozoa: useful aniline blue assay for routine diagnosis of male infertility. *Adv Urol.* 2013;2013:578631.
209. Belloc S, Benkhalifa M, Junca AM, Dumont M, Bacrie PC, Ménézo Y. Paternal age and sperm DNA decay: discrepancy between chromomycin and aniline blue staining. *Reprod Biomed Online.* 2009;19(2):264-9.

210. Mohammadi Z, Tavalae M, Gharagozloo P, Drevet JR, Nasr-Esfahani MH. Could high DNA stainability (HDS) be a valuable indicator of sperm nuclear integrity? *Basic Clin Androl.* 2020;30:12.
211. Björndahl L, Kvist U. Human sperm chromatin stabilization: a proposed model including zinc bridges. *Mol Hum Reprod.* 2010;16(1):23-9.
212. Aoki VW, Moskovtsev SI, Willis J, Liu L, Mullen JB, Carrell DT. DNA integrity is compromised in protamine-deficient human sperm. *J Androl.* 2005;26(6):741-8.
213. Kałuża A, Jarzab A, Gamian A, Kratz EM, Zimmer M, Ferens-Sieczkowska M. Preliminary MALDI-TOF-MS analysis of seminal plasma N-glycome of infertile men. *Carbohydr Res.* 2016;435:19-25.
214. Olejnik B, Kratz EM, Zimmer M, Ferens-Sieczkowska M. Glycoprotein fucosylation is increased in seminal plasma of subfertile men. *Asian J Androl.* 2015;17(2):274-80.
215. Ka UAA, Ferens-Sieczkowska MA, Olejnik B, Ko Odziejczyk J, Zimmer M, Kratz EM. The content of immunomodulatory glycoepitopes in seminal plasma glycoproteins of fertile and infertile men. *Reprod Fertil Dev.* 2019;31(3):579-89.
216. Olejnik B, Jarzab A, Kratz EM, Zimmer M, Gamian A, Ferens-Sieczkowska M. Terminal Mannose Residues in Seminal Plasma Glycoproteins of Infertile Men Compared to Fertile Donors. *Int J Mol Sci.* 2015;16(7):14933-50.
217. Pang PC, Chiu PC, Lee CL, Chang LY, Panico M, Morris HR, i sur. Human sperm binding is mediated by the sialyl-Lewis(x) oligosaccharide on the zona pellucida. *Science.* 2011;333(6050):1761-4.
218. Kratz EM, Kałuża A, Zimmer M, Ferens-Sieczkowska M. The analysis of sialylation, N-glycan branching, and expression of O-glycans in seminal plasma of infertile men. *Dis Markers.* 2015;2015:941871.
219. Maric T, Katusic Bojanac A, Matijevic A, Ceppi M, Bruzzone M, Evgeni E, i sur. Seminal Plasma Protein N-Glycan Peaks Are Potential Predictors of Semen Pathology and Sperm Chromatin Maturity in Men. *Life (Basel).* 2021;11(9):989.
220. Wang W, Kałuża A, Nouta J, Nicolardi S, Ferens-Sieczkowska M, Wuhler M, i sur. High-throughput glycopeptide profiling of prostate-specific antigen from seminal plasma by MALDI-MS. *Talanta.* 2021;222:121495.
221. Gratacós-Mulleras A, Duran A, Asadi Shehni A, Ferrer-Batallé M, Ramírez M, Comet J, i sur. Characterisation of the main PSA glycoforms in aggressive prostate cancer. *Sci Rep.* 2020;10(1):18974.
222. Janiszewska E, Kokot I, Gilowska I, Faundez R, Kratz EM. The possible association of clusterin fucosylation changes with male fertility disorders. *Sci Rep.* 2021;11(1):15674.
223. Jedrzejczak P, Taszarek-Hauke G, Hauke J, Pawelczyk L, Duleba AJ. Prediction of spontaneous conception based on semen parameters. *Int J Androl.* 2008;31(5):499-507.
224. Khoder-Agha F, Kietzmann T. The glyco-redox interplay: Principles and consequences on the role of reactive oxygen species during protein glycosylation. *Redox Biol.* 2021;42:101888.
225. Sharma R, Agarwal A, Mohanty G, Du Plessis SS, Gopalan B, Willard B, i sur. Proteomic analysis of seminal fluid from men exhibiting oxidative stress. *Reprod Biol Endocrinol.* 2013;11:85.
226. Janiszewska E, Kratz EM. Could the glycosylation analysis of seminal plasma clusterin become a novel male infertility biomarker? *Mol Reprod Dev.* 2020;87(5):515-24.
227. Girouard J, Frenette G, Sullivan R. Seminal Plasma Proteins Regulate the Association of Lipids and Proteins Within Detergent-Resistant Membrane Domains of Bovine Spermatozoa. *Biol Reprod.* 2008;78(5):921-31.
228. Rehman I, Ahmad G, Alshahrani S. Chapter 10 - Lifestyle, Environment, and Male Reproductive Health: A Lesson to Learn. U: Sikka SC, Hellstrom WJG, ur. *Bioenvironmental*



- Issues Affecting Men's Reproductive and Sexual Health. Boston: Academic Press; 2018. Str. 157-71.
229. Dai JB, Wang ZX, Qiao ZD. The hazardous effects of tobacco smoking on male fertility. *Asian J Androl.* 2015;17(6):954-60.
230. Cui X, Jing X, Wu X, Wang Z, Li Q. Potential effect of smoking on semen quality through DNA damage and the downregulation of Chk1 in sperm. *Mol Med Rep.* 2016;14(1):753-61.
231. Aboulmaouahib S, Madkour A, Kaarouch I, Sefrioui O, Saadani B, Copin H, i sur. Impact of alcohol and cigarette smoking consumption in male fertility potential: Looks at lipid peroxidation, enzymatic antioxidant activities and sperm DNA damage. *Andrologia.* 2018;50(3).
232. Mostafa RM, Nasrallah YS, Hassan MM, Farrag AF, Majzoub A, Agarwal A. The effect of cigarette smoking on human seminal parameters, sperm chromatin structure and condensation. *Andrologia.* 2018;50(3).
233. Hammadeh ME, Hamad MF, Montenarh M, Fischer-Hammadeh C. Protamine contents and P1/P2 ratio in human spermatozoa from smokers and non-smokers. *Hum Reprod.* 2010;25(11):2708-20.
234. Nassan FL, Chavarro JE, Tanrikut C. Diet and men's fertility: does diet affect sperm quality? *Fertil Steril.* 2018;110(4):570-7.
235. Yauk C, Polyzos A, Rowan-Carroll A, Somers CM, Godschalk RW, Van Schooten FJ, i sur. Germ-line mutations, DNA damage, and global hypermethylation in mice exposed to particulate air pollution in an urban/industrial location. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 2008;105(2):605-10.
236. Lim CC, Hayes RB, Ahn J, Shao Y, Silverman DT, Jones RR, i sur. Association between long-term exposure to ambient air pollution and diabetes mortality in the US. *Environ Res.* 2018;165:330-6.
237. Vasseur JA, Goetz JA, Alley WR, Jr., Novotny MV. Smoking and lung cancer-induced changes in N-glycosylation of blood serum proteins. *Glycobiology.* 2012;22(12):1684-708.
238. Pavić T, Dilber D, Kifer D, Selak N, Keser T, Ljubičić Đ, i sur. N-glycosylation patterns of plasma proteins and immunoglobulin G in chronic obstructive pulmonary disease. *J Transl Med.* 2018;16(1):323.
239. Knezevic A, Gornik O, Polasek O, Pucic M, Redzic I, Novokmet M, i sur. Effects of aging, body mass index, plasma lipid profiles, and smoking on human plasma N-glycans. *Glycobiology.* 2010;20(8):959-69.
240. Welti M, Hülsmeier AJ. Ethanol-induced impairment in the biosynthesis of N-linked glycosylation. *J Cell Biochem.* 2014;115(4):754-62.
241. Greto VL, Cvetko A, Štambuk T, Dempster NJ, Kifer D, Deriš H, i sur. Extensive weight loss reduces glycan age by altering IgG N-glycosylation. *Int J Obes (Lond).* 2021;45(7):1521-31.

## 11. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 27. listopada 1993. u Našicama. Završetkom Prirodoslovno-matematičke gimnazije u Našicama, upisujem preddiplomski studij Molekularne biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Zagrebu. Nakon uspješno završenog preddiplomskog studija, upisujem diplomski studij Molekularne biologije, koji završavam obranom diplomskog rada 2017. godine. Po završetku studija, zapošljava se na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu (MEF) u suradničkom zvanju, na radnom mjestu asistenta za rad na projektu „Reproduktivna i regenerativna medicina – istraživanje novih platformi i potencijala“, u sklopu Centra izvrsnosti za reproduktivnu i regenerativnu medicinu (engl. *Center of Excellence for Reproductive and Regenerative Medicine*, CERRM), pod vodstvom prof. dr. sc. Davora Ježeka. Doktorski studije Biomedicine i zdravstva pri MEF-u upisujem 2018. godine. Pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Ane Katušić Bojanac i dr. sc. Aleksandre Fučić aktivno sudjelujem u znanstvenom radu kao doktorand. U okviru CERRM-a ko-autorica sam niza znanstvenih publikacija u indeksiranim časopisima te sažetaka predstavljenih na međunarodnim kongresima. Također sam sudjelovala na mnogobrojnim nacionalnim i međunarodnim edukacijama.