POKAZATELJI ANTIOKSIDACIJSKOGA SUSTAVA U SJEMENOJ PLAZMI I SPERMIJIMA RASPLODNIH NERASTA RAZLIČITIH PASMINA

Žura Žaja, Ivona

Doctoral thesis / Disertacija

2021

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:178:917115

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Veterinary Medicine - Repository of PHD, master's thesis

DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Sveučilište u Zagrebu
VETERINARSKI FAKULTET

IVONA ŽURA ŽAJA

POKAZATELJI ANTIOKSIDACIJSKOGA SUSTAVA U SJEMENOJ PLAZMI I SPERMIJIMA RASPLODNIH NERASTA RAZLIČITIH PASMINA

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2015.



University of Zagreb
FACULTY OF VETERINARY MEICINE

IVONA ŽURA ŽAJA

ANTIOXIDANT SYSTEM PARAMETERS IN SPERM AND SEMINAL PLASMA OF DIFFERENT BREED BOARS

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2015

Sveučilište u Zagrebu
VETERINARSKI FAKULTET

IVONA ŽURA ŽAJA

POKAZATELJI ANTIOKSIDACIJSKOGA SUSTAVA U SJEMENOJ PLAZMI I SPERMIJIMA RASPLODNIH NERASTA RAZLIČITIH PASMINA

DOKTORSKI RAD

Mentori:
prof. dr. sc. Suzana Milinković Tur
prof. dr. sc. Marko Samardžija

Zagreb, 2015.

University of Zagreb
FACULTY OF VETERINARY MEICINE

IVONA ŽURA ŽAJA

ANTIOXIDANT SYSTEM PARAMETERS IN SPERM AND SEMINAL PLASMA OF DIFFERENT BREED BOARS

DOCTORAL THESIS

Supervisors:
prof. dr. sc. Suzana Milinković Tur
prof. dr. sc. Marko Samardžija

Zagreb, 2015

Zahvaljujem svojim mentorima prof. dr. sc. Suzani Milinković Tur i prof. dr. sc. Marku Samardžiji na nesebičnoj pomoći i usmjeravanju tijekom izrade ovog rada.

Zahvaljujem izv. prof. dr. sc. Jasni Aladrović, dr. sc. Blanki Beer Ljubić i dr. sc. Renati Laškaj te djelatnicima Centara za reprodukciju u stočarstvu Hrvatske d.o.o., Radna jedinica za proizvodnju u Križevcima na pomoći pri prikupljanju i analizi uzoraka za ovo istraživanje.

Veliko hvala doc. dr. sc. Silviju Vince za nesebičnu pomoć pri statstičkoj obradi podataka.

Zahvaljujem i svim djelatnicima Zavoda za fiziologiju i radiobiologiju Veterinarskog fakulteta na pomoći i podršci tijekom izrade ovog doktorskog rada.

Najtoplije hvala suprugu Ninu, sinu Ivanu i Franku na strpljenju i razumjevanju tijekom izrade ovog rada. Veliko hvala mojim roditeljima na velikoj podršci i pomoći u svakom pogledu, također zahvaljujem ostaloj obitelji i prijateljima.

Doktorski rad posvećujem svojim sinovima Ivanu i Franku.

SAŽETAK

Cilj istraživanja bio je utvrditi utjecaj pasmine i hibrida nerasta na pokazatelje antioksidacijske zaštite spermija i sjemene plazme te biokemijske pokazatelje u sjemenoj plazmi. Također, cilj je bio istražiti antioksidacijske pokazatelje u različitim frakcijama spermija, razdvojenim u otopini jodiksanola. Uzorci sjemena 27 rasplodnih nerasta različitih pasmina (švedski landras, njemački landras, veliki jorkšir, pietren) i PIC-hibrid, starosti od 1,5 do 3 godine dobiveni su ručnom fiksacijom penisa, jednokratno u jesenskom razdoblju. U sjemenoj plazmi određena je koncentracija ukupnog antioksidativnog statusa (TAS), aktivnost superoksid dismutaze (SOD) i glutation peroksidaze (GSH-Px), a u ispranim spermijima te u spermijima triju frakcija određena je i koncentracija bakar-cink superoksid dismutaze te manganska superoksid dismutaza. Najbolja sveukupna antioksidativna zaštita u sjemenoj plazmi utvrđena je u PIC-hibrida, a najmanja u pietrena, dok je sveukupna antioksidativna zaštita u ispranim spermijima bila najmanja u PIC-hibrida a najveća u švedskog landrasa. Iz dobivenih rezultata moglo bi se zaključiti da postoje razlike u antioksidativnoj zaštiti sjemene plazme i spermija u istraženim pasminama nerasta i PIC-hibrida. U PIC-hibrida smanjena antioksidativna zaštita spermija kompenzirana je većom antioksidativnom zaštitom sjemene plazme. Koncentracija TAS-a te aktivnost SOD-a i GSH-Px-a bila je značajno veća u patoloških oblika spermija u odnosu na spermije velike i vrlo male gibljivosti. Najmanje vrijednosti TAS-a te SOD-a i GSH-PX-a utvrđene su u spermijima vrlo male gibljivosti u usporedbi s preostalim frakcijama spermija. U spermijima velike gibljivosti dobivene vrijednosti istraživanih pokazatelja bile su značajno veće od onih u spermijima vrlo male gibljivosti, ali značajno manje od onih u patološkim oblicima spermija. Dobiveni rezultati ukazuju na smanjenu antioksidacijsku zaštitu spermija vrlo male gibljivosti u odnosu na spermije velike gibljivosti. Značajno veće vrijednosti TAS-a te SOD-a i GSH-Px-a u patoloških oblika spermija mogu ukazivati na pojačan antioksidativni obrambeni odgovor zbog pojačanog stvaranja ROS-a u toj frakciji spermija. Nerasti iz skupine PIC-hibrida imali su značajno veću koncentraciju ukupnog kolesterola, LDL-kolesterola i triacilglicerola u sjemenoj plazmi. U odnosu na PIC-hibride nerasti pasmine njemački landras imali su značajno manju koncentraciju navedenih lipida, dok su nerasti pasmine pietren imali značajno manju koncentraciju triacilglicerola i ukupnog kolesterola. Određivanje biokemijskih pokazatelja u sjemenoj plazmi, napose masnih tvari i antioksidativnih pokazatelja, omogućuje bolju procjenu kakvoće sjemena u svrhu uspješnije pohrane i čuvanja sjemena.

Ključne riječi: spermiji, sjemena plazma, biokemijski i antioksidativni pokazatelji, nerasti

EXTENDED SUMMARY

The quality of boar semen may fluctuate significantly due to environmental and endogenous influences (age, season, climate, genetics, nutrition, breed etc.). Knowledge of the physiological features of the sperm and seminal plasma and the impact of the breed, lines and individual features of the boar, are a prerequisite for the successful improvement of reproductive efficiency and the heredity of the best genetic traits of semen. Oxidative stress is the primary cause of fertility disorders in mammals, but semen has an antioxidative system which helps it to neutralize the effect of the production of excessive reactive oxygen compounds. Sperm is particularly susceptible to oxidative damage due to the excessive production of reactive oxygen compunds, and because of the large proportion of unsaturated fatty acids in the plasma membrane and a relatively low concentration of antioxidant enzymes in the cytoplasm. Porcine semen is composed of heterogeneous subpopulations of sperm that are distinguished by their functional and structural features, and the share of each subpopulation is associated with the ability of fertilization and the storing of semen. The aim of the study was to determine the influence of boar breeds and hybrids on semen quality, the parameters of antioxidant protection of both spermatozoa and seminal plasma of boars and biochemical parameters in their seminal plasma. Also, the aim was to investigate antioxidant parameters in different sperm fractions, separated in iodixanol density gradient solution.

Semen samples of 27 boars (belonging to either breeds of Swedish Landrace, German Landrace, Large White, Pietrain or PIC-hybrid) aged between 1.5 and 3 years were collected by gloved-hand technique, once, in autumn season. After the evaluation of semen quality, the seminal plasma was separated from the sperm by centrifugation of semen (1,000 x g/15 min). Part of the native semen was centrifuged in a discontinuous iodixanol density gradient solution for 20 min at 1500 x g at 20°C. After the centrifugation, three sperm fractions were obtained: sperm with progressive mobility greater than 90%, sperm with progressive mobility less than 20% and abnormal sperm. In the seminal plasma the biochemical parameters as well as the concentration of total antioxidant status (TAS), and the activities of total superoxide dismutase (TSOD) and glutathione peroxidase (GSH-Px) were determined. Besides of the aforementioned parameters, in the washed sperm and and in three fractions of sperm the activities of copper-zinc superoxide dismutase and manganese superoxide dismutase were determined too. The best overall antioxidant protection in seminal plasma was determined in the PIC-hybrids, and the lowest in the Pietrain breed, while the overall antioxidant protection

in the washed sperm was the lowest in the PIC-hybrids and the highest in Swedish Landrace. From the obtained results, it can be concluded that there are differences in the antioxidative protection of seminal plasma and sperm in the above mentioned boar breeds and PIC-hybrids. Diminished antioxidant protection of sperm in the PIC-hybrids could be compensated by a higher antioxidant protection of seminal plasma.

In the abnormal sperm fraction, the concentration of TAS, and the activities of TSOD and GSH-Px were significantly higher ($P<0.001$) than those in the fractions of high and very low mobility of sperm. The lowest values of TAS and TSOD and GSH-PX were obtained in sperm with very low mobility ($P<0.001$). The results indicated a decrease in antioxidative protection of sperm with very low mobility in relation to the sperm with high mobility. The highest levels of TAS, SOD and GSH-Px found in abnormal sperm could indicate the enhanced antioxidative defence due to excessive production of reactive oxygen species in that sperm fraction. The sperm fraction of high mobility and normal morphology could be applied in the assisted reproduction, but systematic study of the antioxidant parameters, as well as the evaluation of their values in the above mentioned sperm fractions may contribute to a better understanding of fertilizing properties and causes of infertility.

PIC-hybrid boars had a significantly higher concentrations of total cholesterol, LDL-cholesterol, triacylglycerols in seminal plasma, and German Landrace boars had a significantly lower concentration of the all above mentioned lipids as compared to PIC-hybrids. The Pietrain boars had a significantly lower concentration of triacylglycerols and total cholesterol in compared to the PIC-hybrids. The determination of biochemical parameters, particularly lipid substances and antioxidant parameters in boar seminal plasma, contributes to a better assessment of boar semen quality and a higher concentration of the above mentioned fatty substances enables successful storage and preservation of the frozen semen.

Key words: boars, seminal plasma, sperm, antioxidative and biochemical parameters

SADRŽAJ

1. UVOD 1
2. PREGLED DOSADAŠNJIH SPOZNAJA 4
2.1. MUŠKI REPRODUKTIVNI SUSTAV 4
2.2. ANALIZA EJAKULATA 8
2.2.1. STANDARDNE PROCJENE EJAKULATA 8
2.2.2. BIOKEMIJSKI POKAZATELJI U SJEMENOJ PLAZMI 12
2.3. REAKTIVNI KISIKOVI SPOJEVI I OKSIDACIJSKI STRES 35
2.4. ANTIOKSIDACIJSKI ZAŠTITNI MEHANIZMI 48
2.4.1. SUPEROKSID DISMUTAZA 54
2.4.2. KATALAZA 57
2.4.2. GLUTATION PEROKSIDAZA 59
2.4.4. GLUTATION 67
2.4.5. VITAMINI A, C, E 69
2.5. DOSADAŠNJA ISTRAŽIVANJA UTJECAJA PASMINE, INDIVIDUALNIH RAZLIKA NERASTA I GODIŠNJEG DOBA NA PLODNOST 70
3. CILJ I HIPOTEZA ISTRAŽIVANJA 73
4. MATERIJAL I METODE ISTRAŽIVANJA 74
4.1. TIJEK ISTRAŽIVANJA 76
4.2. PRIPREMA UZORAKA ZA ANALIZE 77
4.3. ANALIZA UZORKA 78
4.4. STATISTIČKA OBRADA REZULTATA 84
5. REZULTATI 86
5.1. PROCJENA KAKVOĆE EJAKULATA 86
5.1.1. VOLUMEN EJAKULATA 86
5.1.2. PROGRESIVNA GIBLJIVOST SPERMIJA U NATIVNOM EJAKULATU 87
5.1.3. GUSTOĆA EJAKULATA 88
5.2. BIOKEMIJSKI POKAZATELJI U SJEMENOJ PLAZMI 89
5.2.1. AKTIVNOST ALKALNE FOSFATAZE 89
5.2.2. AKTIVNOST KISELE FOSFATAZE 90
5.2.3. AKTIVNOST γ-GLUTAMIL TRANSFERAZE 91
5.2.4. AKTIVNOST KREATIN KINAZE 92
5.2.5. AKTIVNOST LAKTAT DEHIDROGENAZE 92

5.2.6. KONCENTRACIJA UKUPNIH BJELANČEVINA 93
5.2.7. KONCENTRACIJA ALBUMINA 94
5.2.8. KONCENTRACIJA UKUPNOG KOLESTEROLA 95
5.2.9. KONCENTRACIJA HDL-KOLESTEROLA 96
5.2.10. KONCENTRACIJA LDL-KOLESTEROLA 97
5.2.11. KONCENTRACIJA TRIACILGLICEROLA 98
5.2.12. KONCENTRACIJA KALCIJA 99
5.2.13. KONCENTRACIJA MAGNEZIJA 100
5.2.14. KONCENTRACIJA CINKA 101
5.3. POKAZATELJI ANTIOKSIDACIJSKE ZAŠTITE U SJEMENOJ PLAZMI 102
5.3.1. KONCENTRACIJA UKUPNOG ANTIOKSIDACIJSKOGA STATUSA 102
5.3.2. AKTIVNOST GLUTATION PEROKSIDAZE 103
5.3.3. AKTIVNOST UKUPNE SUPEROKSID DISMUTAZE 104
5.4. POKAZATELJI ANTIOKSIDACIJSKE ZAŠTITE U ISPRANIM SPERMIJIMA 105
5.4.1. KONCENTRACIJA UKUPNOG ANTIOKSIDACIJSKOGA STATUSA 105
5.4.2. AKTIVNOST GLUTATION PEROKSIDAZE 106
5.4.3. AKTIVNOST UKUPNE SUPEROKSID DISMUTAZE 107
5.4.4. AKTIVNOST MANGANSKE SUPEROKSID DISMUTAZE 108
4.4.5. AKTIVNOST BAKAR, CINK SUPEROKSID DISMUTAZE 109
5.5. POKAZATELJI ANTIOKSIDACIJSKE ZAŠTITE U SPERMIJIMA VELIKE GIBLJIVOSTI (>90%) 110
5.5.1. KONCENTRACIJA UKUPNOG ANTIOKSIDACIJSKOGA STATUSA 110
5.5.2. AKTIVNOST UKUPNE GLUTATION PEROKSIDAZE 111
5.5.3. AKTIVNOST UKUPNE SUPEROKSID DISMUTAZE 112
5.5.4. AKTIVNOST MANGANSKE SUPEROKSID DISMUTAZE 113
5.5.5. AKTIVNOST BAKAR, CINK SUPEROKSID DISMUTAZE 114
5.6. POKAZATELJI ANTIOKSIDACIJSKE ZAŠTITE U PATOLOŠKIH OBLIKA SPERMIJA 115
5.6.1. KONCENTRACIJA UKUPNOG ANTIOKSIDACIJSKOGA STATUSA 115
5.6.2. AKTIVNOST GLUTATION PEROKSIDAZE 116
5.6.3. AKTIVNOST UKUPNE SUPEROKSID DISMUTAZE 117
5.7. POKAZATELJI ANTIOKSIDACIJSKE ZAŠTITE U SPERMIJIMA VRLO MALE GIBLJIVOSTI (<20%) 118
5.7.1. KONCENTRACIJA UKUPNOG ANTIOKSIDACIJSKOGA STATUSA 118
5.7.2. AKTIVNOST GLUTATION PEROKSIDAZE 119

5.7.3. AKTIVNOST UKUPNE SUPEROKSID DISMUTAZE 120
5.8. POKAZATELJI ANTIOKSIDACIJSKE ZAŠTITE U SPERMIJA RAZLIČITIH MORFOLOGIJSKIH OBLIKA I GIBLJIVOSTI 122
5.8.1. KONCENTRACIJA UKUPNOG ANTIOKSIDACIJSKOGA STATUSA 122
5.8.2. AKTIVNOST GLUTATION PEROKSIDAZE 123
5.8.3. AKTIVNOST UKUPNE SUPEROKSID DISMUTAZE 124
5.8.4. AKTIVNOST MANGANSKE SUPEROKSID DISMUTAZE 125
5.8.5. AKTIVNOST BAKAR, CINK SUPEROKSID DISMUTAZE 126
6. RASPRAVA 128
6.1. STANDARDNE PROCJENE EJAKULATA 128
6.2. BIOKEMIJSKI POKAZATELJI U SJEMENOJ PLAZMI 134
6.3. POKAZATELJI ANTIOKSIDACIJSKE ZAŠTITE 149
7. ZAKLJUČCI 161
8. POPIS LITERATURE 164
9. PRILOZI 186
9.1. TABLICE 186
9.2. POPIS KORIŠTENIH SKRAĆENICA 200
10. ŽIVOTOPIS 202

1. UVOD

U posljednjih je četrdeset godina umjetna oplodnja svinja imala najznačajniji utjecaj u umjetnom odabiru (selekciji) na temelju kvantitativnih i kvalitativnih genetskih odlika što je rezultiralo brzim napretkom u svinjogojskoj industriji (DYCK i sur., 2011.). Odabir nerasta za proizvodnju sjemena za umjetno osjemenjivanje temelji se na njihovom genetskom potencijalu da mu je potomstvo karakterizirano genetskim linijama muških praščića brzog rasta i ženskih praščića dobrih reprodukcijskih svojstava (OKERE i sur., 2005.). Standardne su metode za procjenu kakvoće sjemena nerasta zadovoljavale uvjete za umjetno osjemenjivanje, no, pokazalo se da njihova sposobnost oplodnje nije uvijek bila zadovoljavajuća (SMITAL i sur., 2004.; KONDRACKI i sur., 2005.; BROEKHUIJSE i sur., 2011.; DYCK i sur., 2011.).

Iako je danas poznato da se kakvoća i količina sjemena razlikuju od jednog do drugog nerasta iste pasmine, između nerasta različitih pasmina, između čistih i križanih pasmina te između samih linija nerasta unutar pasmina, mnoge pojave koje se odnose na te razlike još uvijek nisu u potpunosti razjašnjene (CIERESZKO i sur., 2000.; KOMMISRUD i sur., 2002., OKERE i sur., 2005.; SONDERMAN i LUEBBE, 2008.). Međutim, navedene razlike mogu biti posljedica različitog kemijskog sastava ejakulata, kao i količine sjemene plazme (KAWĘCKA i sur., 2008.). Sjemena plazma ima važnu funkciju u održavanju progresivne gibljivosti spermija, zaštiti stanične membrane spermija i održavanju njihovih oplodnih svojstava (KOMMISRUD i sur., 2002.). Vitalnost i gibljivost spermija ovise o metaboličkim procesima pri kojima se razgradnjom ugljikohidrata, masti i aminokiselina oslobađa energija potrebna za gibanje spermija. Iako gibljivost spermija zauzima važno mjesto u procjeni kakvoće sjemena, gibljivost, sama po sebi, nije precizan pokazatelj oplodne sposobnosti spermija. Za uspješnu oplodnju, potrebna je intaktna akrosoma, odnosno permeabilnost stanične membrane spermija (KOMMISRUD i sur., 2002.). Tijekom kapacitacije spermija dolazi do reorganizacije membranskih bjelančevina, fosfolipida i zastupljenosti kolesterola u staničnoj membrani, a membrana postaje „razvodnjenija“ i propusnija za ulazak kalcijevih iona, bikarbonata i vodikovog peroksida u stanicu. Istraživanja EGHBALI i sur. (2010.) ukazuju kako je koncentracija kalcija, magnezija i ukupnog antioksidacijskog statusa u sjemenoj plazmi povezana s kakvoćom sjemena te da svi čimbenici sinergistički djeluju na udio živih spermija i njihovu gibljivost. Smanjena koncentracija kolesterola vezanog na

lipoproteine male gustoće (LDL-kolesterol) u sjemenoj plazmi značajka je sperme lošije kakvoće (BEER-LJUBIĆ i sur., 2009.).

Spermiji su visoko specijalizirane stanice specifične građe i funkcije, stoga različiti okolišni uvjeti, fiziološki status životinje kao i genetski čimbenici utječu na smanjenu plodnost ili pojavu neplodnosti (SIKKA, 1996.; WOLF i SMITAL, 2009b.; WYSOKIŃSKA i sur., 2009.). Stanični integritet spermija može biti izložen mnogobrojnim štetnim utjecajima, ali je najštetniji učinak oksidacijskog stresa, koji nastaje uslijed povećanog stvaranja reaktivnih kisikovih spojeva (engl. reactive oxygen species, ROS) tijekom hlađenja i pripreme sjemena za umjetno osjemenjivanje (AWDA i sur., 2009.; VALLORANI i sur., 2010.) i/ili narušavanjem ravnoteže oksidansa i antioksidansa (ROCA i sur., 2005.). Membrane spermija sisavaca bogate su nezasićenim masnim kiselinama te su stoga podložne oštećenju uzrokovanom pojačanim stvaranjem ROS-a i ireverzibilnom gubitku svoje funkcije (KAEOKET i sur., 2008.; MORAN i sur., 2008.). Dok mala koncentracija ROS-a pospješuje vezanje spermija za zonu pelucidu i oslobađanje nezasićenih masnih kiselina iz stanične membrane, velika koncentracija ROS-a uzrokuje patološke promjene spermija tako što intenzivira procese lipidne peroksidacije, zbog čega spermiji gube gibljivost i sposobnost preživljavanja (DE LAMIRANDE i GAGNON, 1992.). Tijekom oksidacijskog stresa, osim oksidacijskih oštećenja membranskih lipida, dolazi i do oštećenja integriteta deoksiribonukleinske kiseline (DNK) u jezgri spermija, što može ubrzati proces apoptoze, smanjiti broj spermija, smanjiti kakvoću sjemena i dovesti do neplodnosti (AGARWAL i sur., 2003.). Zbog svega navedenog, vidljiva je važnost preciznog održavanja ravnoteže između stvaranja ROS-a i njihova odstranjivanja, kao i pravo vrijeme i mjesto stvaranja ROS-a za postizanje pune oplodne sposobnosti spermija.

Kako bi se zadržala vitalna reproduktivna sposobnost, spermiji i sjemena plazma sadrže složene antioksidacijske zaštitne mehanizame (enzimske i neenzimske) pomoću kojih neutraliziraju negativne učinke ROS-a (JELEZARSKI i sur., 2008.; OGBUEWU i sur., 2010.). Antioksidansi mogu spriječiti započinjanje lipidne peroksidacije, smanjiti koncentraciju kisika, ukloniti reaktivni kisik, vezati ione željeza i bakra, enzimski ukloniti perokside te prekinuti lanac lipidne peroksidacije uklanjanjem peroksilnog i alkoksilnog radikala (JURKOVIĆ i sur., 2008.). Najdjelotvorniji enzimski antioksidansi obuhvaćaju superoksid dismutazu (engl. superoxide dismutase, SOD), katalazu (engl. catalase, CAT) i glutation peroksidazu (engl. glutathione peroxidase, GSH-Px), a neenzimski antioksidansi uključuju tiolne antioksidanse, vitamin C, vitamin E, karotenoide, prirodne flavonoide,

albumine, mokraćnu kiselinu te druge spojeve i minerale, primjerice selen (SIKKA, 2004.; JURKOVIĆ i sur., 2008.).

Biološka se funkcija SOD-a očituje u uklanjanju superoksidnog radikala čija koncentracija raste *in vivo* s izloženošću kisiku (FRIDOVICH, 1995.). U sisavaca su izdvojene bakar-cink superoksid dismutaza (CuZnSOD) i manganska superoksid dismutaza (MnSOD). CuZnSOD je najvećim dijelom prisutna u citoplazmi, a manjim dijelom u lizosomima, peroksisomima, jezgri i prostoru između izvanjske i unutarnje membrane mitohondrija, dok je MnSOD prisutna u mitohondrijima (HALLIWEL i GUTTERIDGE, 1999.). Prema rezultatima KOWALOWKA i sur. (2008.) važnu fiziološku funkciju u sprečavanju nastanka oksidacijskog stresa u sjemenoj plazmi nerasta ima i izvanstanična SOD. Različiti oblici GSH-Px-a, selenoovisna kao i selenoneovisna epididimalna GSH-Px, štite spermije od oksidacijskih oštećenja (CHABORY i sur., 2010.; MAJIĆ-BALIĆ i sur., 2012.). GSH-Px katalizira redukciju vodikovog peroksida ili organskih hidroperoksida u vodu i odgovarajuće alkohole koristeći reducirani glutation. Mali antioksidacijski kapacitet samih spermija kompenziraju antioksidansi iz sjemene plazme (AGARWAL i sur., 2003.).

Budući da je za normalno preživljavanje i funkciju spermija neophodno precizno održavanje ravnoteže između oksidansa i antioksidansa te da spermije tijekom prolaska kroz epididimis i nakon ejakulacije štite unutarstanični i izvanstanični antioksidacijski mehanizmi, u zadnjih se dvadesetak godina pridaje velika pozornost funkciji antioksidacijskog sustava u očuvanju muških reprodukcijskih svojstava. Pri tome bi određivanje antioksidacijskih pokazatelja u sjemenoj plazmi i spermijima moglo pridonijeti boljoj procjeni kakvoće sjemena nerasta i postati sastavni dio standardnog protokola pregleda sjemena rasplodnjaka.

2. PREGLED DOSADAŠNJIH SPOZNAJA

2.1. MUŠKI REPRODUKTIVNI SUSTAV

Reprodukcijske funkcije muških spolnih organa jesu: stvaranje spermija u testisima (spermatogeneza i spermiogeneza), sazrijevanje, pohrana i transport spermija kroz urogenitalni sustav, izvođenje spolnog čina i regulacija muških reprodukcijskih funkcija spolnim hormonima (GUYTON i HALL, 2006.). Funkcija je reproduktivnoga sustava muških životinja stvaranje velikog broja održivih spolnih stanica (spermija) te njihovo izbacivanje u odgovarajuće mjesto ženskog reproduktivnog sustava u odgovarajuće vrijeme spolnog ciklusa (CAMPBELL i sur., 2003.).

Muški se spolni organi sastoje od parnih testisa (muške sjemenske žlijezde, *testes*) smještenih u mošnji (*scrotum*), nuzjaja (*epididimis*), sjemenovoda (*ductus deferens*), muške mokraćnice (*uretra masculina*), akcesornih spolnih žlijezda: mjehuraste žlijezde (*glandulae vesiculosae*), prostate (*glandula prostatica*), bulbouretralne (Cowperove) žlijezde (*glandulae bulbourethrales*), uretralne (Litreove) žlijezde (*glandulae urethrales*), uda (*penis*) i prepucija (*praeputium*) (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.).

Specifične su anatomske značajke poznate u različitih domaćih životinja. Glans penisa ima veliki raspon oblika u različitih vrsta sisavaca, pa tako u nerasta ima oblik svrdla (spirale). Kaudalno od skrotuma prema trbušnoj stjenci penis nerasta, bika, ovna i jarca tvori karakterističan sigmoidni zavoj (*flexuru sigmoidae*), koji se pri erekciji ispravlja produljujući penis (za razliku od pastuha, pasa i mačka koji ga nemaju). U vrsta koje imaju sigmoidni zavoj postoji parni mišić *m. retractor penis* koji se hvata na repnim kralješcima i s dorzalne strane sigmoidnog zavoja. Svojom relaksacijom omogućava izduljenje penisa na račun ispravljanja sigmoidnog zavoja. U nerasta se sa dorzalne strane prepucij proširuje u obliku slijepe vreće (*diverticulum praeputiale*), gdje se u starijih nerasta može nakupiti i do 100 mL smegme (staničnog detritusa i urina), koja daje jaki i specifičan urinarni miris. Nerast ima naročito dobro razvijene bulbouretralne žlijezde i mjehuraste žlijezde koje su važne, jer doprinose stvaranju neobično velikoga volumena sjemena. Isto se tako nerast ističe među domaćim životinjama po veličini testisa, tj. ima najveće testise u odnosu na tjelesnu masu. Skrotum je u nerasta i pasa smješten kaudalno od anusa u odnosu na bika, pastuha, ovna i jarca, kojima skrotum visi između zadnjih nogu (REECE, 2004.; CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.).

Testisi (parne muške gonade) imaju najznačajniju biološku važnost koja se očituje stvaranjem spermija spermatogenezom i spermiogenezom te stvaranjem steroidnih hormona (aldosterona i testosterona). Spermatogeneza započinje u pubertetu, nastavlja se nakon uspostavljene spolne zrelosti, a degradira staračkom atrofijom testisa (*atrofia senilis*). Proces je spermatogeneze i spermiogeneze kontinuiran, ciklički proces koji se zbiva u zavinutim kanalićima testisa gdje nalazimo različite razvojne stadije spermija počevši od spermatogonija, primarnih i sekundarnih spermatocita, spermatida te spermija. Nizom mitotičkih dioba iz spermatogonija nastaju spermatocite koji se dalje dijele kroz dvije mejotičke diobe u spermatide s haploidnim brojem kromasoma te se one potom metamorfozom kroz proces spermiogeneze preoblikuju u spermije. Sve su navedene promjene spermija popraćene promjenama u citoplazmi i u staničnoj jezgri, a obuhvaćaju smanjenje jezgre i zgušnjavanje kromatina te izduljenje citoplazme i odbacivanja njenog viška. Izuzev navedenih promjena tijekom spermatogeneze, na jednoj strani jezgre od Golgijevog aparata nastaje akrosomalna kapa uz istodobnu sintezu akrosomskih enzima, a na drugu stranu jezgre putuju centrioli i spajaju se u rep spermija uz sintezu bjelančevine tubulina. Mitohondriji se izduljuju i spiralno oviju u području vrata spermija (mjesto izrastanja repa) (KOZARIĆ, 1998.).

Nakon nastanka spermija u sjemenim kanalićima testisa (40 - 45 dana), odvodnim kanalićima spermiji dolaze u epididimis, koji se anatomski sastoji od glave, tijela i repa, a dospjeli spermiji nisu sposobni za oplodnju i gibanje. Izuzev transportne funkcije epididimis sudjeluje u koncentraciji, sazrijevanju i pohrani spermija. Za prolazak kroz šest metara dug epididimis, ovisno o životinjskoj vrsti, spermijima je u nerasta potrebno od 12 do 14 dana, a sam se transport zbiva peristaltičkom kontrakcijom kanalića i trepetljikastog epitela. U glavi epididimisa dolazi do koncentracije pristiglih spermija i do dvadeset puta, sluznica stjenke glave epididimisa resorbira veliki volumen tekućine koja potječe iz sjemenih kanalića. Sekret epididimalnih epitelnih stanica održava spermije u stanju anabioze (stanje sa minimalnom metaboličkom aktivnosti) i minimalnim utroškom energije sa oksidirajućim tvarima i visokom koncentracijom kalija, koji ima inhibitorni učinak na gibljivost. Tijekom prolaska spermija kroz epididimis, dolazi do morfoloških, biokemijskih, fizioloških te funkcionalnih promjena u strukturi spermija pod utjecajem sekrecije epididimalnih enzima, proteina i glikoproteina. U procesu zrenja, spermiji dobivaju lipoproteinsku membranu koja ih štiti od nepovoljnih izvanjskih čimbenika te sprječava aglutinaciju istih dajući im pojedinačni negativni naboj. Pod utjecajem androgenih hormona epitelne stanice epididimisa sekrecijom bjelančevina, iona, aminokiselina, malih organskih molekula i ostalih sastojaka osiguravaju optimalne

uvjete za spermije i tijekom njihove pohrane u samom epididimisu. U epididimalnoj tekućini secernirane bjelančevine imaju važnu funkciju u maturaciji spermija, u reakciji kapacitacije spermija te u interakciji spermija s jajnom stanicom, a najistraženije bjelančevine jesu laktoferin, klasterin, bjelančevina koja prenosi kolesterol, glutation peroksidaza, prostaglandin D2 sintetaza i glukozidaza. Spermiji postaju sposobni za gibanje i oplodnju jajne stanice tek prolaskom kroz rep epididimisa te se do ejakulacije minimalno gibaju. Tijekom ejakulacije dolazi do miješanja i razrjeđenja spermija sa sjemenom plazmom, spermiji se iz stanja anabioze naglo aktiviraju i dosežu svoju potpunu sposobnost gibanja i oplodnje (REECE, 2004.; CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.; FABIOLA ARROTÉIA i sur., 2012.).

Ejakulat, sperma ili sjeme specifična je tekućina koja se manjim djelom sastoji od spermija, a većim od sjemene plazme (95 - 97%). Spermiji se stvaraju spermatogenezom i spermiogenezom u testisima, dok je sjemena plazma proizvod akcesornih spolnih žlijezda. Samo je manji dio sjemene plazme proizvod testisa, sjemenovoda i epididimisa.

Značajke ejakulata nerasta jesu: veliki volumen, velika količina želatinozne mase.

Ejakulacija u nerasta traje prosječno 8 minuta te se zbiva frakcionirano:

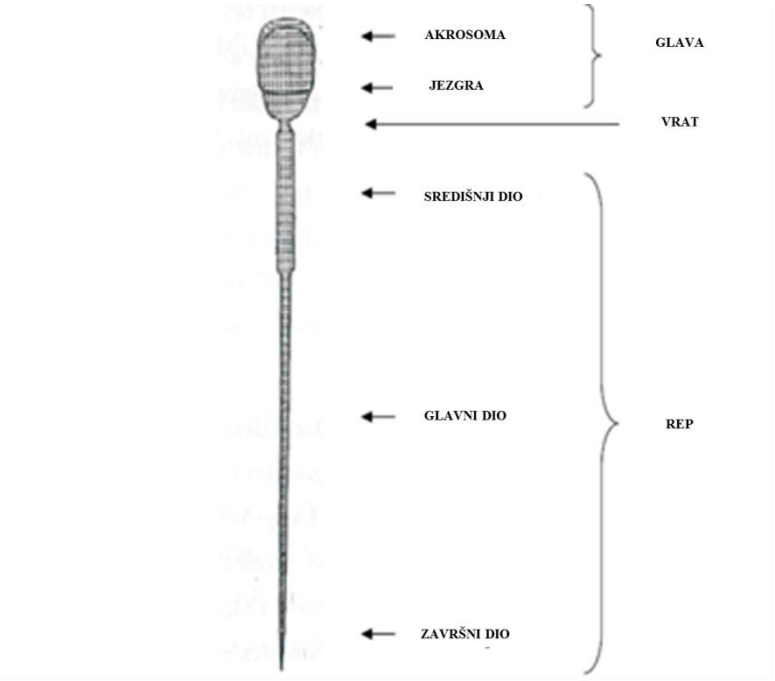
- prespermalna frakcija (10 - 15 mL, vodenasta tekućina oskudna spermijima i želatinoznom masom)
- spermalna frakcija (70 - 110 mL, gusta tekućina mliječne boje zastupljena najvećom koncentracijom spermija, 0,5 - 1 x 10^9/mL)
- postspermalna frakcija (150 - 170 mL, najvećeg volumena, oskudna spermijima, sadrži želatinoznu masu, sekret bulbouretralnih žlijezda).

Druga se i treća frakcija ejakulata hvata u spermohvatač, a potom ocjenjuje, razrjeđuje i priprema u doze za umjetno osjemenjivanje (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.; YASTE OLIVER, 2008.).

Spermiji su muške spolne stanice svojstvenog oblika za svaku vrstu sisavaca te se razlikuje od svih drugih stanica u tijelu životinja, nemaju sposobnost diobe i rasta, ali imaju sposobnost samostalnog gibanja i održivosti izvan organizma u aerobnim i anaerobnim uvjetima. Iako su svojstveni za svaku životinjsku vrstu, ipak postoje neke značajke zajedničke svim vrstama sisavaca.

Spermij se sastoji od glave, središnjeg dijela (vrat i tijelo) i repa. U glavi spermija razlikujemo dva različita anatomska dijela koji čine osnovu stanice spermija: jezgra i akrosoma. Jezgra je spermija sastavljena od genetskog materijala, DNK, te od ribonukleinske kiseline (RNK), kromatina, bjelančevina te alkalne fosfataze, a obavijena je tankim slojem citoplazme. Akrosoma je egzocitotična vezikula (opna) koja proizlazi iz Golgijevog aparata i

sadrži neke važne enzime kao što su hijaluronidaza i akrozin, koji su hidrolitički enzimi važni za postizanje penetracije kroz međustanični matriks folikularnih stanica (*zona pellucida*). Vezikulu okružuju akrosomske membrane, i to: unutarnja akrosomska membrana, koja se nalazi bliže jezgri, i izvanjska akrosomska membrana, koji se nalazi odmah ispod stanične membrane. Vrat je vrlo kratak, a sastoji se od centriola građenog od devet segmenata, središnje i spiralne aksoneme koje sežu sve do repa. Tijelo povezuje glavu sa repom, a smatramo ga „motorom“ koji pokreće rep. Oko središnje aksoneme raspoređeni su mitohondriji koji su važni za gibanje spermija. Tijelo se spermija sastoji od bjelančevina, ugljikohidrata i masti koje sudjeluju u staničnom metabolizmu. Rep je najdulji dio spermija, a za gibljivost najznačajniji organ spermija, koji sadrži središnju aksonemu u središnjem dijelu vrata, spiralno omotana mitohondrijskim omotačem. Rep se sastoji od središnjeg, glavnog i završnog dijela koji završava aksonemom nalik kistu (YASTE OLIVER, 2008.).



Slika 2.1. Građa spermija (preuzeto od YASTE OLIVER, 2008.).

Ejakulat se sastoji od subpopulacija spermatozoida koji se razlikuju u zrelosti i fiziološkom stanju, obzirom na sposobnost kapacitacije, akrosomske reakcije i oplodnje (AITKEN i sur., 1992.).

2.2. ANALIZA EJAKULATA

Uporaba umjetne oplodnje u svinja namijenjenih u komercijalne svrhe značajno je porasla u posljednjih desetak godina (RIESENBECK, 2011.; RODRÍGUEZ i sur., 2013.). Kako bi osigurali vrhunsku kakvoću doza za umjetnu oplodnju, potrebita je rutinska procjena kakvoće sjemena. Analiza se kakvoće sjemena uglavnom temelji na konvencionalnim postupcima, koji obuhvaćaju broj spermija određen na fotometru te gibljivost i morfologiju spermija, koje se procjenjuju uz pomoć mikroskopa, a u malobrojnim se centrima za umjetno osjemenjivanje rabi računalni sustav za analizu sjemena (engl. computer aided semen analysis, CASA). Odnos navedenih osobina spermija i sjemena s *in vivo* pokazateljima plodnosti nerasta još su uvijek predmet rasprave (TSAKMAKIDIS i sur., 2010.; RODRÍGUEZ i sur., 2013.). Međutim, studije u domaćih životinja pokazuju da ove osobine sjemena često nisu u korelaciji s plodnošću, a najmjerodavnija ocjena kakvoće sjemena nerasta je gravidnost i „normalno“ potomstvo. Uzroci koji dovode do neplodnosti nerasta uglavnom su nepoznati, jer se u nerasta osim rečenih postupaka ne provodi daljnja dijagnostika i liječenje, već se uklanjaju iz uzgoja (UBEDA i sur., 2010.; RODRÍGUEZ i sur., 2013.). U humanoj se medicini za provjeru reprodukcijskog potencijala muškaraca, u sklopu procjene spermiograma obavljaju i analize hormona, te različitih biokemijskih pokazatelja sjemene plazme, koje preporuča Svjetska zdravstvena organizacija (engl. World Health Organization, WHO). Neki biokemijski pokazatelji ukazuju na funkciju ili disfunkciju prostate i/ili se odnose na neplodnost u muškaraca (CHIA i sur., 2000.; WHO, 2010.; RODRÍGUEZ i sur., 2013.), stoga bi analiza sjemene plazme mogla biti od kliničkog značaja u istraživanju neplodnosti nerasta.

Svojstva sperme variraju od jedinke do jedinke, a pod utjecajem su mnogih egzogenih čimbenika (hranidba, učestalost uzimanja ejakulata, smještaj, mikroklimatski uvjeti, stres, itd.), ali i endogenih čimbenika (genetski, neuroendokrini, itd.). Kakvoća sperme može se mijenjati radi navedenih čimbenika koji utječu na aktivnost spermatogeneze i spermiogeneze u testisima, ali i zbog možebitnih bolesti reproduktivnog sustava.

2.2.1. STANDARDNE PROCJENE EJAKULATA

Analizom sperme procjenjuje se potencijal plodnosti mužjaka, kvaliteta sjemena i možebitni uzroci neplodnosti. Procjena ejakulata mora biti načinjena vrlo brzo, tj. u što je moguće kraćem vremenskom razdoblju od prikupljanja. Temeljitom se procjenom

selekcioniraju ejakulati sa izrazitim oplodnim svojstvima. Ejakulati se analiziraju makroskopski (boja, miris, konzistencija, pH, volumen) i mikroskopski (gustoća, gibljivost, morfologija).

Volumen ejakulata je fizikalni pokazatelj sperme, ocjenjuje se odmah nakon uzimanja ejakulata. U nerasta se volumen ejakulata razlikuje u odnosu na: jedinku, dob, učestalost uzimanja ejakulata, hranidbu, zdravstveno stanje, način prikupljanja, čimbenike stresa, vrijeme prikupljanja, itd. Mlađi nerasti (5 do 8 mjeseci) imaju manji volumen ejakulata, koji doseže maksimum sa spolnom zrelošću (18 mjeseci), te takav ostaje do andropauze (7 do 8 godina) (KNOX, 2003.; FRUNZĂ i sur., 2008.). Prosječan je volumen ejakulata nerasta 250 mL (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.), a KNOX (2003.) navodi raspon od 150 do 500 mL, dok WOLF i SMITAL (2009.) navode raspon od 50 do 600 mL. U usporedbi s ostalim rasplodnim mužjacima domaćih životinja nerasti imaju najveći prosječni volumen ejakulata, i to uslijed obilatog izlučivanja akcesornih spolnih žlijezda, napose sjemenih vezikula. Bulbouretralna žlijezda također izlučuje veliku količinu sekreta i čini želatinozni dio sperme (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.). Ukoliko je volumen vrlo oskudan, smatra ga se nezadovoljavajućim, jer između volumena ejakulata i drugih obilježja postoji pozitivna korelacija. Učestala ejakulacija smanjuje volumen, te u slučaju uzastopnog sakupljanja dva ejakulata, zasigurno će drugi imati manji volumen. Smanjen volumen nema nužno patološko značenje, ali redovito sadržava manju gustoću spermija (FRUNZĂ i sur., 2008.; WOLF i SMITAL, 2009.).

Boja ejakulata je značajan fizikalni pokazatelj sjemena. Normalna boja sperme nerasta je bijela s plavkastim odsjajem. Ukoliko se sakupljanje sjemena ponovi mnogo puta tijekom jednog dana, sjemenska tekućina postane prozirnija uslijed smanjene koncentracije spermatozoida (STRZEŽEK i sur., 1995b.; FRUNZĂ i sur., 2008.). Normalna se boja sperme može pojavljivati u različitim nijansama (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.).

Miris ejakulata je svojstven svakoj životinjskoj vrsti te podsjeća na miris svježe kuhane kosti ili pak može podsjećati na miris ustajalog mlijeka, miris pečenog kestena (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.; FRUNZĂ i sur., 2008.).

pH ejakulata je značajan pokazatelj kvalitete sjemena. Prema rezultatima KINGA i MACPHERSONA (1966.) pH najznačajnije frakcije ejakulata nerasta iznosi 7,69 ± 0,33. PAULENZ i sur. (2000.) su utvrdili da pH ejakulata nerasta, koji se nakon prikupljanja drži u zatvorenoj posudi iznosi 7,21, a značajno se smanjuje nakon držanja sperme 96 sati na 25ºC odnosno 20°C, i to na 6,69 - 7,06. Vrijednost se pH neznatno povećava na 7,25 ukoliko se sperma drži na 15°C, te na 7,29 ukoliko se pohranjuje na temperaturi od 10 ºC. Ukoliko pH

sperme u trenutku sakupljanja iznosi više od 8, a to ukazuje na lošu kvalitetu sperme ili na prisutnost upalnog procesa u reproduktivnom sustavu i/ili akcesornim spolnim žlijezdama.

Poradi kiselog medija spermatozoidi su u epididimisu u stanju anabioze i ne gibaju se. Doprinos akcesornih spolnih žlijezdi s nižim ili višim razinama izlučivanja u ejakulat, odredit će alkalni ili pak više kiseli pH ejakulata. Promjene u pH vrijednosti negativno utječu na preživljavanje i gibljivost spermija (KING i MACPHERSON, 1966.; KAMP i sur., 2003.).

Određivanje gibljivosti spermija smatra se jednim od najvažnijih značajki sperme. Gibljivost i preživljavanje spermija ovisi o optimalnom omjeru između tekućina koje se stvaraju u prostati i vezikularnim žlijezdama. Sekret prostate je lužnat što je od velikog značaja za metabolizam i gibljivost spermija. Spermiji su sve do trenutka miješanja s alkalnim sekretom prostate nepomični radi kiselog sekreta koji se stvara u epididimisu (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.).

Normalno je gibanje spermija pravocrtno, rotiraju se oko podužne osi prema naprijed s brzim pokretima repa lijevo-desno. Izuzev normalnog, pravocrtnog gibanja spermija, mogu se naći i abnormalni oblici gibanja, primjerice, manježno ili kružno, vibriranje na mjestu, retrogradno (unazad) ili pak mogu biti nepomični. Ejakulati nerasta koji se razrijeđuju za umjetnu oplodnju moraju imati minimalno 70% progresivno gibljivih spermija (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.; FRUNZĂ i sur., 2008.).

Spermiji koji se normalno gibaju, imaju različite brzine gibanja, ovisno o biološkoj vrijednosti sperme, temperaturi i trajanju skladištenja sperme, te o vaginalnom sekretu uterusa i cerviksa, koji se u ženki stvara tijekom estrusa.

Fotoelektrične, elektronske i računalne metode za analiziranje sperme, omogućuju preciznu procjenu gibanja spermija, njihove putanje, brzinu gibanja, ali i oblik promatranih gibanja (MORTIMER, 2000.; FRUNZĂ i sur., 2008.).

Gustoća ejakulata, odnosno koncentracija spermija u ejakulatu (broj spermija u 1 mL ejakulata) služi kao metoda za praćenje zdravlja i reproduktivnog potencijala nerasta te kao najznačajniji pokazatelj u obradi ejakulata nerasta, za optimiziranje genetskog reprodukcijskog potencijala jedinke. Precizna procjena broja spermija nije jedini čimbenik za povećanje doza sjemena po ejakulatu te učinkovitost nerasta u proizvodnji sjemena. Procjena kakvoće sjemena, mora biti integrirana u obradu kao sredstvo kojim bi se osigurao dovoljan broj živih spermija koji se rabe za oplodnju. Koncentracija ejakulata mjeri se hemocitometrom, fotometrom, spektrofotometrom ili CASA-om. Koncentracija ejakulata u nerasta iznosi 25 - 300 x 10^6/mL (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.), dok WOLF i SMITAL (2009.) navode da se koncentracija nerasta nalazi u rasponu od 0,05 do 0,9 x

10^9/mL (50 do 900 x 10^3/ mm^3). Ukoliko analizu nije moguće provesti objektivnim mjernim uređajima, procjena koncentracije sperme može se načiniti i deskriptivno (rijetka, srednje rijetka i gusta). Ukupan broj spermija predstavlja ukupan broj spermija u ejakulatu, a broj funkcionalnih spermija predstavlja broj funkcionalnih (kapacitacijsko sposobnih) spermija u ejakulatu. Prikupljanjem sperme odraslih nerasta, uzastopno tijekom više dana, i to dva puta dnevno dobiva se približno 5 milijardi spermija po ejakulatu (5 x 10^9), dok se u nerasta kojima se sperma uzima dva puta tjedno dobiva 50 milijardi spermija po ejakulatu (50 x 10^9). Nerastima pak kojima se ejakulat prikuplja jednom u dva tjedana dobiva se približno 100 milijardi spermija po ejakulatu, no ukoliko se sperma ne uzima kroz dulje vrijeme, povećava se broj patoloških i nefunkcionalnih spermija (KNOX, 2003.). Sperma nerasta ima malu sposobnost skladištenja, tako da stajanjem opada broj funkcionalnih spermija (SAVIĆ, 2014.). Iako koncentracija spermija nerasta nije velika u usporebi sa onom u drugih vrsta, ukupan je broj spermija u ejakulatu znatno veći od one u drugih životinja.

Mnogi autori navode da starost, godišnje doba, učestalost uzimanja ejakulata, pasmina i drugi okolišni čimbenici utječu na koncentraciju spermija u nerasta (CIERESZKO i sur., 2000.; STANČIĆ i sur., 2003.; KAWĘCKA, i sur., 2008.; KONDRACKI i sur., 2012.).

STANČIĆ i sur. (2003.) navode da se koncentracija ejakulata povećava sa starenjem nerasta, te navode utjecaj godišnjeg doba i pasmine. Nadalje, u istraživanju je ovih autora, koncentracija bila najmanja u razdoblju od travnja do lipnja (178 x 10^6/mL), a najveća u razoblju od lipnja do rujna (219 x 10^6/mL). U novijim istraživanjima STANČIĆ i sur. (2012.) navode da je volumen ejakulata, koncentracija spermija, ukupni broj i progresivna gibljivost spermija znatno manja u toplijem dijelu godine, a time je i broj dobivenih doza za umjetno osjemenjivanje po ejakulatu gotovo dvostruko manji od onih dobivenih u hladnijem dijelu godine.

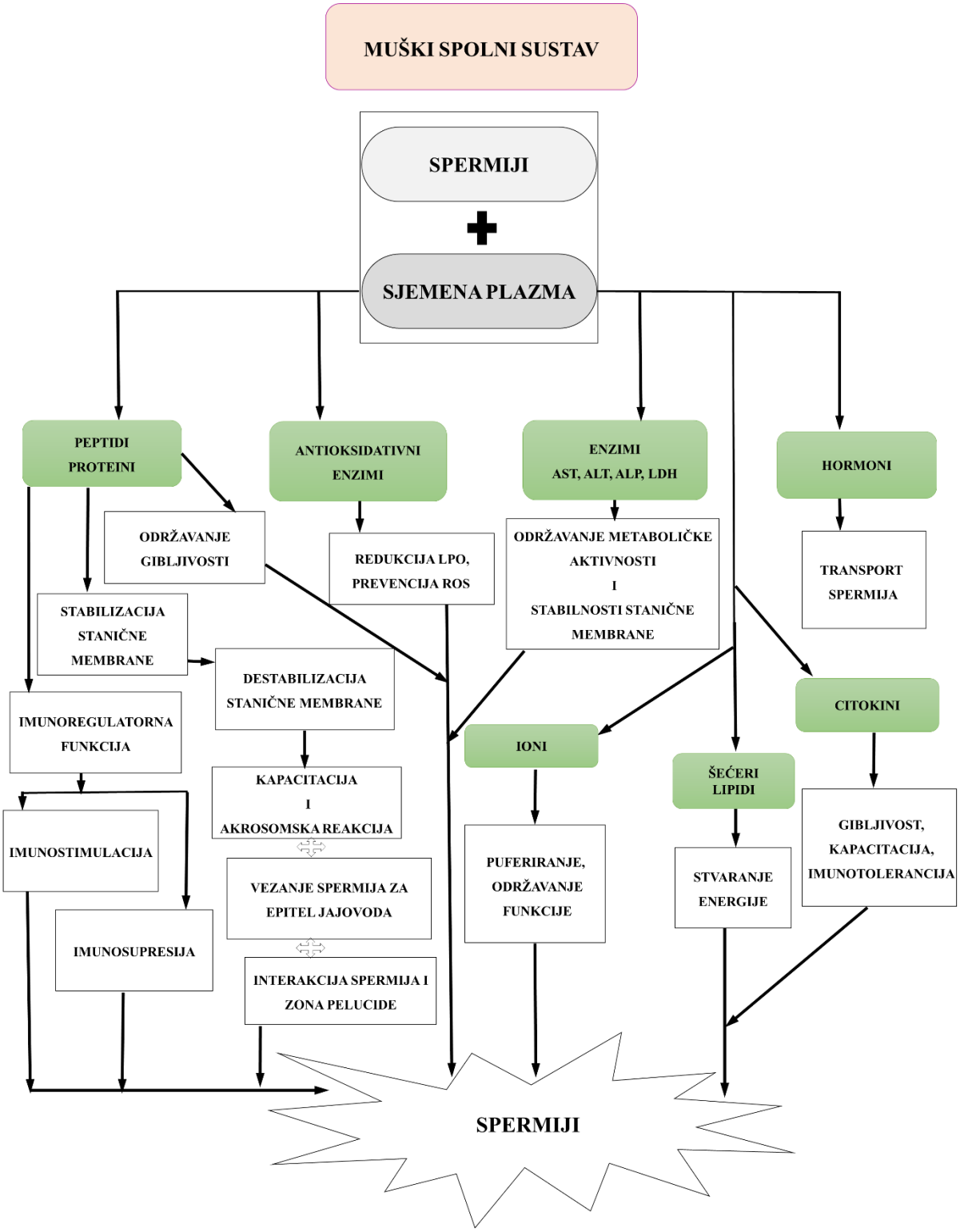
Učestalost prikupljanja sperme utječe na njene kvantitativne i kvalitativne parametre (WOLF i SMITAL, 2009.). Prema navodima većeg broja istraživača, optimalna pauza između dva skoka za neraste u eksploataciji je 3 do 5 dana, a za mlade neraste pauza između dva skoka treba biti veća, najmanje 7 dana (FRANGEÎ i sur., 2005.). Koncentracija, volumen i ostali pokazatelji sperme nerasta povećavaju se sve do dobi nerasta od 3,5 godine (SAVIĆ, 2014.).

CIERESZKO i sur. (2000.) su ustvrili značajno veću koncentraciju u nerasta pasmine pietren u odnosu na nerasta pasmine veliki jorkšir, dok su KONDRACKI i sur. (2012.) ustvrdili manji volumen ejakulata u pasmine durok od one u pietrena, ali je koncentracija spermija u duroka bila veća.

2.2.2. BIOKEMIJSKI POKAZATELJI U SJEMENOJ PLAZMI

Uvriježeno je da se u nerasta sjemena plazma može supstituirati razrjeđivačima bez značajnijeg štetnog utjecaja, no nedavna su istraživanja ustvrdila da sjemena plazma ima različite funkcije u metabolizmu spermija (RODRIGUEZ-MARTINEZ i sur., 2011.). Naime, funkcija sjemene plazme fiziološki je povezana sa ejakulacijom spermija te njihovim opstankom u ženskom spolnom sustavu. Funkcije sjemene plazme u maturaciji spermija intezivno su istraživane, no s oprečnim rezultatima, dok je nekoliko istraživanja u različitih vrsta ustvrdilo različite funkcije sjemene plazme, uključujući: 1) aktivaciju i povećanje gibljivosti spermija, te poboljšanje i sveukupne kvalitete sperme; 2) puferiranje, kako bi se osigurao optimalni osmotski i hranjivi medij; 3) prevenciju prijevremene aktivacije tijekom fiziološkog transporta spermija te stabilizaciju stanične membrane uz pomoć inhibitora kapacitacije; 4) zaštitu spermija od fagocitoze i razaranja u upalnim procesima; 5) reguliranje transporta i eliminacije spermija; 6) poboljšanje postotka ovulacije u krava, kao i indukciju ovulacije u svinja i deva; 7) poboljšanje interakcije spermij-jajna stanica; 8) aktivaciju ekspresije embrionalnih citokina i pomoći u pripremi majčinog sustava za razvoj embrija, napose u uspostavljanju imunosne tolerancije nužne za održivost gravidnosti; i 9) utjecaj na plodnost (JUYENA i STELLETTA, 2012.). RODRÍGUEZ i sur. (2013.) navode da sjemena plazma ima važnu funkciju tijekom kapacitacije spermija, stimulira imunosni sustav sluznice uterusa za neutralizaciju patogena, a da pri tome tolerira spermije i zametke (RODRIGUEZ-MARTINEZ i sur., 2011.).

Na temelju istraživanja provedenih u ljudi, u nerasta te u drugih životinjskih vrsta, ustvrđeno je nekoliko biokemijskih pokazatelja koji bi mogli biti od kliničkog značaja, primjerice za otkrivanje patologije testisa i/ili akcesornih spolnih žlijezda te praćenja zdravstvenog stanja.



Slika 2.2. Prikaz najznačajnijih sastojaka i funkcija sjemene plazme. Kratice označavaju: AST, aspartat aminotransferaza; ALT, alanin aminotransferaza; ALP, alkalna fosfataza; LDH, laktat dehidrogenaza; LPO, lipidna peroksidacija; ROS, reaktivni kisikovi spojevi (prema JUYENA i STELLETTA, 2012.).

Sastav sjemena, napose sjemene plazme, razlikuje se ne samo među vrstama, već i među jedinkama, čak i od ejakulata do ejkulata iste jedinke. Takve su razlike važne pri ocjenjivanju kvalitete sjemena.

Važno je poznavanje kemijskog sastava sjemene plazme pri odabiru razrjeđivača, koji održava i produljuje životni vijek spermija tijekom čuvanja sjemena. Sperma sadrži 8% organske tvari i 2% mineralnih tvari što ukupno čini približno 10% suhe tvari, te približno 90% vode (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.; RODRIGUEZ-MARTINEZ i sur., 2011.). Spermiji i sjemena plazma sadrže jednostavne šećere, koji imaju značajnu funkciju u energetskom metabolizamu spermija. Koncentracija šećera ovisna je o razini testosterona i godišnjem dobu. Prema BARONOS-u (1971.) sperma nerasta sadrži 16 do 80 mg/dL ukupnih ugljikohidrata. Nekoliko je autora ustvrdilo da spermiji nerasta dobivaju energiju ne samo metaboliranjem glukoze i fruktoze, već i iz neheksoznih spojeva kao primjerice iz glicerola, piruvata, laktata, citrata (MEDRANO i sur., 2006.) te neuobičajenih heksoza, primjerice sorbitola i manoze (RODRÍGUEZ-GIL, 2013.).

Sperma nerasta sadrži 9 do 60 mg/dL fruktoze, galaktoze 4 do 20 mg/dL (GERFEN i sur., 1994.), glukoze 1 do 5 mg/dL, 300 do 400 mg/dL inozitola (BARONOS, 1971.). Enzim heksokinaza ima veći afinitet prema glukozi u odnosu na druge monosaharide. Stoga spermiji nerasta rabe glukozu brže i učinkovitije, i to najvećim djelom preko glikolitičkog puta (RODRÍGUEZ-GIL, 2013.). Inozitol osigurava osmotski tlak u sjemenoj tekućini nerasta, a luče ga sjemene vezikule, te ga u sjemenoj plazmi nerasta ima oko 2 do 3%. Sjeme nerasta sadrži vrlo velike razine sijalinske kiseline, koja se sintetizira u bulbouretralnim žlijezdama, te oko 175 mg/dL limunske kiseline, koja se sintetizira u sjemenim vezikulama (STRZEZEK i sur., 1995a.; FRUNZĂ i sur., 2008.; RODRIGUEZ-MARTINEZ i sur., 2011.). Sorbitol je također sastojak sjemene plazme, i kao inozitol spada u šećerne alkohole, a kemijska mu je građa slična fruktozi te se također sintetizira u sjemenim vezikulama. Enzim sorbitol dehidrogenaza pretvara ga u fruktozu, te se rabi kao metabolički supstrat, a u sjemenu nerasta izmjerena je količina od 6 do 18 mg/dL (KING i MANN, 1959.; JUYENA i STELLETTA, 2012.). Sjemena plazma nerasta obiluje ergotioninom (0,3 – 0,8 mmol/L), a stvara se u sjemenim vezikulama te djeluje antioksidacijski štiteći sulfhidrilne veze bjelančevina (NIKODEMUS i sur., 2011.).

Lipidi, odnosno lipidni sastav stanične membrane spermija i sjemene plazme ključni su u funkciji spermija. Lipidi se sastoje od kolesterola, fosfolipida, diacilglicerola, triacilglicerola i voštanih estera. Izvorom se lipida u sjemenoj plazmi smatraju epididimis i spermiji (PICKETT I KOMÁREK, 1966.). Lipidi u ejakulatu, a napose fosfolipidi i

kolesterol, imaju važnu funkciju u strukturi i funkciji stanične membrane spermija (CROSS, 1998.). Nadalje, imaju i značajnu funkciju u strukturi, metabolizmu i kapacitaciji spermija te oplodnji jajne stanice (JUYENA i STELLETTA, 2012.). U nedostatku supstrata za glikolizu, endogeni i egzogeni lipidi imaju značajnu funkciju u opskrbi spermija energijom za njihovu gibljivost i održivosti (SCOTT i DAWSON, 1968.; JUYENA i STELLETTA, 2012.). Postoje različite vrste fosfolipida prisutnih u sjemenoj plazmi nerasta, među kojima se lecitin (fosfatidilkolin) nalazi u najvećoj količini (FRUNZĂ i sur., 2008.; JUYENA i STELLETTA, 2012.).

Triacilgliceroli su esteri glicerola i masnih kiselina, i nastaju tako da se tri masne kiseline vežu na tri hidroksidne skupine glicerola, a pripadaju jednostavnim i neutralnim mastima. Najznačajnija je funkcija triacilglicerola u organizmu pohrana energije, ali se rabe i u sintezi drugih masti poput kolesterola. Budući su netopljivi u vodi, triacilgliceroli se vežu za jednu od dvije podskupine lipoproteina, lipoproteine vrlo male gustoće (engl. very low density lipoprotein, VLDL) ili hilomikrone (engl. chylomicrons, CM), koji im omogućuju intravaskularni transport (HEEREN i sur., 1999.).

Žlijezde muškog reproduktivnog sustave izlučuju triacilglicerol u sjemenu plazmu (VIGNON i sur., 1992.). Inkubacija humanih spermija u sjemenoj plazmi ukazuje da spermiji u aerobnim uvjetima koriste triacilglicerole za svoj metabolizam (SEBASTIAN i sur., 1987.; MONTAGNON i sur., 1990.; BEER-LJUBIĆ i sur., 2009.). ARGOV i sur. (2007.) su po prvi puta dokazali prisutnost receptora za lipoproteine vrlo male gustoće (VLDLr) na spermijima bikova, što ukazuje na mehanizam kojim spermiji koriste izvanstanične lipide (BEER-LJUBIĆ i sur., 2009.).

ABDEL AZIZ i sur. (1983.) su odredili koncentraciju fruktoze, slobodnih masnih kiselina, triacilglicerola i aktivnosti lipaze u sjemenu normospermičnih, oligospermičnih i azospermičnih muškaraca, neposredno i dva sata nakon likvefakcije ejakulata. Koncentracija fruktoze i slobodnih masnih kiselina znatno se smanjila, dok je koncentracija triacilglicerola značajno porasla, što je bilo izraženije u sjemenu normospermičnih muškaraca u odnosu na oligospermične, a u azospermičnih potpuno izostala. Autori navode da spermiji rabe fruktozu i slobodne masne kiseline za opskrbu energijom ili ih inkorporiraju u triacilglicerole.

SEBASTIAN i sur. (1987.) navode da je neplodnost povezana s povećanjem koncentracije većine podskupina neutralnih lipida u sjemenu. Spermiji oligospermičnih muškaraca imali su značajno veću koncentraciju triacilglicerola u odnosu na normalne spermije, dok je značajno veća koncentracija triacilglicerola nađena u sjemenoj plazmi

azoospermičnih muškarca u odnosu na plodne muškarce. Utvrđena je i negativna korelacija između koncentracije neutralnih lipida u ejakulatu i plodnosti.

KULKA i sur. (1984.) nisu ustvrili značajnu razliku u koncentraciji triacilglicerola u spermijima i sjemenoj plazmi među skupinama normospermičnih, oligospermičnih, azospermičnih, teratospermičnih i astenospermičnih muškaraca.

U svojem su istraživanju ÇEVIK i sur. (2007.) ustvrdili značajnu razliku u koncentraciji triacilglicerola u sjemenoj plazmi među skupinama bikova pasmine smeđe švicarsko govedo. Koncentracija triacilglicerola bila je značajno veća u skupini normospermičnih bikova u odnosu na skupinu bikova sa oligospermijom.

Sveukupna su istraživanja o funkciji triacilglicerida u muškoj plodnosti oskudna u odnosu na fosfolipide, a napose kolesterol. Novija su istraživanja usmjerena prema analizi masnokiselinskog sastava pojedinih lipida spermija i sjemene plazme u humanoj i animalnoj andrologiji.

Fosfolipidi su važna skupina spojeva koja izgrađuje staničnu membranu te pripadaju u strukturne i složene lipide. Građeni su slično kao i triacilgliceroli, od glicerola i masnih kiselina, koje su vezane za hidroksilne skupine, a umjesto treće masne kiseline, na treću je hidroksilnu skupinu vezan fosfat na kojeg se pak veže neka organska skupina (npr. kolin u slučaju lecitina).

Glatka endoplazmatska mrežica zajedno s Golgijevim aparatom sintetizira sve membranske lipide, posebice fosfolipide i kolesterol. Sinteza navedenih spojeva zbiva se uz citosolnu površinu njihove membrane. Procesi sinteze fosfolipida i sterola uključuju mitohondrije i peroksisome (FAGONE i JACKOWSKI, 2009.). Fosfolipide izlučuju epididimisi i prostata (VIGNON i sur., 1992.).

Fosfolipidi izgrađuju membrane stanica, pa tako i spermija te su najzastupljeniji lipidi u sjemenoj plazmi kao i u spermijima nerasta (KOMAREK i sur., 1965.; ROOKE i sur., 2001.). Polovica je fosfolipida u sjemenoj plazmi „slobodna“, dok je druga polovica vezana za lipoproteine. Odnos kolesterola i fosfolipida važan je pokazatelj kapacitacijsko-dekapacitacijskih procesa (MONTAGNON i sur., 1990.).

Spermiji mogu koristiti fosfolipide u proizvodnji energije u odsustvu topljivih ugljikohidrata (SCOTT i DAWSON, 1968.; JUYENA i STELLETTA, 2012.). Štoviše, spermiji, u određenim uvjetima, mogu izmjenjivati lipide iz izvanstaničnog okoliša (VASQUEZ i ROLDAN, 1997.; CEROLINI i sur., 2001.). Lizofosfolipidi su skupina jednostavnih fosfolipida, koji su uključeni u biosintezu stanične membrane, a imaju funkciju i u akrosomalnoj egzocitozi (ROLDAN, 1998.; CEROLINI i sur., 2001.).

U sjemenoj je plazmi azoospermičnih i oligospermičnih muškaraca smanjena koncentracija ukupnih fosfolipida, kao i u spermijima oligospermičnih muškaraca. Nađena je pozitivna korelacija između koncentracije fosfolipida u sjemenoj plazmi i broja spermija, odnosno plodnosti u muškaraca (SEBASTIAN i sur., 1987.).

HUACUJA i sur. (1981.) navode nižu koncentraciju fosfolipida u sjemenoj plazmi azoospermičnih muškaraca u odnosu na muškarce sa plodnom spermom. Nadalje su ustvrdili izmjenu kolesterola i fosfolipida između spermija i sjemene plazme, sa značajnom korelacijom u sastavu lipida u sjemenoj plazmi s onom u spermija.

Među skupinama nerasta s lošom i dobrom gibljivošću spermija nađena je statistički značajnih razlika u koncentraciji ukupnih lipida, fosfolipida i kolesterola. Koncentracije ukupnih lipida, kolesterola i fosfolipida pozitivno su korelirale sa gibljivošću i održivošću spermija, udjelom spermija normalne morfologije i stanične membrane (AM-IN i sur., 2011.).

Kolesterol je jednostavni lipid iz skupine steroida. Steroidi su esteri masnih kiselina i sterolskih alkohola, a građeni su od četiri međusobno povezana ugljikova prstena te postranog lanca građenog od osam ugljikovih atoma. Jetra sintetizira veći dio kolesterola, ali organi poput testisa, jajnika i nadbubrežne žiljezde mogu također sintetizirati kolesterol, dok se jedan dio kolesterola unosi hranom (SHARPE i sur., 2006.). Budući da je netopljiv u vodi, kolesterol se veže za bjelančevine u serumu i sjemenoj plazmi tvoreći tako lipoproteine, lipoproteine vrlo male gustoće, lipoproteine male gustoće (engl. low density lipoprotein, LDL) ili lipoproteine velike gustoće (engl. high density lipoprotein, HDL), koji im omogućuju transport (BEER-LJUBIĆ i sur., 2009.).

Kolesterol je glavni sterol u ejakuliranom sjemenu sisavaca te se prvenstveno nalazi u staničnoj membrani. Velika se količina kolesterola sintetizira u epididimisima, odakle se tijekom sazrijevanja spermija transportira u stanične membrane (JACYNO i sur., 2009.). Stanična se membrana spermija različitih vrsta životinja odlikuje različitim udjelom kolesterola, koji je najzastupljeniji sterol u spermijima svih istraživanih vrsta. No, stanična membrana spermija nerasta ima mnogo manje kolesterola u usporedbi s drugim vrstama. Omjer između kolesterola i fosfolipida u staničnoj membrani spermija nerasta najniži je i iznosi 0,20 (PARKS i LYNCH, 1992.; CROSS, 1998.), što je uzrok izrazite osjetljivosti spermija na osmotske promjene i promjene niskih temperatura (JACYNO i sur., 2009.). Pozitivne su korelacije nađene između omjera kolesterola i fosfolipida te postotka živih i normalnih spermija dva sata nakon odmrzavanja ejakulata nerasta. Kolesterol regulira fluidnost stanične membrane, tijekom sazrijevanja spermija u epididimisu, te tijekom kapacitacije i akrosomske reakcije u ženskom spolnom sustavu (JACYNO i sur., 2009.).

Tijekom procesa kapacitacije „napušta“ staničnu membranu spermija i veže se za bjelančevine u sjemenoj plazmi i bjelančevine u ženskom spolnom sustavu (BEER-LJUBIĆ i sur., 2009.). Ključan je i u mehanizmu semipermeabilnosti stanične membrane (CROSS, 1998.). Kolesterol je prekursor za nekoliko važnih steroidnih hormona, koje luče kora nadbubrežne žlijezde, jajnici i testisi. WISE i sur. (1993.) su utvrdili pozitivnu korelaciju između koncentracije kolesterola i testosterona u krvnom serumu nerasta. Testosteron stimulira rast i razvoj spolnih organa, kao i spermatogenezu i spolnu aktivnost. Ejakulirani spermiji iz sjemene plazme dobivaju dodatni kolesterola (CROSS, 1998.; JACYNO i sur., 2009.).

Sjemena plazma nerasta sadrži relativno male količine kolesterola (KOMMISRUD i sur., 2002.; JACYNO i sur., 2009.). Koncentracija kolesterola u sjemenoj plazmi muškaraca iznosi 25 mg/dL (CROSS, 1996.), što je nekoliko puta više u odnosu na neraste u istraživanju kojeg su proveli JACYNO i sur. (2009.). Slične su rezultate dobili i DIACONESCU i sur. (2014.) koji su ustvrdili slične koncentracije kolesterola u sjemenoj plazmi bikova i muškaraca, dok je u nerasta koncentracija bila desetak puta niža. Kolesterol u sjemenoj plazmi muškaraca inhibira preuranjenu akrosomsku reakciju te pospješuje preživljavanje spermija (CROSS, 1996.). Prostata izlučuje kolesterol u sjemenu plazmu, koji potom štiti spermije od možebitnih štetnih okolišnih čimbenika (VIGNON i sur., 1992.). Stanične membrane spermija nerasta koje sadrže veću količinu kolesterola otpornije su na osmotski „šok“ (JACYNO i sur., 2009.). U istraživanju kojeg su sproveli JACYNO i sur. (2009.) koncentracija je kolesterola u sjemenoj plazmi nerasta pozitivno korelirala sa gibljivošću, koncentracijom i ukupnim brojem spermija, dok je negativno korelirala sa udjelom morfološki promijenjenih spermija.

Rezultati AL-JANABI i sur. (2012.) imali su značajnu pozitivnu korelaciju između koncentracije kolesterola u ejakulatu i koncentracije spermija. Dobiveni su rezultati u skladu sa rezultatima HUACUJA i sur. (1981.) koji su ustvrili izmjenu kolesterola i fosfolipida između spermija i sjemene plazme sa značajnom korelacijom u sastavu lipida u sjemenoj plazmi s onom u spermija. Nadalje su u azosteničnih muškarca ustvrdili najnižu koncentraciju kolesterola i fosfolipida u sjemenoj plazmi, dok se koncentracija kolesterola među oligospermičnim, astenospermičnim i normospermičnim muškarcima nije razlikovala.

U svojem istraživanju ÇEVIK i sur. (2007.) su ustvrdili značajnu razliku u koncentraciji kolesterola u sjemenoj plazmi među skupinama bikova pasmine smeđe švicarsko govedo. Tako je koncentracija kolesterola bila značajno veća u skupini normospermičnih bikova u odnosu na skupinu bikova sa oligospermijom. BEER-LJUBIĆ i

sur. (2009.) su ustvrdili da je koncentracija ukupnog kolesterola u sjemenoj plazmi mladih bikova simentalske pasmine bila značajno veća u proljeće u usporedbi s onom u ljetnom razoblju, dok je u starijih bikova bila značajno veća u zimskim razoblju u usporedbi s onom u jesen. Uočene su promjene, u koncentraciji kolesterola u sjemenoj plazmi, povezane sa potrošnjom izvanstaničnih lipida u metabolizmu spermija te su zaključili da je mjerenje koncentracije kolesterola u sjemenoj plazmi bikova možebitni biokemijski pokazatelj kvalitete sperme.

GÜNDOĞAN (2006.) navodi da se u ovnova smanjuje koncentracija kolesterola i ukupnih lipida u sjemenoj plazmi u ljeto, te gibljivost i koncentracija spermija u istom razdoblju.

U sjemenoj je plazmi azoospermičnih i oligospermičnih muškaraca utvrđena veća koncentracija ukupnog kolesterola u sjemenoj plazmi u odnosu na plodne muškarce (SEBASTIAN i sur., 1987.), dok MESEGUER i sur. (2004.) nisu ustvrdili razliku u koncentraciji kolesterola u sjemenoj plazmi među neplodnim i plodnim muškarcima.

Bjelančevine su važne za funkciju spermija i odnose se na interakciju spermija u različitim okruženjima duž ženskog spolnog sustava prema jajnoj stanici. Specifični peptidi i proteini djeluju kao signali za moduliranje imunosnog sustava ženki u netoleranciji ili toleranciji antigena sperme, možda čak utječu i na relativnu plodnost mužjaka i/ili para uspostavljanjem stanja majčinske tolerancije prema embriju.

Bjelančevine u sjemenoj plazmi imaju nekoliko značajnih funkcija koje prethode oplodnji, kao što su regulacija kapacitacije i akrosomske reakcije, uspostava spremnika spermija u jajovodu, modulacija imunosnog odgovora sluznice maternice te transportu spermija unutar ženskog spolnog sustava, nadalje bjelančevine sudjeluju i u interakciji i fuziji gameta (KOZIOROWSKA-GILUN i sur., 2011a.; RODRIÍGUEZ-MARTÍNEZ i sur., 2011.).

Do sada istražene bjelančevine imaju mnoštvo funkcija (od proizvodnje energije do staničnog prepoznavanja, itd.), no samo ih je nekoliko povezano sa (ne)plodnošću. Koncentracija bjelančevina u spermi manja je od one u krvnoj plazmi te je stoga prosječna količina bjelančevina od 30 do 60 g/L (RODRIGUEZ-MARTINEZ i sur., 2011.). DIACONESCU i sur. (2014.) navode da je koncentracija bjelančevina veća u sjemenoj plazmi bikova nego u sjemenoj plazmi nerasta.

Sjemene vrećice u nerasta izlučuju većinu bjelančevina u sjemenu tekućinu (STRZEŻEK, 2002.) te imaju funkciju u očuvanju stanične membrane spermija.

KOZIOROWSKA-GILUN i sur. (2011a.) su dokazali da je koncentracija bjelančevina u sjemenoj plazmi nerasta pod utjecajem godišnjeg doba. Najveća je koncentracija

bjelančevina u sjemenoj plazmi nerasta izmjerena tijekom razdoblja jeseni i zime, uslijed zaštite u očuvanju cjelovitosti stanične membrane spermija, koja je nužna u održavanju funkcije spermija. Sukladno s rečenim, sperma nerasta prikupljena u jesen ima bolja svojstva od one prikupljene u ljetnom razoblju. Nadalje, nađena je velika korelacija između ukupne koncentracije bjelančevina i antioksidativnih svojstava sjemene plazme (STRZEZEK i sur., 1999.; KOZIOROWSKA-GILUN i sur., 2011a.). GÜNDOĞAN (2006.) navodi da se u ovnova smanjuje koncentracija bjelančevina u sjemenoj plazmi u proljeće i ljeto, što bi se moglo pripisati slabijoj održivosti spermija, što potvrđuje da bjelančevine sjemene plazme imaju značajnu funkciju u očuvanju stabilnosti stanične membrane spermija.

AL-JANABI i sur. (2012.) su izvjestili da nisu pronašli korelaciju između koncentracije bjelančevina i istraživanih biokemijskih pokazatelja u sjemenoj plazmi, kao ni s progresivnom gibljivošću spermija.

ČEŘOVSKÝ i sur. (2007.) kvalitativno su identificirali i kvantitativno odredili količinu aminokiselina u spermi nerasta. Glutaminska je kiselina zastupljena u najvećoj količini, zatim slijedi glicin, pa taurin. Autori su istovremeno ustvrdili negativnu korelaciju između udjela morfološki abnormalnih spermija i koncentracije slobodnih aminokiselina u sjemenoj plazmi nerasta.

Neraste karakterizira izlučivanje velike količine estrogena sintetiziranog u testisima, koji se izlučuju u sjemenu plazmu. U nerasta estrogen ima važnu funkciju u regulaciji razvoja i funkcije testisa (ZDUŃCZYK i sur., 2011.). U spermi je velika koncentracija androgenih i estrogenih hormona te mnoštvo enzima primjerice katalaza, fosfataza, mucinaza, hijaluronidaza, tripsin, amilaza, lipaza i kolinesteraza (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.).

Kisela fosfataza (engl. acid phosphatase, ACP) je skupina enzima koji nespecifično kataliziraju hidrolizu ortofosfatnih monoestera u kiselom mediju. Funkcija kisele fosfataze je u proizvodnji, transportu i recikliranju fosfata, što je ključno za metaboličke i energetske transdukcijske procese stanica. U sjemenoj plazmi nerasta ACP se nalazi u četiri molekularna oblika podrijetlom iz sjemenih vrećica, epididimisa i prostate. Aktivnost je ACP-a podrijetlom iz epididimisa najzastupljenija i iznosi oko 90% ukupne aktivnosti u sjemenoj plazmi nerasta (WYSOCKI i STRZEZEK, 2003.). U pasa i čovjeka je najzastupljenija ACP iz prostate, a povišene vrijednosti u krvi ukazuju na benigne hiperplazije ili razvoj karcinoma. ACP je u sjemenoj plazmi uključena u kapacitaciju spermija, akrosomsku reakciju (SALZBERGER i sur., 1992.), hiperaktivaciju i vezanje za *zona pellucidu*/oplodnju jajne stanice (URNER i SAKKAS, 2003.; WYSOCKI i STRZEZEK, 2003.; STASIAK i sur., 2010.). ACP iz epididimisa je uključena u post testikularne procese sazrijevanja spermija (WYSOCKI i

STRZEZEK, 2006.), tj. u fosforilacijsko-defosforilacijske procese, koji su povezani sa sazrijevanjem spermija u epididimisu. SOUCEK i VARY (1984.) kao i još neki autori ustvrdili su da su kisela i alkalna fosfataza sastavni dijelove stanične membrane spermija te da je ACP nađena i u izvanjskoj akrosomalnoj membrani spermija.

Alkalna fosfataza je (engl. alkaline phosphatases, ALP) defosforilirajući enzim aktivan u mnogim tkivima: kostima, bubrezima, jetri, plućima, crijevima, placenti te sjemenoj plazmi i membrani spermija mužjaka različitih vrsta životinja te čovjeka, a katalizira hidrolizu fosfatnih skupina u nizu različitih supstrata. Podrijetlo ALP u sjemenoj plazmi ovisi o životinjskoj vrsti. U nerasta i pasa se veći dio ALP-a sintetizira u epididimisu (cauda), a akcesorne spolne žlijezde i testis stvaraju zanemarivu količinu tog enzima (EINARSSON i sur., 1976.; BUCCI i sur., 2014.). U bikova su pak sjemene vrećice najznačajniji izvor ALP-a, a u kunića testisi, epididimisi, *vas deferens* i ampula sjemenovoda podjednako sintetiziraju veliku količinu enzima, dok su pak u konja najveće vrijednosti nađene u testisima i epididimisima, dok su u muškaraca najveće vrijednosti u prostati (TURNER i McDONNELL, 2003.; BUCCI i sur., 2014.). Najviše razine aktivnosti ALP nalaze se u sjemenoj plazmi nerasta, a najniže u muškaraca (BELL i LAKE, 1962.). Izuzev u sjemenoj plazmi, ALP sastavni je dio stanične membrane spermija (SOUCEK i VARY, 1984.), te je povezana s citoplazmatskom kapljicom (MONIEM i GLOVER, 1972.; GLOGOWSKI i sur., 2002.). ALP iz sjemena može hidrolizirati fosfatne estere raznih mononukleotida, šećera, glicerofosfata i piridoksal-fosfata, kao i adenozin trifosfata (ATP) (GLOGOWSKI i sur., 2002.).

Epididimis je u nerasta glavni organ u sintezi alkalne fosfataze, te je aktivnost ovog enzima također određena u citoplazmatskoj (protoplazmatskoj) kapljici spermija, što upućuje na njegovu povezanost s metabolizmom glikogena u epitelu epididimisa, čime se dospjeli spermiji opskrbljuju energijom. ALP sudjeluje i u proizvodnji slobodne fruktoze u ejakulatu, koja nakon fruktolize osigurava energiju neophodnu za gibljivost spermija (STASIAK i sur., 2010.).

Neke su studije pokazale korelaciju između aktivnosti enzima i koncentracije spermija povezane sa plodnošću bikova (STALLCUP, 1965.) i pastuha (TURNER i MCDONNELL, 2003.; PESCH i sur., 2006.; BUCCI i sur., 2014.).

ALP ima važnu funkciju u kapacitaciji spermija. Velike su vrijednosti ALP aktivnosti nađene u sjemenoj plazmi (napose u frakciji ejakulata bogatog spermijima), a vjerojatno su odgovorne za održavanje spermija u stanju anabioze te u sprečavanju prijevremene kapacitacije, koja bi mogla oslabiti sposobnost oplođivanja. Istraživanja su potvrdila da sjemena plazma sadrži čimbenike koji inhibiraju kapacitaciju spermija (VADNAIS i

ROBERTS, 2007.; BUCCI i sur., 2014.). Tijekom prolaska kroz ženski spolni sustav spermiji sa svojih površina gube bjelančevine sjemene plazme, kao i druge čimbenike koji ih oblažu i koji su odgovorni za dekapacitaciju. Potom prolaze kroz proces kapacitacije i stječu oplodnu sposobnost (BRÜSSOW i sur., 2008.). BUCCI i sur. (2014.) ustvrdili su da ALP doprinosi stabilizaciji membrane spermija, a mogla bi imati i funkciju u metabolizmu ATP-a, kao i Ca^{2+} preko transporta Ca^{2+} - ATP-aze.

Aktivnosti se enzima poput γ-glutamil-transferaze i ALP odnose na kakvoću sjemena i funkciju membrana te sudjeluju u različitim metaboličkim procesima tijekom dozrijevanja spermija (KUMAR i sur., 2000.; SELIGMAN i sur., 2005.; BUCCI i sur., 2014.). CLEMENTS i sur. (2010.) opisuju malu aktivnost ALP u nerastu s azoospermijom.

Gama-glutamil transferaza (engl. Gamma glutamyl transferase, GGT) je enzim prisutan u membranama stanica mnogih tkiva, uključujući bubrege, žučovode, gušteraču, žučni mjehur, slezenu, mozak, srce i sjemene vezikule (GOLDBERG, 1980.). Najveća je aktivnost GGT-a u tkivima s funkcijom transporta, primjerice bubrezi i žučni sustav, što je dovelo do zaključka da je GGT uključen u prijenos aminokiselina kroz staničnu membranu preko slijeda reakcija koje čine "gama-glutamilski ciklus" (WHITFIELD, 2001.). Također je uključen i u metabolizam glutationa u prijenosu gama-glutamil funkcionalne skupine na različite akceptore molekula (vodu, L-aminokiseline ili peptide), oslobađajući cistein kao proizvod za očuvanje unutarstanične homeostaze oksidacijskog stresa (WHITFIELD, 2001.; YOKOYAMA, 2007.). GGT ima važnu funkciju u održavanju unutarstaničnog cisteina i glutationa.

Određivanje aktivnosti gama-glutamil transferazae u serumu često se rabi kao pokazatelj disfunkcije jetre i unosa alkohola. U posljednjih nekoliko godina postignut je napredak u tom području, kao i napredak u razumijevanju njegove fiziološke funkcije u suzbijanju oksidaciskog stresa. GGT čini ključni dio cikličkog procesa u kojem razlaže izvanstanični glutation na staničnoj membrani i to na aminokiseline od kojih je građen, a potom ih unosi unutar stanice, gdje se rabe u sintezi unutarstaničnog glutationa. Stanja koja dovode do povećanja serumskog GGT-a, primjerice opstruktivne bolesti jetre, konzumacija alkohola u velikim količinama, te uporaba lijekova koji induciraju enzime, dovode do povećanja slobodnih radikala i opasnosti od iscrpljivanja glutationa. No i produkti nastali u GGT reakciji mogu dovesti do povećane proizvodnje slobodnih radikala, napose u prisutnosti željeza. Osobe s velikim vrijednostima GGT-a u serumu imaju veliki rizik od koronarnih bolesti srca, dijabetesa tipa 2 i mozgovnog udara te veću smrtnost (WHITFIELD, 2001).

U domaćih je životinja GGT uglavnom prisutna u bubrezima, gušterači i crijevima, a njezina je aktivnost u jetri relativno velika u krava, konja, ovaca i koza, a vrlo mala u pasa, mačaka i ptica. Uporaba referentnih vrijednosti može pomoći u interpretaciji varijacija GGT-a u serumu, uglavnom u hepatobilijarnih bolesti goveda, ovaca, koza te kolestatskih poremećaja u pasa. Mjerenje je GGT-a u mokraći dobar pokazatelj toksičnog bubrežnog oštećenja (BRAUN i sur., 1983.).

SELIGMAN i sur. (2005.) su dokazali da je GGT aktivno uključen u proces razgradnje glutationa u cistein, a koja je najintezivnija u glavi epididimidisa. GGT je enzim važan u reprodukciji mužjaka, obilno ga se nalazi u tkivima epididimisa (AGRAWAL i VANHA-PERTTULA, 1988.), a njegova je prisutnost presudna za mušku plodnost (KUMAR i sur., 2000.). Poznato je da u epididimisu ima nekoliko izoformi GGT-a, te da su podložne utjecaju testosterona (PALLADINO i HINTON, 1994.). Iako autori navode da je enzim lokaliziran u epitelu epididimisa, ustvrđeno je da i u tekućini epididimisa postoji slobodni oblik GGT-a, kojega je aktivnost 200 do 500 puta veća u sjemenu nego u serumu (SELIGMAN i sur., 2005.).

Mužjaci miševa, koji nemaju GGT (GGT deficijentni) imaju značajno manje testise, sjemene vezikule i epididimise, te oligospermiju ili azoospermiju. Osim toga spermiji su nepokretni i neplodni. Rezultati ukazuju da sam GGT nije neophodan za normalnu reproduktivnu funkciju, već je potreban za primjerene razine unutarstaničnog glutationa (GSH) i cisteina, kojih regulira GGT (KUMAR i sur., 2000.).

GGT je esencijalni enzim u zaštiti spermija od oksidacijskog stresa (SIKKA, 1996.). GGT je prisutna u području akrosome i središnjem dijelu spermija pojedinih vrsta sisavaca (primjerice nerasta) te može dodatno utjecati na udio GSH u oociti u trenutku penetracije spermija (FUNAHASHI i sur., 1996.). Obzirom na veliki broj mitohondrija u spermiju, ovi su antioksidativni mehanizmi važni u održavanju gibljivosti spermija, brzine hiperaktivacije i održanja tijekom skladištenja (IRVINE, 1996.; STEFANOV i sur., 2013.).

Rezultati su pokazali da tijekom skladištenja sperme na 15 ºC tijekom 72 sata, dolazi do smanjenja spermija s progresivnom gibljivošću te da je to svojstvo bilo u korelaciji sa smanjenjem aktivnosti laktat dehidrogenaze (LDH) i GGT. Analiza biokemijskih pokazatelja mogla bi pružiti dodatne informacije o reproduktivnom zdravlju i plodnosti u nerasta (STEFANOV i sur., 2013.).

LÓPEZ RODRÍGUEZ i sur. (2013.) su dokazali umjerenu negativnu korelaciju između aktivnosti GGT-a i ALP-a sa volumenom ejakulata, umjereno pozitivnu korelaciju s

progresivnom gibljivošću spermija te značajno pozitivnu korelaciju s koncentracijom spermija u ejakulatu nerasta.

PESCH i sur. (2006.) su pronašli značajnu povezanost između volumena sjemena i koncentracije spermija s enzimima AST, GGT, ALP, ACP i LDH te ionima Fe i Zn u sjemenu pastuha. Značajna korelacija između GGT-a i gibljivosti spermija može ukazivati na njegovu funkciju u zaštiti stanica od slobodnih radikala kisika (ROS).

Laktat dehidrogenaza (engl. lactate dehydrogenase, LDH) je skupina enzima uključenih u završni dio glikolize, a kataliziraju reakciju pretvorbe piruvata u laktat i obrnuto preko Cori ciklusa uz prelazak koenzima NADH u NAD^+, te dehidrogenaciju 2-hidroksibutirata. LDH se nalazi u sisavaca i ptica u tri izoforme, i to izoenzimi: A4, B4 te C4 (X) (LI i sur., 1983.). LDHA je najaktivniji izoenzim u skeletnom mišićju, gdje se uslijed nedostatka kisika zbivaju glikolitički procesi, kako bi se zadovoljile metaboličke potrebe. Pri tome je LDHB najprisutniji u srčanom mišiću, koji je pak ovisan o aerobnim metaboličkim procesima. LDHC je prisutan u testisima odnosno spermatocitama, spermatidama i spermijima, ali je također nađen u maloj količini u jajnim stanicama (ODET i sur., 2008.). LDH je enzim koji se uglavnom nalazi unutar stanica (u citoplazmi), osim izoenzima LDHC koji je lokaliziran i u unutrašnjosti mitohondrija (BLANCO i sur., 1976.). U serumu se određuju aktivnosti enzima i izoenzima LDH pacijenata tijekom dijagnostike, praćenja i liječenja bolesti iz sljedećih područja: kardiologije, hepatologije, hematologije i onkologije (HUIJGEN i sur., 1997.). Dijagnostički je važan pokazatelj infarkta miokarda kao i njegove prognoze, zatim u mišićnih bolesti, naročito distrofije. Najveće značenje određivanja aktivnosti LDH ima u bolestima jetre, a u nekim slučajevima može poslužiti kao tumorski biljeg.

Postoje brojni enzimi aktivni u spermi, no neki pak imaju važnu funkciju u procesima u kojima se stvara energija, a neki od njih su LDH te sorbitol dehidrogenaza (DIACONESCU i sur., 2014.).

Rezultati istraživanja MERANO i sur. (2006.) ukazuju da spermiji nerasta učinkovito metaboliziraju citrat i laktat kroz metabolički put koji je reguliran LDH-om kako bi se dobila dovoljna energija za održavanje, pa čak i povećanje cjelokupne funkcije spermija nerasta.

ODET i sur. (2008.) su ustvrdili da uklanjanjem *Ldhc* gena u miševa dolazi do nemogućnosti hiperaktivacije spermija, nemogućnosti njihova prodora u zonu pellucidu *in vitro*, te nemogućnosti provođenja procesa fosforilacije, koja je karakteristična za kapacitaciju spermija. Rezultati ukazuju da enzim LDHC ima značajnu funkciju u održavanju procesa

glikolize i proizvodnje ATP u biču spermija (*flagellum*), koji su potrebni za plodnost mužjaka i funkcije spermija.

Enzimi aspartat aminotransferaza (engl. aspartate aminotransferase, AST) i LDH-a su citoplazmatski enzimi, a nalaze se u glavi i središnjem dijelu spermija. Oslobađanje tih enzima iz stanice više se odražava na integritet stanične membrane spermija nego na kapacitet oplođivanja spermija (MOORE i sur., 1976.).

U više se istraživanja navodi da LDH ima važnu metaboličku funkciju u kapacitaciji spermija i oplodnji. U istraživanju ASADPOUR-a (2012.) su ustvrđene značajne korelacije između razine LDH i preživljavanja spermija, tako da je povećanje postotka živih i normalnih spermija u korelaciji s povećanjem LDH aktivnosti u sjemenoj plazmi. DUAN i GOLDBERG (2003.) su ustvrdili da izoenzim LDHC4 ima značajnu metaboličku funkciju u kapacitaciji spermija i oplodnji. Nadalje, budući je LDH unutarstanični enzim i povećanje njegove razine u sjemenoj plazmi, može biti pokazatelj integriteta stanične membrane spermija (DUAN i GOLDBERG, 2003.; ASADPOUR, 2012.).

Enzimi ALP, AST i LDH su nužni za metaboličke procese koji osiguravaju energiju za preživljavanje, gibljivost i plodnost spermija. PESCH i sur. (2006.) su ustvrdili korelaciju između LDH-a i gibljivosti, progresivne gibljivosti i živih spermija, što može ukazivati na to da izvanstanični LDH osigurava metabolizam spermija. Suprotno tome, DOGAN i sur. (2009.) su pronašli negativnu korelaciju između volumena ejakulata i LDH, AST te ALP u sjemenoj plazmi arapskih konja.

PONCE i sur. (2001.) su još jednom dokazali da izloženost stalnoj svjetlosti tijekom duljeg vremenskog razdoblja ima loš utjecaj na uspješnost oplodnje, vjerojatno uslijed smanjene kontraktibilnosti epididimisa. Stalna izloženost svijetlosti sprječava izlučivanje i sintezu melatonina, a kontraktilnost epididimisa uvjetovana je melatoninom. Usporen prolaz gameta kroz epididimis će rezultirati smanjenjem aktivnosti LDH-a spermija, vjerojatno uslijed starenja spermija u kanalu epididimisa. Radi značajnog smanjenja aktivnosti specifičnog izoenzima spermija LDHC4, i to onoga iz glave i repa epididimisa, ukazuje na promjene u fertilizacijskoj sposobnosti spermija, koje još treba razjasniti.

Kreatin kinaza (engl. creatine kinase, CK) je enzim eksprimiran u različitim stanica tkiva, kojima je potrebna velika količina energije. CK katalizira reverzibilnu pretvorbu kreatina (Cr), uz utrošak ATP, za stvaranje fosfokreatina (PCr) i adenozin difosfata (ADP), i time čini spremnik energije odmah dostupnim u stanici. CK je ključni enzim za staničnu energetiku, a predstavlja sustav enzima s nekoliko izoenzima, koji su različito razmješteni, napose na onim mjestima gdje se energija stvara i/ili troši. Eksperimentalni podaci ukazuju na

to da se CK nalazi u neposrednoj blizini mjesta na kojima su intezivni procesi, npr. ionski transport kroz membranu uz pomoć ionskih crpki te na drugim mjestima gdje se zbivaju ATP ovisni procesi. CK/PCr sustav čine zajednički kompleks te imaju više značajnih funkcija u staničnoj energetskoj homeostazi (WALLIMANN i sur., 1992.). CK je citosolni dimerni enzim, koji se pojavljuje u tri izoforme: „mišićni tip“ CK-MM, „moždani tip“ CK-BB i „hibridni tip“ CK-MB, dok u mitohondriju postoje dva izoenzima CK-Mi. CK-BB izoenzim je najrasprostranjeniji te je prisutan u mnogim tkivima: mozgu, srcu, glatkim mišićima, živčanom sustavu i drugim tkivima (WALLIMANN i sur., 1992.; TEIXEIRA i BORGES, 2012.). Određivanje CK enzima ima najveće dijagnostičko značenje u postavljanju dijagnoze mišićnih bolesti i ustvrđivanju infarkta miokarda (CK-MB).

KAVANAGH i DARBY (1983.) su u svojem istraživanju ustvrdili da je podrijetlo CK u sjemenoj plazmi djelom iz prostate, ali i iz drugih akcesornih spolnih žlijezda.

CK se ne nalazi samo u mišićnim stanicama već je prisutan u spermijima, fotoreceptorskim stanicama mrežnice, stanicama mozga, bubrega, znojnim žlijezdama, stanicama miometrija, posteljice, gušterače, timusa, štitnjače, četkastom porubu crijevnih epitelnih stanica, endotelnim stanicama, stanicama hrskavice i kostiju, makrofagima, trombocitima, stanicama tumora i karcinoma (WALLIMANN i sur., 1992.; WALLIMANN i HEMMER, 1994.), koje se odlikuju promjenjivim zahtjevima za energijom, što ukazuje na funkciju CK/PCr sustava u puferiranju i transportu energije. WALLIMAN i sur. (1986.), su ustvrdili prisutnost velikih količina CK (CK-BB i CK-Mi) i ukupnog kreatina u spermijima te PCr i Cr u sjemenoj plazmi (LEE i sur., 1988.; TEIXEIRA i BORGES, 2012.). CK-BB je izoenzim lokaliziran u repu spermija i sjemenoj plazmi muškaraca, dok je CK-Mi izoenzim prisutan u središnjem dijelu spermija u mitohondrijima koji njima obiluju (WALLIMAN i sur., 1986.; WALLIMANN i sur., 1992.). MIYAJI i sur. (2001.) su ustvrdili CK-BB izoenzim u sjemenoj plazmi muškaraca, dok su u spermijima pronašli mitohondrijski CK-Mi te citosolni CK-MM izoenzim, ali ne i CK-BB izoformu. Poznato je da se CK nalazi u sjemenoj plazmi, gdje katalizira regeneraciju ATP-a nužnu za površinsku fosforilaciju spermija (LEE i sur., 1988.; TEIXEIRA i BORGES, 2012.).

Utvrđeno je da je razina kreatin kinaze u ljudskoj spermi objektivan biokemijski biljeg za zrelost spermija i oplodni potencijal (HUSZAR i VIGUE, 1993.; HALLAK i sur., 2001.). U uzorcima ejakulata sa smanjenom koncentracijom spermija (obično s većom učestalošću nezrelih spermija), CK aktivnost je bila 10 do 20 puta veća od one u normospermičnim ejakulatima (HUSZAR i sur., 1988a.; HUSZAR i sur., 1988b.). Imunocitokemijska istraživanja CK pojedinog spermija ukazuju da su povećane koncentracije CK odraz zaostale

citoplazme spermija koja nije bila „izbačena“ tijekom kasne spermiogeneze (HUSZAR i VIGUE, 1993.; HALLAK i sur., 2001.). Nadalje, zbivaju se promjene u biosintezi CK izoenzima istodobno sa citoplazmatskim gubitkom i služi kao pokazatelj zrelosti spermija (HUSZAR i VIGUE, 1990.). U nezrelih spermija s viškom citoplazme, prevladava CK-BB izoenzim, dok u normalno razvijenim spermijima prevladava izoenzim CK-MM (HUSZAR i VIGUE, 1990.; HUSZAR i sur., 1997.; ALANI i sur., 2009.).

Nezreli spermiji s povećanom količinom citoplazme imaju veću količinu CK enzima i ne vežu se za jajnu stanicu (HUSZAR i sur., 1994.), a imaju i veći stupanj lipidne peroksidacije (HUSZAR i VIGUE, 1994.). Ove razlike ukazuju da se gubitak citoplazme i promjene CK-BB u CK-MM izoenzim zbivaju istodobno, uz remodeliranje stanične membrane spermija, a uključuje i razvitak receptora za prepoznavanje oocita i promjene u strukturi lipida (HUSZAR i sur., 1997.).

Brojne su neovisne studije pokazale da je funkcionalna manjkavost spermija povezana s povišenim razinama određenih enzima, kao što su CK, LDH i glukoza-6-fosfat dehidrogenaza te manjkavosti u spermiogenezi, koja dovodi do otpuštanja nezrelih spermija iz germinativnog epitela (HALLAK i sur., 2001.).

HALLAK i sur. (2001.) su ustvrdili da je aktivnost CK u spermijima značajno viša u tri skupine neplodnih muškaraca u odnosu na skupinu zdravih donora. Aktivnost CK negativno je korelirala s koncentracijom spermija, ukupnim brojem spermija, progresivnom gibljivosti te spermijima normalne morfologije, a pozitivno korelirala s postotkom spermija s abnormalnim oblikom repa. Povišene razine CK u spermijima su povezane s jakom oligospermijom, bez obzira na dijagnozu. Identifikacija muškaraca sa smanjenim oplodnim potencijalom i/ili neplodnosti, bez obzira na koncentraciju spermija, može biti važan čimbenik u obradi parova. CK može biti osjetljiv pokazatelj kvalitete i zrelosti spermija u praćenju liječenih bolesnika (HALLAK i sur., 2001.).

Korelacija između aktivnosti CK i koncentracije malondialdehida (MDA) pokazuje da je povećana razina lipidne peroksidacije povezana sa nepotpunom zrelošću spermija, koja je češće urođena nego stečena mana spermija (HUSZAR i VIGUE, 1994.).

ALANI i sur. (2009.) su u svojem istraživanju otkrili značajno višu koncentraciju MDA i aktivnost CK u sjemenoj plazmi neplodnih muškaraca s normozoospermijom u usporedbi sa plodnim muškarcima te je utvrđena značajno pozitivna korelacija između aktivnosti CK i MDA u sjemenoj plazmi muškaraca. Nadalje, smatraju da bi određivanje aktivnosti CK i koncentracije MDA u sjemenoj plazmi mogla biti prihvaćena metoda za

razlikovanje neplodnih uzorka sjemena od zdravih, uz već prihvaćene standardne analize sjemena.

Za razliku od mnogih drugih spermija kralješnjaka i beskralješnjaka, spermiji nerasta ne sadrže fosfokreatin i CK, što ukazuje da se energetski metabolizam spermija nerasta najvećim dijelom temelji na glikolizi trošeći izvanstanične ugljikohidrate te proizvodnju laktata (KAMP i sur., 2003.).

Jednako su tako, enzimi alanin aminotransferaza (engl. alanine transaminase, ALT) i AST značajni u metaboličkim procesima koji osiguravaju energiju za preživljavanje, gibljivost i plodnost spermija (DOGAN i sur., 2009.). Tako, povećanje postotka abnormalnih spermija u ejakulatu uzrokuje veliku koncentraciju enzima transaminaza u izvanstaničnoj tekućini, uslijed oštećenja membrane spermija i istjecanja tih enzima iz spermija (GUNDOGAN, 2006). Mjerenje aktivnosti transaminaza (AST i ALT) u sjemenoj plazmi dobar je pokazatelj stabilnosti stanične membrane spermija i kakvoće sjemena (DOGAN i sur., 2009.).

Sperma sadrži mineralne soli (fosfate, sulfate, bikarbonate, itd.), koje osiguravaju osmotski tlak za očuvanje cjelovitosti stanične membrane spermatozoida, a osim toga sadrži i ione neophodne za aktivaciju enzima (Mg, Zn, Ca itd.). Vitamini prisutni u sjemenoj plazmi jesu: C, B, A, D i E.

Kalcij (Ca) je najzastupljeniji mineral u organizmu živih bića, a najviše je deponiran u kostima (99%) u obliku kristala hiroksiapatita (kalcij, fosfor i hidroksid), dok se preostali dio (1%) nalazi u izvanstaničnim tekućinama. Dio je kalcija u izvanstaničnoj tekućini vezan za bjelančevine (90% za albumine te 10% za globuline), i u ovakvom obliku ne prolazi kroz staničnu membranu. Nadalje, dio se Ca nalazi u sastavu anionskih spojeva (bikarbonata, citrata, fosfata, sulfata), a funkcionalni oblik kalcija nalazi se u ionskom obliku. Ionski Ca i Ca u sastavu anionskih spojeva mogu prolaziti kroz biološke membrane. Najznačajnija funkcija Ca vezanog za bjelančevine je regulacija pH izvanstanične tekućine, pri čemu alkalni pH uzrokuje povećano vezivanje Ca i time smanjuje ionizirani kalcij (GOLDSTEIN, 1990.). Unutarstanični se kalcij nalazi deponiran u unutarstaničnim organelama, i to u endoplazmatskoj mrežici i mitohondrijima. Najznačajnije funkcije kalcija u organizmu su: sudjelovanje u putevima prijenosa signala, zgrušavanju krvi, kontrakciji mišića, kočimbenik je u enzimskim reakcijama, oplodnji i dr. (BRINI i sur., 2013.).

Koncentracija Ca u sjemenoj plazmi nerasta približno je 5 (2 - 6) mg/100mL, što je najmanja vrijednost u usporedbi s ispitivanim uzorcima sjemena čovjeka, ovna, pastuha, dok je u bikova bila najviša 34 (24 - 45) mg/100mL (MANN, 1954.). Isti autor navodi da je u

muškarca najznačajniji izvor kalcija u sjemenoj plazmi sekret prostate, te da sekret sjemenih vezikula nerasta sadrži 12 mg Ca u 100 mL sekreta.

Odavno je poznato da je izvanstanični kalcij potreban za uspješnu oplodnju. Posve je jasno da su procesi koji pokreću i održavaju aktivnosti spermija nakon ejakulacije pod biokemijskom kontrolom. Dokazano je da Ca, točnije Ca^{2+}, nužan u održanju značajki spermija: održivost, gibljivost, progresivna gibljivost i kapacitacija. Spermijima su za održavanje normalne gibljivosti neophodni unutarstanični Ca^{2+} kao i kalcij iz sjemne plazme, uz brojne druge čimbenike. Nadalje, čini se da spermiji imaju funkcionalni raspon koncentracije Ca koji mogu tolerirati u izvanstaničnom okolišu, a koncentracija Ca koja prelazi te vrijednost uzrokuje smanjenu aktivnost spermija. U muškaraca sa smanjenom gibljivošću spermija u odnosu na muškarce s normalnom gibljivošću spermija, dokazano je da muškarci sa smanjenom gibljivošću spermija imaju smanjenu koncentraciju Ca^{2+} u sjemenoj plazmi (PRIEN, 1991.). *In vitro* studije s uzorcima sjemena muškaraca i nerasta potvrđuju ranija istraživanja o smanjenoj aktivnosti spermija, koji su bili u mediju bez slobodnog Ca. Dokazano je da izvor Ca, odnosno, spoj koji se koristi u izradi medija, može imati utjecaj na funkciju spermija te da je jednostavni medij sa CaH_2PO_4 bolji izbor od $CaCl_2$. Iz PRIEN-ovih (1991.) je rezultata vidljivo da je izvanstanični izvor kalcija neophodan za normalnu aktivnosti spermija te da su u to uključeni i proteini iz sjemene plazme. WITTE i SCHÄFER-SOMI (2007.) također naglašavaju značaj kalcija, kolesterola i progesterona u indukciji kapacitacije i akrosomske reakcije u spermijima sisavaca. BREITBART (2003.) navodi da unutarstanični kalcij i bikarbonati imaju najznačajniju funkciju u procesu kapacitacije spermija nerasta.

Proces sazrijevanja spermija mijenja odgovor spermija na kalcijeve ione, koji imaju dvojak učinak na gibljivost spermija. U epididimisu, u kojem je velika koncentracija iona kalcija, potiču nezrele spermije, dok u ejakuliranom sjemenu, velika koncentracija iona kalcija sprječavaju gibljivost spermija. Akcesorne spolne žlijeze luče bjelančevine koje vežu kalcij i inhibitore tih bjelančevina, koje se pak miješaju sa spermijima tijekom ejakulacije. U ženskom spolnom sustavu spermiji stječu puni kapacitet za oplodnju jajne stanice. Tijekom procesa kapacitacije inhibitori se vežu na bjelančevine koje prenose Ca te bivaju uklonjene, a oslobođeni ioni Ca aktiviraju akrosomsku reakciju i olakšavaju prodiranje spermija u jajnu stanicu (HONG i sur., 1984.). ZANAVELD i sur. (1989.) navode da je uz priliv Ca^{2+}, akrosomska reakcija popraćena i oslobađanjem enzima uz membranske promjene, koje su nužne u interakciji spermij-jajna stanica. LOGOGLU i sur. (1997.) navode da je koncentracija

Ca u sjemenoj plazmi normospermnih, ali neplodnih muškaraca, značajno niža u odnosu na fertilnu skupinu muškaraca.

WONG i sur. (2001.) nisu pronašli razliku u koncentraciji kalcija, magnezija, cinka, bakra u krvi i sjemenoj plazmi subfertilne i fertilne skupine muškaraca. Iako kalcij, magnezij, cink i bakar imaju važnu funkciju u spermatogenezi i plodnosti, određivanjem njihovih koncentracija u krvi i sjemenoj plazmi ne može se ustvrditi plodnost ili neplodnost u muškaraca.

Iako MURASE i sur. (2007.) u svom istraživanju navode promjene u mineralnom sastavu sjemena nerasta, koje su pod utjecajem godišnjeg doba, stresa uzrokovanog toplinom i vlagom, koncentracija kalcija u sjemenoj plazmi nerasta je ostala stabilna tijekom godine, dok su ostali pokatatelji kvalitete sjemena bili najlošiji tijekom ljetnog razoblja.

MERT i sur. (2009.) su ustvrdili promjene u koncentraciji kalcija, kalija, bakra, magnezija, željeza i cinka u sjemenoj plazmi s obzirom na različlite pasmine ovnova i razlike u godišnjem dobu (ljeto - jesen).

KAYA i sur. (2002.) su ustvrdili da učestalije uzimanja ejakulata u ovnova dovodi do smanjenja Ca^{2+} u sjemenoj plazmi i smanjenja gibljivosti spermija (ASADPOUR, 2012.).

ZHANG i sur. (2010.) navode značajnu pozitivnu korelaciju kalcija u sjemenoj plazmi s gibljivošću spermija, linearnom gibljivošću spermija i ostalim parametrima spermija te negativnu korelaciju kalcija i magnezija s pH vrijednosti sjemene plazme.

Značajna pozitivna korelacija utvrđena je između koncentracije kalcija u sjemenoj plazmi i gibljivosti spermija te stupnja aktivnosti spermija (AL-JANABI i sur., 2012.).

Nađena je značajno smanjenja koncentracija K i Ca u sjemenoj plazmi neplodnih muškarcima u usporedbi sa plodnima (HAMAD i sur., 2014.).

Magnezij (Mg) je neophodan za biokemijske funkcije stanica pa tako i spermija. Četvrti je najzastupljeniji kation u tijelu, a ima značajnu funkciju u brojnim biološkim procesima, primjerice staničnom energetskom metabolizmu, stabilizaciji stanične membrane, staničnim diobama i sintezi bjelančevina.

Otprilike je 60% od ukupnog magnezija prisutno u kostima te je magnezij u tom obliku u ravnoteži s ionizirajućim magnezijem u izvanstaničnoj tekućini, pa se i do 30% magnezija koji se nalazi u kostima može lako mobilizirati u stanju nedostatka magnezija. Sposobnost mobilizacije magnezija iz kostiju smanjuje se starenjem. Približno se 20% magnezija nalazi u skeletnim mišićima, 19% u drugim mekim tkivima te manje od 1% u izvanstaničnoj tekućini. U izvanstaničnoj se tekućini 65% magnezija nalazi u ioniziranom obliku, 20% magnezija je vezano za bjelančevine i to uglavnom za albumine, a preostali se

dio nalazi u sastavu fosfata, citrata i dr.. Nakon kalija drugi je najzastupljeniji unutarstanični kation, a unutar stanice samo se od 0,5 do 5% nalazi u ioniziranom obliku, dok je preostali dio vezan za spojeve primjerice ATP, ADP, citrate, bjelančevine, RNK i DNK ili se nalazi unutar mitohondriji i endoplazmatske mrežice (EBEL i GUNTHER, 1980.; SWAMINATHAN, 2003.).

Zbog svojih fizikalnih i kemijskih svojstava, unutarstanični se magnezij može vezati za jezgru, ribosome, staničnu membranu ili makromolekule, koje nastaju u citosolu stanice. Magnezij je neophodan kako bi jezgra funkcionirala kao cjelina te u očuvanju fizikalne stabilnosti kao i agregacije ribosoma u polisome, na kojima se odvijaja sinteza bjelančevina. Ionski Mg je i kočimbenik za enzime ribonukleinskih kiselina (ribozimi) koji mogu specifično prepoznati i cijepati ciljnu mRNK. Ionski je Mg uključen u aktiviranje enzima (endonukleazu) važnih za popravak DNK odnosno za popravljanje DNK oštećenja.

Magnezij aktivira više od 300 različitih enzima te sudjeluje u mnogim metaboličkim procesima, primjerice, glikolizi, Krebsovom ciklusu, β-oksidaciji i aktivnom transportu iona kroz staničnu membranu. Ionski Mg ima značajnu funkciju u regulaciji funkcija mitohondrija, uključujući i kontrolu njihovog volumena, sastav iona te proizvodnje ATP-a (PASTERNAK i sur., 2010.).

Dakle, iz svega navedenog očito je da magnezij sudjeluje u metabolizmu bjelančevina, ugljikohidrata, masti i nukleinskih kiselina te da je Mg nužan za normalno funkcioniranje spermija napose u metaboličkim procesima.

MANN (1954.) navodi da čovjek ima 14 mg/100 mL, bik 12 mg/100 mL, nerast 11 (5 -14) mg/100 mL, ovan 3 mg/100 mL, pastuh 3 mg/100 mL Mg u sjemenoj plazmi.
Sjemena plazma sadrži veliku koncentraciju elemenata u tragovima primjerice Ca, Mg, Cu, Zn i selena (Se) u vezanom i slobodnom obliku. Navedeni elementi u tragovima imaju vrlo značajnu funkciju i utječu na različite značajke sjemena, primjerice gibljivost spermija (SORENSEN i sur., 1999.; ABD-ALRAHMAN i ABDELLA, 2013.).

U sjemenoj su plazmi kationi Na, K, Ca i Mg važni u uspostavljanju osmotske ravnoteže, a osim toga esencijalni su elementi u tragovima sastavni dijelovi mnogih važnih enzima. Dakle, biokemijska je procjena sjemene plazme važan kriterij za procjenu plodnosti i dijagnostiku muških reproduktivnih poremećaja.

Abnormalne koncentracije Ca, Mg, Zn i Cu u sjemenoj plazmi koreliraju s neplodnošću u muškaraca. Magnezij ima također funkciju u spermatogenezi, napose u gibljivosti spermija. Jednako tako, Mg je značajan kation koji se nalazi u gotovo svim enzimskim sustavima (SORENSEN i sur., 1999; WONG i sur., 2001.; ÇEVIK i sur., 2007.;

ABD-ALRAHMAN i ABDELLA, 2013.). Prema WONGU i sur. (2001.), Mg se smatra pokazateljem stanja sekreta sjemenih vezikula. U istraživanju ÇEVIK i sur. (2007.) nađena je značajna razlika u koncentraciji Mg u sjemenoj plazmi među skupinama bikova pasmine smeđe švicarsko govedo. Skupina bikova sa oligospermijom imala je manju koncentraciju Mg, dok razlike u koncentraciji Mg između bikova pasmina holstein i smeđe švicarsko govedo nije bilo.

MERT i sur. (2009.) su odredili koncentraciju kalcija, kalija, bakra, magnezija, željeza i cinka u sjemenoj plazmi ovnova raznih pasmina. Nađena je razlika u mjerenim pokazateljima u odnosu na genotipove i vrijeme uzimanja uzoraka sjemena, koji mogu biti korisni u boljem i učinkovitijem planiranju anestrusa u sezoni parenja istraživanih vrsta ovnova, dok sličnih podataka za razlike među pasminama nerasta nema u dostupnoj literaturi.

Rezultati ABD-ALRAHMAN i ABDELLA (2013.) ukazuju da porast kooncentracije magnezija u sjemenoj plazmi muškaraca uzrokuje smanjenje gibljivosti spermija, što se podudara sa rezultatima LORNAGE i sur. (1983.), koji navode da se pri povećanoj koncentraciji iona Mg iznad 0,8 mM/L, smanjuje gibljivost spermija, a što se ne podudara s rezultatima studije SORENSEN i sur. (1999.) koji ukazuju kako velika koncentracija magnezija nema inhibitorni učinak na gibljivost spermija.

ZHANG i sur. (2010.) navode značajnu negativnu korelaciju magnezija u sjemenoj plazmi s linearnom gibljivošću spermija i ostalim parametrima spermija te negativnu korelaciju kalcija i magnezija s pH vrijednosti sjemene plazme.

WONG i sur. (2001.) nisu pronašli razliku u koncentraciji kalcija, magnezija, cinka i bakra u krvi i sjemenoj plazmi subfertilne i fertilne skupine muškaraca. Tako su koncentracije cinka i magnezija u sjemenoj plazmi u slaboj korelaciji s brojem spermija, ali je pronađena jaka korelacija između minerala kalcija, magnezija i cinka u sjemenoj tekućini. Iako kalcij, magnezij, cink i bakar imaju važnu funkciju u spermatogenezi i plodnosti, određivanjem njihovih koncentracija u krvi i sjemenoj plazmi plazmi ne može se ustvrditi plodnost ili neplodnost u muškaraca.

Koncentracija kalcija i magnezija u sjemenoj plazmi bila je značajno veća u skupini plodnih muškaraca u odnosu na skupine neplodnih muškaraca. Dobiveni rezultati ukazuju da kalcij i magnezij u sjemenoj plazmi imaju vrlo značajnu funkciju u muškoj plodnosti te bi se trebali uzeti u obzir u dijagnostici i liječenju muške neplodnosti (BASSEY i sur., 2013.).

Veća koncentracija Mg i Se u sjemenoj plazmi nerasta povezana je s manjim stupnjem oštećenja stanične membrane spermija i manjim brojem spermija sa proksimalnom citoplazmatskom retencijom (LÓPEZ RODRÍGUEZ i sur., 2013.). Nerasti s dobrom

kvalitetom sjemena ima li su veću koncentraciju Mg u sjemenoj plazmi od onih sa lošom kvaliteteom. Značajno je veća koncentracija Mg u sjemenoj plazmi nerasta s dobrom kvalitetom sjemena bila krajem ljeta, a manja početkom ljeta (LÓPEZ RODRÍGUEZ i sur., 2013.).

Cink (Zn) je mikronutrijent, koji ima važnu funkciju u fiziologiji spermija, u proizvodnji i/ili održivosti spermija, u prevenciji razgradnje te stabilizaciji stanične membrane spermija. Nadalje, ima funkciju i u stabilizaciji kromatina u jezgri spermija, gibljivosti spermija, a djeluje i antioksidativno (LIPENSKÝ i sur., 2014.).

Bakar, cink i selen sudjeluju u mnogim biokemijskim procesima koji podržavaju život. Najvažniji od tih procesa su stanično disanje, stanični aerobni procesi, DNK i RNK replikacija, održavanje integriteta stanične membrane i vezivanje slobodnih radikala kisika. Bakar, cink i selen su uključeni u uklanjanje slobodnih radikala kisika pomoću kaskadnih enzimskih sustava. Bakar i cink su kočimbenici u reakciji koju katalizira enzim superoksid dismutaza u kojoj se superoksidni radikal prevodi u manje štetan vodikov peroksid (CHAN i sur., 1998.).

Biokemijska je funkcija cinka (Zn^{2+}) neophodna za više od 300 enzima koji sudjeluju u sintezi, metabolizmu i prometu bjelančevina, ugljikohidrata, lipida, nukleinskih kiselina i nekih vitamina, primjerice vitamin A. Enzimi koji sadrže cink, a dobro su poznati jesu superoksid dismutaza, ALP i alkoholna dehidrogenaza. Cink je neophodan za normalno funkcioniranje imunosnog sustava, sintezu DNK i staničnu diobu te štiti bjelančevine i lipide od oksidacijskog oštećenja. Hranom unešen cink nužan je za kosti, kognitivne funkcije, plodnost i reprodukciju, metabolizam masnih kiselina, acidobazni metabolizam, metabolizam vitamina A te za normalni vid.

Resorpcija cinka ovisi o dozi, a uglavnom se odvija u gornjem dijelu tankog crijeva. Resorbirani se cink transportira krvlju, uglavnom vezan za albumine. Veći se dio cinka nalazi unutar stanice te je ukupan sadržaj cinka u tijelu odrasle osobe približno 2 do 4 grama, od kojih se 2/3 nalaze u mišićnom tkivu i 30% u koštanom tkivu. Cinka u izvanstaničnim tekućinama ima približno 0,1% od ukupne količine cinka. Velike se koncentracije cinka nalaze u pojedinim dijelovima oka, i u tekućini koju luči prostata (HOTZ i BROWN, 2004.).

Minerali kao što su cink i selen (strukturna komponenta glutation peroksidaze), povezani su s kvalitetom sjemena u muškaraca, zbog njihovih antioksidativnih svojstava (BEDWAL i BAHUGUNA, 1994.; CHIA i sur., 2000; POWELL, 2000.; RODRÍGUEZ i sur., 2013.). Nadalje, cink je u WHO priručniku opisan kao pokazatelj funkcije prostate (WHO, 2010.). Niske razine cinka nađene su u sjemenoj plazmi neplodnih muškaraca (CHIA i sur.,

2000.; COLAGAR i sur., 2009.). U nerasta se neke promjene u mineralnom sastavu odnose na utjecaj godišnjeg doba i toplinskog stresa (MURASE i sur., 2007.; RODRÍGUEZ i sur., 2013.).

Od devet bioloških elemenata u tragovima cink, bakar i selen važni su u reprodukciji oba spola. U spolno zrelih muških jedinki velika je koncentracija cinka u testisima, a prostata pak ima najveću koncentraciju cinka u tijelu. Nedostatak cinka najprije narušava aktivnost angiotenzin konvertirajućeg enzima, što pak dovodi do iscrpljenja testosterona i inhibicije spermatogeneze. U štakora se uslijed nedostatka cinka često opaža veći udio spermija patoloških oblika. Smatra se da cink pomaže u produljenju funkcionalnog životnog vijeka ejakuliranih spermija (BEDWAL i BAHUGUNA, 1994.).

Skupina štakora hranjena sa hranom koja sadrži male količine cinka imala je značajno smanjenjen broj spermija u ejakulatu, dok je skupina štakora hranjena hranom koja nije sadržavala cink bila azospermična. Nedostatak cinka inhibira steroidogenezu u testisima što rezultira smanjenom proizvodnjom ili izostankom proizvodnje spermija (HAMDI i sur., 1997.).

Nadalje, PESCH i sur. (2006.) su našli značajnu korelaciju između volumena sjemena kao i koncentracije spermija pastuha s koncentracijom mikronutrijenata Fe i Zn u sjemenoj plazmi.

Najviše je istraživanja o važnosti Zn u reprodukciji provedeno u ljudi, no nažalost rezultati su vrlo oprečni, pa su ZHAO i XIONG (2005.) u svom istraživanju ustvrdili da sjemena plazma astenozoospermičnih i oligoastenozoospermičnih muškaraca sadrži značajno manju koncentraciju cinka u odnosu na sjemenu plazmu plodnih muškaraca. Stoga je manja koncentracija cinka u sjemenoj plazmi povezana sa smanjenom proizvodnjom i gibljivosti spermija te neplodnosti u astenozoospermičnih i oligoastenozoospermičnih muškaraca. Gotovo istovjetne rezultate navode i ATIG i sur. (2012.).

Plodna je skupina muškaraca imala značajno veću koncentraciju Zn u sjemenoj plazmi u odnosu na neplodnu skupinu. Koncentracija Zn u sjemenoj plazmi muškaraca značajno korelira s brojem spermija i udjelom spermija normalne morfologije te je nađena značajna pozitivna korelacija između koncentracije Zn s koncentracijama Ca i K u sjemenoj plazmi. Prehrana osiromašena cinkom može biti čimbenik rizika u lošoj kvaliteti sperme i idiopatske muške neplodnosti (COLAGAR i sur., 2009.).

Utvrđena je negativna korelaciju između gibljivosti spermija i koncentracije cinka i magnezija u sjemenoj plazmi muškaraca (ABD-ALRAHMAN i ABDELLA, 2013.), dok su

ZHANG i sur. (2010.) ustvrdili negativnu korelaciju koncentracije cinka u krvi s gibljivošću spermija.

LÓPEZ RODRÍGUEZ i sur. (2013.) navode negativnu korelaciju koncentracije Zn u sjemenoj plazmi nerasta s udjelom spermija s abnormalnim repom. Vrlo je vjerojatno da Zn utječe na kvalitetu sperme na različite načine čime ga je teško povezati s jednim parametrom. Koncentracija Zn bi mogla biti pokazatelj plodnosti nerasta, ali uslijed velike varijacije u mjerenim uzorcima te slabe korelacije s kvalitetom sjemena u dobivenim rezultatima, ograničena je njegova potencijalna primjena u dijagnostičke svrhe. Izuzev toga, treba uzeti u obzir i utjecaj godišnjeg doba na kvalitetu sjemena. Uočena je značajno različita koncentracija Zn u sjemenoj plazmi u uzoraka koji su prikupljeni na početku ljeta u odnosu na one prikupljene krajem ljeta. Veća koncentracija cinka izmjerena je u sjemenoj plazmi nerasta s boljom kvalitetom sjemena u odnosu na one sa lošijom.

Skupina nerasta s najvećim udjelom morfološki abnormalnih spermija (24,3%) imala je najmanju koncentraciju cinka u sjemenoj plazmi, dok je pak skupina nerasta s najmanjim udjelom morfološki abnormalnih spermija (16,8%) imala najveću koncentraciju cinka u sjemenoj plazmi. Temeljem dobivenih rezultata ipak se ne može zaključiti da postoji značajna povezanost između koncentracije cinka u sjemenoj plazmi nerasta i procijenjenih parametara kvalitete sperme (LIPENSKÝ i sur., 2014.).

2.3. REAKTIVNI KISIKOVI SPOJEVI I OKSIDACIJSKI STRES

Gotovo su svi živi organizmi ovisni o kisiku, a aerobni organizmi znatno učinkovitije iskorištavaju energiju za obavljanje životnih funkcija u odnosu na anaerobne organizme. Povećana je količina kisika u atmosferi dopridonijela razvoju mnogih evolucijski prednosti za žive organizme, no nije zanemariv ni štetni učinak kisika na žive organizme. Tijekom metaboličkih procesa u organizmu se stvaraju toksične, reaktivne molekule nazvane reaktivni kisikovi spojevi (ROS), stoga je aerobni metabolizam povezan s toksičnim učinkom kisika uslijed oksidacije osnovnih bioloških molekula, što može mijenjati stanične funkcije, ugroziti opstanak stanica ili oboje (HALLIWELL i GUTTERIDGE, 2007.; OGBUEWU i sur., 2010.). Brojne studije svjedoče o staničnim oštećenjima koje uzrokuju slobodni kisikovi radikali, kao etiološki čimbenici u nastanku i patogenezi bolesti primjerice, neurodegenerativnih poremećaja, upala, neplodnosti, virusnih infekcija, autoimunih bolesti, bolesti probavnog sustava, i dr. (OGBUEWU i sur., 2010.).

Patološki oblici spermija i mrtvi spermiji te leukociti u kontaminiranim ejakulatima stvaraju ROS u prekomjernim količinama što je jedan od najučestalijih uzroka neplodnosti u mužjaka. Stanična membrana spermija sisavaca sadrži veliki udio višestruko nezasićenih masnih kiselina (engl. polyunsaturated fatty acid, PUFA), plazmalogena (glicerofosfolipidi) i sfingomijelina (fosfolipidi). Ovakva je struktura stanične membrane spermija odgovorna za fleksibilnosti i funkcionalnu sposobnost spermija. Međutim, lipidi su spermija glavni supstrati za lipidnu peroksidaciju (engl. lipid peroxidation, LPO), što može uzrokovati značajne funkcionalne poremećaje spermija. S druge pak strane, ROS nastali lipidnom peroksidacijom u malim (fiziološkim) količinama utječu na metabolizam spermija poboljšavajući sposobnost spermija u interakciji sa *zona pellucidom* (ATIKEN i sur., 1989.). Nepoznato je koja količina ROS-a ima pozitivan učinak na funkcionalnu sposobnost spermija, a koja pak može dovesti do neplodnosti u mužjaka.

U normalnim fiziološkim funkcijama, postoji dinamička interakcija između prooksidativnih i antioksidativnih tvari u ejakulatu. Prekomjerno stvaranje ROS-a može nadvladati zaštitni antioksidacijski mehanizam, i u dvosloju stanične membrane spermija, inicirati promjene u lipidima i/ili bjelančevinama te izazvati promjene u DNK-a, čime dolazi do smanjene gibljivosti i preživljavanja spermija (AITKEN i sur., 1995.). Kako bi se umanjili negativni učinci ROS-a, spermiji i sjemena plazma imaju nekoliko mehanizama kojima neutraliziraju ROS. Ti mehanizmi uključuju enzimske i neenzimske antioksidativne sustave koji djeluju sinergijski kako bi spriječili štetne učinke nusproizvoda aerobnog metabolizma (OGBUEWU i sur., 2010.). Ejakulat sisavaca (prvenstveno sjemena tekućina) sadrži mnoge spojeve sa neenzimskim antioksidativnim djelovanjem (primjerice askorbinsku kiselinu, α-tokoferol, taurin i albumine) (ALVAREZ i STOREY, 1983.). Međutim, i antioksidativni enzimi imaju značajniju funkciju u zaštiti spermija protiv ROS (OGBUEWU i sur., 2010.).

Spermiji

Ejakulat je mješavina spermija proizvedenih u testisima i sjemene plazme koju izlučuju aksesorne spolne žlijezde i epididimisi, a miješaju se zajedno u vrijeme ejakulacije. Poput krvi, sjeme se sastoji od dva odjeljka, staničnog i nestaničnog. Sjemena plazma sadrži različite čestice koje utječu na funkciju i preživljavanje spermija tijekom prolaska kroz ženski reproduktivni sustav, a ima i važne regulatorne funkcije u raznim procesima prije penetracije spermija u jajnu stanicu (CASTELLINI, 2008.). Ove se funkcije odnose na prehranu, zaštitu, regulaciju gibljivosti i kapacitaciju spermija, prepoznavanje i vezanje gameta (WABERSKI i sur., 1996.).

Lipidi stanične membrane

Obilježje bioloških membrana je asimetrični razmještaj lipida u dvosloju. Lipidni se sastav stanične membrane spermija u sisavaca znatno razlikuje od onih u somatskih stanica sisavaca. Stanične membrane spermija imaju vrlo velik udio fosfolipida, sterola, zasićenih i višestruko nezasićenih masnih kiselina, stoga su spermiji osobito osjetljivi na oštećenja uzrokovana prekomjernim stvaranjem ROS-a (AITKEN i CLARKSON, 1987.; SANOCKA i KURPISZ, 2004.).

Lipidi su tvari odgovorne za fluidnost lipidnog dvosloja stanične membrane, te za promjene u sastavu stanične membrane spermija, koje se zbivaju tijekom prolaska i sazrijevanja spermija kroz epididims, kapacitaciju spermija u reproduktivnom sustavu ženki, a uključeni su i u staničnu fuziju (PARKS i HAMMERSTEDT, 1985.; SANOCKA i KURPIZS, 2004.; ZAKOŠEK PIPAN i sur., 2014.).

Tijekom prolaska spermija kroz epididimis mijenja se sastav masnih tvari u staničnoj membrani. Uslijed ove promjene plazmalogeni postaju najzastupljeniji fosfolipidi u repu epididimisa te je molarni omjer kolesterola i fosfolipida dvostruko veći tijekom migracije spermija iz sjemenih kanalića (AVELDANO i sur., 1992.).

Veliki je udio višestruko nezasićenih masnih kiselina, napose dokozaheksaenske kiseline (DHA) u staničnoj membrani spermija. Udio je DHA značajno veći u nezrelim germinativnim stanicama i nezrelim spermijima u odnosu na zrele spermije što ukazuje na smanjenje udjela DHA tijekom procesa sazrijevanja spermija (OLLERO i sur., 2000.).

Tijekom kapacitacije spermija fosfolipid fosfatidilserin premješta se iz središnjeg dijela spermija u akrosomalno područje, a katkada u ekvatorijalno područje (KOTWICKA i sur., 2002.). Spermiji sadrže i desmosterol, koji se tijekom kapacitacije gubi (CROSS, 2003.). Sfingomijelin u spermijima utječe na brzinu kapacitacije usporavanjem „gubitka“ sterola, a egzogena sfingomijelinaza ubrzava kapacitaciju pospješujući gubitak sterola i generiranje ceramida (CROSS, 2000.).

Kolesterol regulira fluidnost i propusnost stanične membrane. „Istjecanje“ kolesterola tijekom kapacitacije omogućuje „utjecanje“ izvanstaničnog Ca^{2+}. Povećana unutarstanična koncentracija Ca^{2+} ima značajnu funkciju u akrosomskoj reakciji (ZANEVELD i sur., 1991.; BREITBART i SPUNGIN, 1997.). Akrosomska je reakcija ključna u interakciji gameta svih vrsta, a omogućuje spermijima da penetriraju u *zona pellucidu* i da se spoje (fuzioniraju) sa staničnom membranom jajne stanice. Spermiji koji ne prođu proces akrosomske reakcije ne mogu oploditi jajnu stanicu. *Zona pellucida* veže se na najmanje dva različita receptora na staničnoj membrani spermija. Vezanje na receptor tirozin kinaze regulira adenilil ciklazu što

dovodi do povišenja cikličkog adenozin monofosfata (cAMP) i aktivacije protein kinaze. Protein kinaza aktivira i otvara naponski ovisne Ca^{2+} kanale što dovodi do povećanja razine Ca^{2+}. Tirozin kinaza također može aktivirati Na^{+}/H^{+} crpku što dovodi do alkalizacije citosola. Protein kinaza također aktivira fosfolipazu A2, koja tada sintetizira arahidonsku kiselinu iz fosfolipida u membrani spermija. Arahidonska se kiselina konvertira u prostaglandine i leukotriene pomoću enzima ciklooksigenaze i lipooksigenaze. Povećanje koncentracije Ca^{2+} i pH dovodi do fuzije membrana i akrosomske egzocitoze (BREITBART i SPUNGIN, 1997.). Akrosomska se reakcija zbiva u prednjem dijelu glave spermija. Izvanjska akrosomalna membrana ima veliki udio sterola koji priječe preuranjenu fuziju unutarnje i izvanjske akrosomalne membrane (preuranjenu egzocitozu).

Lipidi stanične membrane spermija također imaju značajnu funkciju kojom reguliraju polariziranu migraciju površinskih antigena spermija tijekom razvojnih procesa, kao što su sazrijevanje i kapacitacija. Štoviše, regionalizacija lipida može dovesti i do regionalizacije bjelančevina uslijed specifične topljivosti bjelančevina na različitim mjestima.

Membranski su lipidi spermija uključeni i u interakciju gameta. Tako sulfogalaktozilglicerolipidi (WEERACHATYANUKUL i sur., 2001.) i lizofosfatidilkolin (RIFFO i PARRAGA, 1997.) stimuliraju oplodnu sposobnost spermija i induciraju promjene u sastavu *zona pellucide*, a u oolemi potiču fuziju spermija i jajne stanice (HINKOVSKA i sur., 1986.; ARTS i sur., 1993.; MARTINEZ i MORROS, 1996.).

Ukratko, sve lipidne komponente koje se nalaze u membrani spermija uključene su u spermatogenezu, regulaciju maturacije spermija, kapacitaciju, akrosomsku reakciju i u fuziju membrana gameta. Veliki udio višestruko nezasićenih masnih kiselina u staničnoj membrani spermija, čini spermije osobito podložnim oštećenjima prouzročenim ROS, koji pak induciraju lipidnu peroksidaciju. Prema tome spermiji su jedinstveni po strukturi, funkciji, ali i izrazitoj osjetljivosti na oštećenja uzrokovana lipidnom peroksidacijom, a koju pak uzrokuju ROS (ALVAREZ i sur., 1987.).

Reaktivni kisikovi spojevi i slobodni radikali

Slobodni su radikali čestice, ioni, atomi ili molekule koji u izvanjskoj ljusci imaju jedan ili više nesparenih elektrona (HALLIWELL i GUTTERIDGE, 2007.). Slobodni radikali nastaju homolitičkim cijepanjem kovalentnih veza, pri čemu svaki elektron ostaje vezan u susjednom atomu. Nespareni elektroni čine molekule izrazito nestabilnim i reaktivnim. Pri nastojanju da se uspostavi stabilno stanje reagiraju sa elektronima najbližih molekula, pa je srednji polumjer njihove difuzije manji od 100 nm. Tako se primjerice, sparuju s elektronom

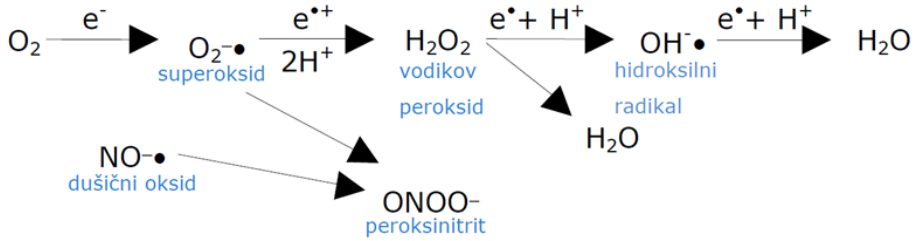
iz izvanjske orbite drugog elektrona, uzrokujući pri tome njihovo davanje ili uzimanje iz drugih molekula. Slobodni su radikali uglavnom organskog podrijetla, a mogu reagirati s organskim i/ili neorganskim spojevima te imati pozitivan, negativan ili neutralan naboj (HALLIWELL i GUTTERIDGE, 2007.). Jednom stvoren slobodni radikal može izazvati niz lančanih reakcija reagirajući međusobno ili s drugim manje reaktivnim molekulama pri čemu nespareni elektroni stvaraju kemijske veze uz oslobađanje energije. Najučestalije reakcije slobodnih radikala jesu: davanje elektrona (reducirani radikal daje elektron neradikalu), primanje elektrona (oksidirani radikal prima elektron od neradikala), oduzimanje vodika, reakcija adicije, itd. Poluživot slobodnih radikala u biološkim sustavima vrlo je kratak i traje najčešće nekoliko mikrosekundi što otežava njihovo kvantificiranje (KEHRER, 2000.; HORTON, 2003.).

Naziv reaktivni kisikovi spojevi obuhvaća slobodne radikale i reaktivne molekule koje nisu slobodni radikali. ROS su najzastupljeniji radikali u organizmu, a najznačajniji su superoksidni anion ($O_2^{\bullet -}$) i hidroksilni radikal ($OH^{\bullet -}$). Najznačajniji neradikali biološkog sustava jesu vodikov peroksid (H_2O_2), singletni kisik ($^1O_2$) i hipoklorna kiselina (HOCl) (Tablica 2.1.).

Tablica 2.1. Reaktivni kisikovi spojevi (prema ŠTEFAN i sur., 2007.)

Slobodni radikali	Čestice koje nisu slobodni radikali
superoksidni, $O_2^{\bullet -}$	vodikov peroksid, H_2O_2
hidroksilni, $OH^{\bullet}$	hipokloritna kiselina, HClO
peroksilni, $ROO^{\bullet}$	ozon, O_3
alkoksilni, $RO^{\bullet}$	singletni kisik, $^1O_2$
hidroperoksilni, $HO_2^{\bullet}$	

Superoksidni anion i vodikov peroksid su vrlo selektivni i stoga manje reaktivni, dok je hidroksilni radikal vrlo reaktivan te reagira sa svim molekulama u staničnom okolišu. Hidroksilni radikali nastaju spajanjem superoksidnog aniona s vodikovim peroksidom, a reakciju kataliziraju prijelazni metali u tzv. Haber-Weissovoj ili u Fentonovoj reakciji.



Slika 2.3. Redukcija kisika i nastanak slobodnih radikala (ŠVERKO, 2011.).

Izuzev ROS-a u slobodne radikale pripadaju: reaktivni dušikovi spojevi (RDS), reaktivni kloridni spojevi (RCS), reaktivni bromovi spojevi (RBS) te reaktivni sumporni spojevi (HALLIWELL i GUTTERIDGE, 2007.).

U biološkim su sustavima značajni RDS poput dušikovog oksida ($NO^{\bullet-}$) ili dušikovog dioksida ($NO_2^{\bullet-}$), a od neradikala nitratna kiselina (HNO_2) i peroksinitrit ($ONOO^-$) (Tablica 2.2.).

Tablica 2.2. Reaktivni dušikovi spojevi (prema ŠTEFAN i sur., 2007.)

Slobodni radikali	Čestice koje nisu slobodni radikali
dušikov oksid, $NO^{\bullet-}$	nitrozil, NO^+
	nitritna kiselina, HNO_2
	dušikov trioksid, N_2O_3
dušikov dioksid, $NO_2^{\bullet-}$	peroksinitrit, $ONOO^-$
	alkilperoksinitrit, ROONO

Dušikov oksid nastaje iz L-arginina, u endotelnim, živčanim i upalnim stanicama, djelovanjem enzima dušik oksid sintetaze (MONCADA i HIGGIS, 1993.; HALLIWELL i GUTTERIDGE, 2007.). Fiziološke funkcije NO-a jesu: lokalna vazodilatacija, regulacija krvnoga tlaka, inhibicija agregacije trombocita, regulacija srčane kontraktilnosti, stanična signalizacija, a u središnjem živčanom sustavu djeluje kao neurotransmitor na više funkcija, uključujući pamćenje, dok na periferiji djeluje preko neadrenergičnih, nekolinergičnih živaca, regulirajući funkcije raznih organa putem uspostavljanja/moduliranja imunosnog odgovora (MONCADA i HIGGIS, 1993.). Makrofagi uz kisikove radikale stvaraju i $NO^{\bullet-}$ kojega rabe za uništavanje patogenih mikroorganizama i tumorskih stanica. Dušikov oksid nije jako toksičan, ali lako reagira sa vodikovim peroksidom ili superoksidnim anionom te nastaje jako

toksični peroksinitritni radikal ($ONOO^-$) i dušikov dioksid ($NO_2^\bullet$) koji ubijaju bakterije, gljivice, helminte i tumorske stanice (STEVANOVIĆ i sur., 2011.). Poznato je da dušikov oksid u malim koncentracijama ima značajnu funkciju u reprodukciji i oplodnji, održavajući gibljivost spermija, ostali RDS, primjerice dušikov dioksid i peroksinitritni radikal, smatraju se naprotiv štetnima. Dušikov oksid u velikim koncentracijama oštećuje spermije mehanizmom inhibicije mitohondrijske respiracije i sinteze DNK-a (OGBUEWU i sur., 2010.). Sinteza $NO^{\bullet-}$ uslijed infekcije i upale doprinosi smanjenju gibljivosti i funkciji spermija te posljedično tome uzrokuje neplodnost (ROSSELLI i sur., 1995.). Velike su koncentracije stvorenog dušikovog oksida povezane s patogenezom raznih poremetnji, primjerce septičkog šoka, hiperdinamičkog stanja ciroze, kroničnim upalnim stanjima, cerebralnoj ishemiji (mozgovni udar), epilepsiji, itd. (HALLIWELL i GUTTERIDGE, 2007.).

Stvaranje reaktivnih kisikovih spojeva

U stanicama ROS mogu nastati uslijed djelovanja endogenih i egzogenih čimbenika. Egzogeni su čimbenici primjerice, ultraljubičasto i ionizirajuće zračenje, ozon, stres, određeni lijekovi (citostatici), ksenobiotici, herbicidi, a ponekad može biti i hrana, napose bogata nezasićenim masnim kiselinama i stoga izložena oksidiranju (FÜRST, 1996.). Male se količine ROS-a u stanicama, pa tako i spermijima, neprestano stvaraju tijekom metaboličkih procesa, prije svega u procesima oksidativne fosforilacije. Mitohondriji troše oko 90% staničnog kisika pri transportu elektrona, koji nije u potpunosti učinkovit te 1 - 4% elektrona nedostaje u lancu oksidativne fosforilacije, a tijekom redukcije kisika u vodu stvaraju se superoksidni radikali (LENAZ, 1998., JACOB i WINYARD, 2009.). U mitohondrijima, približno 2% od ukupne potrošnje kisika, odlazi na stvaranje ROS-a (KEHRER, 2000.). Stoga su mitohondriji glavni unutarstanični izvor ROS-a i slobodnih radikala uslijed „curenja“ elektrona iz respiratornog lanca. Slobodni radikali nastaju u redukcijsko-oksidacijskim reakcijama tijekom fizioloških i patoloških procesa primjerice u ciklooksigenaznom putu mitohondrijskog respiratornog lanca, u sustavu citokroma P450 u endoplazmatskoj mrežici, oksidacijom masnih kiselina u peroksisomima, metabolizmom arahidonske kiseline u staničnim membranama, aktivnošću stanica imunosnog sustava (DE DUVE i BAUDHUIN, 1966.; FÜRST, 1996.; DEAN i sur.,1997.; RAHA i ROBINSON, 2000.). Slobodni radikali mogu nastati i tijekom enzimatske oksidacije i autooksidacije različitih kemijskih spojeva poput tiola, gliceraldehida, reduciranog flavinmononukleotida ($FMNH_2$), reduciranog flavinadenindinukleotida ($FADH_2$), pojedinih hormona i neurotransmitora (katekolamini**)**, pri čemu dolazi do redukcije molekularnog kisika i nastajanja superoksida, najčešće uz prisutnost

iona prijelaznih metala (DEAN i sur.,1997.; HALLIWELL i GUTTERIDGE, 2007.). Enzimi koji stvaraju ROS su brojni, a uključuju citokrome P450, različite oksidaze, peroksidaze, lipooksigenaze i dehidrogenaze (KEHRER, 2000.; HALLIWELL i GUTTERIDGE, 2007.).

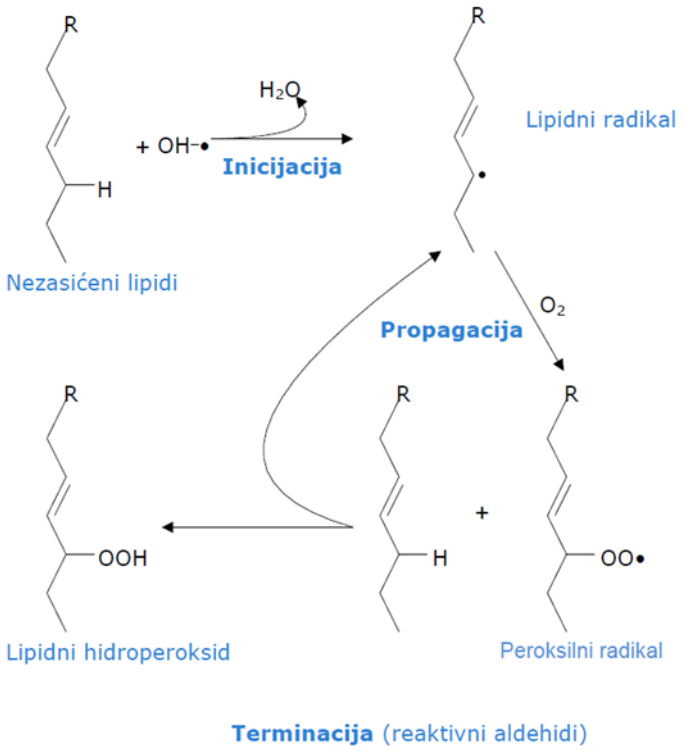
ROS ima dvojaku funkciju u biološkim sustavima, te mogu imati štetan i/ili koristan učinak u živih organizama (BUONOCORE i sur., 2010.). Pri tome neprijeporan značaj imaju u mnogobrojnim procesima, primjerice u unutarstaničnoj signalizaciji, proliferaciji, apoptozi, embriogenezi te imunosnom odgovoru (MATÉS i SÁNCHEZ-JIMÉNEZ, 1999.). Aktivnošću stanica imunosnog sustava (neutrofila, eozinofila i makrofaga) nastaju ROS kao dio mehanizma unutarstaničnog ubijanja mikroorganizama. Neutrofili izlučuju enzim mijeloperoksidazu, koji katalizira reakciju tijekom koje nastaje hipoklorna kiselina koja uništava mikroorganizme (KLEBANOFF i sur., 2013.). Nadalje, jedan od obranih mehanizama fagocita uključuje i enzimski kompleks na izvanstaničnoj površini membrane nazvan nikotinamid adenin dinukleotid fosfat-oksidaze (NADPH oksidaza), koji je odgovoran za "respiratorni prasak", a nastaje pri kontaktu aktiviranih fagocita s patogenim mikroorganizmom. Proces karakteriziraju povećana potrošnja kisika (snažan oksidativni metabolizam) te stvaranje superoksidnih radikala i dušikovog oksida (VAN EEDEN i sur., 1999.).

Slobodnih radikala u organizmu, odnosno stanicama, ima u vrlo malim koncentracijama, a veće koncentracije imaju nepovoljan pa i toksičan učinak, tj. uslijed velike koncentracije ili neučinkovitog uklanjanja ROS-a dolazi do oksidacijskog stresa, a time do oštećenja makromolekula i razvoja metaboličkih poremećaja. Kisikovi radikali mogu uzrokovati lipidnu peroksidaciju, oštećenje DNK, bjelančevina i ugljikohidrata, te oksidirati gotovo svaku organsku molekulu, tako što destabiliziraju dušikove atome u DNK, RNK i aminokiselinama te dvostruke veze masnih kiselina (FÜRST, 1996.; DEAN i sur., 1997.; KEHRER, 2000.; DAVIES, 2003.; JACOB i WINYARD, 2009.). Značajnija oštećenja makromolekula mijenjaju staničnu strukturu i funkciju što posljedično remeti funkcije imunosnog sustava te reparacijske procese. Naposljetku, slobodni radikali mogu imati i citotoksičan učinak što može rezultirati staničnom smrću (nekroza ili apoptoza), kromosomskim aberacijama, mutacijama, kancerogenezom itd.

Lipidna peroksidacija

Lipidi su funkcionalne i strukturne komponente bioloških membrana, najznačajnije energetske rezerve u organizmu, prekursori za vitamine i hormone, a sudjeluju i u međustaničnoj komunikaciji i regulaciji ekspresije gena (CATALÁ, 2006.; CATALÁ, 2009.).

Lipidna je peroksidacija oksidativna degradacija lipida, potaknuta djelovanjem ROS-a i/ili RDS-a. U tom procesu slobodni radikali "kradu" elektrone lipidima (u staničnim membranama, lipoproteinima i drugim molekulama), što dovodi do oštećenja stanica, a proces se nastavlja mehanizmom lančane reakcije slobodnih radikala. Staničnu membranu čine lipidi (fosfolipidi, glikolipidi, kolesterol) koji sadrže višestruko nezasićene masne kiseline (PUFA), koje su pak izrazito podložne lipidnoj peroksidaciji. Osjetljivost PUFA prema lipidnoj peroksidaciji raste sa povećanjem broja dvostrukih veza, stoga dokozaheksaenska kiselina (C22:6) ima veću sposobnost oksidacije od linolne kiseline (C18:2) (WAGNER i sur., 1994.; CATALÁ, 2006.; ŠTEFAN i sur., 2007.). Započeta reakcija lipidne peroksidacije ima progresivni tijek te se sastoji od: inicijacije, propagacije i terminacije.



Slika. 2.4. Tijek lipidne peroksidacije (ŠVERKO, 2011.).

Proces oksidacije lipida započinje inicijacijom tijekom koje osobito reaktivni oksidans ($X^{\bullet}$) oduzima atom vodika metilenskoj skupini ($-CH_2-$) višestruko nezasićene masne kiseline pa nastaju alkilni, odnosno slobodni lipidni radikali ($L^{\bullet}$). Inicijaciju započinje hidroksilni radikal ($OH^{\bullet-}$), no ponekad ju započinje i peroksilni radikal ($LOO^{\bullet}$), alkoksilni radikal ($LO^{\bullet}$) ili pak lipidni radikal (L•) (CATALÁ, 2006.; HALLIWELL i GUTTERIDGE, 2007.).

Ukoliko antioksidansi nisu prisutni dolazi do propagacije, a time do nastanka lančane reakcije lipidne peroksidacije. Lipidni radikali u aerobnim uvjetima reagiraju s kisikom te tako nastaje peroksilni radikal. Oduzimanjem vodika drugoj nezasićenoj masnoj kiselini, peroksilni radikal stvara lipidni hidroperoksid (LOOH) i novi lipidni radikal. Lipidni hidroperoksid stvara nove radikale, što pak ima za posljedicu grananje lančane reakcije. Propagacija se može višestruko ponavljati. Tijekom propagacije LOOH u prisutnosti željeza disocira do LO$^{\bullet}$ i LOO$^{\bullet}$, što dovodi do reinicijalizacije peroksidacije. Uz dovoljno kisika i neoksidiranih lipida mala količina slobodnih radikala nastala u stadiju inicijacije dovest će do obnavljanja lipidnih hidroperoksida koji s prijelaznim metalima pospješuju proces LPO (CATALÁ, 2006.; HALLIWELL i GUTTERIDGE, 2007.; KOLENC, 2010.; ŠVERKO, 2011.).

Proces LPO završava terminacijom, koja nastaje reakcijom slobodnih radikala ili pak zaštitnim djelovanjem antioksidansa.

Proizvodi lipidne peroksidacije

Lipidna peroksidacija često nastaje kao odgovor na oksidacijski stres, a uključena je u mnogobrojna patološka stanja: upale, uključujući aterosklerozu, neurodegenerativne bolesti, karcinome i neplodnost. Tijekom lipidne peroksidacije dolazi do razgradnje primarnih proizvoda LPO te nastanka sekundarnih proizvoda, raznih aldehida (GIROTTI, 1998.; GUÉRAUD i sur., 2010.). Neki su od tih aldehida izrazito reaktivni i mogu se smatrati drugim toksičnim agensima, koji se šire i povećavaju oštećenja započeta slobodnim radikalima. U usporedbi sa slobodnim radikalima, aldehidi su relativno stabilni i mogu difundirati u stanice ili čak izaći iz stanica u kojima su nastali te „napasti mete“ daleko od mjesta njihovog nastanka. Nastali citotoksični aldehidi pokazuju veliku reaktivnost s biomolekulama, kao što su bjelančevine, DNK i fosfolipidi. Aldehidi koji su do sada najintenzivnije proučavani jesu: 4-hidroksi-2-nonenal (4-HNE) i 4-hidroksi-2-heksanal (HHE) te ketoaldehidi malondialdehid (MDA) i glioksal, koji su biološki aktivni i reagiraju sa raznim staničnim komponentama i enzimima (UCHIDA, 2003.; CATALÁ, 2006.; ŠVERKO, 2011.).

Biološke implikacije proizvoda lipidne peroksidacije na spermije

Lipidna je peroksidacija višestruko nezasićenih masnih kiselina u staničnoj membrani spermija autokatalitička samopropagirajuća reakcija, koja može uzrokovati stanične disfunkcije povezane s gubitkom integriteta stanične membrane te može poremetiti sve spomenute funkcije spermija, a gdjekad i potpuno inhibirati spermatogenezu. Lipidna

peroksidacija bioloških membrana uzrokuje umanjenje funkcionalnosti membrane, smanjenje fluidnosti, opadanje vrijednosti membranskog potencijala, inaktivaciju enzima i receptora vezanih na membranu i povećanje nespecifične propusnosti iona. Smanjenje fluidnosti, odnosno rigidnost stanične membrane može uzrokovati rupturu membrane i gubitak staničnog sadržaja (ŠTEFAN i sur., 2007.; CATALÁ, 2009.; CATALÁ, 2010.). Dokazano je da djelomično smanjenje plodnosti spermija može biti posljedica oksidativnih oštećenja nastalih prekomjernim stvaranjem ROS-a, lipidne peroksidacije membrana i apoptoze, te time smanjenja broja spermija i kakvoće sjemena (KOWALOWKA i sur., 2008.; KUMARESAN i sur, 2009.; ZAKOŠEK PIPAN i sur., 2014.).

Oksidacijski se stres može definirati kao nesrazmjer između prooksidansa i antioksidansa u korist oksidansa (SIES, 1997.). Prooksidansi uključuju sve čimbenike koji imaju aktivnu funkciju u pojačanom stvaranju slobodnih radikala i drugih reaktivnih kisikovih spojeva, primjerice stanični mehanizmi (mitohondrijsko disanje, specifični enzimi), kao i egzogeni čimbenici (zračenje, višestruko nezasićene masne kiseline, onečišćenje zraka, lijekovi i sl.). Poremećaj ravnoteže između stvaranja i eliminacije ROS-a uzrokuje oksidacijski stres, a može nastati kao posljedica povećanog stvaranja oksidansa i/ili smanjene antioksidacijske zaštite. Organizam nastoji nadvladati oksidacijski stres povećanom sintezom antioksidansa. Nenadvladani oksidacijski stres ima posljedice, odnosno oštećenja, ovisno o tipu stanica u zahvaćenom tkivu/organu, i o intenzitetu (jačini i duljini trajanja) oksidativnog oštećenja, a može doprinijeti nastanku bolesti poremetnjom regulacije u prijenosu signala i/ili oksidativnom oštećenju staničnih makromolekula (masti, bjelančevina, DNK, RNK, ugljikohidrata) koji nadmašuje stanični kapacitet za regeneraciju i popravak oštećenih molekula (WELLS i sur., 2009.). Stoga posljedice nenadvladanog oksidacijskog stresa jesu poremetnje u fluidnosti i propusnosti membrana, ionskom transportu, staničnoj signalizaciji, ekspresiji gena i sintezi bjelančevina, zatim u razvoju mutacija, kancerogenezi (aktivacija ili inhibicija proliferacije stanica) te staničnoj smrti (HALLIWELL i GUTTERIDGE, 2007.).

Pomak u korist prooksidansa, odnosno pojačano stvaranje slobodnih radikala i drugih reaktivnih kisikovih spojeva, u spermi i vaginalnom sekretu može prouzročiti oksidacijski stres spermija. Kronična se asimptomatska urogenitalna upala može smatrati stanjem koje uzrokuje oksidacijski stres, a možebitna je posljedica idiopatska neplodnost.

Biološke implikacije proizvoda lipidne peroksidacije i ROS-a na bjelančevine i nukleinske kiseline spermija

Proizvodi LPO i ROS osim oštećenja na membrani spermija mogu prouzročiti oštećenja DNK-a i bjelančevina, koja mijenjaju strukturu i funkciju spermija te povećavaju osjetljivost spermija prema majčinskim makrofagima (AITKEN i sur., 1994.). Oksidativno se oštećenje mitohondrijske DNK-a zbiva u svim aerobnim stanicama koje su bogate mitohondrijima, što uključuje i spermije. Osim toga, redoks stanje spermija utječe na fosforilaciju i stvaranje ATP-a, koje pak utječu na oplodni potencijala spermija (CUMMINS i sur., 1994.).

Tijekom oksidacije bjelančevina nastaje mnoštvo fizikalnih i biokemijskih promjena kao što su primjerice: povećanje osjetljivosti oksidiranih bjelančevina na proteolitičku enzimsku razgradnju, promjene mehaničkih svojstava, promjene u građi, povećanje hidrofobnosti, promjena u vezanju kočimbenika te metalnih iona i drugo. Slobodni radikali stvaraju unakrsne veze među bjelančevinama i agregate velikih molekularnih masa, fragmentiraju bjelančevine, oksidiraju okosnice polipeptidnih lanaca uslijed čega dolazi do promjena enzimske aktivnosti i ionskog transporta (DAVIES, 2003.). Slobodni radikali u enzimima oksidiraju sulfhidrilne skupine (-SH-) aminokiselina, uzrokuju disocijaciju peptidnih veza što dovodi do promjene u katalitičkom djelovanju, toplinskoj stabilnosti te proteolitičkoj osjetljivosti. Sve su aminokiseline podložne na oksidaciju $OH^{\bullet}$ skupinu, a osobito one koje sadrže sumpor poput cisteina i metionina (BERLETT i STADTMAN, 1997.; LJUBIČIĆ i sur., 2013.). Djelovanjem slobodnih radikala mogu nastati oksidacijska oštećenja nukleinskih kiselina disocijacijom šećera i modifikacijom purinskih i pirimidinskih baza, te nadalje oduzimanjem H atom iz metilne skupine što uzrokuje pucanje prstenova baza u molekuli DNK-a. Posljedice štetnog učinka slobodnih radikala na DNK su greške pri replikaciji, translaciji i inhibiciji sinteze bjelančevina, ekspresiji gena, što izaziva mutacije i posljedičnu kancerogenezu i/ili apoptozu (COOKE i sur., 2003.). Oštećenja DNK-a bivaju popravljena sustavom za reparaciju, a ukoliko reparacija izostane mogu nastati mutacije, apoptoza ili pak razvoj tumorskih bolesti. Modificirane bjelančevine i masti su funkcionalno neaktivne molekule koje se zamjenjuju uobičajenim staničnim sustavom zamjene molekula ili se pak nakupljaju te uzrokuju razna oštećenja i oboljenja, dok je oštećenje DNK-a neophodno reparirati (EVANS i sur., 2004.; LJUBIČIĆ i sur., 2013.).

Štetni učinci lipidne peroksidacije na funkciju spermija

Prekomjerno stvaranje ROS-a u ejakulatu možebitni je uzrok neplodnosti, a stvaraju ih uglavnom neutrofili, ali i abnormalni spermiji (DE LAMIRANDE i GAGNON, 1995.). Veća je koncentracija ROS-a povezana sa smanjenim brojem gibljivih spermija, dok je veći broj gibljivih spermija opažen u uzorku sjemena s manjom koncentracijom ROS-a (IWASAKI i GAGNON, 1992.). Isti su autori ustvrdili da patološki oblici spermija stvaraju reaktivne kisikove spojeve. Velika koncentracija vodikovog peroksida inducira lipidnu peroksidaciju i rezultira staničnom smrti spermija.

Smanjenje mitohondrijskog membranskog potencijala (MMP) povezano je s povećanim stvaranjem ROS-a u spermijima. Pojedinci s lošim pokazateljima kakvoće ejakulata (smanjena gibljivost, mala gustoća, smanjeni postotak morfološki normalnih spermija) imali su značajno niži MMP (WANG i sur., 2003a.).

Neplodni su muškraci imali snižene vrijednosti pokazatelja kakvoće sperme prouzročene većom koncentracijom ROS-a u ejakulatu. U neplodnih muškaraca postoji pozitivna korelacija između povećanog oštećenja spermija ROS-om i povećane aktivnosti citokroma C, kaspaza 9 i 3, koji upućuju na apoptozu (WANG i sur., 2003b.).

Prekomjerno stvaranje slobodnih radikala često ima za posljedicu greške u spermiogenezi, koje rezultiraju oslobađanjem spermija iz germinalnog epitela, koji pak imaju citoplazmatsku retenciju u neprimjereno velikom stupnju. Suvišak citoplazme sadrži enzime koji potiču dodatno stvaranje ROS-a u redoks sustavu stanične membrane spermija. Gubitak funkcije spermija nastao je uslijed lipidne peroksidacije nezasićenih masnih kiselina u staničnoj membrani spermija, stoga stanična membrana gubi fluidnost, a stanice funkciju (AITKEN i SAWYER, 2003.). Osim navedenog, posljedice oksidacijskog stresa uključuju gubitak gibljivosti i fertilizacijski potencijal te indukciju DNK-a oštećenja u jezgri spermija. Endogeno je oksidacijsko oštećenje DNK-a zametnih stanica povezano s ranim prekidom trudnoće, nasljednim mutacijama, genetskim bolestima i povećanom učestalošću urođenih psihofizičkih mana, morbiditetom u potomaka i karcinomima u djetinjstvu. Većina DNK-a oštećenja se popravi, ali oštećeni se dijelovi mogu ispoljiti kao mutacije tijekom DNK-a replikacije koja prati diobu stanica u spermatogenezi, oogenezi i embriogenezi.

H_2O_2 izravno utječe na funkcije spermija napose na proces oplodnje. Male koncentracije podržavaju kapacitaciju, dok velike koncentracije imaju štetne učinke, koji pak ovise o promjenama stanične membrane i unutarstaničnoj homeostazi oksidativnih procesa (OEHNINGER i sur., 1995.).

Oksidacijski je stres rezultirao značajnim gubitkom gibljivosti i inducirao oštećenja DNK-a u perkolom izdvojenih populaciji vrlo gibljivih spermija. Subletalni učinci oksidativnog stresa na gibljivost spermija su povezani s membranskom translokacijom fosfatidilserina u staničnoj membrani spermija, koja je rani pokazatelj poremećaja funkcije membrane povezanog s apoptozom (KEMAL DURU i sur., 2000.).

Oksidacijski stres induciran leukocitima ima štetan učinak na višestruko nezasićene masne kiseline u fosfolipidima spermija, što pak može rezultirati smanjenjem fluidnosti stanične membrane (ZALATA i sur., 1998.).

Pozitivni učinci slobodnih radikala

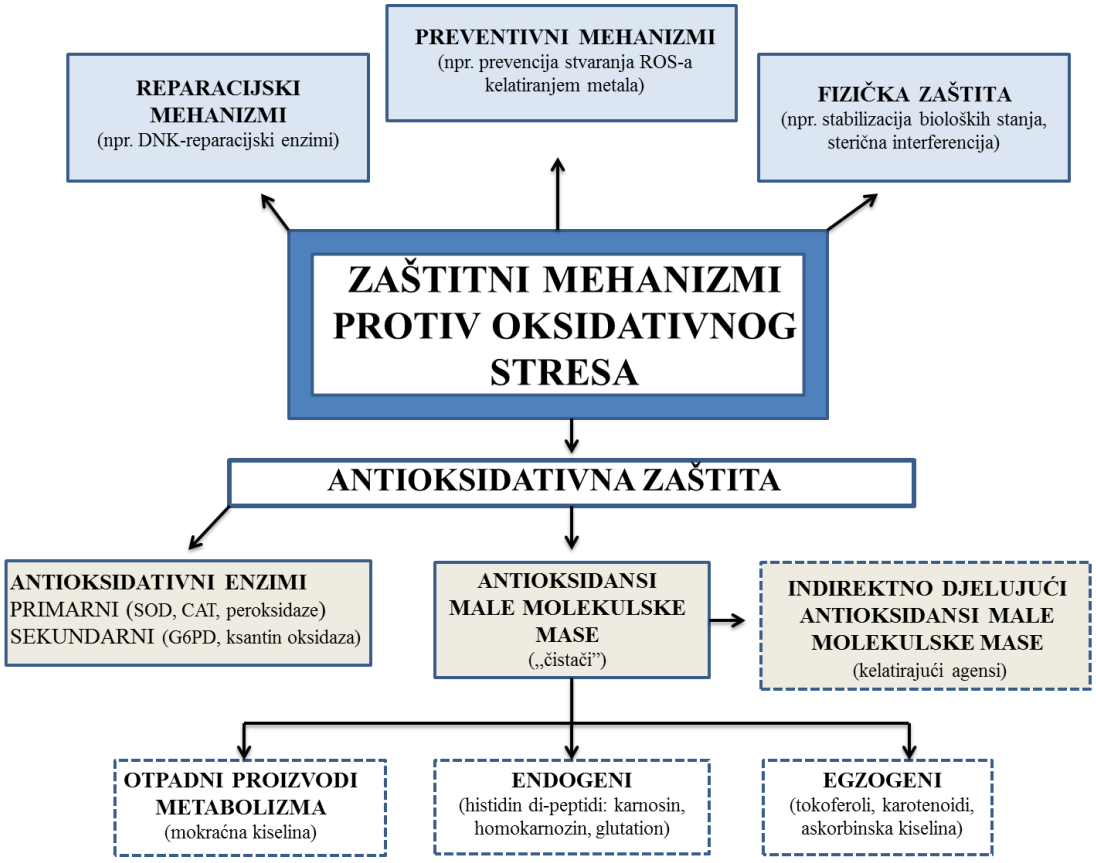
ROS se fiziološki stvaraju tijekom staničnog metabolizma. Mitohondrijski je respiratorni lanac najznačajniji biološki izvor superoksidnog anionskog radikala u fiziološkim uvjetima. Tijekom tetravalentne redukcije kisika do vode pomoću mitohondrijske citokrom c oksidaze, navedeni radikali mogu istjecati iz mitohondrija u stanicu. Male koncentracije reaktivnih oksidansa imaju pozitivan učinak i djeluju selektivno (DE LAMIRANDE i sur., 1997.), i to na metabolizam protuupalnih prostanoida (derivati arahidonske kiseline) u regulaciji gena ili u regulaciji staničnog rasta, unutarstaničnoj signalizaciji i ostalih vrsta prijenosa signala. Štoviše, slobodni radikali kisika imaju važnu funkciju u regulaciji vazotonusa i antimikrobnoj zaštiti. Određene količine ROS-a imaju utjecaj u regulaciji funkcije spermija. Male količine slobodnih radikala u ejakulatu poboljšavaju sposobnost spermija da se vežu za *zona pellucidu*. Nadalje, inkubacija spermija s malim koncentracijama vodikovog peroksida stimulira kapacitaciju spermija, hiperaktivaciju, akrosomsku reakciju i fuziju s oocitom (DE LAMIRANDE i GAGNON, 1993.; GRIVEAU i LE LANNOU, 1997.; SANOCKA i KURPISZ, 2004.).

2.4. ANTIOKSIDACIJSKI ZAŠTITNI MEHANIZMI

Oksidacijski je stres, odnosno prekomjerno stvaranje ROS-a u ejakulatu, jedan od najučestalijih uzroka neplodnosti u mužjaka. Stoga je u normalnim, fiziološkim uvjetima za preživljavanje i normalnu funkciju spermija, neophodna osjetljiva ravnoteža između stvaranja i uklanjanja slobodnih radikala (SHINDE i sur., 2012.).

Kako bi spriječio štetne posljedice koje se zbivaju u stanici, organizam/stanica je razvio nekoliko mehanizama kojima neutralizira oksidativni stres, primjerice prevenciju od

oštećenja, reparabilni procesi sanacije oksidativnih oštećenja, mehanizam fizičke zaštite oštećenja te najznačajniji antioksidacijski zaštitni mehanizmi (Slika 2.5.).



Slika 2.5. Podjela unutar staničnih zaštitnih antioksidacijskih mehanizama (prema KOHEN i NYSKA, 2002.)

Učinci su ROS i dušika uravnoteženi s učinkom enzimskih i neenzimskih antioksidansa. Takva je antioksidativna obrana iznimno važna, jer predstavlja izravno uklanjanje slobodnih radikala (prooksidansa), čime se osigurava primjerena zaštita sustava (VALKO i sur., 2006.).

Antioksidansi su tvari koje štite stanice od oštećenja uzrokovanih slobodnim radikalima. Interferencijom antioksidansi stabiliziraju slobodne radikale te tako spriječavaju neželjene učinke slobodnih radikala (SHINDE i sur., 2012.).

Značajke učinkovitih antioksidansa:

- specifično interferiranje u neutraliziranju učinaka slobodnih radikala,
- keliranje redoks metala,
- regeneracija u interakciji s drugim antioksidansima unutar "antioksidativne mreže",
- pozitivan učinak na ekspresiju gena,
- lako se apsorbiraju,

- koncentracija u tkivima i biološkim tekućinama na fiziološki učinkovitoj razini,
- djeluju u vodenom i/ili membranskom okružju (VALKO i sur., 2006.).

Određeni antioksidansi mogu regenerirati drugi antioksidans i tako obnoviti svoju prvobitnu funkciju. Ovaj se proces naziva "antioksidativna mreža" (SIES i sur., 2005.). Redoks ciklusi vitamina E i C tvore takvu antioksidativnu mrežu. Primjerice koenzim Q10 regenerira vitamin E, a lipoična kiselina regenerira vitamin E, vitamin C, koenzim Q10 i glutation čime se sprječava oštećenje lipidnog sloja stanične membrane (ŠVERKO, 2011.).
Temeljem teorije oksidacijskog stresa antioksidansi su primarni u sanaciji stresa nastalog uslijed djelovanja slobodnih radikala (RAHAL i sur., 2014.). Endogeni se antioksidansi stalno stvaraju u organizmu te se dijele na enzimske i neenzimske molekule, koje su umrežene i djeluju interaktivno, a obično su raspoređene u citoplazmi i različitim staničnim organelama, ali se nalaze i u izvanstaničnoj tekućini. Endogeni i egzogeni antioksidansi neutraliziraju djelovanje slobodnih radikala, pa stoga utječu na stvaranje učinkovitijeg imunosnog odgovora, a smanjuju rizik od karcinoma, degenerativnih oboljenja, teod pojave neplodnosi jedinki (YADAV i sur., 2006.; PHAM-HUY i sur., 2008.; SHINDE i sur., 2012.). Eukariotski organizmi posjeduju nekoliko sveprisutnih primarnih antioksidativnih enzima, kao što su superoksid dismutaza, katalaza i glutation peroksidaza, koji kataliziraju kompleks kaskada u reakcijama gdje dolazi do pretvorbe ROS-a u stabilnije molekule vode i kisika, a za što su im potrebni elementi u tragovima (selen, željezo, bakar, cink i magnezij) kao kočimbenici (YOUNG i WOODSIDE, 2001.; RAHAL i sur., 2014.). Izuzev primarnih antioksidansa, veliki broj sekundarnih enzima djeluje u uskoj interakciji s antioksidansima male molekulske mase, kako bi formirali redoks cikluse, koji osiguravaju potrebne kočimbenike za osnovne funkcije enzimskih antioksidansa. Neenzimski su antioksidansi podijeljeni u endogene (metaboličke) i egzogene (unesene hranom). Endogeni antioksidansi uključuju lipoičnu kiselinu, glutation, L-arginin, mokraćnu kiselinu, bilirubin, koenzim Q10, melatonin, bjelančevine male molekulske mase, koje vežu teške metale (metal-kelatirajuće bjelančevine), transferin, itd. (KOHEN i NYSKA, 2002.; PHAM-HUY i sur., 2008.). Egzogeni antioksidansi (nutrijenti) su spojevi koji se ne mogu proizvesti u tijelu te se moraju unijeti hranom i/ili dodacima hrani, a mogu biti prirodni i sintetski, primjerice vitamin E, vitamin C, karotenoidi, flavonoidi, likopen, elementi u tragovima (Se, Cu, Zn, Mn) (SHINDE i sur., 2012.).

Antioksidacijski sustav štiteći stanice od prekomjerne koncentracije slobodnih radikala djeluje na tri zaštitne razine (Slika 2.6.), koji se sastoji od:

- antioksidansa topljivih u mastima (vitamin A, E, karotenoidi, ubikinoni, itd.),
- antioksidansa topljivih u vodi (vitamin C, mokraćna kiselina, taurin, itd.),

- antioksidativnih enzima (GSH-Px, CAT, SOD),
- tiol redoks sustava, a kojega čine sustav glutationa (glutation/glutation reduktaza/glutaredoksin/glutation peroksidaza) i sustav tioredoksina (tioredoksin/ tioredoksin peroksidaza/ tioredoksin reduktaza) (SURAI, 2006.).



Slika 2.6. Zaštitne razine antioksidacijskog sustava (prema SURAI, 2006.).

Liposolubilni su „čistači“ smješteni u staničnim membranama i lipoproteinima, a čine ih vitamin E (α-tokoferol), provitamin vitamina A (β-karoten) i koenzim Q10.

Hidrosolubilni „čistači“ nalaze se u vodenom okružju, izvanjskom ili unutarstaničnom prostoru, a čine ih: vitamin C (askorbinska kiselina), reducirani glutation (GSH), mokraćna kiselina, ureja te albumini, transferin, ceruloplazmin, feritin, bilirubin, biliverdin, cistein, histidin i laktoferin (SURAI, 2006.; LJUBIČIĆ i sur., 2013.).

Spermiji nerasta, u fosfolipidima stanične membrane, sadrže velike količine višestruko nezasićenih masnih kiselina te imaju relativno mali antioksidativni kapacitet, što ih čini, vrlo osjetljivima na oksidativna oštećenja (SANOCKA i KURPISZ, 2004.; KOWALOWKA i sur., 2008.). Oksidativni se status u stanici održava enzimskim i neenzimskim antioksidansima osiguravajući optimalnu količinu ROS-a koja je neophodna za fiziološku funkciju spermija.

Antioksidansi su smješteni uglavnom u središnjem dijelu spermija, području oskudnom sa citoplazmom, te u tekućinama akcesornih spolnih žlijezda. Oskudni volumen citoplazme u središnjem dijelu spermija, ograničava i antioksidacijski kapacitet, stoga postoje ograničeni endogeni mehanizmi spermija koji nastoje poništiti nastala oštećenja. Izuzev navedenog, antioksidativni enzimi koji se nalaze u središnjem dijelu spermija ne mogu osigurati zaštitu membranskih lipida u glavi i repu spermija od peroksidativnog oštećenja (AITKEN, 1995.; KOWALOWKA i sur., 2008.). Spermiji ovise i o izvanstaničnoj antioksidativnoj zaštiti, koja je u interakciji s biokemijskim sastojcima sjemene plazme (KOWALOWKA i sur., 2008.; ZAKOŠEK PIPAN i sur., 2014.). Spermiji u aerobnim uvjetima tijekom normalnih metaboličkih procesa stvaraju ROS, a izloženi su visokoj razini kisika tijekom prolaska kroz muški i ženski spolni sustav te tijekom procesa oplodnje, no istodobno u ejakulatu postoje višestruki mehanizmi za zaštitu od oksidativnih oštećenja, unutarstanični i izvanstanični antioksidativni enzimski i neenzimski sustav. Enzimski antioksidansi i antioksidansi male molekulske mase uklanjaju slobodne radikale kao mehanizam samozaštite (ALVAREZ i sur., 1987.; FRAGA i sur., 1991.; LEWIS i sur., 1995.). Spermiji sadrže antioksidativne enzime, kao što je superoksid dismutaza, katalaza i glutation peroksidaza, dok je sjemena plazma bogata i neenzimatskim antioksidansima male molekulske mase (primjerice L-glutation; glutation; L-ergotionein, ERT) (KOWALOWKA i sur., 2008.). Prisutnost i koncentracija antioksidansa u spermijima razlikuje se među životinjskim vrstama (STRZEZEK i sur., 2009.). Spermiji su u pastuha iznimno dobro zaštićeni od oštećenja prouzročenih ROS-om u usporedbi sa spermijima nerasta, koji imaju ograničen antioksidacijski sustav u usporedbi s drugim životinjskim vrstama (STRZEZEK i sur., 1999.; KOWALOWKA i sur., 2008.; STRZEZEK i sur., 2009.). Jednako je tako, i enzimski antioksidativni zaštitni sustav protiv ROS-a u spermija nerasta vrlo oskudan za razliku od mužjaka drugih vrsta, te ga čine velika aktivnost SOD-a i mala aktivnost GSH-Px. Katalaza nije nađena u spermijima nerasta i pasa (STRZEZEK i sur., 2009.). Spermiji pastuha, za razliku od nerasta, imaju kompletni enzimski obrambeni sustav protiv ROS-a (SOD, CAT, GSH-Px), dok u psa spermiji i spermalna frakcija ejakulata sadrže uglavnom SOD (STRZEZEK i sur., 2009.). U ispranim spermijima psa utvrđena je i fosfolipidna hidroperoksidna glutation peroksidaza (PHGSH-Px), čija je aktivnost mala u zrelih spermija. Obzirom da spermiji nerasta imaju slabu enzimsku antioksidativnu zaštitu, taj nedostatak je nadoknađen antioksidansima male molekulske mase i to GSH i ERT. Navedeni su antioksidansi male molekulske mase u spermijima pastuha prisutni u znatno većoj koncentraciji nego u nerasta (STRZEZEK i sur., 2009.).

Različite se životinjske vrste razlikuju u antioksidativnoj obrani protiv oksidativnog oštećenja i u sjemenoj plazmi (STRZEZEK i sur., 1999.; KOWALOWKA i sur., 2008.). Među enzimskim antioksidansima u sjemenoj plazmi pastuha CAT ima najveću aktivnost (STRZEZEK i sur., 2009.; KOWALOWKA i sur., 2008.). Osim prisustva velike aktivnosti SOD-a u sjemenoj plazmi nerasta, enzimi iz skupine glutation peroksidaza nalaze su u ograničenim količinama. Uslijed nedostatka aktivnosti katalaze u spermijima i sjemenoj plazmi nerasta, zaštitu spermija protiv ROS-a pruža uglavnom antioksidacijski sustav sjemene plazme. Prethodna su istraživanja pokazala da antioksidativna svojstva čine bjelančevine sjemene plazme, a to su cink-ovisni vezikularni proteini, L-askorbinska kiselina i antioksidansi male molekulske mase primjerice GSH i ERT, koji imaju važnu funkciju u detoksikaciji ROS-a (STRZEZEK i sur., 1999.; STRZEZEK i sur., 2009.). U sjemenu pastuha, GSH i ERT su prisutni u velikim količinama (MRUK i sur., 2002.), dok su u sjemenoj plazmi nerasta zabilježene manje koncentracije GSH i ERT. Jednako tako, prethodna su istraživanja pokazala da dodavanje GSH u razrjeđivače sjemena ima blagotvoran učinak na pohranjeno sjeme u tekućem obliku te na kakvoću sjemena i oplodnu sposobnosti nakon otapanja sperme (FUNAHASHI i SANO, 2005.). Važno je napomenuti da GSH štiti spermije od oksidativnog oštećenja, ali ima i funkciju u stabilizaciji SH-skupine u molekulama bjelančevina. Smatra se da specifična antioksidativna svojstva bjelančevina sjemene plazme te prisustvo velike aktivnosti SOD-a u sjemenu nerasta nadoknađuju nedostatak antioksidansa male molekulske mase (KOWALOWKA i sur., 2008.; ZAKOŠEK PIPAN i sur., 2014.). Istraživanje KOWALOWKA i sur. (2008.) ukazuje na važnost zaštite SH-skupine katalitičkom aktivnosti SOD koja je prisutna u sjemenoj plazmi nerasta. SOD je najznačajniji antioksidans u sjemenoj plazmi nerasta te ima najveći kapacitet u uklanjanju slobodnih radikala, a razina aktivnosti SOD-a u sjemenoj plazmi oscilira tijekom godišnjih doba, te je znatno veća u proljeće i jesen, vjerojatno zbog razlika u pasmini, starosti nerasta ili individualnim varijacijama među jedinkama (KOWALOWKA i sur., 2008.; KOZIOROWSKA-GILUN i sur., 2011a.). Iako se GSH-Px aktivnost u sjemenoj plazmi nije značajno mijenjala pod utjecajem godišnjeg doba, veća je GSH-Px aktivnost zabilježena u proljetnim i ljetnim razdobljima (KOZIOROWSKA-GILUN i sur., 2011a.). Važno je napomenuti da SOD, CAT i GSH-Px predstavlja prvu liniju obrane od štetnih učinaka ROS-a u reproduktivnom sustavu nerasta (STRZEZEK i sur., 1999.; SIKKA, 2004.; VERNET i sur., 2004.; KOWALOWKA i sur., 2008.; KOZIOROWSKA-GILUN i sur., 2011b.). Smanjenje antioksidativnog kapaciteta u sjemenoj plazmi povezano je s pojačanom lipidnom peroksidacijom u membrani spermija, što rezultira oštećenjem oplodne sposobnost spermija.

Koncentracija je ukupnog antioksidacijskog statusa (engl. total antioxidant status, TAS) u sjemenoj plazmi nerasta iznosila 0,6 mM, dok je u pastuha iznosila 2,09 mM, i bile su veće od onih u psa (STRZEZEK i sur., 2009.). Moguće, da je razina TAS-a u sjemenoj plazmi i reproduktivnim tekućinama pod utjecajem antioksidativnog sustava, a sastoji se od SOD, CAT, GSH-Px i ukupnog reduciranog glutationa i oksidiranog disulfidnog glutationa (GSSG), koji štite spermije od lipidne peroksidacije (KOZIOROWSKA-GILUN i sur., 2011a.).

U nekim patološkim stanjima, kao što su primjerice upale reproduktivnoga sustava, hiperaktivirani leukociti i/ili morfološki abnormalni spermiji prekomjerno stvaraju ROS, što dovodi do oksidacijskog stresa ejakulata. Oksidacijski stres ejakulata može iscrpiti antioksidativnu aktivnost, što rezultira smanjenom gibljivošću spermija, uslijed naglog gubitka unutarstaničnog ATP-a, što uzrokuje oštećenja aksoneme, kraće vrijeme preživljavanja spermija, veći stupanj morfoloških oštećenja u središnjem dijelu spermija sa štetnim učincima na kapacitaciju i akrosomsku reakciju spermija (DE LAMIRANDE i GAGNON, 1992.). Lipidna se peroksidacija membrane spermija smatra ključnim mehanizmom oštećenja spermija, koji nastaje uslijed prekomjernog stvaranja ROS-a te može rezultirati neplodnošću (ALVAREZ i sur., 1987.). Neprimjereno male količine ROS-a jednako tako mogu rezultirati neplodnošću, tako što ometaju fiziološku funkciju ROS-a u regulaciji funkcija spermija.

Pri malim koncentracijama, ROS (superoksidni radikal, vodikov peroksid i dušikov oksid) imaju pozitivan učinak na spermije, potiču kapacitaciju spermija, hiperaktivaciju, akrosomsku reakciju, te signalizacijske procese koji osiguravaju oplodnju (AITKEN i sur., 1989.; AITKEN i sur., 1995.; FORD, 2004.). Međutim, prekomjerne količine ROS-a mogu poremetiti strukturu i funkciju stanične membrane spermija (AITKEN, 1995.) i uzrokovati oštećenja lipidnog matriksa, što je pak povezano sa smanjenom gibljivosti spermija (CHATTERJEE i GAGNON, 2001.; ZAKOŠEK PIPAN i sur., 2014.).

Iz svega navedenog proizlazi, da je za preživljavanje i normalnu funkciju spermija, neophodna osjetljiva ravnoteža između korisnih i štetnih učinaka ROS-a te antioksidansa.

ENZIMSKI ANTIOKSIDANSI

2.4.1. SUPEROKSID DISMUTAZA

Jedan od najučinkovitijih unutarstaničnih enzimskih antioksidansa je superoksid dismutaza (SOD). SOD je antioksidativni enzim koji katalizira dismutaciju superoksidnog radikala u kisik i u manje reaktivni vodikov peroksid. Peroksidi mogu biti razloženi reakcijom

katalaze ili glutation peroksidaze. SOD je antioksidativni enzim koji izravno djeluje na inhibiciju LPO spermija (ALVAREZ i sur., 1987.).

Premda je izoliran davne 1939. godine tek su 1969. godine Mc CORD i FRIDOVICH dokazali antioksidativni učinak SOD-a. Otkriće SOD-a dovelo je do razvoja teorije o superoksidnom radikalu kao glavnom čimbeniku odgovornom za toksičnost kisika, a SOD kao glavni zaštitni čimbenik protiv njega. Povećanjem koncentracije kisika raste i aktivnost SOD-a (FRIDOVICH, 1995.; HALLIWELL i GUTTERIDGE, 2007.).

SOD postoji u nekoliko izoformi, koje se razlikuju u svojstvima metalnog iona koji sadrže i aminokiselinskom sastavu, molekulskoj masi, kao i broju podjedinica, kočimbenika, lokalizaciji, mehanizmima regulacije i funkciji u specifičnim fiziološkim i patološkim procesima te drugim značajkama. U ljudi postoje tri oblika SOD-a: (1) citosolna ili bakar-cink superoksid dismutaza, (2) mitohondrijska i (3) izvanstanična SOD (EC-SOD) (LANDIS i TOWER, 2005.). SOD uništava $O_2^{\bullet-}$ s iznimno visokim stupnjem reakcija, uzastopnom oksidacijom i redukcijom iona prijelaznog metala u aktivnom mjestu u "ping-pong" mehanizmu (MATES i sur., 1999.).

$$O_2^{\bullet-} + O_2^{\bullet-} + 2H^+ \longrightarrow H_2O_2 + O_2$$

Bakar-cink superoksid dismutaza je enzim s molekulskom masom oko 32 kDa, a sastoji se od dvije identične podjedinice (homodimera) te je prisutan u gotovo svim eukariotskim stanicama (eritrociti, hepatociti, neuroni, miokardiociti, spermiji, itd.) (MATES i sur., 1999.). CuZnSOD u sisavaca je napose eksprimirana u stanicama jetre, bubrega i u motoričkim neuronima (ASAYAMA i BURR, 1985.; PARDO i sur. 1995.; TODOROVIĆ, 2013.). Lokalizirana je u citosolu, ali je prisutna i u lizosomima, nukleusu i u prostoru između unutarnje i izvanjske membrane mitohondrija te u peroksisomima (OKADO-MATSUMOTO i FRIDOVICH, 2001.). CuZnSOD specifično katalizira dismutaciju superoksidnog aniona u kisik i vodikov peroksid. Svaka podjedinica sadrži u aktivnom mjestu klaster iona bakra i cinka. Bakar u aktivnom mjestu enzima omogućava odvijanje katalitičke aktivnosti, a cink stabilizaciju prostorne konformacije (ŠVERKO, 2011.). Aktivnost je enzima napose u goveđim eritrocitima relativno neovisna o pH (5 - 9,5), a vrlo je stabilana i otporana na djelovanje proteaza (VALKO i sur., 2006.; HALLIWELL i GUTTERIDGE, 2007.). Obzirom da je enzim prisutan u mnogim tkivima, mnoga su oboljenja povezana s promjenom funkcije ovog enzima (ŠVERKO, 2011.). MnSOD "knock-out" miševi ugibaju u prvih 10 dana života uslijed nedostatka MnSOD enzima, dok su CuZnSOD "knock-out" miševi zdravi sve do

nastanka traumatskih oštećenja. Eliminacija funkcionalnog gena za CuZnSOD dovodi do neplodnosti ženki (MATZUK i sur. 1998.), hepatokancerogeneze (ELCHURI i sur. 2005.), oštećenja jetre uzrokovana alkoholom (KESSOVA i sur. 2003.) i skraćenjem životnog vijeka u ovih životinja (ELCHURI i sur. 2005.; TODOROVIĆ, 2013.).

Mitohondrijska superoksid dismutaza je homotetramer molekulske mase oko 96 kDa, koji sadrži jedan atom mangana po podjedinici (MATES i sur., 1999.). U ciklusu od Mn (III) do Mn (II), a potom opet do Mn (III), MnSOD dismutira superoksid u dva koraka. Iako je MnSOD labilnija na denaturaciju zagrijavanjem, organskim otapalima i deterdžentima, te se ne inhibira cijanidom, njezina aktivnost opada u alkalnom pH, te se u mnogim značajkama razlikuje od CuZnSOD, ali dismutira superoksid kao i CuZnSOD. Rasprostranjena je u bakterija, biljka i životinja u raznim tkivima, a nalazi se u matriksu mitohondrija. U prokariota je MnSOD smještena u citoplazmi (STEINMAN i sur. 1994.; TODOROVIĆ, 2013.). Aktivnost MnSOD i CuZnSOD ovisi o tkivu i o vrsti, dok MnSOD ovisi i o broju mitohondrija u nekom tkivu. Zreli eritrociti sisavaca nemaju MnSOD jer nemaju mitohondrije i ostale organele, no MnSOD čini oko 10% ukupne SOD u jetri štakora (HALLIWELL i GUTTERIDGE, 2007.). Aktivnost MnSOD unutar stanice jednaka je intenzitetu metaboličke aktivnosti tkiva, stoga je najviša aktivnost ovog enzima u srcu, mozgu, jetri i bubrezima (HALLIWELL i GUTTERIDGE, 2007.; TODOROVIĆ, 2013.).

Mitohondriji čine primarno mjesto proizvodnje superoksida tijekom procesa staničnog disanja uslijed „bijega“ elektrona u lancu oksidativne fosforilacije. Stoga je MnSOD najznačajniji enzim u uklanjanju superoksida unutar mitohondrijskog matriksa i smatra se ključnim enzimom koji deaktivira i detoksicira ROS u stanici, a nužan je za preživljavanje organizma i proizvodnju ATP-a u okruženju bogatom kisikom (ZHU i sur., 2012.). Od sve tri izoforme SOD-a, MnSOD je jedina neophodna za opstanak aerobnih organizama (CARLIOZ i TOUATI, 1986.; TODOROVIĆ, 2013.). Značaj MnSOD-a potvrđuju i istraživanja na MnSOD „knock-out“ miševima koji su ugibali ubrzo nakon rođenja s izraženim neurodegenerativnim poremećajima i kardiopatijama (LEBOVITZ i sur., 1996.). Osim za opstanak u aerobnoj sredini, funkcija je MnSOD potvrđena u nastanku i razvoju velikog broja bolesti i patoloških stanja.

Izvanstanična superoksid dismutaza je sekrecijski, homotetramerni glikoprotein molekulske mase 135 kDa, s velikim afinitetom za određene glikozaminoglikane kao heparin i heparin sulfat (MATES i sur., 1999.). EC-SOD kao i izoenzim CuZnSOD sadrži bakar i cink, a inhibira ga cijanid. Prvi je put otkrivena u izvanstaničnoj tekućini po čemu je i dobila ime, a čini većinu ukupne SOD aktivnosti u plazmi, limfi i sinovijalnoj tekućini

(MARKLUND, 1982.). Najnižu aktivnost u tkivima među izoenzimima ima EC-SOD (MARKLUND, 1982.), izuzev u maternici gdje je njena aktivnost veća od aktivnosti MnSOD (MARKLUND, 1984a.). Najviša je aktivnost ovog enzima u ljudi zabilježena u krvnim žilama, plućima, maternici i štitastoj žlijezdi (MARKLUND, 1984b.). Raspodjela izvanstanične SOD u tkivima razlikuje se među vrstama, a najveća je aktivnost zabilježena u plućima i bubrezima, a najmanja u poprečnoprugastom mišiću. Gledano u cjelini, raspodjela se EC-SOD u tkivima razlikuje više između vrsta nego raspodjele CuZnSOD i MnSOD (MARKLUND, 1984b.). Ipak, 1 g ljudskog plućnoga tkiva sadrži nekoliko stotina jedinica EC-SOD dok plazma sadrži svega 30 jedinica/mL (MARKLUND, 1982.). Ekspresiju EC-SOD u tkivima sisavaca reguliraju citokini (MRUK i sur., 1998.; STRÅLIN i MARKLUND, 2000.), a ne odgovor pojedinih stanica na oksidanse (SANDSTRÖM i sur., 1994.; STRÅLIN i MARKLUND, 1994.). Katalitička je aktivnost EC-SOD povezana sa mnogim patofiziološkim procesima (TODOROVIĆ, 2013.). Rezultati istraživanja KOWALOWKA i sur. (2008.) ukazuju da je EC-SOD važan antioksidativni enzim u sjemenoj plazmi nerasta, koji ima važnu fiziološku funkciju u suzbijanju oksidativnog stresa u spermijima.

Potpuno drugačija SOD izoforma, koja sadrži nikal (Ni-SOD) u aktivnom centru, otkrivena je u Streptomyces i cijanobakterija. Ni-SOD je mala bjelančevina sa 117 aminokiselina koja ne pokazuje homolognost sekvenci s drugim SOD izoformama. Ni-SOD je tetramerni ili heksamerni enzim koji strukturno izgleda različito od drugih SOD izomera (WUERGES i sur., 2004.; HALLIWELL i GUTTERIDGE, 2007.).

U bakterija, algi, protista (tripanosoma) i nekih biljaka SOD je homodimer koji u aktivnom središtu podjedinica sadrži ion željeza (Fe-SOD), dok izoenzim FeZn-SOD s dvije podjedinice sadrži mangan, odnosno željezo (HALLIWELL i GUTTERIDGE, 2007.).

2.4.2. KATALAZA

Katalaza (CAT) je tetramerni enzim koji se sastoji od četiri identične tetraedarno razmještene podjedinice od 60 kDa, te sadrži jednu ferriprotoporfinsku skupinu po podjedinici, a molekulske je mase od oko 240 kDa (MATES i sur., 1999.; HALLIWELL i GUTTERIDGE, 2007.). CAT reagira vrlo učinkovito s vodikovim peroksidom kojega razlaže na vodu i molekularni kisik. U sisavaca pak CAT ima i peroksidativnu aktivnost te reagira i sa H donorima (metanol, etanol, mravlja kiselina ili fenoli) (AEBI, 1984.). Od svih atioksidativnih enzima CAT ima najveću sposobnost vezivanja te jedna molekula CAT može u minuti razložiti oko 6.000.000 molekula vodikovog peroksida na vodu i kisik (VALKO i

sur., 2006.). Nespecifični inhibitori CAT jesu azid, cijanid, peroksinitriti te hipoklorna kiselina, ali najučinkovitiji i najspecifičniji *in vivo* inhibitor je aminotriazol (HALLIWELL i GUTTERIDGE, 2007.).

$$2H_2O_2 \xrightarrow{CAT} 2H_2O + O_2$$

$$ROOH + AH_2 \xrightarrow{CAT} H_2O + ROH + A$$

Katalitička aktivnost; peroksidativna aktivnost pri čemu R označava neki od brojnih H donora

CAT je enzim prisutan u stanicama biljaka, životinja i aerobnih bakterija (MATES i sur., 1999.; VALKO i sur., 2006.). U životinja je prisutna u svim tkivima, ali najveća aktivnost katalaze zabilježena je u jetri, eritrocitima i kori bubrega, a niža aktivnost zabilježena je u mozgu, srcu i skeletnom mišićju, spermijima, iako ta aktivnost varira među različitim tipovima stanica. Eritrocite CAT štiti od vodikovog peroksida koji je nastao dismutacijom superoksidnog aniona autooksidacijom hemoglobina. Kako vodikov peroksid prolazi kroz membranu, CAT štititi tkiva od vodikovog peroksida absorbirajući ga u eritrocite, a potom ga neutralizira (WINTERBOURN i STERN, 1987.; HALLIWELL i GUTTERIDGE, 2007.). Vodikov je peroksid molekula bez naboja te nije jako reaktivan, ali njegova se toksičnost očituje kada ulazi u Haber-Weissovu ili Fentonovu reakciju koju kataliziraju prijelazni metali, a nastaje jako toksičan hidroksilni radikal ($OH^{\bullet}$).

CAT se nalazi u staničnim organelama, peroksisomima, a samo manjim djelom u mitohondrijima (VALKO i sur., 2006.). Neki od najznačajnijih metaboličkih funkcija peroksisoma jesu: β-oksidacija masnih kiselina, sinteza kolesterola i žučnih kiselina, a važni su i u metabolizmu purina, poliamina, amino kiselina, reaktivnih kisikovih vrsta (WALTON i PIZZITELLI, 2012.).

U životinja se vodikov peroksid neutralizira CAT-om i GSH-Px-om. CAT štiti stanice od vodikovog peroksida koji nastaje u peroksisomima, a onaj nastao u mitohondrijima, endoplazmatskoj mrežici i citoplazmi uklanja GSH-Px1 (HALLIWELL i GUTTERIDGE, 2007.; LJUBIČIĆ i sur., 2013.). GSH-Px ima značajnu funkciju u uklanjanju manjih (fizioloških) količina H_2O_2, dok se učinak CAT-a očituje pri većim koncentracijama H_2O_2, odnosno CAT i odgovorna je za razgradnju peroksida tijekom oksidacijskog stresa (HALLIWELL i GUTTERIDGE, 2007.; LJUBIČIĆ i sur., 2013.).

Transgenični miševi kojima je uklonjen gen za CAT fenotipski su normalne i zdrave životinje do 1 godine starosti. No, nakon traume dolazi do promjena u oksidativnoj

fosforilaciji mitohondrija u mozgu (HO i sur., 2004.; TODOROVIĆ, 2013.). Kako bi ustvrdili funkciju reaktivnih kisikovih spojeva u sisavaca i njihov utjecaj na duljinu životnog vijeka, SCHRINER i sur. (2005.) uzgojili su transgenične miševe koji hipereksprimiraju ljudsku CAT lokaliziranu u peroksisomima, nukleusu ili mitohondrijima (MCAT). Maksimalni životni vijek u MCAT životinja se u prosjeku povećao za 5 do 5,5 mjeseci. Srčane bolesti i katarakta razvijale su se starijoj dobi, oksidacijsko je oštećenje bilo manje, a smanjio se i razvoj mitohondrijske delecije. Rečeni rezultati podupiru teoriju da je starenje povezano sa slobodnim radikalima te potvrđuje da su mitohondriji izvor radikala (SCHRINER i sur., 2005.; TODOROVIĆ, 2013.).

Iako CAT nije neophodna za neke tipove stanica u normalnim uvjetima, ona ima važnu funkciju u stjecanju tolerancije na oksidacijski stres u adaptivnom odgovoru stanica. Preživljavanje se štakora izloženih 100%-tnom kisiku povećalo kada su im prije i tijekom izlaganja kisiku, intravenozno aplicirani liposomi koji sadrže SOD i CAT (TURRENS i sur., 1984.; MATES i sur., 1999.).

2.4.2. GLUTATION PEROKSIDAZA

Glutation peroksidaza pripada skupini filogenetski srodnih enzima, koja je prvi put otkrivena u životinjskom tkivu 1957. godine, a manje je prisutna u biljaka i bakterija. GSH-Px predstavlja drugu liniju obrane protiv lipidske peroksidacije, a desetljećima je poznato da GSH-Px katalizira reakciju redukcije vodikovog peroksida ili organskih hidroperoksida do vode i odgovarajućeg alkohola, uz oksidaciju reduciranog glutationa, koji je donor vodika. Tako je jedna od najvažnijih funkcija GSH-Px-a održavanju ravnoteže između ROS-a i antioksidansa, odnosno uključena je u uravnoteženje homeostaze H_2O_2 u signalnim kaskadama (ZHANG i sur., 2012.; BRIGELIUS-FLOHÉ i MAIORINO, 2013.).

$$H_2O_2 + 2GSH \xrightarrow{\text{GSH-Px}} GSSH + 2H_2O$$

$$ROOH + 2GSH \xrightarrow{\text{GSH-Px}} ROH + GSSH + H2O$$

Supstrat za katalitičku reakciju GSH-Px-a je H_2O_2; supstrat za katalitičku reakciju GSH-Px-a je organski peroksid ROOH, GSH-Px razgrađuje perokside na vodu (ili alkohol), uz istovremenu oksidaciju GSH.

U životinjskim je tkivima široko rasprostranjena, a uglavnom je specifična za GSH kao donor vodika. Izuzev vodikova peroksida, glutation peroksidaze mogu neutralizirati i druge perokside uz oksidaciju GSH, primjerice perokside masnih kiselina i sintetske perokside (kumil-hidroperoksid, tert(t)-butil-hidroperoksid) koji se koriste kao supstrati *in vitro*. Svi GSH-Px enzimi ne mogu neutralizirati perokside masnih kiselina, koji su esterificirani s lipidima u lipoproteinima i membranama, stoga ih enzim lipaza mora prethodno otpustiti s lipida. Glutation peroksidaze mogu biti inhibirane tiomalinskom kiselinom (CHAUDIERE i sur., 1984.). Najveća je ukupna aktivnost GSH-Px-a u ljudi i životinja u jetrenom tkivu, tkivu bubrega i u punoj krvi, a umjerena je njezina aktivnost u eritrocitima, srcu i mozgu, dok je najniža aktivnost u skeletnom mišićju, masnom tkivu i plazmi (HALLIWELL i GUTTERIDGE, 2007.). U sisavaca je poznato osam izoenzima GSH-Px-a, od kojih četiri pripadaju podskupini selen ovisne glutation peroksidaze (GSH-Px-1, GSH-Px-2, GSH-Px-3 i GSH-Px-4), a ostale četiri izoforme podskupini selen neovisne (GSH-Px-5, GSH-Px-6, GSH-Px-7 i GSH-Px-8). GSH-Px-6 je selenoprotein u ljudi, ali ne i u štakora i miševa (KRYUKOV i sur., 2003.), a eksprimira se u mirisnom (olfaktornom) epitelu (DEAR i sur., 1991.; BRIGELIUS-FLOHÉ i MAIORINO, 2013.). Te dvije podskupine enzima razlikuju se u nekoliko podjedinica, prirodi vezanja selena u aktivnom središtu i njihovom katalitičkom mehanizmu. U sisavaca selen ovisne glutation peroksidaze jesu selenoproteini sa selenocisteinom (Se-Cys) u katalitičkom centru, koje kataliziraju redukciju organskih i anorganskih peroksida za razliku od selen neovisnih glutation peroksidaza koje u aktivnom središtu nemaju Se-Cys te mogu reducirati samo organske perokside potpuno drugačijim mehanizmom (CHAMBERS i sur., 1986.; ZHANG i sur., 2012.; BRIGELIUS-FLOHÉ i MAIORINO, 2013.; TODOROVIĆ, 2013.). Osim po supstratnoj specifičnosti, ove izoforme se razlikuju i po staničnoj lokalizaciji, vrsti tkiva i genu koji ih kodira (TODOROVIĆ, 2013.).

GSH-Px djeluje zajedno s glutationom, koji je tripeptid, a u stanicama se nalazi u velikim koncentracijama. GSH-Px je najznačajniji antioksiativni enzim u zaštiti protiv niske razine oksidacijskog stresa, dok je CAT značajna za neposredno uklanjanje H_2O_2 tijekom pojačanog oksidacijskog stresa (VALKO i sur., 2006.).

Citosolna i mitohondrijska glutation peroksidaza (CGSH-Px ili GSH-Px-1) je ubikvitarni homotetramerni enzim koji u katalitičkom središtu sadrži selenocistein u svakoj od četiri identične podjedinice. Molekulska masa pročišćene GSH-Px-1 u sisavaca iznosi od 83 do 95 kDa, a podjedinica oko 22-23 kDa (AWASTHI i sur., 1975.; LUBOS i sur., 2011.). GSH-Px-1 koristi GSH kao obligatni kočimbenik tijekom redukcije vodikova peroksida do

vode, štiteći stanice od oksidativnih oštećenja. Osim vodikovog peroksida GSH-Px-1 razlaže topljive sintetske hidroperokside male molekulske mase, primjerice kumil-hidroperoksid i tert(t)-butil-hidroperoksid, lipidne hidroperokside, peroksinitrite i druge topljive hidroperokside nakon otpuštanja s membranskih lipida (HALLIWELL i GUTTERIDGE, 2007.; LUBOS i sur., 2011.; BRIGELIUS-FLOHÉ i MAIORINO, 2013.). GSH-Px-1 (glutation: vodikov peroksid-oxidoreduktaza) je prvi put opisana 1957. godine kao eritrocitni enzim koji štiti hemoglobin od oksidativnog oštećenja (MILLS, 1957.; HALLIWELL i GUTTERIDGE, 2007.; LUBOS i sur., 2011.). Izrazito je osjetljiv selenoprotein na nedostatak selena što za posljedicu ima pad u GSH-Px-1 aktivnosti. GSH-Px-1 je jedna od najučestalijih enzima iz GSH-Px obitelji, zajedno sa GSH-Px-2 koja je specifična za crijevni epitel, a najveća prisutnost GSH-Px-1 zabilježena je u eritrocitima, bubrezima, jetri i plućima (MARGIS i sur., 2008.). GSH-Px-1 je ključni antioksidativni enzim uključen u sprječavanje štetnog nakupljanja unutarstaničnog vodikovog peroksida, koji je prisutan u svim stanicama, a pronađen je u citosolu, mitohondrijima, nukleusu te u nekim stanicama i u peroksisomima (MARGIS i sur., 2008.; LUBOS i sur., 2011.). Utvrđeno je da je učinkovitija u uklanjanju unutarstaničnih peroksida od CAT u različitim fiziološkim uvjetima (ANTUNES i sur., 2002.; LUBOS i sur., 2011.). Osim antioksidativne funkcije GSH-Px-1 je uključena u razvoj i prevenciju mnogih bolesti, uključujući karcinome i kardiovaskularne bolesti. Hiperekspresija enzima GSH-Px-1 može dovesti do razvoja inzulinsko rezistentnih fenotipova što je zajedničko obilježje dijabetesa tipa 2 i metaboličkog sindroma, a navodi se i protuupalna funkcija GSH-Px-1 (LUBOS i sur., 2011.; BRIGELIUS-FLOHÉ i MAIORINO, 2013.). Različite studije su pokazale da su se GSH-Px-1 "knock-out" miševi normalno razvili što ukazuje na to da nedostatak u antioksidativnoj obrani može biti kompenziran drugim bjelančevinama ili da „normalni“ oksidacijski stres ne uzrokuje oštećenje (HO i sur., 1997.; DE HAAN i sur., 1998.). Nasuprot tome, teški akutni oksidacijski stres uzrokovao je uginuće GSH-Px-1 "knock-out" miševa bez obzira na dodavanje selena u hranu, dok je tzv. „divlji tip“ miševa preživio, a također je dobivao selen (CHENG i sur., 1998.). Ovi rezultati ukazuju da se GSH-Px-1 ne može zamijeniti s bilo kojim drugim selenoproteinom u zaštiti od generalizirang oksidacijskog stresa te da GSH-Px-1 ima primarnu antioksidativnu funkciju *in vivo* (BRIGELIUS-FLOHÉ i MAIORINO, 2013.).

Gastrointestinalna glutation peroksidaza (GIGSH-PX ili GSH-Px-2) je homotetramerna citosolna bjelančevina koja se sastoji od 22 kDa-ska monomera sa selenocisteinom u aktivnom središtu, slično izoformi GSH-Px-1 (CHU i sur., 1993.). Izuzev različitog gena koji kodira enzim GSH-Px-2, on ima veliku sličnost s GSH-Px-1 (sekvence,

tetramerne strukture i specifičnosti supstrata). Unutar obitelji selen ovisne glutation peroksidaze, GSH-Px-2 je najstabilnija nakon restrikcije selena, zatim slijedi GSH-Px-4, GSH-Px-3 i na kraju GSH-Px-1 (WINGLER i sur., 1999.). GSH-Px-2 se akumulira u citosolu i jezgri (MARGIS i sur., 2008.), a uglavnom se eksprimira u gastrointestinalnom sustavu, uključujući i epitel jednjaka, a u ljudi u jetri, dok se u glodavaca eksprimira samo u epitelu gastrointestinalnog sustava od ezofagusa do kolona (CHU i ESWORTHY, 1995.). Najveća se koncentracija bjelančevina GSH-Px-2 nalazi u bazama kripti, a postupno se smanjuje prema vrhu kripti u debelom crijevu, odnosno prema resicama u tankom crijevu (FLORIAN i sur., 2001.). Zbog specifične tkivne distribucije pretpostavlja se da ova izoforma GSH-Px-a ima glavnu funkciju u prvoj liniji zaštite od lipidnih hidroperoksida unesenih hranom kao i onih nastalih lipidnom peroksidacijom u samom crijevu (CHU i sur., 1993.). Budući da baza kripti nije preferencijalno mjesto za resorpciju tvari, prevencija unosa hidroperoksida teško može biti glavna funkcija GSH-Px-2 (BRIGELIUS-FLOHÉ i MAIORINO, 2013.). GSH-Px-2 „knock-out“ miševi nisu razvili nikakva fenotipska obilježja (ESWORTHY i sur., 2000.), ali su razvili pojačanu alergijsku upalnu reakciju dišnih puteva izazvanu albuminima iz jaja (DITTRICH i sur., 2010.). Neke studije podupiru antikancerogenu funkciju GSH-Px-2 ukoliko je tumorogeneza povezana s upalom (BRIGELIUS-FLOHÉ i KIPP, 2009.), no vjerojatnije je da je glavna funkcija GSH-Px-2 prevencija upale (BRIGELIUS-FLOHÉ i MAIORINO, 2013.).

Plazmatska (izvanstanična) glutation peroksidaza (PGSH-Px ili GSH-Px-3) je homotetramerni ekskrecijski selenoenzim i nalazi se u citosolu. GSH-Px-3 je po mnogočemu slična citoplazmatskoj izoformi (GSH-Px-1) pa tako i u molekulskoj masi koja iznosi oko 92 kDa, dok svaka podjedinica ima molekulsku masu od 23 kDa. Naime GSH-Px-3 je izvanstanični enzim aktivno ispušten u plazmu gdje se nalazi kao glikozilirana bjelančevina (glikoprotein). Više od 97% ukupnog selena u plazmi miševa sadržano je u GSH-Px-3 i selenoproteinu P (OLSON i sur., 2010.). Velika razina u plazmi može ukazivati na funkciju GSH-Px-3 u transportu ili održavanju homeostaze selena, međutim, nema dokaza koji bi poduprli tu pretpostavku (OLSON i sur., 2010.). Osim GSH, GSH-Px-3 koristi i druge reducense (tioredoksin i glutatredoksin) što bi moglo objasniti učinkovitost GSH-Px-3 iako je koncentracija glutationa u plazmi mala i izmjerena je u mikromolima (BJÖRNSTEDT i sur., 1994.; MAIORINO i sur., 2007.). Homotetramerni selenoenzimi ne neutraliziraju složene hidroperokside kao što to čine monomeri, izuzev GSH-Px-3 koja razlaže i složene hidroperokside. GSH-Px-3 izuzev vodikovog peroksida reducira i topljive hidroperokside, lipidne hidroperokside, male sintetske hidroperokside te fosfolipidne hidroperokside.

AVISSAR i sur. (1994.) prvi su put opisali da stanice proksimalnih savijenih tubula bubrega sintetiziraju GSH-Px-3, koja se pak izlučuje u plazmu kroz bazolateralne membrane (WHITIN i sur., 2002.). Plazmatska se glutation peroksidaza nalazi i u drugim tkivima te je prisutna u različitim organima, kao što su pluća, epididimisi, *vas deferens*, posteljica, testisi, srce i mišići (MARGIS i sur., 2008.). Razne studije provedene na ljudima i miševima utvrdile su prisutnost GSH-Px-3 u raznim izvanstaničnim tekućinama primjerice u krvnoj plazmi (TAKAHASHI i sur., 1987.), mlijeku (AVASSAR i sur., 1991.), u tekućini plućnog epitela i ostalih plućnih stanica u ljudi (AVISSAR i sur., 1996.), u amnionskoj tekućini (KINGSLEY i sur., 1998.; BRIGELIUS-FLOHÉ, 1999.), u sjemenoj plazmi, očnoj vodici, u koloidu folikula štitaste žlijezde (KÖHRLE i GÄRTNER, 2009.) i masnom tkivu (MAEDA i sur., 1997.; WHITIN i sur., 2002.; BRIGELIUS-FLOHÉ i MAIORINO, 2013.). Ekspresija GSH-Px-3 značajno varira između stanica i različitih tkiva.

Utvrđena je unutarstanična lokalizacija GSH-Px-3 na bazalnom dijelu stanične membrana stanica tubula korteksa bubrega (OLSON i sur., 2010.; MALINOUSKI i sur., 2012.), kao i na bazalnim membranama epitelnih stanice crijeva, epididimisa, bronha i pneumocita tipa II (BURK i sur., 2011.; BRIGELIUS-FLOHÉ i MAIORINO, 2013.). Očito je da se GSH-Px-3 sintetiziran u bubregu može transportirati te vezati za bazalne membrane u drugim tkivima, izuzev epididimisa koji sintetizira i izlučuje GSH-Px-3 u lumen, gdje su pohranjeni spermiji (BURK i sur., 2011.).

Oksidacijski stres aktivira regulaciju GSH-Px-3 u upalnim stanjima. Protuupalnu funkciju GSH-Px-3 dokazuju studije u kojima su utvrđene povećane koncentracije GSH-Px-3 u plazmi pacijenata koji su oboljeli od upalnih respiratornih i probavnih bolesti (BRIGELIUS-FLOHÉ i MAIORINO, 2013.).

Fosfolipidna hidroperoksidna glutation peroksidaza (PHGSH-Px ili GSH-Px-4) je monomerni enzim molekulske mase od 19 - 23 kDa, sa selenocisteinom u aktivnom središtu (URSINI i sur., 1985.). Prvotno je GSH-Px-4 bila opisivana kao protein koji inhibira lipidnu peroksidaciju (URSINI i sur., 1982.), a zbog svoje jedinstvene sposobnost da reducira, hidroperokside u složenim lipidima kao što su fosfolipidni hidroperoksidi, kolesterol hidroperoksidi te hidroperokside kolesterolestera, čak i kada su umetnuti u biomembrane ili lipoproteine (THOMAS i sur., 1990.). GSH-Px-4 reducira i tiamin hidroperokside koji nastaju nakon „napada“ slobodnih radikala na timin u DNK (BAO i sur., 1997.). Kao donor vodika koristi GSH, ali ne tako specifično kao ostale GSH-Px. Najznačajnija je funkcija GSH-Px-4 spriječavanje lipidne peroksidacije biomemebrana s glutationom i vitaminom E (URSINI i sur., 1986.). Fosfolipidna GSH-Px je široko rasprostranjena u različitim tkivima i organima

(testisi, spermiji, jetra, bubreg, srce, mozak,itd.), a unutar stanice prisutna je u jezgri, mitohondrijima i citosolu, vezana za membranu (HERBETTE i sur., 2007.; MARGIS i sur., 2008.). GSH-Px-4 postoji u tri izoforme, citosolna (cGSH-Px-4), mitohondrijska (mGSH-Px-4) i spermo nuklearna GSH-Px-4 (snGSH-Px-4), koje kodira isti gen. Dok je cGSH-Px-4 sveprisutna u stanicama, mGPx-4 i snGPx-4 su uglavnom eksprimirane u testisima, a oskudno u ostalim tkivima (BRIGELIUS-FLOHÉ i MAIORINO, 2013.).

Uklanjanje („knock-out“) cijelovitog GSH-Px-4 gena je smrtonosno, dok mGSH-Px-4 „knock-out“ miševi preživljavaju i normalno se razvijaju (SCHNEIDER i sur., 2009.). Međutim, mužjaci mGSH-Px-4 „knock-out“ miševa su neplodni, a njihovi spermiji imaju strukturne abnormalnosti, primjerice savijeni rep spermija, glave spermija odvojene od srednjeg dijela spermija, mitohondriji razmješteni u srednjem dijelu, a takva značajke podsjećaju na dugotrajni nedostatak selena (PFEIFER i sur., 2001.). Ključna funkcija mGSH-Px-4 je da osigurava strukturalni i funkcionalni integritet te maturaciju spermija (BRIGELIUS-FLOHÉ i MAIORINO, 2013.).

SnGSH-Px-4 „knock-out“ miševi preživljavaju i plodni su (CONRAD i sur., 2005. ; PUGLISI i sur., 2012.). Morfološke osobitosti testisa i spermija snGSH-Px-4 „knock-out“ miševa su očuvane, ali je nepravilna kondenzacija kromatina u spermatozoida smještenih u glavi epididimisa što može negativno utjecati na razvoj embrija (PUGLISI i sur., 2012.). To pak ukazuje da je nedostatak snGSH-Px-4 kompenziran drugim enzimima, ali ne i pravilna kondezacija kromatina. Najznačajnija je funkcija snGSH-Px-4 u svim stadijima maturacije spermija u epididimisu stabilizacija strukturnog integriteta kromatina spermija i zaštita DNK spermija od oksidacije (PFEIFER i sur., 2001.; BRIGELIUS-FLOHÉ i MAIORINO, 2013.). U spermatidama sn-GSH-Px-4 postoji kao topljiva peroksidaza, a u zrelim spermijima kao strukturna netopljiva bjelančevina koja je u inaktivnom obliku inkorporirana u kapsulu mitohondrija (URSINI i sur., 1999.).

Epididimska glutation peroksidaza (eGSH-Px ili GSH-Px-5) je homotetramerni sekrecijski enzim molekulske mase od oko 24 kDa koji u aktivnom središtu sadrži cistein te pripada u skupinu od selena neovisnih GSH-Px (GHYSELINK i sur., 1989.; BRIGELIUS-FLOHÉ i MAIORINO, 2013.). Androgeni hormoni kontroliraju ekspresiju GSH-Px-5 (PERRY i sur., 1992.), koja ima veliku homologiju s GSH-Px-3 te je kao i GSH-Px-3 specifična za topljive hidroperokside. Epididimska glutation peroksidaza zajedno s GSH-Px-3 čini više od 95% sveukupne količine GSH-Px-a u epididimisu miševa, štakora, nerasta, majmuna i ljudi. Protein se nalazi u epitelnim stanicama i u lumenu epididimisa, te vezan za glavu spermija prolazi kroz epididimis sve do *vas deferens* (REJRAJI i sur., 2002.).

U mužjaka GSH-Px-5 „knock-out“ miševa ne razvijaju se nedostaci u epididimisima i spermijima, a i plodnost je u mlađoj dobi očuvana. Međutim, uočena je veća učestalost pobačaja i razvojnih defekata kada su ženke „divljeg tipa“ parene s GSH-Px-5 „knock-out“ mužjacima starijima od 1 godine u usporedbi s mužjacima „divljeg tipa“ iste dobi. U repu je epididimisa u GSH-Px-5 „knock-out“ mužjaka, uslijed izloženosti DNK oksidativnim „napadajima“, bila puno manja kompaktnost DNK-a spermija, što upućuje na činjenicu da je GSH-Px-5 „moćan antioksidativni hvatač“ (CHABORY i sur., 2009.).

GSH-Px-5 je obilno eksprimirana u epitelnim stanicama glave epididimisa, gdje regulira koncentraciju hidroperoksida, a time održava optimalnu koncentraciju hidroperoksida za optimalnu funkciju snGSH-Px4. GSH-Px-5 se izlučuje u lumen epididimisa, gdje se veže za glavu spermija te ih tako prati sve do repa epididimisa i priječi da budu oštećeni vodikovim peroksidom, nadalje, GSH-Px-5 spriječava preuranjenu akrosomsku reakciju spermija tijekom skladištenja u repu epididimisa te održava spermije sposobnim za oplodnju (OKAMURA i sur., 1997.; BRIGELIUS-FLOHÉ i MAIORINO, 2013.).

Olfaktorna glutation peroksidaza (GSH-Px-6) je homoteramerni selenoenzim sa selenocisteinom u aktivnom središtu u ljudi, dok je u glodavaca i drugih vrsta, o selenu neovisna bjelančevaina sa cisteinom u aktivnom središtu (DEAR i sur., 1991.). Molekulske je mase od 22,5 kDa, a do sada GSH-Px-6 nije pročišćena te nisu načinjene kinetičke analize (DEAR i sur., 1991.; KRYUKOV i sur., 2003.).

GSH-Px-6 je otkrivena pomoću silico analiza kao mirisno vežući metabolizirajući enzim (engl. odorant binding metabolizing enzyme) (DEAR i sur., 1991.). Kloniranjem slijeda otkriven je blizak odnos s glutation peroksidazama, a *in situ* hibridizacija otkrila je ekspresiju u embriju miša (KRYUKOV i sur., 2003.) i u Bowmanovoj žlijezdi, mjestu gdje su mirisi degradirani nakon što su transducirali signale (DEAR i sur., 1991.). Spoznaje o ovom GSH-Px su oskudne, pa čak i o njegovoj ulozi u olfaktornom sustavu (BRIGELIUS-FLOHÉ i MAIORINO, 2013.).

Neselenocisteinska fosfolipidna hidroperoksidna glutation peroksidaza (NPGSH-Px ili GSH-Px-7) je monomerni enzim sa cisteinom u aktivnom središtu i ubraja se u selen neovisne glutation peroksiaze. GSH-Px-7 je po prvi puta opisana kao nova glutation peroksidaza s cisteinom u katalitičkim središtu u embrionalnim fibroblastima BRCA1-null miša (UTOMO i sur., 2004.). Zbog velike podudarnosti sa fosfolipidnom hidroperoksidnom GSH-Px (PHGSH-Px = GSH-Px-4) nazvana je neselenocisteinska PHGSH-Px (NPGSH-Px). NPGSH-Px ima molekulsku masu od oko 22 kDa s malom glutation peroksidaznom

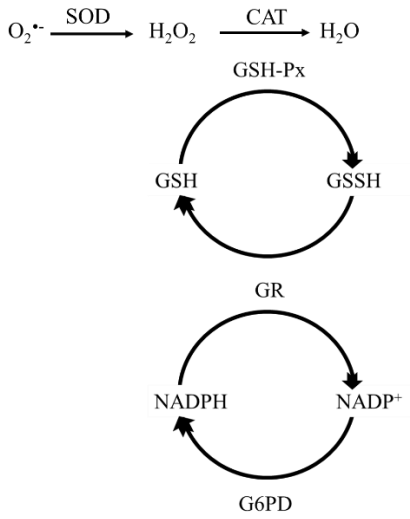
aktivnošću *in vitro*. Opisana je kao citosolna bjelančevina, ali je kasnije GSH-Px-7 pronađena i u lumenu endoplazmatske mrežice (NGUYEN i sur., 2010.).

Gen koji kodira ekspresiju NPGSH-Px nađen je u mnogim tkivima, uključujući i mliječnu žlijezdu u razvoju. NPGSH-Px ima ključnu funkciju u stanicama karcinoma dojke u ublažavanju oksidativnog stresa koji generira metabolizam višestruko nezasićenih masnih kiselina (UTOMO i sur., 2004.; MARGIS i sur., 2008.; BRIGELIUS-FLOHÉ i MAIORINO, 2013.).

Glutation peroksidaza 8 (GSH-Px-8) je monomerni enzim sa cisteinom u aktivnom središtu. Filogenetskom je analizom otkrivena nova GSH-Px u sisavaca i vodozemaca, a budući da je posljednja otkrivena dobila je ime GSH-Px-8 (TOPPO i sur., 2008.). GSH-Px-8 je membranska bjelančevina endoplazmatske mrežice (NGUYEN i sur., 2010.). Malo je spoznaja o njezinim funkcijama, GSH-Px-8 pripada enzimima kojih ima u izobilju u plućima. Tijekom virusne upale pluća razina joj opada, a oporavkom tkiva razina joj se normalizira (YAMADA i sur., 2012.).

Rezultati novijih studija ukazuju da vodikov peroksid nije samo štetan već da sudjeluje u mnoštvu esencijalnih fizioloških funkcija, primjerice u prijenosu unutarstaničnih poruka. GSH-Px enzimi održavaju homeostazu H_2O_2 u signalnim kaskadama, primjerice signalni put inzulina. Osim toga sudjeluju u apoptozi, kancerogenezi, upalnim reakcijama, plodnosti itd. Različite su izoforme GSH-Px enzima različito raspoređene u tkivima kako bi ostvarile optimalnu antioksidativnu zaštitu stanica u interakciji s ostalim antioksidansima (FORMAN i DICKINSON, 2003.; ŠVERKO, 2011.; BRIGELIUS-FLOHÉ i MAIORINO, 2013.).

U detoksikaciji ROS-a sudjeluju sekundarni enzimi (glutation reduktaza, glukoza-6-fosfat dehidrogenaza i citosolna glutation-stransferaza) tako da smanjuju razinu peroksida ili pak stalnim dotokom metaboličkih međuproizvoda (glutationa, NADPH, itd.) neophodnih za primjereno funkcioniranje primarnih antioksidativnih enzima. Glukoza-6-fosfat dehidrogenaza (engl. glucose-6-phosphate dehydrogenase, G-6-PDH) je prvi enzim s kojim započinje pentozni fosfatni put, a gdje se u najvećoj mjeri stvara NADPH (HALLIWELL i GUTTERIDGE, 2007.). Glutation reduktaza (engl. glutathione reductase, GR) obnavlja reducirani oblik glutationa iz oksidiranog oblika glutationa uz redukciju nikotinamid adenin dinukleotid fosfata (NADPH) u oksidirani oblik nikotinamidnog dinukleotida ($NADP^+$). Glutation-s-transferaza (engl. glutathione-s-transferase, GST) pripada skupini enzima koji rabe glutation u reakcijama koje doprinose transformaciji širokog raspona spojeva, uključujući lijekove, proizvode oksidacijskog stresa i kancerogenih tvari, odnosno katalizira konjugaciju ksenobiotika s glutationom (VALKO i sur., 2006.; LJUBIČIĆ i sur., 2013.).



Slika 2.7. Shematski prikaz tijeka reakcije glutation redoks sustava. Kratice: superoksid dismutaza (SOD), katalaza (CAT), glutation peroksidaza (GSH-Px), glutation reduktaza (GR), glutation (GSH), oksidirani oblik glutationa (GSSG - dimerna forma), G6PD (glukoza-6-P-dehidrogenaza) (prema OSREDKAR, 2012.).

NEENZIMSKI ANTIOKSIDANSI

2.4.4. GLUTATION

Glutation (γ-glutamilcisteinilglicin, GSH) je najznačajniji neenzimski stanični tiolni antioksidans male molekulske mase (307 Da), čija je struktura prvi puta otkrivena 1935. godine (MEISTER, 1988.). GSH je prisutan u aerobnih bakterija, biljaka, životinja i ljudi u velikim koncentracijama. U tkivima je sisavaca prisutan u rasponu od 1do10 mM (WU i sur., 2004.; LU, 2013.). GSH je tripeptid (glutaminska kiselina, cistein i glicin), koji je prisutan u dva oblika, u reduciranom obliku GSH te u oksidiranom obliku GSSG, u kojem su dvije molekule GSH povezane disulfidnim (S-S) vezama (VALKO i sur., 2006.). Reducirani oblik GSH je prevladavajući oblik i smatra se da ga ima više od 98% od ukupnog GSH (AKERBOOM i sur., 1982.; LU, 2013.). Većina staničnog GSH nalazi se u citosolu (80-85%), 10 do 15% u mitohondrijima i mali postotak u endoplazmatskoj mrežici, jezgri i peroksisomima (MEREDITH i REED, 1982.; HWANG i sur., 1992.; LU, 2000.; WU i sur., 2004.; LU, 2013.). Većina se GSH nalazi unutar stanice, no prisutan je i u izvanstaničnom prostoru, ali u relativno malim koncentracijama, primjerice u plazmi u koncentraciji od 2 do 20 μmol/L (GRIFFITH, 1999.; WU i sur., 2004.). Najveći dio GSH u plazmi potječe iz jetre, koja ima središnju funkciju u održavanju homeostaze GSH. Gotovo sva količina GSH sintetizirana u jetri izluči se u plazmu i žuč (OOKHTENS i KAPLOWITZ, 1998.; LU, 2013.).

Dakle, deregulacija sinteze GSH u jetri ima utjecaj na homeostazu GSH u cijelom organizmu. Koncentraciju GSH održavaju dva metabolička puta: jedan je *de novo* sinteza od gradivnih aminokiselina cisteina, glutamina te glicina uz katalizaciju dvaju enzima γ-glutamilcistein sintetaza i glutation sintetaza. Drugi je metabolički put recikliranje pomoću glutation reduktaze uz NADPH kao donora elektrona, gdje GSSH prelazi u GSH (FUJII i sur., 2003.). Radi cisteinskog ostatka, GSH lako neenzimski oksidira u disulfidni glutation pomoću elektrofilnih tvari (primjerice, slobodnih radikala i reaktivnih kisikovih i/ili dušikovih spojeva). Oksidirani glutation može oksidacijom oštetiti mnoge enzime ukoliko se nalazi u prevelikoj koncentraciji. Koncentracije se staničnog GSH znatno smanjuju kao odgovor na malnutriciju bjelančevinama, oksidacijski stres i mnoga patološka stanja (GRIFFITH, 1999.; WU i sur., 2004.; LU, 2000.). Oksidirani glutation se nakuplja u stanicama te je omjer GSH i GSSG dobar pokazatelj oksidacijskog stresa (HWANG i sur., 1992.; VALKO i sur., 2006.).

Glutation je multifunkcionalni, unutarstanični, neenzimski antioksidans koji djeluje kao kočimbenik u katalitičkim reakcijama djelovanjem glutation peroksidaze, te kao donor elektrona koji je potreban za razgradnju H_2O_2. Uključen je u mnoge druge biokemijske puteve i stanične funkcije, uključujući metabolizam askorbinske kiseline, održavanje komunikacije između stanica (BARHOUMI i sur., 1993.), prevenciji oksidacije -SH skupina bjelančevina, osobito u jezgri bjelančevina koje su potrebne za reparaciju i ekspresiju DNK-a, i transportu bakra (CHANCE i sur., 1979.; KOHEN i NYSKA, 2002.). Glutation djeluje kao kelirajući agens iona bakra te priječi njegovo sudjelovanje u Haber-Weissovoj reakciji; djeluje kao kočimbenik za više enzima, kao što je glikosilaza i onih koji su uključeni u biosintezu leukotriena. Nadalje, ima značajnu funkciju u sintezi bjelančevina, njihovoj razgradnji i unakrsnom povezivanju. Osim svojih biokemijskih funkcija, glutation može izravno ukloniti ROS te je stoga jaki antioksidan *per se*. GSH može stupiti u interakciju s hidroksilnim, peroksilnim i aloksilnim radikalima kao i s hipoklornom kiselinom i singletnim kisikom, nakon reakcije s ROS-om, postaje glutation radikal, koji se može regenerirati u reducirani oblik (KOHEN i NYSKA, 2002.; HALLIWELL i GUTTERIDGE, 2007.). Reakcija glutationa s radikalom $R^{\bullet}$ se može prikazati kao:

$$GSH + R^{\bullet} \rightarrow GS^{\bullet} + RH$$

Tako stvoreni tiol radikali mogu oblikovati neradikal odnosno, oksidirani glutation (GSSG):

$$GS^{\bullet} + GS^{\bullet} \rightarrow GSSG$$

Pomoću NADPH i glutation reduktaze, GSSG se ponovno reducira u glutation i time se krug zatvara (CHANCE i sur., 1979.; LJUBIČIĆ i sur., 2013.).

Najznačajnije zaštitne funkcije glutationa protiv oksidacijskog stresa su (MASELLA i sur., 2005.; VALKO i sur., 2006.):

- glutation je kočimbenik u reakcijama detoksikacije oksidacijskog stresa u nekoliko enzima, npr. glutation peroksidaza, glutation transferaza i ostali;
- GSH sudjeluje u transportu aminokiselina kroz staničnu membranu;
- GSH „hvata“ i izravno neutralizira hidroksilne radikale i singletni kisik, detoksificira vodikov peroksid i lipidne perokside u reakciji katalitičkog djelovanja glutation peroksidaze, gdje GSH oksidira u GSSH (LU, 2013.);
- glutation može regenerirati najvažnije antioksidanse, vitamin C i E u njihove aktivne oblike te izravno ili posredno reducirati tokoferol radikal vitamina E.

GSH je ključna odrednica u redoks signalizaciji, vitalni je čimbenik u detoksifikaciji ksenobiotika i regulaciji proliferacije stanica, apoptozi, imunosnom sustavu i fibrogenezi (LU, 2013.). Glutation također ima značajnu funkciju u spermatogenezi i dozrijevanju spermija (WU i sur., 2004.). Budući da aplikacija glutationa ima pozitivan učinak na mušku neplodnost, spojevi koji povećavaju razinu GSH mogu se koristiti u liječenju neplodnosti u muških jedinki (LENZI i sur., 1994.; IRVINE, 1996.; FUJII i sur., 2003.).

2.4.5. VITAMINI A, C, E

Vitamin C „hvata“ i uklanja ROS i RDS unutar i izvanstaničnog prostora, te je jedan od značajnijih antioksidansa u plazmi sa brojnim antioksidativnim i ostalim učincima, primjerice redukcija oksidiranog vitamina E, prevencija oksidacije LDL, resorpcija Fe u probavnom sustavu, enzimatski kočimbenik, i drugo. Askorbinska se kiselina nalazi u velikim koncentracijama u sjemenoj plazmi i štiti muške germinativne stanice i DNK-a od oksidativnog oštećenja (FRAGA i sur., 1991.). Koncentracija L-askorbinske kiseline u sjemenoj plazmi nerasta iznosi 141 μM i viša je od one u pastuha od 49 μM (STRZEZEK i sur., 2009.). DAWSON i sur. (1987.) su ustvrdili da mala razina vitamina C dovodi do neplodnosti i povećanog oštećenja DNK-a spermija.

Vitamin E je najzastupljeniji i najučinkovitiji liposolubilni „hvatač“ peroksil radikala u organizmu, a inkorporiran je u lipidnom dvosloju stanične membrane. Nadalje, vitamin E inhibira lančanu reakciju slobodnih radikala u procesu lipidne peroksidacije u staničnim membranama, u membranama organela, lipoproteinima, masnom tkivu i mozgu, te ima

značajnu funkciju u usporavanju razvoja ateroskleroze, kardiovaskularnih i ostalih oboljenja. Vitamin A vrlo učinkovito „hvata“ i uklanja ROS osobito singletni kisik te se kao i vitamin E nalazi u staničnim membranama i lipoproteinima, a djeluje protektivno protiv ateroskleroze, kardiovaskularnih i s ostalim antioksidansima poboljšava gibljivost i funkciju spermija (HALLIWELL, 1996.; OGBUEWU i sur., 2010.; ŠVERKO, 2011.).

2.5. DOSADAŠNJA ISTRAŽIVANJA UTJECAJA PASMINE, INDIVIDUALNIH RAZLIKA NERASTA I GODIŠNJEG DOBA NA PLODNOST

Na temelju istraživanja provedenih u nerasta, u drugih životinjskih vrsta, te u ljudi ustvrđeno je nekoliko biokemijskih pokazatelja koji bi mogli biti od kliničkog značaja, kao što su primjerice pokazatelji funkcije ili disfunkcije testisa i/ili ostalih akcesornih spolnih žlijezda, ili se pak odnose na kakvoću sjemena i rasplodnu učinkovitost odnosno neplodnost.

Oksidacijski je stres stanje povezano s prekomjernim stvaranjem reaktivnih kisikovih spojeva (ROS) te je rasprostranjen uzrok poremećaja plodnosti u sisavaca. Tekućine iz reproduktivnog sustava rasplodnjaka stvaraju povoljno okružje za spermije tijekom prolaska i sazrijevanja u epididimisu te pri ejakulaciji. Štoviše, spermiji i sjemena plazma posjeduju enzimske i neenzimske antioksidativne sustave kojima neutraliziraju učinke prekomjernog stvaranja ROS-a. Procjena antioksidativnog kapaciteta sjemene plazme i spermija rasplodnih nerasta različitih pasmina dodatno je saznanje i pomoć pri procjeni reproduktivnog potencijala.

Analizom se sperme procjenjuje potencijal plodnosti mužjaka, kakvoća sjemena i možebitni uzroci neplodnosti. Svojstva sperme variraju od jedinke do jedinke, a pod utjecajem su mnogih egzogenih čimbenika (godišnje doba, hranidba, učestalost uzimanja ejakulata, smještaj, stres, itd.) ili endogenih čimbenika (pasmina, genetski, neuroendokrini, itd.). Kakvoća se sperme može mijenjati zbog navedenih čimbenika koji utječu na aktivnost spermatogeneze u testisima, ali i zbog možebitnih bolesti reproduktivnog sustava. Spoznaje o fiziološkim značajkama sjemena, spermija i sjemene plazme te utjecaj pasmine, linije i pojedinačnih značajki rasplodnjaka, preduvjet su za uspješno unapređenje reprodukcijske učinkovitosti te za nasljeđivanje najboljih značajki donora sjemena.

Križanje pasmina je metoda kojom se u uzgoju svinja može poboljšati učinkovitost proizvodnje. Stoga mnoge zemlje, dugi niz godina, u reprodukciji svinja koristite hibridne krmače i neraste. Mnoge su studije dokazale da se hibridni nerasti odlikuju boljim libidom, većim testisima, boljom kakvoćom sjemena i većim postotkom koncepcije od čistokrvnih

nerasta. Križanjem pojedinih pasmina obično se dobiva željeni proizvodni učinak, primjerice kvalitetno meso i bolja obilježja sperme koja se odnose na kvalitetu i kvantitetu. Kakvoća je sjemena izuzetno važna prilikom korištenja rasplodnih nerasta, a pri tome je vrlo važan broj doza za osjemenjivanje dobiven iz jednog ejakulata. Nadalje, oplodnja čim većeg broja ovuliranih jajnih stanica, što pak ovisi o dobroj kakvoći sjemena. Križanje različitih pasmina svinja opće je prihvaćeni oblik usmjerenog parenja u kojem je vrlo važno odabrati prikladne pasmine ili linije za križanje (KAWĘCKA i sur., 2008.).

Reprodukcijski se proces temelji na maksimalnoj iskoristivosti željenih obilježja svinja. Prve provjere reproduktivnih sposobnosti mladih nerasta uključuju ocjenu libida, detaljnije analize sjemena te procjenu morfološki promijenjenih spermija. Morfološka procjena spermija omogućuje najobjektivniju procjenu sjemena. Vrsta i broj morfološki promijenjenih spermija pokazuje stupanj nepravilnosti spermatogeneze (KAWĘCKA i sur., 2008.).

KAWĘCKA i sur. (2008.) su u svojem istraživanju našli značajne razlike u kvaliteti i kvantiteti sjemena među pasminama i njihovim križancima. Nerasti pasmine pietren imali su uglavnom značajno najlošiju kvalitetu sjemena (najmanju gibljivost, ukupan broj spermija te najveći udio morfološki patoloških spermija), dok su križanci nerasta, otac durok i majka pietren, imali spermu najboljih svojstava (najveću gibljivost spermija, najveću koncentraciju spermija te najmanji udio spermija sa promijenjenim oblicima). Nerasti pasmine durok isticali su se najvećim brojem spermija u cjelokupnom ejakulatu.

KNECHT i sur. (2014.) ustvrdili su da je najveći volumen sjemena u nerasta pasmine poljski veliki jorkšir, no u analizi drugih parametara sperme, nerasti ove pasmine imali su najlošije rezultate. Najviše je doza za osjemenjivanje dobiveno od križanaca pasmina durok i pietren zimi. Analiza je korelacije pokazala da su križanci (durok i pietren) i nerasti pasmine poljski veliki jorkšir najosjetljiviji na više temperature okoliša, što je rezultiralo smanjenjem koncentracije spermija u ljeto i jesen.

CIERESZKO i sur. (2000.) istraživali su utjecaj godišnjeg doba i pasmine na kakvoću sjemena nerasta (koncentracija spermija, volumen ejakulata i broj spermija). Ustvrdili su razliku među pasminama nerasta veliki jorkšir, pietren i križanaca durok i pietren. Osim utjecaja pasmine ustvrdili su i utjecaj godišnjeg doba, pri čemu je kakvoća sjemena bila ljeti najlošija, dok je u jesen i zimu bila najboljih svojstava.

SONDERMAN i LUEBBE (2008.) navode da izuzev individualnih razlika među nerastima, postoje razlike među pasminama (čistokrvni i križanci) te među linijama nerasta, što je svojim rezultatima potvrdio SMITAL (2009.), koji je istraživao razlike među sedam

pasmina nerasta i njihovih križanaca. U istraživanju se procjenjivao volumen ejakulata, koncentracija spermija, progresivna gibljivost spermija, ukupan broj spermija i ostali pokazatelji, a pasmine nerasta su se značajno razlikovale u svim istraživanim značajkama. Ustvrđen je i značajan učinak godišnjeg doba na kakvoću sperme. Tako su najlošije vrijednosti značajki sjemena zabilježene u ljeto, dok su najviše vrijednosti bile u jesen i zimu.

WOLF i SMITAL (2009a.) su u svom istraživanju ustvrdili male razlike u osobitosti sperme između dvije pasmina nerasta. Češki veliki jorkšir (Large White) imao je nešto veće vrijednosti u koncentraciji spermija, gibljivosti, ukupnom broj spermija i broju funkcionalnih spermija, dok je češki landras imao nešto veći volumen sjemena. Slične su pak rezultate u svojim istraživanjima dobili TĂPĂLOAGĂ i sur. (2013.), odnosno razlika među pasminama (veliki jorkšir, landras, pietren) je bilo, ali nisu bile značajne.

GERFEN i sur. (1994.) su u svojem istraživanju pronašli pasminske razlike u nekoliko biokemijskih pokazatelja, od šest testiranih, u sjemenoj plazmi nerasta, no ni jedna pasmina nerasta nije imala veće vrijednosti za sve mjerene pokazatelje. Od standardnih analiza sjemena sve su se istraživane osobine značajno razlikovale među pasminama, veća je koncentracija spermija bila u meishan pasmine, ali je imala najmanji volumen ejakulata, dok je obratno bilo sa nerastima pasmine američki jorkšir, a najmanje je statistički značajnih razlika ustvrđeno u istraživanim pokazateljima između navedenih pasmina nerasta sa nerastima pasmine fengjing.

U dostupnoj literaturi izuzev prethodno navedenog istraživanja nije nađeno studija o utjecaju pasmine nerasta na biokemijske pokazatelje sjemene plazme. Jednako tako nije nađeno literaturnih podataka koji navode razlike u antioksidativnom statusu spermija i sjemene plazme među pasminama nerasta.

3. CILJ I HIPOTEZA ISTRAŽIVANJA

Ciljevi ovog istraživanja bili su:

1. Istražiti kakvoću sjemena nerasta te utvrditi pasminske i hibridne osobitosti.
2. Razdvojiti spermije od sjemene plazme i odrediti pokazatelje njihove antioksidacijske zaštite te istražiti utjecaj pasminskih i hibridnih značajki.
3. Odrediti koncentraciju minerala, masnih tvari, bjelančevina i aktivnost enzima u sjemenoj plazmi nerasta radi utvrđivanja pasminskih i hibridnih značajki.
4. Istražiti povezanost antioksidacijskih i biokemijskih pokazatelja u sjemenoj plazmi s kakvoćom sjemena te utvrditi pasminske i hibridne značajke.
5. Razdvojiti spermije nerasta u otopini diskontinuiranog gradijenta gustoće, jodiksanola radi istraživanja antioksidacijskih pokazatelja u različitim frakcijama spermija te utvrditi pasminske i hibridne osobitosti.

Hipoteza ovog istraživanja je da će nerasti različitih pasmina i PIC hibridi imati razlike u: kakvoći sjemena; biokemijskim pokazateljima; antioksidacijskoj zaštiti spermija i sjemene plazme. Ukoliko se temeljna hipoteza u potpunosti pokaže ispravnom, antioksidacijski i biokemijski pokazatelji mogli bi doprinijeti boljoj procjeni kakvoće sjemena rasplodnih nerasta.

4. MATERIJAL I METODE ISTRAŽIVANJA

Centri za umjetno osjemenjivanje životinja imaju pravila i propise koji se moraju poštivati. U Republici Hrvatskoj „Uzgojni program iz svinjogojstva“ nalaže da svi nerasti, koji dolaze u centre, moraju biti izravno testirani (engl. „performance test“). Performance test se obavlja na izabranim muškim i ženskim uzgojno valjanim životinjama koje su predviđene za rasplod, i to u testnoj stanici ili na farmi (engl. „field performance test“). Performance test u mužjaka započinje kada imaju tjelesnu masu 30 kg pa sve do 100 kg tjelesne mase. U ustvrđivanju uzgojne vrijednosti nerasta rabe se podaci o slijedećim osobinama, prikupljenim tijekom i na kraju testa: 1. dnevni prirast, 2. životni prirast, 3. konverzija hrane, 4. debljina slanine, 5. izražajnost mesnih dijelova, 6. osjetljivost na stres. Testiranje se provodi na temelju *Pravilnika o testiranju uzgojno valjanih rasplodnih životinja* (NN 74/98). Nerasti koji u testu zadovolje propisane kriterije i dobiju visoke ocjene, mogu biti uvršteni u reprodukcijski program pojedinog centra. Među njima se za reprodukcijski program odabiru nerasti s nadprosječnim proizvodnim svojstvima.

Pravila nalažu da odabrani nerasti moraju proći sve propisane karantenske mjere, te ukoliko dijagnostičke provjere pokažu da su nerasti zdravi, moguće ih je prihvatiti u centre.

Pri odabiru nerasta za istraživanje pozornost se pridaje dobnim značajkama, istovjetnim proizvodnim značajkama (mesni tipovi svinja „plemenite pasmine“), te primjerenim uvjetima držanja s mogućnošću izdvajanja i promatranja pasminskog učinka na kakvoću sjemena.

U ovo je istraživanje uključeno 27 rasplodnih nerasta starosti od 18 do 40 mjeseci. Životinje su nasumično odabrane i podijeljene u pet skupina prema pasminskim osobitostima. U pasmina njemački landras i pietren bilo je po šest nerasta, a u pasmina švedski landras, veliki jorkšir i Pig Improvement Company (PIC) hibrid po pet nerasta.

Sjeme rasplodnih nerasta uzimali smo od klinički zdravih životinja kojima se dva puta godišnje uzimaju uzorci krvi u svrhu pretrage propisane *Naredbom o mjerama zaštite životinja od zaraznih i nametničkih bolesti* (NN 17/12).

Držanje i hranjenje životinja

Tijekom pokusnog razdoblja životinje su boravile u zasebnim odjeljcima veličine 12 m^2 (3,5 x 3,5 m), a svaki je odjeljak imao zaseban, ograđen i natkriven ispust (Slika 4.1.).



Slika 4.1. Unutrašnjost nerastnika (preuzeto od MARKOVIĆ (2005.).

Krmna smjesa kojom su hranjene životinje izrađena je prema propisanoj recepturi, a proizvodnja i kakvoća krmne smjese bile su pod nadzorom Zavoda za hranidbu domaćih životinja Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Životinje su hranjene jedanput dnevno i to prije skoka s 3 kg gotove krmne smjese za neraste koja je bila optimalno uravnotežena sukladno *Pravilniku o kakvoći stočne hrane* (NN 26/98) (tablica 1.).

Nerasti su se napajali po volji (*ad libitum)* na automatskim pojilicama, koje su svaki dan kontrolirane i čišćene od ostataka hrane i eventualnih ostataka slame.

U objektu su redovito provođene zoohigijenske mjere, odnosno čišćenje i pranje objekta uz obilato nasteljavanje suhom slamom ležišta svakog nerasta. Uz svakodnevno čišćenje i pranje objekta, jedanput tjedno timaritelji su obavljali i pomnjivo čišćenje i pranje nerasta i objekta.

Tablica 4.1. Sastav krmne smjese za neraste (*Pravilnik o kakvoći stočne hrane*, 1998.).

Sirove bjelančevina	16 %
Mast	16 %
Sirova vlakna	7 %
Fosfor	0,6 %
Kalcij	1 %
Natrij	0,25 %
Cink	50 mg/kg
Vitamin A	5 000 IJ/kg
Vitamin D	625 IJ/kg

4.1. TIJEK ISTRAŽIVANJA

Istraživanje je provedeno u Centru za reprodukciju u stočarstvu Hrvatske d.o.o., Radna jedinica za proizvodnju u Križevcima tijekom rutinskog iskorištavanja rasplodnih nerasta, kojima se dva puta tjedno uzima sjeme, a u svrhu dobivanja sjemena za umjetno osjemenjivanje.

Prije svake ejakulacije sjemena nerasti su bili stimulirani dovođenjem nerasta u izdvojenu prostoriju u kojoj se nalazio fantom krmače. Pokusnim je nerastima ejakulat polučen ručnom fiksacijom penisa nakon skoka na fantom što je obavljala uvijek ista osoba na koju su nerasti naviknuti i koja poznaje navike svakog nerasta pojedinačno.

Budući da nepovoljni izvanjski čimbenici mogu utjecati na kakvoću sjemena, provodio se nadzor na svim kritičnim točkama u postupcima sa spermom kako bi se nepoželjni učinci sveli na najmanju moguću mjeru. Zbog osjetljivosti sperme na sniženje temperature (temperaturni šok), sperma je uzimana u graduirane staklene posude (spermohvatač) omotane staničevinom.

Pokusi su obavljeni u jesenskom razdoblju, a uzorci sjemena nerasta za analizu uzeti su jednokratno svim odabranim nerastima uključenim u istraživanje. Pri tome je u tri različita navrata s vremenskim razmakom od tjedan dana, uzeto po desetak uzoraka sjemena od desetak različitih nerasta.

Odmah po uzimanju ejakulata načinjena je provjera čistoće ejakulata te makroskopska (organoleptička) i mikroskopska procjena ejakulata te određivanje gustoće ejakulata.

4.2. PRIPREMA UZORAKA ZA ANALIZE

U spermohvatač su uzimane posljednje dvije frakcije sjemena, koje su bile procijeđene kroz tri sloja sterilne gaze u svrhu odvajanja sekreta bulbouretralnih žlijezda, koji bi mogao začepiti kateter pri umjetnom osjemenjivanju. Nakon provjera koje su trajale nekoliko sekundi procijeđeni je ejakulat stavljen u vodenu kupelj zagrijanu na 37 ˚C, gdje je i ostao tijekom postupka mikroskopske ocjene ejakulata.

Odjeljivanje sjemene plazme i ispiranje spermija provedeno je nakon makroskopske i mikroskopske procjene, dio sjemena je centrifugiran pri 1000 x g kroz 15 minuta i odvojena je sjemena plazma od spermija. Odvojena sjemena plazma pohranjena je na -80 ºC do analize, a odvojeni spermiji isprani su u fiziološkoj otopini tri puta, te centrifugirani pri 500 x g kroz 5 minuta i potom pohranjeni na -80 ºC do analiza.

Odjeljivanje spermija u otopini diskontinuiranog gradijenta gustoće jodiksanola. Dio nativnog sjemena pripremljen je za centrifugiranje u otopini diskontinuiranog gradijenta gustoće jodiksanola (OptiPrep™, Axis, Norveška) prema uputama proizvođača. Pri tome su jednaki volumeni sjemena i 60 %-tna otopina jodiksanola promiješani kako bi se dobila gustoća sjemena od 1,170 g/mL. Na tako pripremljeni sloj sjemena nadslojene su dvije otopine jodiksanola različitih gustoća koje su pripremljene od jodiksanola i HBSS pufera (Hanks Buffered Salt Solution, HANKS, 1975.), i to najprije otopina gustoće 1,154 g/mL, a zatim otopina gustoće 1,119 g/mL. Gradijent gustoće je centrifugiran pri 1500 x g kroz 20 minuta na sobnoj temperaturi (oko 20 ºC).

Centrifugiranjem su dobivene tri frakcije spermija. U frakciji između slojeva otopine jodiksanola gustoće 1,119 g/mL i 1,154 g/mL, izdvojili su se normalni spermiji velike gibljivosti (> 90%), u talogu su bili spermiji vrlo male gibljivosti (< 20%), a u gornjem sloju gradijenta, odnosno na samoj površini, bili su patološki oblici spermija (deformirani spermiji, spermiji s citoplazmatskom kapljicom, spermiji odvojenih glava i repova). Sve tri frakcije spermija pohranjene su na -80 °C do analiza.

U uzorcima su sjemene plazme određivani sljedeći antioksidacijski pokazatelji: ukupni antioksidativni status (engl. total antoxidant status, TAS), glutation peroksidaza (engl. glutathione peroxidase, GSH-Px), ukupna superkosid dismutaza (engl. total superoxide dismutase, TSOD). Osim navedenih antioksidacijskih pokazatelja u uzorcima sjemene plazme određeni su i sljedeći biokemijski pokazatelji: alkalna fosfataza (engl. alkaline phosphatase, ALP), kisela fosfataza (engl. acid phosphatase, ACP), γ-glutamil transferaza (engl. γ-glutamyltransferase, GGT), kreatin kinaza (engl. creatine kinase, CK), laktat dehidrogenaza

(engl. L-lactate dehydrogenase, LDH), ukupne bjelančevine, albumini, ukupni kolesterol, kolesterol vezan na lipoproteine velike gustoće (eng. high denity lipoprotein-cholesterol, HDL-kolesterol), kolesterol vezan na lipoproteine male gustoće (engl. low density lipoprotein-cholesterol, LDL-kolesterol) i triacilglicerol te kalcij, magnezij i cink. Dobivene su vrijednosti izražene jedinicama po litri sjemene plazme.

U ispranim spermijima te u izdvojenim spermijima različitih morfologijskih oblika i gibljivosti, antioksidacijski je status praćen određivanjem TAS, GSH-Px, TSOD, manganske superoksid dismutaze (MnSOD) te bakar, cink supeoksid dismutaze (Cu,Zn SOD). Dobivene su vrijednosti izražene po gramu bjelančevina koje su u spermijima određene pirogalol postupkom.

4.3. ANALIZA UZORKA

MAKROSKOPSKA OCJENA EJAKULATA

Makroskopskom su ocjenom procijenjeni volumen, boja, konzistencija i miris sjemena.

Volumen ili količina ejakulata je određena direktnim očitavanjem volumena ejakulata u graduiranom spermohvataču.

Boja ejakulata ovisi o gustoći i **konzistenciji** pa je u nerasta ejakulat fiziološki vodenastobijel (konzistencije mlijeka). Bilo kakva odstupanja u boji ili konzistenciji nisu prihvatljiva, pa su ejakulati koji su sadržavali primjese krvi, mokraće, gnoja, dlaka, izmeta, prašine, slame bili izuzeti iz istraživanja.

Miris je ejakulata specifičan u pojedinih vrsta životinja, pa i u nerasta. Ejakulati koji su imali miris na mokraću, trulež ili kakav drugi neugodan miris bili su izuzeti iz istraživanja.

MIKROSKOPSKA OCJENA EJAKULATA

Mikroskopskom su ocjenom svježeg sjemena procijenjene progresivna gibljivost i morfologijske značajke spermija na binokularnom mikroskopu "Olympus BX50F" s ugrađenim spermotermom (Olympus, Tokyo, Japan).

Progresivna je gibljivost spermija u nativnom ejakulatu mikroskopirana u stisnutoj kapljici pokrivenoj pokrovnicom. Kapljica je sjemena od 10 µL stavljena na zagrijanu predmetnicu pomoću pipete i pažljivo prekrivena zagrijanom pokrovnicom. Staklene su predmetnice fiksirane na spermotermu, a potom su uzorci sperme pregledani najprije pod povećanjem od 100 x, a potom pod povećanjem od 200 x.

Prosudba progresivne gibljivosti spermija izražena je u postocima (%). Pri tome su zbrajani samo spermiji koji su se gibali prema naprijed, odnosno progresivno. Spermiji koji su se gibali u mjestu, u krug (manježno) ili vijugavo, nisu zbrajani, jer su to patološki oblici gibanja i znaci su odumiranja spermija. Uzorci sjemena u kojima je progresivna gibljivost spermija bila manja od 70% bili su izuzeti iz istraživanja.

Morfologijske su značajke spermija u nativnom ejakulatu uključivale procjenu građe i oblika većeg broja spermija. Kada se uoči veći broj deformiranih spermija, načini se preparat (razmaz) koji se fiksira i oboji, postupkom prema Bloomu u 5%-tnoj vodenoj otopini eozina i 10%-tnoj vodenoj otopini nigrozina. Preparat je pregledan pomoću fazno-kontrasnog mikroskopa, najprije pod srednjim povećanjem, a potom pod imerzijom u povećanju od 1000 x. Budući da nije uočen veći broj deformiranih spermija u istraživanim uzorcima nije bilo potrebno načiniti fiksirane i obojene preparate.

OCJENA GUSTOĆE EJAKULATA (KONCENTRACIJE SPERMIJA U EJAKULATU)

Gustoća sjemena, odnosno koncentracija spermija u ejakulatu (broj spermija u 1 mL ejakulata), objektivno je utvrđena elektronskim brojačem "Photometer SDM5" (MiniTüb, Landshut, Njemačka).

U kivetu je otpipetirano 4,0 mL 0,9%-tne otopine NaCl i 0,08 mL nativnog sjemena, a potom je sadržaj promiješan. U program za brojenje spermija nerasta unijeti su podaci o volumenu sjemena i progresivnoj gibljivosti spermija, a uređaj je potom odredio gustoću i broj doza sjemena s 2,5 milijarde gibljivih spermija, kao i potrebnu količinu razrijeđivača s kojom valja razrijediti ejakulat. U jednom se mililitru (mL) nerastova sjemena zadovoljavajuće koncentracije nalazi 150 do 250 milijuna spermija.

Ejakulati koji su zadovoljili kriterije makroskopske i mikroskopske pretrage te zadovoljavajuću koncentraciju spermija proslijeđeni su na daljnju obradu, a dobiveni su rezultati zabilježeni i potom statistički obrađeni.

ODREĐIVANJE POKAZATELJA ANTIOKSIDACIJSKOG STATUSA

Koncentracija ukupnog antioksidacijskoga statusa (TAS) određena je komercijalnim kompletima Total Antioksidant Status (kat. br. NX2332) tvrtke „Randox" (Irska) na automatskom biokemijskom analizatoru Olympus AU 400 (Olympus, Tokyo, Japan). Metoda se temelji na stvaranju radikala kationa 2, 2′-azino-di-[3-ethylbenzthiazoline sulphonate] (ABTS®) koji nastaje inkubacijom ABTS® s peroksidazom (metmioglobin) i vodikovim peroksidom (H_2O_2).

ABTS® daje relativno stabilno modro-zeleno obojenje koje se mjeri pri valnoj dužini od 600 nm. Antioksidansi u dodanom uzorku uzrokuju supresiju stvaranja plavo-zelenog obojenja koja se očituje smanjenim obojenjem, što je proporcionalano koncentraciji ukupnih antioksidansa u ispitivanim uzorcima. Koncentracija se TAS-a mjeri stupnjem inhibicije ABTS®.

Koncentracija je TAS-a određena u sjemenoj plazmi, u ispranim spermijima te spermijima izdvojenim u gradijentu gustoće. Koncentracija TAS-a u sjemenoj plazmi izražena je u jedinicama po litri (mmol/L), a u spermijima je izražena u jedinicama po gramu bjelančevina.

Aktivnost glutation peroksidaze (GSH-Px; E. C. 1.11.1.9) određena je komercijalnim kompletima Ransel (kat. br. RS505) tvrtke „Randox“ (Irska) na automatskom biokemijskom analizatoru Olympus AU 400 (Olympus, Tokyo, Japan) pri valjnoj dužini od 340 nm.

Metoda se temelji na tome da GSH-Px katalizira oksidaciju glutationa (GSH) vodikovim peroksidom i kumena hidroperoksidom. Uz prisustvo glutation reduktaze i reduciranog nikotinamid adenin dinukleotid fosfata (NADPH) oksidirani se oblik glutationa (GSSG) odmah prevodi u reducirani oblik uz oksidaciju NADPH u $NADP^+$. Ukupna glutation peroksidaza oksidira glutation s pomoću vodikova peroksida.

Aktivnost GSH-Px određena je u sjemenoj plazmi, u ispranim spermijima te u spermijima izdvojenim u gradijentu gustoće. Aktivnost GSH-Px u sjemenoj plazmi izražena je u U/L, a u spermijima je izražena po gramu bjelančevina.

Aktivnosti ukupne superoksid dismutaze (TSOD; E. C. 1.15.1.1) određena je gotovim kompletima Ransod (kat. br. SD125) tvrtke „Randox“ (Irska) na automatskom biokemijskom analizatoru Olympus AU 400 (Olympus, Tokyo, Japan). Metoda se temelji na stvaranju superoksidnih radikala iz ksantina spomoću ksantin oksidaze koji reagiraju sa 2-(4-jodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-feniltetrazol kloridom i tvore formazan crveno obojenje. Aktivnost TSOD mjeri se kao stupanj inhibicije ove reakcije.

MnSOD je određena nakon inkubacije uzorka s 1 M KCN koji inhibira CuZnSOD, tako da je aktivnost CuZnSOD izračunata kao razlika aktivnosti ukupne TSOD i MnSOD (SPITZ i OBERLEY, 1989.; IBRAHIM i sur., 2000.).

Aktivnost TSOD određena je u sjemenoj plazmi, gdje je izražena u U/mL. U ispranim i izdvojenim spermijima različitih morfologijskih oblika i gibljivosti određena je aktivnost TSOD, MnSOD i CuZnSOD, a vrijednosti su izražene po gramu bjelančevina.

ODREĐIVANJE BIOKEMIJSKIH POKAZATELJA

Aktivnost je alkalne fosfataze (ALP; E. C. 3.1.3.1) određena na automatskom biokemijskom analizatoru Olympus AU 400 (Olympus, Tokyo, Japan) uporabom reagensa Alkalna fosfataza (kat. br. OSR 6104) proizvođača Beckman Coulter (Fullerton, SAD). Enzim ALP razgrađuje p-nitrofenilfosfat na fosfat i p-nitrofenol koji daje žuto obojenje te se mjeri pri valnoj dužini od 405 nm.

Aktivnost ALP u sjemenoj plazmi izražena je u U/L.

Aktivnost kisele fosfataze (ACP; E. C. 3.1.3.2) određena je na automatskom biokemijskom analizatoru Olympus AU 400 (Olympus, Tokyo, Japan) uporabom reagensa Kisela fosfataza (kat. br. TR1110) proizvođača Dijagnostika d.d. (Sisak, Hrvatska). Enzim ACP u kiselom mediju (pH 4,9) razgrađuje supstrat p-nitrofenilfosfat, dodatkom natrijeve lužine inkubacija se prekida, a oslobođeni p-nitrofenol u alkalnom mediju prelazi u žuto obojeni kinoidni oblik, koji se mjeri pri valnoj dužini od 405 nm.

Aktivnost ACP izražena je u U/L sjemene plazme.

Aktivnost γ-glutamil transferaze (GGT; E. C. 2.3.2.2) određena je na automatskom biokemijskom analizatoru Olympus AU 400 (Olympus, Tokyo, Japan) uporabom reagensa Gama-glutamil transferaza (kat. br. TR19103) proizvođača Thermo Scientific (Middletown, SAD). GGT razgrađuje L-γ-glutamil-karboksi-4-nitroanilid i prenosi oslobođenu glutaminsku skupinu na glicil-glicin, a pri tome se stvaraju γ-glutamilglicilglicin i 4-nitroanilin (p-nitroanilin). Metoda se temelji na mjerenju nastalog 4-nitroanilina pri valnoj dužini od 405 nm koji u alkalnom mediju daje žutu obojenost, a aktivnost je GGT-a proporcionalna intenzitetu nastalog obojenja.

Aktivnost GGT-a u sjemenoj plazmi izražena je u U/L.

Aktivnost kreatin kinaze (CK; E. C. 2.7.3.2) određena je na automatskom biokemijskom analizatoru Olympus AU 400 (Olympus, Tokyo, Japan) uprabom reagensa Kreatinin kinaza (kat. br. TR14115) proizvođača Thermo Scientific (Middletown, SAD). Enzim CK katalizira reverzibilni prijenos fosfata s kreatin-fosfata na ADP. Pri pH 6,5 i uz dovoljan višak kreatin-fosfata i ADP-a reakcija se potpuno usmjeruje prema nastanku kreatina i ATP-a. Na tu glavnu reakciju nastavlja se dodatna reakcija u kojoj nastali ATP u prisutnosti HK-a fosforilira glukozu. Stvoreni glukoza-6- fosfat reagira u indikatorskoj reakciji s NADP-om uz G-6-PD te nastaju 6-fosfoglukonolakton i reducirani $NADPH_2$. Metoda se temelji na mjerenju novonastalog $NADPH_2$ optičkim testom pri valnoj dužini od 340 nm koji je srazmjeran aktivnosti CK-a.

Aktivnost CK u sjemenoj plazmi izražena je u U/L.

Aktivnost laktat dehidrogenaze (LDH; E. C. 1.1.1.27) određena je na automatskom biokemijskom analizatoru Olympus AU 400 (Olympus, Tokyo, Japan) uporabom reagensa Laktat dehidrogenaza (kat. br. TR20015) proizvođača Thermo Scientific (Middletown, SAD). Enzim LDH u prisutnosti NAD^+ katalizira prelazak laktata u piruvat i pri tome nastaje NADP2 koji se mjeri optičkim testom pri valnoj dužini od 340 nm, a povećanje je apsorpcije sukladno prelasku oksidiranog u reducirani oblik koenzima i mjera je aktivnosti enzima.

Aktivnost LDH u sjemenoj plazmi izražena je u U/L.

Koncentracija ukupnih bjelančevina određena je na automatskom biokemijskom analizatoru Olympus AU 400 (Olympus, Tokyo, Japan) uporabom reagensa Total protein (kat. br. OSR6132) proizvođača Beckman Coulter (Fullerton, SAD). Koncentracija je ukupnih bjelančevina u sjemenoj plazmi rasplodnih nerasta određena spektrofotometrijski biuret metodom. Biuretska reakcija nastaje u alkalnom okružju vezivanjem bjelančevina (peptidne veze) s ionima bakra koji tvore plavoljubičasti obojeni kompleks čiji je intenzitet obojenja srazmjeran koncentraciji ukupnih bjelančevina.

Koncentracija ukupnih bjelančevina u ispranim spermijima te izdvojenim spermijima različitih morfologijskih oblika i gibljivosti određena je na automatskom biokemijskom analizatoru Olympus AU 400 spektrofotometrijski pirogalol-crvenilo metodom upotrebom reagensa Urinary/CSF protein (kat. br. OSR6170) proizvođača Beckman Coulter (Fullerton, SAD). Pirogalol-crvenilo se veže s proteinima u kiseloj sredini koja sadržava ione molibdata. Nastali modro obojeni spoj ima maksimum apsorpcija na valnoj dužini od 600 nm, pa je optička gustoća na 600 nm izravno razmjerna koncentraciji bjelančevina u uzorku.

Vrijednost koncentracije ukupnih bjelančevina u sjemenoj plazmi, ispranim spermijima te izdvojenim spermijima različitih morfologijskih oblika i gibljivosti izražena je u g/L.

Koncentracija albumina određena je na automatskom biokemijskom analizatoru Olympus AU 400 (Olympus, Tokyo, Japan) uporabom reagensa Albumin (kat. br. TR36026) proizvođača Thermo Scientific (Middletown, SAD). Koncentracija albumina u uzorcima sjemene plazme rasplodnih nerasta određena je spektrofotometrijski pri valnoj dužini od 637 nm. Albumini iz sjemene plazme sa svojim aminoskupinama vežu se s indikatorom bromkrezol zelenilom i nastali kompleks mijenja boju indikatora u zelenomodru. Koncentracija nastalog kompleksa razmjerna je koncentraciji albumina u uzorcima sjemene plazme.

Vrijednosti koncentracije albumina u sjemenoj plazmi izražene su u g/L.

Koncentracija ukupnog kolesterola određena je na automatskom biokemijskom analizatoru Olympus AU 400 (Olympus, Tokyo, Japan) uporabom reagensa Kolesterol (kat. br. TR13303) proizvođača Thermo Scientific (Middletown, SAD). Koncentracija ukupnog kolesterola određena je u sjemenoj plazmi rasplodnih nerasta enzimskom spektrofotometrijskom metodom uz primjenu kolesterol oksidaze. Djelovanjem kolesterol-esteraze (KE), esteri kolesterola hidroliziraju se na kolesterol i masne kiseline. Kolesterol-oksidaza (KO) oksidira kolesterol (3-OH skupina kolesterola oksidira se do ketona) i pri tome se oslobđa H_2O_2 koji djelovanjem peroksidaze (POD) oksidira 4-aminoantipirin uz fenol te daje crveno obojeni proizvod. Intenzitet boje (koncentracija nastalog proizvoda) je na valnoj dužini od 500 nm razmjeran koncentraciji ukupnog kolesterola u uzorku sjemene plazme.

Vrijednosti koncentracije ukupnog kolesterola u sjemenoj plazmi izražene su u mmol/L.

Koncentracija HDL-kolesterola određena je na automatskom biokemijskom analizatoru Olympus AU 400 (Olympus, Tokyo, Japan) uporabom reagensa HDL-Kolesterol (kat. br. TR1035) proizvođača Dijagnostika d.d. (Sisak, Hrvatska) i to izravnom metodom bez prethodne obrade uzorka sjemene plazme. LDL i VLDL-kolesterol, te hilomikroni inhibiraju se apsorpcijom na površinu deterdženta, a HDL se frakcija kolesterola deterdžentom otapa. Oslobođeni HDL-kolesterol u reakciji s kolesterol-esterazom (KE), kolesterol oksidazom (KO) i kromogenom tvori obojeni kompleks kojemu je intenzitet boje na valnoj dužini od 600 nm razmjeran je koncentraciji HDL-kolesterola u uzorku.

Vrijednosti koncentracije HDL- kolesterola u sjemenoj plazmi izražene su u mmol/L.

Koncentracija LDL-kolesterola određena je na automatskom biokemijskom analizatoru Olympus AU 400 (Olympus, Tokyo, Japan) uporabom reagensa LDL-Kolesterol (kat. br. TR53101) proizvođača Dijagnostika d.d. (Sisak, Hrvatska) i to izravnom metodom bez prethodne obrade uzorka sjemene plazme. U prvoj se reakciji uklanja ne-LDL-kolesterol koji s reagensom tvori neobojeni kompleks. U drugoj se reakciji otapa preostala LDL-kolesterol frakcija koja u reakciji s kromogenom stvara obojeni proizvod, kojemu je intenzitet boje na valnoj dužini od 546 nm razmjeran koncentraciji LDL-kolesterola u uzorku.

Vrijednosti su koncentracije LDL-kolesterola u sjemenoj plazmi izražene u mmol/L.

Koncentracija triacilglicerola određena je na automatskom biokemijskom analizatoru Olympus AU 400 (Olympus, Tokyo, Japan) uporabom reagensa Trigliceridi (kat. br. TR22203) proizvođača Thermo Scientific (Middletown, SAD) i to metodom enzimskom spektrofotometrije s glicerolfosfat-oksidazom u uzorcima sjemene plazme rasplodnih nerasta. Triacilgliceroli se pomoću lipaze hidroliziraju na slobodne masne kiseline (SMK) i glicerol.

Glicerol se potom fosforilira s ATP uz glicerol-kinazu (GK) te nastaje glicerol-3-fosfat i ADP. Glicerol-3-fosfat s glicerol-fosfat-oksidazom (GPO) oksidira u dihidroksiaceton-fosfat (DAP) i vodikov peroksid. U Trinder5 tipu reakcije koju katalizira peroksidaza, vodikov peroksid reagira s 4-aminoantipirinom (4-AAP) i 3,5-dikloro-2-hidroksibenzen-sulfonatom (DHBS) te nastaje crveno obojeni spoj.

Apsorpcija obojenja pri valnoj dužini od 500 nm razmjerna je koncentraciji triacilglicerola u uzorku sjemene plazme, a dobivene su vrijednosti izražene je u mmol/L.

Određivanje koncentracije minerala

U sjemenoj su plazmi određene koncentracije kalcija, magnezija i cinka uporabom atomskog apsorpcijskog spektrofotometra Aanalyst 200 (Perkin-Elmer, Waltham, SAD). Atomska je apsorpcijska spektrofotometrija postupak u kojem se element dovodi u plinovito, disocirano, neionizirano, nepobuđeno stanje u kojem je sposoban apsorbirati zračenje definirane valne dužine. Atomizacija se postiže plamenom. Količina apsorbiranog svjetla proporcionalna je koncentraciji elementa u uzorku sjemene plazme.

Vrijednosti koncentracije navedenih minerala u sjemenoj plazmi izražene su u mmol/L.

4.4. STATISTIČKA OBRADA REZULTATA

Statistička je analiza podataka načinjena pomoću programskog paketa SAS (Statistical Analysis Software) 9.1.3. Service Pack 4 (2002-2003 by SAS Institute Inc., Cary, USA).

Deskriptivna je statistika (broj podataka, minimalne i maksimalne vrijednosti, srednja vrijednost, standardna devijacija, standardna pogreška, medijan, donji i gornji kvartil, koeficijent varijabilnosti) načinjena pomoću SAS modula PROC MEANS i PROC FREQ.

Normalna je distribucija podataka testirana pomoću modula PROC UNIVARIATE, a homogenost/heterogenost varijanci podataka između skupina analizirana je Levene testom pomoću GLM modula (PROC GLM) i opcije HOVTEST. Ponekad je distribucija podataka i homogenost/heterogenost varijanci testirana statističkom aplikacijom SAS-a „Interactive Data Analysis“. Kada su pretpostavke normalne distribucije analiziranih zavisnih varijabli bile narušene te kod heterogenosti varijanci različitih skupina, načinjena je transformacija varijabla. Iz tog su razloga podatci o gibljivosti spermija prije analize transformirani arkus sinus funkcijom. Većina je podataka o biokemijskim pokazateljima sjemene plazme transformirana upotrebom logaritma na bazu 10, a manji je broj varijabli transformiran

drugim korijenom. Podatci o antioksidativnom statusu spermija transformirani su uporabom logaritma na bazu 10, kvadriranjem, drugim korijenom, recipročnim drugim korijenom i eksponencijalnom transformacijom. Zaključci se dobiveni testiranjem hipoteze na transformiranim podatcima u ovoj disertaciji odnose i na originalne podatke.

Generalni je linearni model (PROC GLM) uporabljen za analizu varijabli između pasmina nerasta te između različitih frakcija spermija. Rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti i 95 %-tni interval pouzdanosti, a izračunati su metodom najmanjih kvadrata (LSM - least squares means) korištenjem LSMEANS naredbe i opcija PDIFF i CL. Za usporedbu je srednjih vrijednosti korištena Tukey-Kramer-ova metoda višestrukih usporedbi na razini statističke značajnosti $P<0,05$. Rezultati su nakon analize, ukoliko su podatci bili transformirani, obrnutom transformacijom vraćeni na originalne vrijednosti (srednja vrijednost i 95 %-tni interval pouzdanosti) i kao takve prikazane u tekstu ili grafikonu.

Pearson-ov je koeficijent korelacije izračunat između različitih parametara sjemene plazme i spermija korištenjem CORR modula SAS-a (PROC CORR).

Grafikoni su izrađeni pomoću modula SAS/GRAPH, postupcima PROC GCHART i PROC GPLOT, a u izradi je grafikona ponekad korištena anotacijska grafika. Izlazni je format grafikona bio png (Portable Network Graphics) u rezoluciji od 600 dpi (Dots Per Inch).

5. REZULTATI

Istraživanje je načinjeno na 27 rasplodnih nerasta starosti od 1,5 do 3,5 godine, a istraživne su razlike u kakvoći sjemena, antioksidacijskoj zaštiti spermija i sjemene plazme te razlike biokemijskih pokazatelja u sjemenoj plazmi nerasta različitih pasmina i PIC-hibrida. Rezultati istraživanih pokazatelja među različitih pasminama rasplodnih nerasta i PIC-hibrida prikazani su na Slikama 5.1. - 5.41. kao srednje vrijednosti i 95%-tni interval pouzdanosti srednje vrijednosti (engl. confidence interval, CI) te u tablicama 9.1. - 9.41. U Tablicama 9.1. - 9.41. naznačene su sljedeće vrijednosti: broj uzoraka (N), minimalna vrijednost (min), maksimalna vrijednost (max), srednja vrijednost (M), standardna devijacija (SD), standardna pogreška (SE), medijan, gornji kvartil (Q1), donji kvartil (Q3) i koeficijent varijabilnosti (KV). Slike su uključene u tekst uz opis rezultata, a tablični je prikaz rezultata dodan na kraju disertacije.

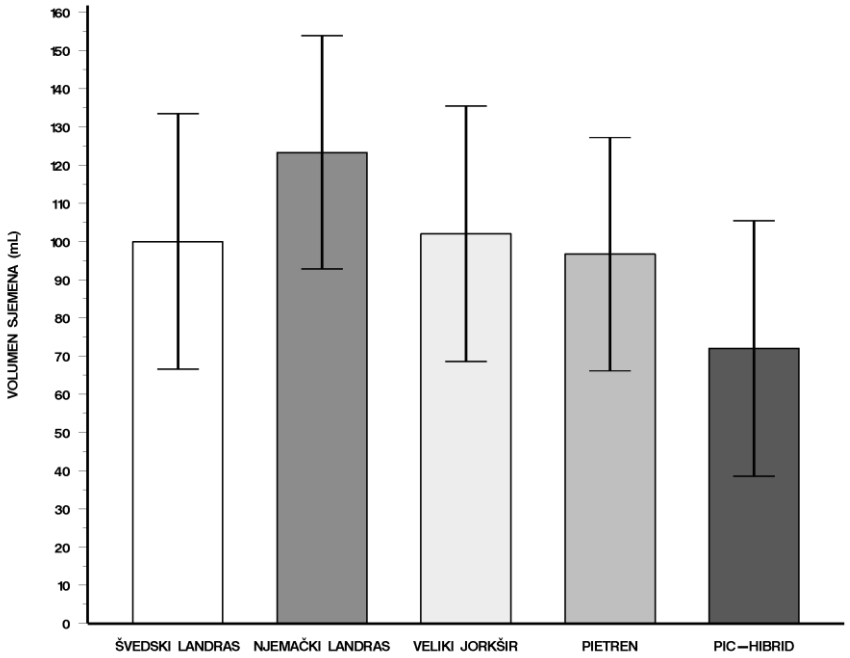
5.1. PROCJENA KAKVOĆE EJAKULATA

5.1.1. VOLUMEN EJAKULATA

Rezultati mjerenja volumena ejakulata rasplodnih nerasta nakon makroskopske pretrage ejakulat i statističke obrade podataka prikazani su na Slici 5.1. te u Tablici 9.1.

Najveći je volumen ejakulata zabilježen u rasplodnih nerasta pasmine njemački landras i prosječno je iznosio 123,33 mL, uz raspon 95%-tnog intervala pouzdanosti srednje vrijednosti od 92,79 do 153,87 mL, a najmanji volumen sjemena izmjeren je u PIC-hibrida i iznosio je 72,00 mL (38,54 – 105,46 mL). U preostalih skupina nisu zabilježena veća odstupanja srednjih vrijednosti pa je u nerasta pasmine švedski landras srednja vrijednost volumena ejakulata bila 100,00 mL (66,54 – 133,46 mL), u nerasta pasmine veliki jorkšir 102,00 mL (68,54 – 135,46 mL), a u pietrena 96,67 mL (66,13 – 127,21 mL).

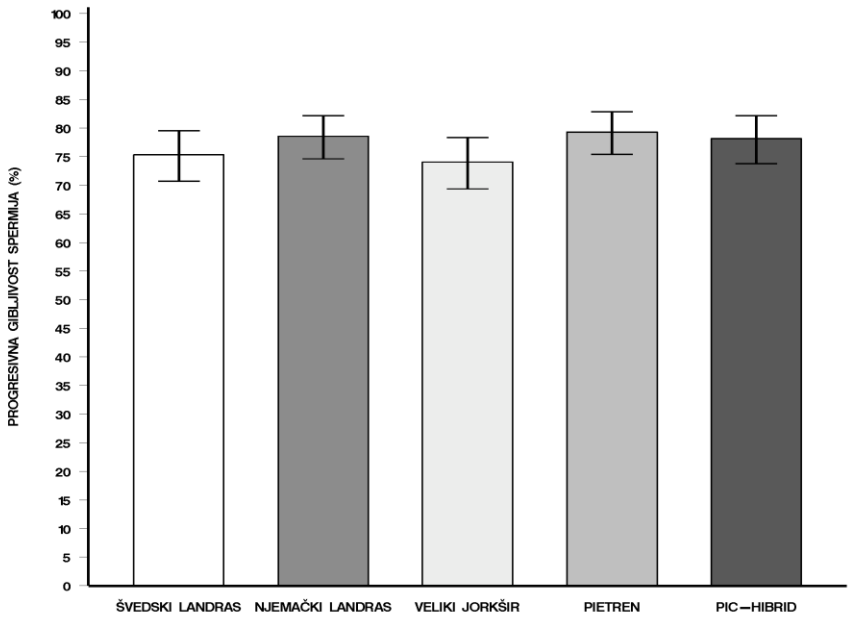
Usporedbom dobivenih rezultata, nakon statističke analize, utvrđeno je da se volumen ejakulata razlikovao među skupinama, a napose među skupinama njemačkog landrasa i PIC-hibrida, ali te razlike nisu bile statistički značajne ($P>0,05$).



Slika 5.1. Volumen ejakulata rasplodnih nerasta različitih pasmina i PIC-hibrida.

5.1.2. PROGRESIVNA GIBLJIVOST SPERMIJA U NATIVNOM EJAKULATU

Rezultati istraživanja progresivne gibljivosti spermija u uzorku nativnog ejakulata nerasta različitih pasmina i PIC-hibrida prikazani su na Slici 5.2. te u Tablici 9.2.



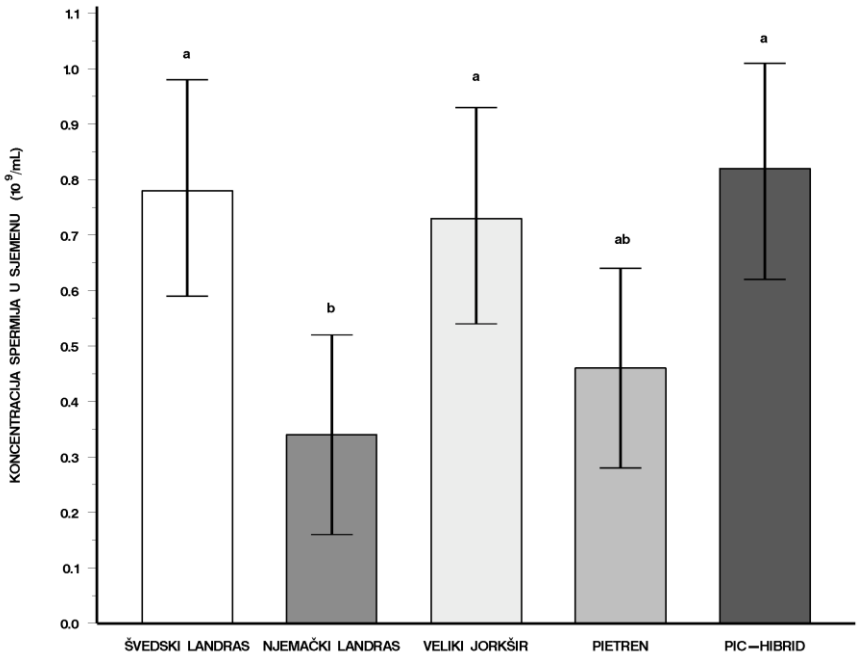
Slika 5.2. Progresivna gibljivost spermija u nativnom uzorku ejakulata nerasta različitih pasmina i PIC-hibrida.

Utvrđene vrijednosti ukazuju da je progresivna gibljivost spermija u uzorku nativnog ejakulata nerasta pasmine pietren iznosila 79,29% (75,42 – 82,87%) i bila je vršna srednja vrijednost u svih skupina, dok je najniža srednja vrijednost bila u skupini velikog jorkšira i iznosila je 74,03% (69,36 – 78,36%) (Slika 4.2.). Zabilježene srednje vrijednosti progresivne gibljivosti spermija bile su u švedskog landrasa 75,29% (70,72 – 79,53%), u njemačkoga landrasa 78,55% (74,62 – 82,18%) te u PIC-hibrida 78,14% (73,78 – 82,14%).

Usporedbom dobivenih vrijednosti nisu utvrđene značajnije razlike progresivne gibljivosti spermija između nerasta različitih pasmina i PIC-hibrida (P>0,05).

5.1.3. GUSTOĆA EJAKULATA

Rezultati istraživanja gustoće ejakulata (koncentracije ejakulata) nerasta utvrđene elektronskim brojačem u nativnim uzorcima ejakulata dobivenih od različitih pasmina i PIC-hibrida, nakon statističke obrade prikazani su na Slici 5.3. te u Tablici 9.3.



Slika 5.3. Gustoća ejakulata u nerasta različitih pasmina i PIC-hibrida. Različita slova u eksponentu označavaju statističku značajnost između skupina na razini P<0,05 i P<0,01.

Najviša prosječna vrijednost gustoće sjemena među skupinama dobivena je u PIC-hibrida i iznosila je 0,82 x 10^9/mL (0,63 – 1,02 x 10^9/mL), a najniža vrijednost zabilježena je u njemačkog landrasa 0,35 x 10^9/mL (0,17 – 0,52 x 10^9/mL). Malo viša vrijednost koncentracije spermija od skupine njemačkog landrasa zabilježena je u pietrena i iznosila je 0,47 x 10^9/mL (0,29 – 0,65 x 10^9/mL). Podjednake prosječne vrijednosti koncentracije

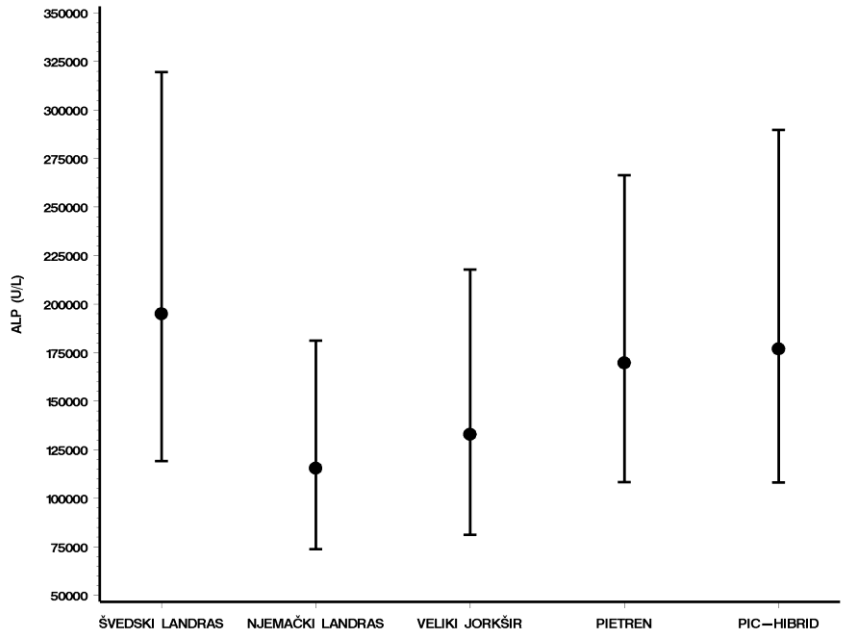
spermija zabilježene su u nerasta pasmine švedski landras od 0,79 x 10^9/mL (0,59 – 0,98 x 10^9/mL) te u velikog jorkšira od 0,74 x 10^9/mL (0,54 – 0,93 x 10^9/mL).

Statistički značajno nižu vrijednost koncentracije spermija imala je skupina njemačkog landrasa u odnosu na švedskog landrasa i velikog jorkšira na razini $P<0,05$, dok je statistički nižu vrijednost koncentracije spermija na razini $P<0,01$ imao njemački landras u odnosu na PIC-hibrida, što je posebice naznačeno na Slici 5.3.

5.2. BIOKEMIJSKI POKAZATELJI U SJEMENOJ PLAZMI

5.2.1. AKTIVNOST ALKALNE FOSFATAZE

Rezultati istraživanja aktivnosti alkalne fosfataze (ALP) u sjemenoj plazmi nerasta različitih pasmina i PIC-hibrida prikazani su na Slici 5.4. te u Tablici 9.4.



Slika 5.4. Aktivnost alkalne fosfataze u sjemenoj plazmi nerasta različitih pasmina i PIC-hibrida.

Vrijednost aktivnosti ALP-a u sjemenoj plazmi nerasta pasmine švedski landras iznosila je 195148 U/L (119199 – 319487 U/L), a na Slici 5.4. uočljivo je da iskazuje vršnu srednju vrijednost među skupinama. Najniža srednja vrijednost aktivnosti ALP-a među skupinama utvrđena je u pasmini njemačkog landrasa i iznosila je 115587 U/L (73700 – 181278 U/L). Nešto višu vrijednost od njemačkog landrasa imala je skupina velikoga jorkšira, gdje je aktivnost enzima iznosila 133062 U/L (81276 – 217844 U/L). Približno slične

prosječne vrijednosti aktivnosti ALP-a u sjemenoj plazmi uočene su u skupinama pietrena od 169808 U/L (108273 – 266315 U/L) te u PIC-hibrida od 177011 U/L (108121 – 289794 U/L).

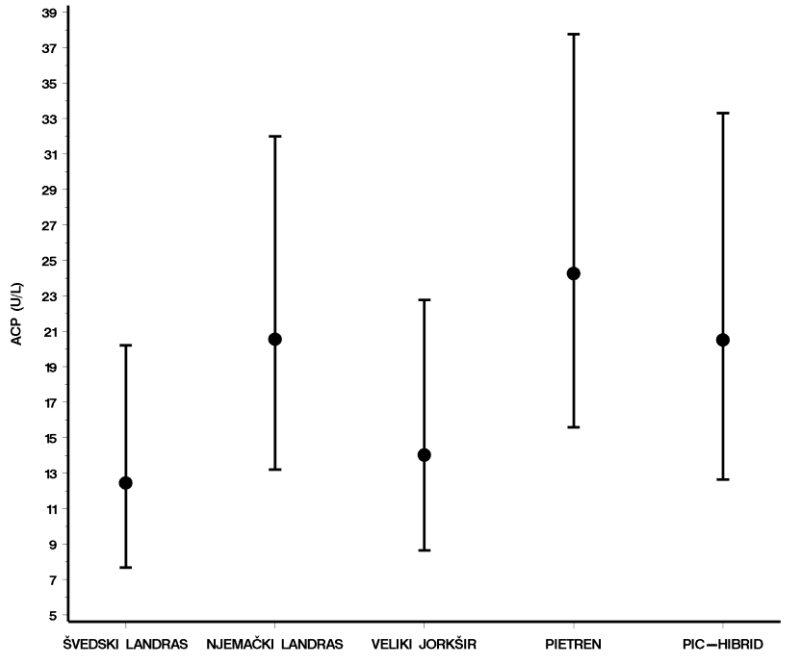
Usporedbom dobivenih vrijednosti aktivnosti ALP-a u sjemenoj plazmi između skupina zamijećene su razlike, ali te razlike među skupinama nisu bile statistički značajne (P>0,05).

5.2.2. AKTIVNOST KISELE FOSFATAZE

Rezultati istraživanja aktivnosti kisele fosfataze (ACP) u sjemenoj plazmi nerasta različitih pasmina i PIC-hibrida prikazani su na Slici 5.5. te u Tablici 9.5.

Prosječna aktivnost ACP-a u sjemenoj plazmi nerasta iz skupine švedski landras bila je 12,46 U/L (7,67 – 20,22 U/L) te je bila najmanja srednja vrijednost među skupinama, dok je u skupini nerasta pasmine pietren utvrđena najviša prosječna aktivnost ACP-a od 24,27 U/L (15,60 – 37,77 U/L). Aktivnost ACP-a u sjemenoj plazmi nerasta njemačkoga landrasa bila je 20,56 U/L (13,21 – 31,99 U/L), a podjednaka vrijednost aktivnosti enzima od 20,52 U/L (12,64 – 33,30 U/L) zabilježena je i u skupini nerasta PIC-hibrida. Nadalje, aktivnost ACP-a u sjemenoj plazmi skupine velikoga jorkšira iznosila je 14,03 U/L (8,65 – 22,78 U/L).

Usporedbom dobivenih vrijednosti aktivnosti ACP-a u sjemenoj plazmi među skupinama nerasta i statističkom obradom podataka nisu utvrđene statistički značajne razlike (P>0,05).



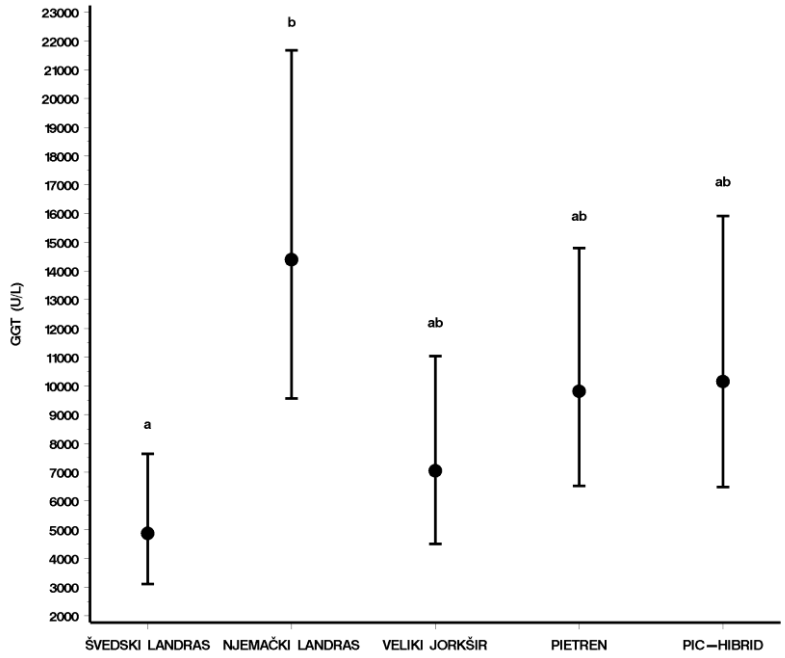
Slika 5.5. Aktivnost kisele fosfataze u sjemenoj plazmi nerasta različitih pasmina i PIC-hibrida.

5.2.3. AKTIVNOST γ-GLUTAMIL TRANSFERAZE

Rezultati istraživanja aktivnosti γ-glutamil transferaze (GGT) u sjemenoj plazmi nerasta različitih pasmina i PIC-hibrida prikazani su na Slici 5.6. te u Tablici 9.6.

Srednja vrijednost aktivnosti GGT-a u sjemenoj plazmi nerasta pasmine švedskoga landrasa, a koja je istodobno bila i najniža srednja vrijednost među skupinama, iznosila je 4873 U/L (3111 – 7631 U/L). U nerasta pasmine njemačkoga landrasa zabilježena je najviša srednja vrijednost GGT-a među skupinama i iznosila je 14396 U/L (9559 – 21682 U/L). U nerasta pasmine pietren srednja je vrijednost GGT-a u sjemenoj plazmi iznosila 9821 U/L (6521 – 14791 U/L), a slična vrijednost od 10157 U/L (6486 – 15908 U/L) zabilježena je i u PIC-hibrida. Skupina velikoga jorkšira imala je manju aktivnost GGT-a od prethodno navedenih skupina, a vrijednost je iznosila 7050 U/L (4502 – 11041 U/L).

Usporedbom vrijednosti dobivenih rezultata aktivnosti GGT-a statistički značajna odstupanja utvrđena su među pasminama švedskog i njemačkog landrasa. Pri tome je aktivnost GGT-a u sjemenoj plazmi njemačkoga landrasa bila značajno veća ($P<0,01$) nego u švedskoga landrasa. Usporedbom vrijednosti GGT-a u sjemenoj plazmi preostalih skupina nerasta, velikog jorkšira, pietrena i PIC-hibrida, nisu utvrđene statistički značajne razlike ($P>0,05$).



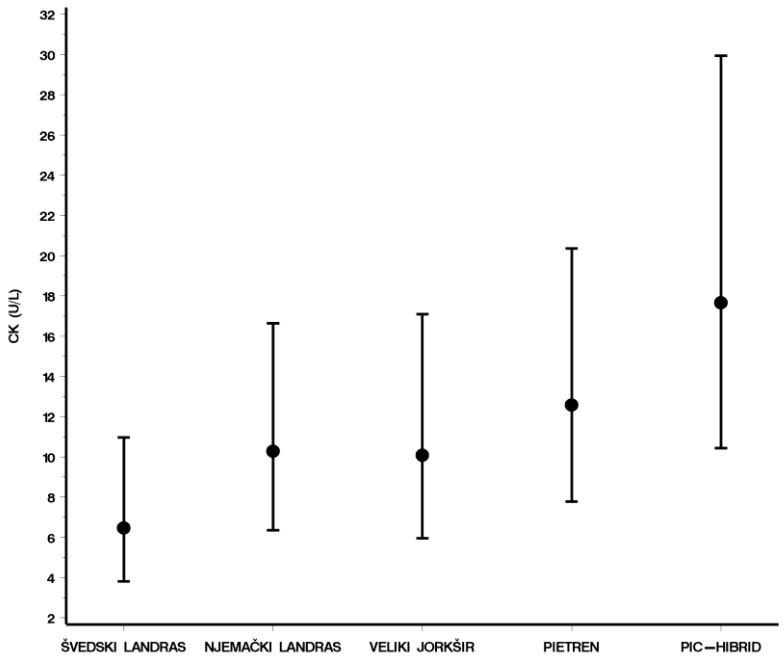
Slika 5.6. Aktivnost γ-glutamil transferaze u sjemenoj plazmi nerasta različitih pasmina i PIC-hibrida. Različita slova u eksponentu označavaju statističku značajnost između skupina na razini $P<0,01$.

5.2.4. AKTIVNOST KREATIN KINAZE

Rezultati istraživanja aktivnosti kreatin kinaze (CK) u sjemenoj plazmi nerasta različitih pasmina i PIC-hibrida prikazani su na Slici 5.7. te u Tablici 9.7.

Aktivnosti CK u sjemenoj plazmi nerasta pasmine švedskog landrasa bila je 6,47 U/L (3,82 – 10,97 U/L), a iz grafičkog prikaza na Slici 5.7. uočljivo je da je to najniža srednja vrijednost među nerastima svih istraživanih pasmina. Skupina nerasta PIC-hibrida imala je najvišu srednju vrijednost aktivnosti CK među skupinama koja je iznosila 17,67 U/L (10,42 – 29,94 U/L). Skupina nerasta pasmine pietren imala je aktivnost CK od 12,58 U/L (7,77 – 20,36 U/L), što je niža vrijednost od one zabilježene u PIC-hibrida. Nerasti skupine njemačkog landrasa imali su aktivnost CK od 10,28 U/L (6,35 – 16,64 U/L), a slična je vrijednost zabilježena i u nerasta pasmine velikoga jorkšira, odnosno 10,09 U/L (5,95 – 17,09 U/L).

Usporedbom dobivenih vrijednosti razlike u aktivnosti CK u sjemenoj plazmi među skupinama nisu, međutim, bile statistički značajne (P>0,05).



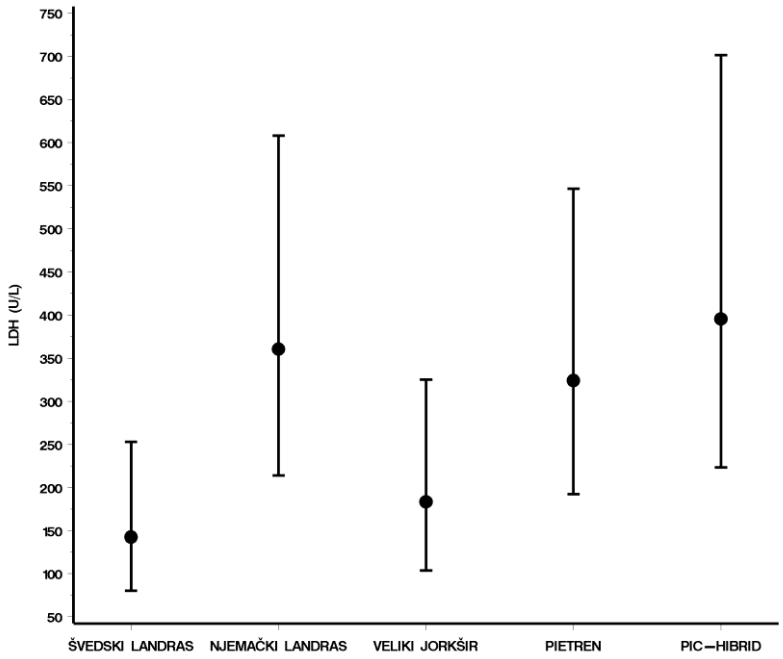
Slika 5.7. Aktivnost kreatin kinaze u sjemenoj plazmi nerasta različitih pasmina i PIC-hibrida.

5.2.5. AKTIVNOST LAKTAT DEHIDROGENAZE

Rezultati istraživanja aktivnosti laktat dehidrogenaze (LDH) u sjemenoj plazmi nerasta različitih pasmina i PIC-hibrida prikazani su na Slici 5.8. te u Tablici 9.8.

Aktivnost LDH u sjemenoj plazmi nerasta pasmine švedskoga landrasa zabilježena je kao najniža vrijednost među skupinama s prosječnom vrijednosti od 142,62 U/L (80,48 – 252,75 U/L). Vrijednost pak aktivnosti LDH u PIC-hibrida bila je 395,74 U/L (223,30 – 701,32 U/L) te je zabilježena kao najviša srednja vrijednost. Malo niža vrijednost aktivnosti enzima LDH od skupine PIC-hibrida zabilježena je u njemačkoga landrasa te je iznosila 360,61 U/L (213,88 – 607,99 U/L). Još nižu aktivnost LDH u sjemenoj plazmi, od PIC-hibrida i njemačkoga landrasa, imaju nerasti pasmine pietren i to 324,19 U/L (192,28 – 546,59 U/L). Iz grafičkog prikaza vidljivo je da je skupina velikog jorkšira zabilježena kao još niža, ali ne i najniža aktivnosti LDH među skupinama, a iznosila je 183,48 U/L (103,53 – 325,16 U/L).

Uočene su razlike među pasminama, napose između švedskoga landrasa i PIC-hibrida, ali statističkom analizom dobivenih podataka nisu zabilježene značajne razlike aktivnosti LDH u sjemenoj plazmi istraživanih skupina nerasta (P>0,05).



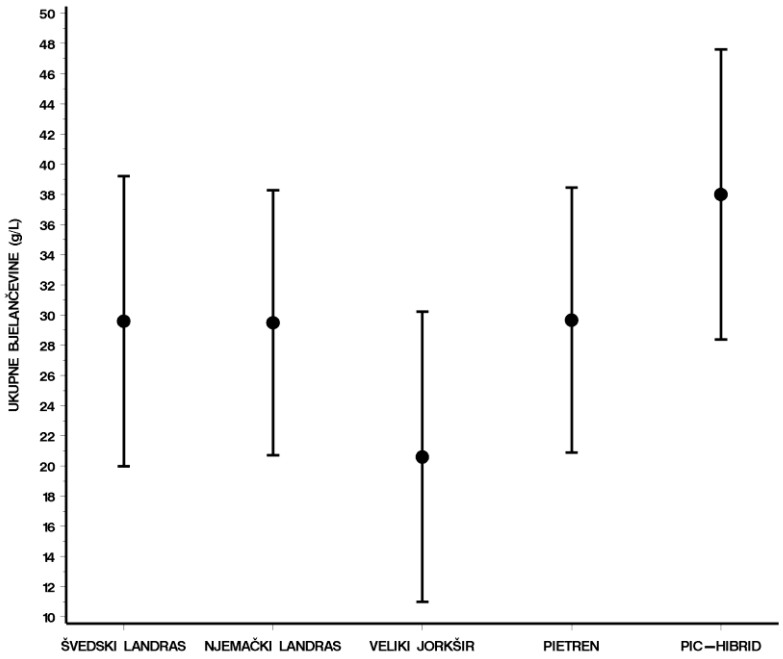
Slika 5.8. Aktivnost laktat dehidrogenaze u sjemenoj plazmi nerasta različitih pasmina i PIC-hibrida.

5.2.6. KONCENTRACIJA UKUPNIH BJELANČEVINA

Rezultati istraživanja koncentracije ukupnih bjelančevina u sjemenoj plazmi nerasta različitih pasmina i PIC-hibrida prikazani su na Slici 5.9. te u Tablici 9.9.

U pasmine velikoga jorkšira zabiljžena je najniža srednja vrijednost koncentracije ukupnih bjelančevina u sjemenoj plazmi među skupinama i iznosila je 20,60 g/L (10,98 – 30,22 g/L), dok je u PIC-hibrida zabilježena najviša srednja vrijednost od 38,00 g/L (28,38 – 47,62 g/L). Približno jednake vrijednosti koncentracija ukupnih bjelančevina zabilježene su u pietrena i to 29,67 g/L (20,89 – 38,45 g/L), u švedskoga landrasa 29,60 g/L (19,98 – 39,22 g/L) te u njemačkoga landrasa 29,50 g/L (20,72–38,28 g/L).

Prosječna koncentracija ukupnih bjelančevina u sjemenoj plazmi najvišu je vrijednost dosegla u skupini PIC-hibrida, a najnižu u velikoga jorkšira, no među skupinama nije bilo statistički značajnih razlika (P>0,05).



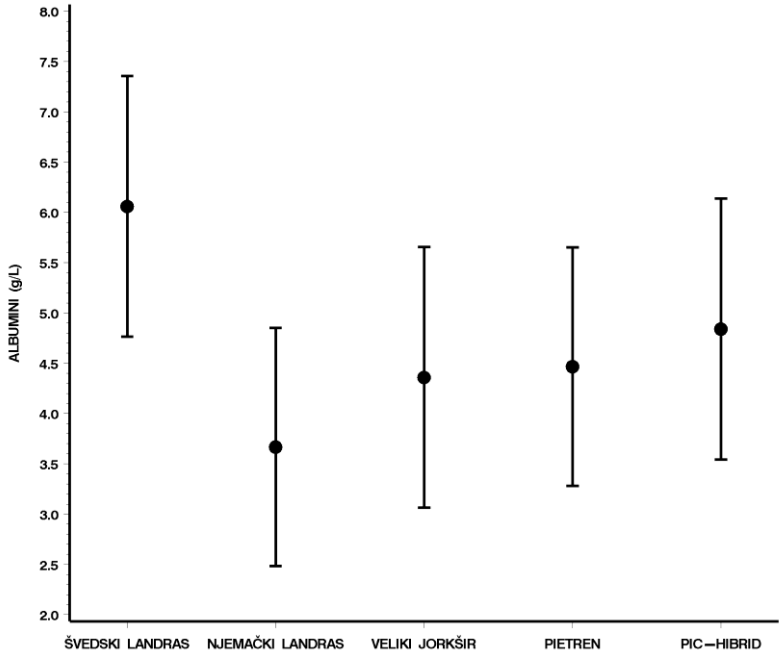
Slika 5.9. Koncentracija ukupnih bjelančevina u sjemenoj plazmi nerasta različitih pasmina i PIC-hibrida.

5.2.7. KONCENTRACIJA ALBUMINA

Rezultati istraživanja koncentracije albumina u sjemenoj plazmi nerasta različitih pasmina i PIC-hibrida prikazani su na Slici 5.10. te u Tablici 9.10.

Koncentracija albumina u sjemenoj plazmi nerasta pasmine švedski landras bila je 6,06 g/L (4,76 – 7,36 g/L) te je zabilježena kao najveća srednja vrijednost među skupinama, a u njemačkog je landrasa koncentracija albumina iznosila 3,67 g/L (2,48 – 4,85 g/L) što je najniža srednja vrijednost među skupinama. Približno jednake vrijednosti albumina zabilježene su u ostalim skupinama nerasta pa tako u velikog jorkšira iznose 4,36 g/L (3,06 – 5,66 g/L), u pietrena 4,47 g/L (3,28 – 5,65 g/L) te u PIC-hibrida 4,84 g/L (3,54 – 6,14 g/L).

Usporedbom dobivenih vrijednosti, koncentracija albumina u sjemenoj plazmi među skupinama nerasta, nisu utvrđene statistički značajne razlike (P>0,05).



Slika 5.10. Koncentracija albumina u sjemenoj plazmi nerasta različitih pasmina i PIC-hibrida.

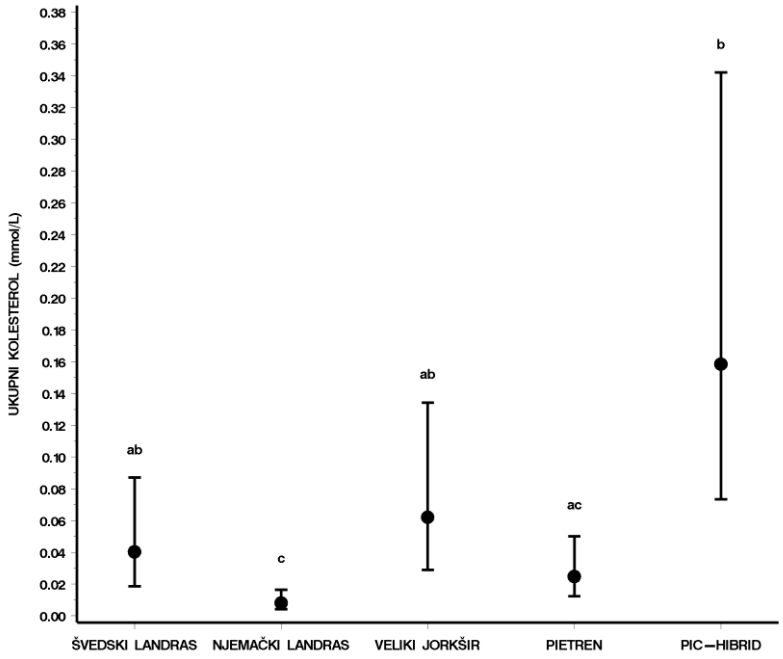
5.2.8. KONCENTRACIJA UKUPNOG KOLESTEROLA

Rezultati istraživanja koncentracije ukupnog kolesterola u sjemenoj plazmi nerasta različitih pasmina i PIC-hibrida prikazani su na Slici 5.11. te u Tablici 9.11.

Najveća srednja vrijednost koncentracije ukupnog kolesterola u sjemenoj plazmi, kao što se vidi na Slici 5.11., zabilježena je u skupini nerasta PIC-hibrida, a iznosila je 0,159 mmol/L (0,073 – 0,342 mmol/L). Najmanju pak, srednju vrijednost koncentracije ukupnog kolesterola imala je skupina nerasta njemačkog landrasa i to 0,008 mmol/L (0,004 – 0,017 mmol/L). Nisku, ali ipak veću koncentraciju ukupnog kolesterola od njemačkog landrasa, imala je skupina nerasta pasmine pietren, a iznosila je 0,025 mmol/L (0,012 – 0,050 mmol/L). Skupine nerasta švedski landras i veliki jorkšir imale su manja odstupanja u vrijednostima koncentracije ukupnog kolesterola u sjemenoj plazmi nego prethodno navedene skupine, a njihove vrijednosti iznosile su za švedskog landrasa 0,040 mmol/L (0,019 – 0,087 mmol/L) te velikog jorkšira 0,062 mmol/L (0,029 – 0,134 mmol/L).

Usporedbom vrijednosti koncentracije ukupnog kolesterola u sjemenoj plazmi nerasta različitih pasmina i PIC-hibrida zabilježene su statistički značajne razlike. Tako je zabilježena značajno viša koncentracija kolesterola u sjemenoj plazmi PIC-hibrida u odnosu na

njemačkog landrasa (P<0,001) i pietrena (P<0,01), te značajno manja u njemačkog landrasa u odnosu na velikog jorkšira i švedskog landrasa (P<0,05).



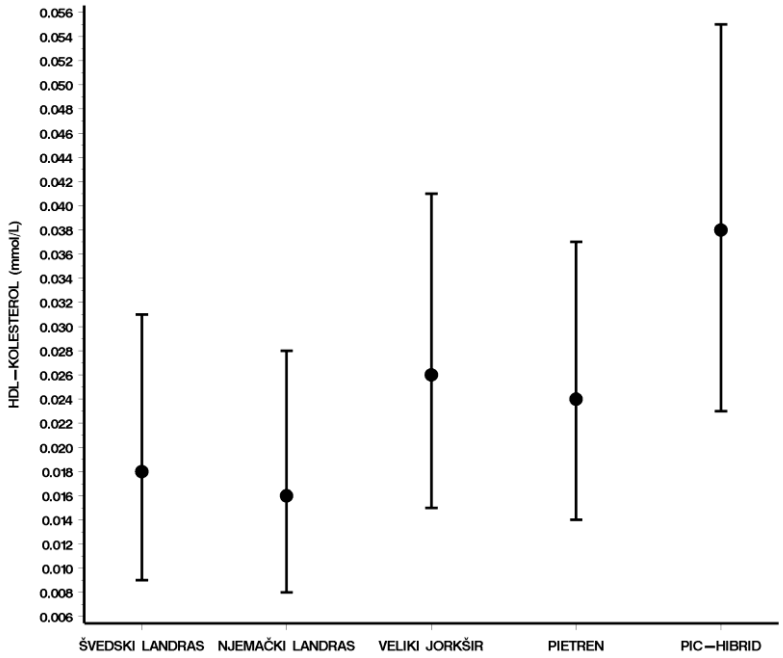
Slika 5.11. Koncentracija ukupnog kolesterola u sjemenoj plazmi nerasta različitih pasmina i PIC-hibrida. Različita slova u eksponentu označavaju statističku značajnost između skupina na razini P<0,05, P<0,01i P<0,001.

5.2.9. KONCENTRACIJA HDL-KOLESTEROLA

Rezultati istraživanja koncentracije HDL-kolesterola u sjemenoj plazmi nerasta različitih pasmina i PIC-hibrida prikazani su na Slici 5.12. te u Tablici 9.12.

U skupini PIC-hibrida zabilježena je najveća srednja vrijednost koncentracije HDL-kolesterola u sjemenoj plazmi koja je iznosila 0,038 mmol/L (0,023 – 0,055 mmol/L), a najmanja je vrijednost zabilježena u skupini nerasta pasmine njemačkog landrasa i iznosila je 0,016 mmol/L (0,008 – 0,028 mmol/L). Njemačkom landrasu približno slična vrijednost koncentracije HDL-kolesterola u sjemenoj plazmi, zabilježena je u švedskog landrasa i iznosila je 0,018 mmol/L (0,009 – 0,031 mmol/L). Manje razlike u vrijednostima, zabilježena je među skupinama velikog jorkšira s koncentracijom HDL-kolesterola od 0,026 mmol/L (0,015 – 0,041 mmol/L) i pietrena s koncentracijom od 0,024 mmol/L (0,014 – 0,037 mmol/L).

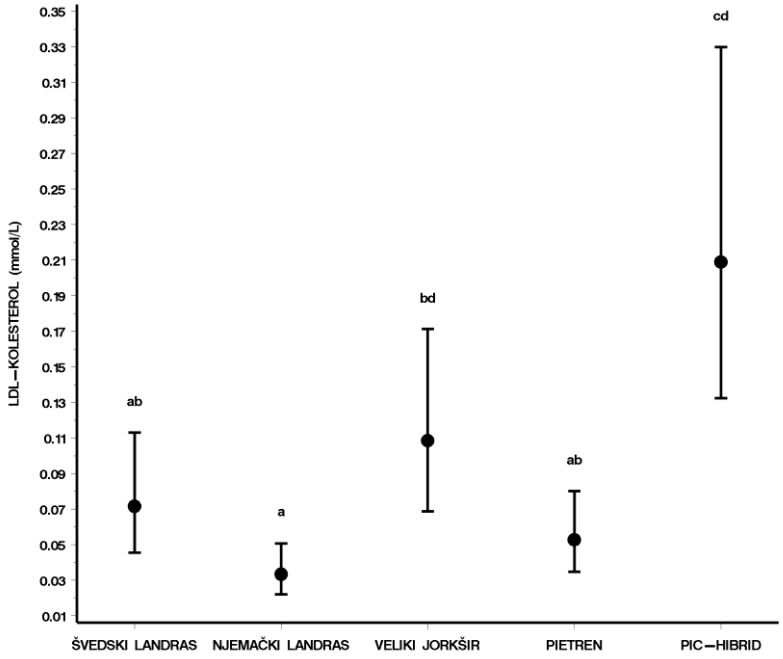
Usporedbom vrijednosti koncentracije HDL-kolesterola u sjemenoj plazmi nerasta različitih pasmina i PIC-hibrida nisu utvrđene značajne razlike (P>0,05).



Slika 5.12. Koncentracija HDL-kolesterola u sjemenoj plazmi nerasta različitih pasmina i PIC-hibrida.

5.2.10. KONCENTRACIJA LDL-KOLESTEROLA

Rezultati istraživanja koncentracije LDL-kolesterola u sjemenoj plazmi nerasta različitih pasmina i PIC-hibrida prikazani su na Slici 5.13. te u Tablici 9.13.



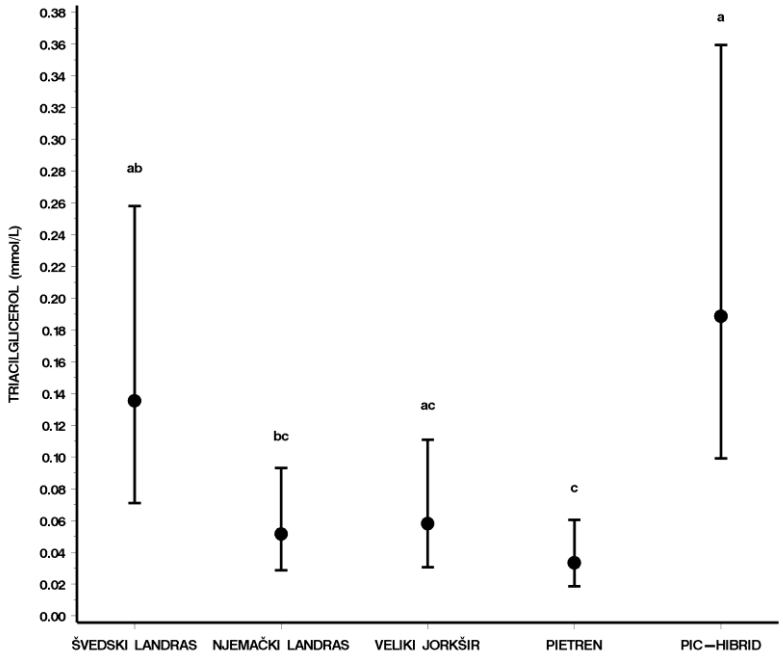
Slika 5.13. Koncentracija LDL-kolesterola u sjemenoj plazmi nerasta različitih pasmina i PIC-hibrida. Različita slova u eksponentu označavaju statističku značajnost između skupina na razini $P<0,05$, $P<0,01$ i $P<0,001$.

Najveća srednja vrijednost koncentracije LDL-kolesterola u sjemenoj plazmi utvrđena je u skupini PIC-hibrida i iznosila je 0,21 mmol/L (0,13 – 0,33 mmol/L), dok je u skupini nerasta njemačkog landrasa utvrđena najmanja srednja vrijednost od 0,03 mmol/L (0,02 – 0,05 mmol/L). Veće vrijednosti koncentracije LDL-kolesterola u sjemenoj plazmi, naspram onih u skupini njemačkog landrasa, zabilježene su u pietrena i to 0,05 mmol/L (0,03 – 0,08, mmol/L), švedskog landrasa 0,07 mmol/L (0,05 – 0,11 mmol/L) te velikog jorkšira 0,11 mmol/L (0,07 – 0,17 mmol/L).

Statistička analiza podataka utvrdila je značajno manju vrijednost koncentracije LDL-kolesterola u sjemenoj plazmi njemačkog landrasa u odnosu na PIC-hibrida ($P<0,001$) i velikog jorkšira ($P<0,01$). Statistički značajno viša vrijednost zabilježena je u PIC-hibrida naspram pietrena ($P<0,001$) i švedskog landrasa ($P<0,05$).

5.2.11. KONCENTRACIJA TRIACILGLICEROLA

Rezultati istraživanja koncentracije triacilglicerola u sjemenoj plazmi nerasta različitih pasmina i PIC-hibrida prikazani su na Slici 5.14. te u Tablici 9.14.



Slika 5.14. Koncentracija triacilglicerola u sjemenoj plazmi nerasta različitih pasmina i PIC-hibrida. Različita slova u eksponentu označavaju statističku značajnost između skupina na razini $P<0,05$ i $P<0,01$.

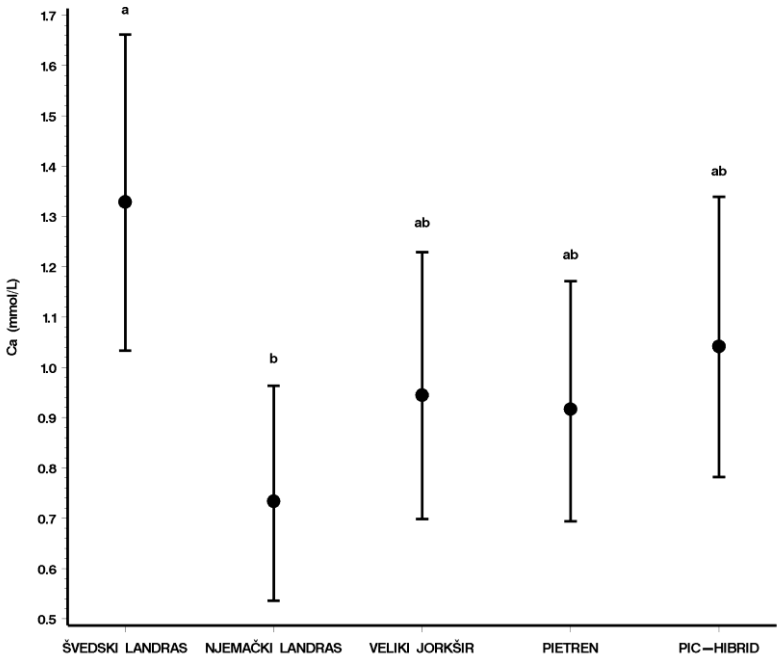
Srednja vrijednost koncentracije triacilglicerola u sjemenoj plazmi nerasta PIC-hibrida najveća je vrijednost među istraživanim skupinama te je iznosila 0,19 mmol/L (0,10 – 0,36

mmol/L), a najmanja srednja vrijednost zabilježena je u skupini pietrena i iznosila je 0,03 mmol/L (0,02 – 0,06 mmol/L). Nerasti skupine njemačkog landrasa i velikog jorkšira imaju podjednake koncentracije triacilglicerola u sjemenoj plazmi te je ona u njemačkog landrasa iznosila 0,05 mmol/L (0,03 – 0,09 mmol/L), a u velikog jorkšira 0,06 mmol/L (0,03 – 0,11 mmol/L). Prosječna koncentracija triacilglicerola u sjemenoj plazmi nerasta pasmine švedskog landrasa veća je od one u njemačkog landrasa i velikog jorkšira te je iznosila 0,14 mmol/L (0,07 – 0,26 mmol/L).

Usporedbom vrijednosti koncentracije triacilglicerola u sjemenoj plazmi nerasta različitih pasmina i PIC-hibrida statističkom obradom podataka ustvrđene su značajno veće vrijednosti u skupini PIC-hibrida u odnosu na pietrena ($P<0,01$) i njemačkog landrasa ($P<0,05$). Istovremeno, statistički značajno niže vrijednosti utvrđene su u nerasta pasmine pietren u odnosu na neraste pasmine švedski landras ($P<0,05$).

5.2.12. KONCENTRACIJA KALCIJA

Rezultati istraživanja koncentracije kalcija u sjemenoj plazmi nerasta različitih pasmina i PIC-hibrida prikazani su na Slici 5.15. te u Tablicama 9.15.



Slika 5.15. Koncentracija kalcija u sjemenoj plazmi nerasta različitih pasmina i PIC-hibrida. Različita slova u eksponentu označavaju statističku značajnost između skupina na razini $P<0,05$.

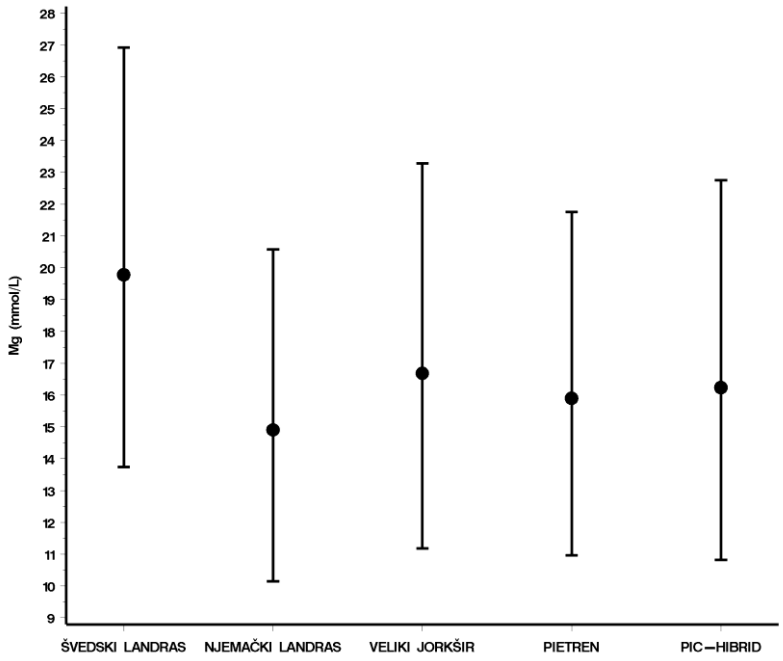
Srednja vrijednost koncentracije kalcija u sjemenoj plazmi nerasta bila je najviša u švedskog landrasa i iznosila je 1,33 mmol/L (1,03 – 1,66 mmol/L), a najmanja je bila u njemačkog landrasa i iznosila je 0,73 mmol/L (0,54 – 0,96 mmol/L). Približno slične srednje

vrijednosti koncentracija kalcija zabilježene su u pietrena od 0,92 mmol/L (0,69 – 1,17 mmol/L), velikog jorkšira od 0,95 mmol/L (0,70 – 1,23 mmol/L) te u PIC-hibrida od 1,04 mmol/L (0,78 – 1,34 mmol/L).

Uočene razlike srednjih vrijednosti koncentracije kalcija u sjemenoj plazmi među skupinama švedskog landrasa i njemačkog landrasa utvrđene su i statističkom analizom na razini značajnosti od $P<0,05$, gdje je u skupini švedskog landrasa zabilježena najveća vrijednost. U preostalih skupina nisu utvrđene statistički značajne razlike koncentracije kalcija u sjemenoj plazmi ($P>0,05$).

5.2.13. KONCENTRACIJA MAGNEZIJA

Rezultati istraživanja koncentracije magnezija u sjemenoj plazmi nerasta različitih pasmina i PIC-hibrida prikazani su na Slici 5.16. te u Tablici 9.16.



Slika 5.16. Koncentracija magnezija u sjemenoj plazmi nerasta različitih pasmina i PIC-hibrida.

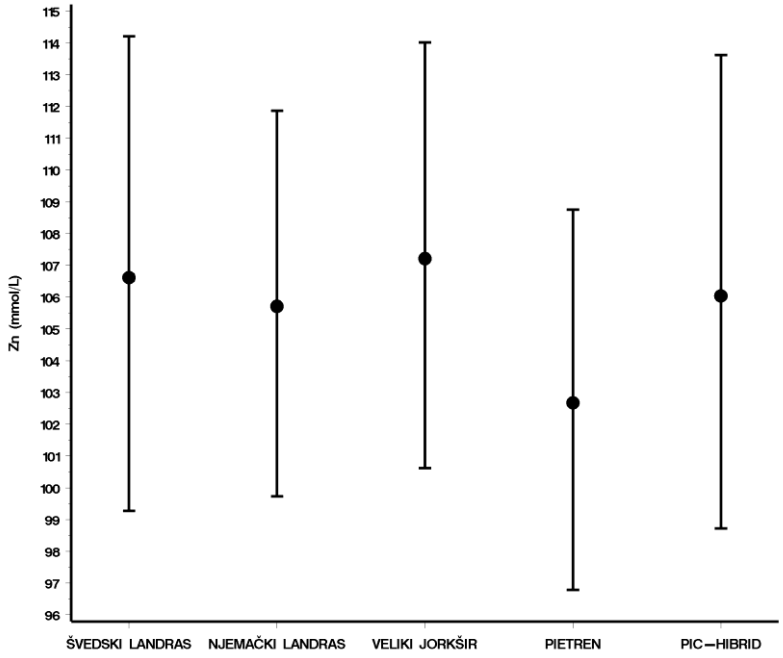
Prosječna vrijednost koncentracije magnezija u sjemenoj plazmi nerasta pasmine švedskog landrasa od 19,78 mmol/L (13,74 – 26,92 mmol/L) bila je najveća među u istraživanim skupinama nerasta, a suprotno tomu, najmanja prosječna vrijednost bila je u nerasta pasmine njemačkog landrasa te je iznosila 14,91 mmol/L (10,14 – 20,58 mmol/L). Među preostalim promatranim skupinama uočljiva je sličnost prosječnih vrijednosti koncentracija magnezija u sjemenoj plazmi te su one u skupini pietrena iznosile 15,90

mmol/L (10,97 – 21,75 mmol/L), PIC-hibrida 16,24 mmol/L (10,82 – 22,76 mmol/L) i velikog jorkšira 16,68 mmol/L (11,18 – 23,28 mmol/L).

Usporedbom rezultata, nakon statističke analize, utvrđeno je da se prosječne vrijednosti koncentracije magnezija u sjemenoj plazmi razlikuju među skupinama, napose među skupinama švedskog i njemačkog landrasa, ali te razlike nisu bile statistički značajne (P>0,05).

5.2.14. KONCENTRACIJA CINKA

Rezultati istraživanja koncentracije cinka u sjemenoj plazmi nerasta različitih pasmina i PIC-hibrida prikazani su na Slici 5.17. te u Tablici 9.17.



Slika 5.17. Koncentracija cinka u sjemenoj plazmi nerasta različitih pasmina i PIC-hibrida.

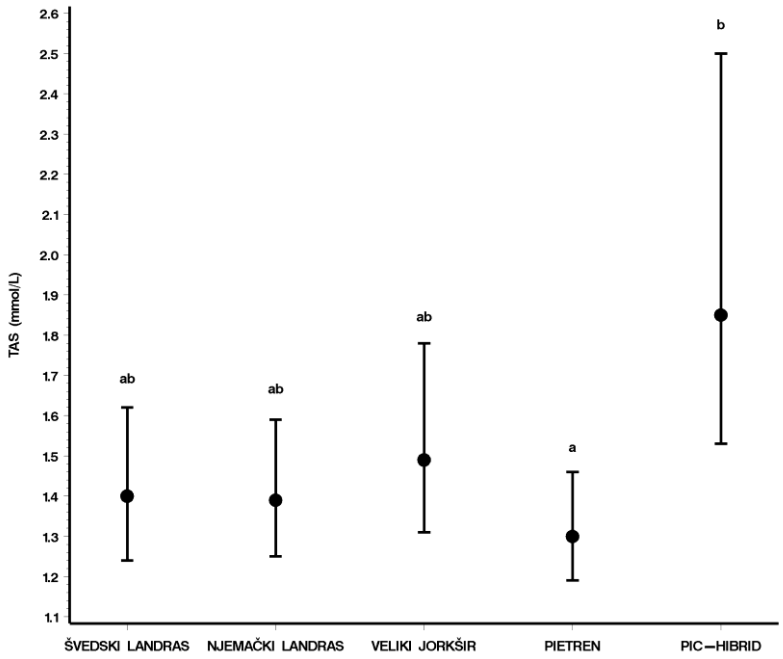
Prosječne vrijednosti koncentracije cinka u sjemenoj plazmi nerasta pasmine veliki jorkšir od 107,22 mmol/L (100,62 – 114,02 mmol/L), švedski landras od 106,62 mmol/L (99,28 – 114,22 mmol/L), PIC-hibrid od 106,04 mmol/L (98,73 – 113,62 mmol/L) te njemački landras od 105,71 mmol/L (99,73 – 111,87 mmol/L) neznatno su se razlikovale, pri čemu je najveća srednja vrijednost zabilježena u velikog jorkšira, a najmanja u njemačkog landrasa. Najveće razlike koncentracije cinka u sjemenoj plazmi zabilježene su u nerasta pasmine pietren, gdje je koncentracija cinka iznosila 102,68 mmol/L (96,78 – 108,75 mmol/L), što je ujedno bila i najniža srednja vrijednost među skupinama.

Nakon statističke obrade podataka srednjih vrijednosti koncentracije cinka u sjemenoj plazmi različitih pasmina nerasta i PIC-hibrida nisu utvrđene statistički značajne razlike (P>0,05).

5.3. POKAZATELJI ANTIOKSIDACIJSKE ZAŠTITE U SJEMENOJ PLAZMI

5.3.1. KONCENTRACIJA UKUPNOG ANTIOKSIDACIJSKOGA STATUSA

Rezultati istraživanja koncentracije ukupnog antioksidacijskoga statusa (TAS) u sjemenoj plazmi nerasta različitih pasmina i PIC-hibrida prikazani su na Slici 5.18. te u Tablici 9.18.



Slika 5.18. Koncentracija ukupnog antioksidacijskoga statusa (TAS) u sjemenoj plazmi nerasta različitih pasmina i PIC-hibrida. Različita slova u eksponentu označavaju statističku značajnost između skupina na razini P<0,05.

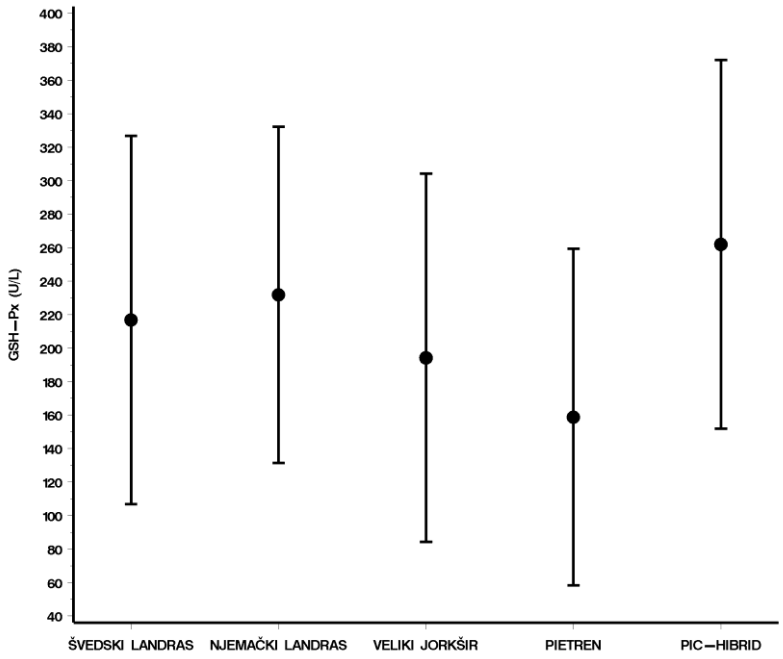
Koncentracija TAS-a u sjemenoj plazmi nerasta bila je najveća u skupini PIC-hibrida i iznosila je 1,85 mmol/L (2,51 – 1,54 mmol/L). Na Slici 5.18. dobro je uočljiva najmanja vršna vrijednost koncentracije TAS-a u sjemenoj plazmi nerasta skupine pietren od 1,31 mmol/L (1,47 – 1,19mmol/L). Neznatno različite vrijednosti koncentracije TAS-a u sjemenoj plazmi zabilježene su u nerasta pasmine njemački landras od 1,39 mmol/L (1,60 – 1,25 mmol/L) i nerasta skupine švedski landras od 1,40 mmol/L (1,63 – 1,25 mmol/L). Približno sličnu, ali veću vrijednost od nalaza u spomenutih skupina imala je pasmina nerasta veliki

jorkšir čija je koncentracija TAS-a u sjemenoj plazmi iznosila 1,50 mmol/L (1,78 – 1,31 mmol/L).

Usporedbom vrijednosti koncentracije TAS-a u sjemenoj plazmi nerasta različitih pasmina i PIC-hibrida te statističkom obradom podataka ustvrđene su statistički značajno veće koncentracije u skupini PIC-hibrida u odnosu na pasminu pietren ($P<0,05$). Istovremeno, koncentracija TAS-a u sjemenoj plazmi PIC-hibrida bila je veća i od one u njemačkog landrasa, a te su razlike bile blizu statističke značajnosti ($P\leq0,05$).

5.3.2. AKTIVNOST GLUTATION PEROKSIDAZE

Rezultati istraživanja aktivnosti glutation peroksidaze (GSH-Px) u sjemenoj plazmi nerasta različitih pasmina i PIC-hibrida prikazani su na Slici 5.19. te u Tablici 9.19.



Slika 5.19. Aktivnost ukupne glutation peroksidaze (GSH-Px) u sjemenoj plazmi nerasta različitih pasmina i PIC-hibrida.

Srednja vrijednost aktivnosti GSH-Px u sjemenoj plazmi nerasta skupine PIC-hibrida od 262,00 U/L (151,97 – 372,03 U/L) utvrđena je kao najviša vrijednost među istraživanim skupinama. Suprotno tomu, u skupine nerasta pietren zabilježena je najmanja vrijednost od 158,83 U/L (58,39 – 259,28 U/L). Promatramo li usporedbeno vrijednosti GSH-Px od 216,80 U/L (106,77 – 326,83 U/L) u pasmine švedskog landrasa i vrijednosti od 231,83 U/L (131,39 – 332,28 U/L) u njemačkog landrasa, uočljiva je sličnost aktivnosti GSH-Px u sjemenoj

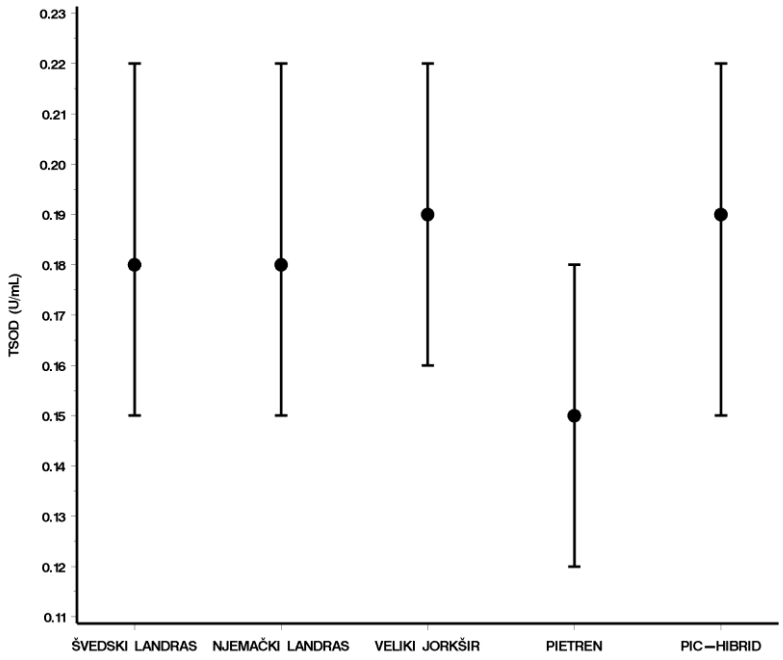
plazmi. Malo manja vrijednost GSH-Px izmjerena je u sjemenoj plazmi nerasta pasmine veliki jorkšir, a iznosila je 194,20 U/L (84,17 – 304,23 U/L).

Usporedbom rezultata, nakon statističke analize, utvrđeno je da su se prosječne vrijednosti aktivnosti GSH-Px u sjemenoj plazmi nerasta razlikovale među skupinama, a napose među skupinama PIC-hibrida i pietrena, ali te razlike nisu bile statistički značajne (P>0,05).

5.3.3. AKTIVNOST UKUPNE SUPEROKSID DISMUTAZE

Rezultati istraživanja aktivnosti ukupne superoksid dismutaze (TSOD) u sjemenoj plazmi nerasta različitih pasmina i PIC-hibrida prikazani su na Slici 5.20. te u Tablici 9.20.

Srednja vrijednost TSOD-a u sjemenoj plazmi nerasta pasmine veliki jorkšir od 0,20 U/mL (0,16 – 0,23 U/mL) bila je najveća vrijednost u istraživanih skupina. Približno slične vrijednosti TSOD-a zabilježene su u sjemenoj plazmi nerasta švedskog i njemačkog landrasa te PIC-hibrida, gdje su vrijednosti u švedskog landrasa iznosile 0,19 U/mL (0,15 – 0,22 U/mL), u njemačkog landrasa 0,19 U/mL (0,16 – 0,22 U/mL) te PIC-hibrida 0,19 U/mL (0,16 – 0,22 U/mL). Pri tome su nerasti pasmine pietrena imali najmanju aktivnost TSOD u sjemenoj plazmi među skupinama, a ona je iznosila 0,16 U/mL (0,13 – 0,19 U/mL).



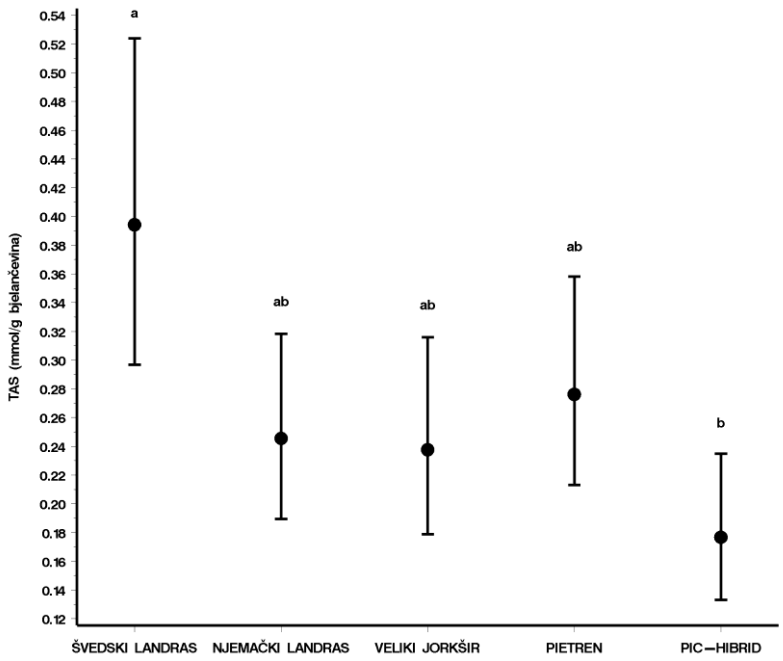
Slika 5.20. Aktivnost ukupne superoksid dismutaze (TSOD) u sjemenoj plazmi nerasta različitih pasmina i PIC-hibrida.

Nakon statističke obrade podataka srednjih vrijednosti aktivnosti TSOD-a u sjemenoj plazmi različitih pasmina nerasta i PIC-hibrida nisu utvrđene statistički značajne razlike među skupinama (P>0,05).

5.4. POKAZATELJI ANTIOKSIDACIJSKE ZAŠTITE U ISPRANIM SPERMIJIMA

5.4.1. KONCENTRACIJA UKUPNOG ANTIOKSIDACIJSKOGA STATUSA

Rezultati istraživanja koncentracije ukupnog antioksidacijskoga statusa (TAS) u ispranim spermijima nerasta različitih pasmina i PIC-hibrida prikazani su na Slici 5.21. te u Tablici 9.21.



Slika 5.21. Koncentracija ukupnog antioksidacijskoga statusa (TAS) u ispranim spermijima nerasta različitih pasmina i PIC-hibrida. Različita slova u eksponentu označavaju statističku značajnost između skupina na razini P<0,01.

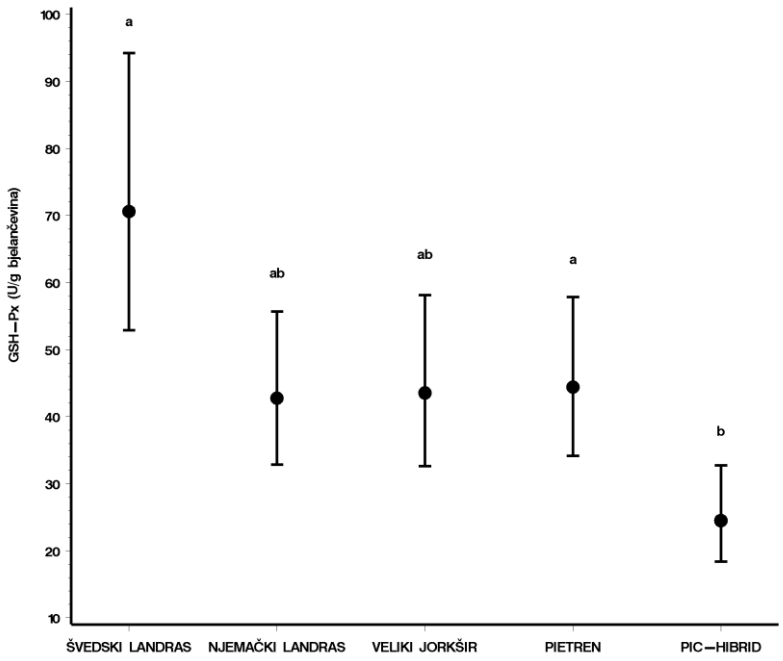
Najveća srednja vrijednost koncentracije TAS-a u ispranim spermijima zabilježena je u nerasta pasmine švedskoga landrasa i iznosila je 0,39 mmol/g bjelančevina (0,30 – 0,52 mmol/g bjelančevina), a najmanja vrijednost u nerasta PIC-hibrida od 0,18 mmol/g bjelančevina (0,13 – 0,23 mmol/g bjelančevina). Približno istovjetna vrijednost koncentracije TAS-a utvrđena je u nerasta skupine veliki jorkšir od 0,24 mmol/g bjelančevina (0,18 – 0,32 mmol/g bjelančevina) i nerasta skupine njemački landras od 0,25 mmol/g bjelančevina (0,19 – 0,32 mmol/g bjelančevina). Malo veća vrijednost koncentracije TAS-a u odnosu na

spomenute skupine zabilježena je u nerasta pasmine pietren i iznosila je 0,28 mmol/g bjelančevina (0,21 – 0,36 mmol/g bjelančevina).

Usporedbom vrijednosti koncentracije TAS-a u ispranim spermijima nerasta različitih pasmina i PIC-hibrida statističkom su obradom podataka utvrđene statistički značajne razlike, i pri tome su vrijednosti u skupini švedskog landrasa bile značajno veće u odnosu na skupinu PIC-hibrida ($P<0,01$). Premda su se i u ostalim skupinama koncentracije TAS-a u ispranim spermijima nerasta razlikovale te razlike nisu bile statistički značajne ($P>0,05$).

5.4.2. AKTIVNOST GLUTATION PEROKSIDAZE

Rezultati istraživanja aktivnosti glutation peroksidaze (GSH-Px) u ispranim spermijima nerasta različitih pasmina i PIC-hibrida prikazani su na Slici 5.22. te u Tablici 9. 22.



Slika 5.22. Aktivnost ukupne glutation peroksidaze (GSH-Px) u ispranim spermijma nerasta različitih pasmina i PIC-hibrida. Različita slova u eksponentuoznačavaju statističku značajnost između skupina na razini $P\leq0,05$, $P<0,05$, i $P<0,001$.

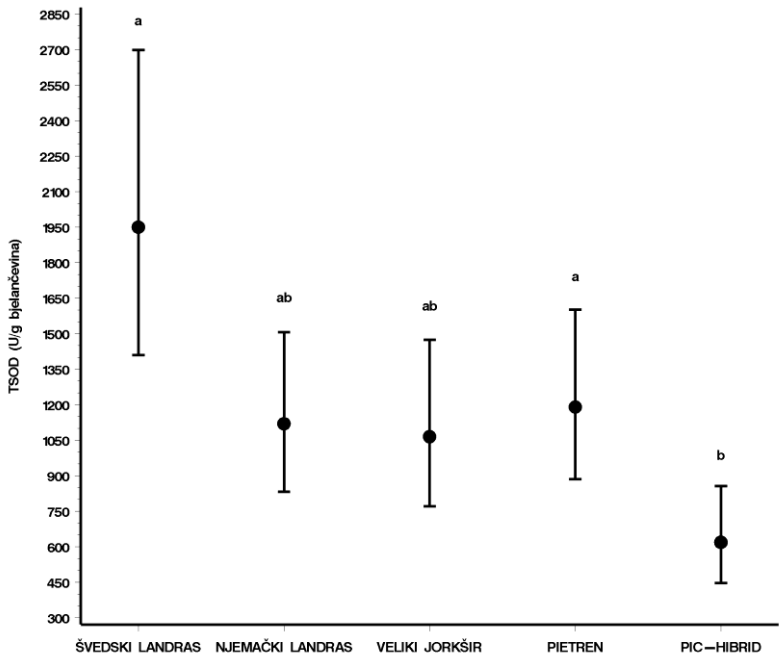
Prosječna vrijednost aktivnosti GSH-Px u ispranih spermija nerasta pasmine švedski landras od 70,61 U/g bjelančevina (52,91 – 94,23 U/g bjelančevina) bila je najveća utvrđena vrijednost, a najmanja vrijednost zabilježena je u nerasta skupine PIC-hibrida i iznosila je 24,51 U/g bjelančevina (18,37 – 32,71 U/g bjelančevina). Aktivnost GSH-Px u sjemenoj plazmi ostalih istraživanih pasmina nerasta neznatno se razlikovala te je u njemačkog landrasa

iznosila 42,78 U/g bjelančevina (32,87 – 55,67 U/g bjelančevina), velikog jorkšira 43,54 U/g bjelančevina (32,63 – 58,11 U/g bjelančevina),i pietrena 44,43 U/g bjelančevina (34,14 – 57,82 U/g bjelančevina).

Uočene razlike vrijednosti GSH-Px u ispranim spermijima među skupinama švedskog landrasa i PIC-hibrida potvrđene su i statističkom analizom na razini značajnosti od P<0,001, a pri tome su u skupini švedskog landrasa utvrđene najveće vrijednosti. U ostalih je istraživanih skupina nerasta aktivnost GSH-Px u ispranim spermijima bila značajno veća u PIC-hibrida u odnosu na onu u pietrena (P<0,05), dok su razlike između PIC-hibrida i njemačkog landrasa te velikog jorkšira bile na granici statističke značajnosti (P≤0,05).

5.4.3. AKTIVNOST UKUPNE SUPEROKSID DISMUTAZE

Rezultati istraživanja aktivnosti ukupne superoksid dismutaze (TSOD) u ispranim spermijima nerasta različitih pasmina i PIC-hibrida prikazani su na Slici 5.23. te u Tablici 9. 23.



Slika 5.23. Aktivnost ukupne superoksid dismutaze (TSOD) u ispranim spermijima nerasta različitih pasmina i PIC-hibrida. Različita slova u eksponentu označavaju statističku značajnost između skupina na razini P<0,05 i P<0,001.

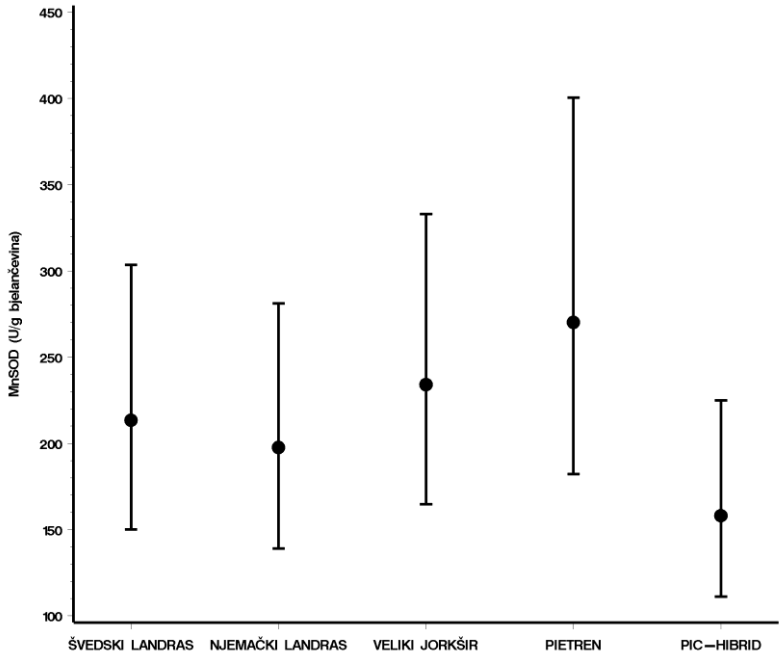
Najveća vrijednost aktivnosti TSOD-a u ispranim spermijima utvrđena je u nerasta pasmine švedskoga landrasa i iznosila je 1950,98 U/g bjelančevina (1410,47 – 2698,62 U/g bjelančevina), a najmanja je vrijednost utvrđena u ispranim spermijima nerasta PIC-hibrida i

iznosila je 619,60 U/g bjelančevina (447,94 – 857,04 U/g bjelančevina). Približno slične vrijednosti aktivnosti TSOD-a u ispranim spermijima zabilježene su u skupinama velikog jorkšira, njemačkog landrasa i pietrena, te su u velikog jorkšira iznosile 1066,16 U/g bjelančevina (770,78 – 1474,72 U/g bjelančevina), njemačkog landrasa 1120,78 U/g bjelančevina (833,50 – 1507,08 U/g bjelančevina), a u pietrena 1191,00 U/g bjelančevina (885,72 – 1601,50 U/g bjelančevina).

Usporedbom vrijednosti aktivnosti TSOD-a u ispranim spermijima nerasta različitih pasmina i PIC-hibrida statističkom obradom podataka ustvrđene su statistički značajne razlike. Tako je aktivnost TSOD u ispranim spermijima PIC-hibrida bila značajno manja u odnosu na švedskog landrasa ($P<0,001$) i pietrena ($P<0,05$).

5.4.4. AKTIVNOST MANGANSKE SUPEROKSID DISMUTAZE

Rezultati istraživanja aktivnosti manganske superoksid dismutaze (MnSOD) u ispranim spermijima nerasta različitih pasmina i PIC-hibrida prikazani su na Slici 5.24. te u Tablici 9. 24.



Slika 5.24. Aktivnost manganske superoksid dismutaze (MnSOD) u ispranim spermijima nerasta različitih pasmina i PIC-hibrida.

Prosječna vrijednost aktivnosti MnSOD-a u ispranim spermijima nerasta pasmine pietren od 270,25 U/g bjelančevina (182,31 – 400,62 U/g bjelančevina) utvrđena je kao

najveća vrijednost među skupinama, a najmanja je vrijednost zabilježena je u skupini nerasta PIC-hibrida, a iznosila je 158,13 U/g bjelančevina (111,20 – 224,87 U/g bjelančevina). Najsličnije vrijednosti aktivnosti MnSOD-a u ispranim spermijima zamjećene su u nerasta skupine njemačkoga landrasa od 197,68 U/g bjelančevina (139,01 – 281,10 U/g bjelančevina) i švedskoga landrasa od 213,47 U/g bjelančevina (150,11 – 303,55 U/g bjelančevina). Nešto malo veću aktivnost MnSOD-a od švedskoga landrasa imala je skupina velikoga jorkšira, a njezina je aktivnost u ispranim spermijima iznosila 234,17 U/g bjelančevina (164,67 – 332,99 U/g bjelančevina).

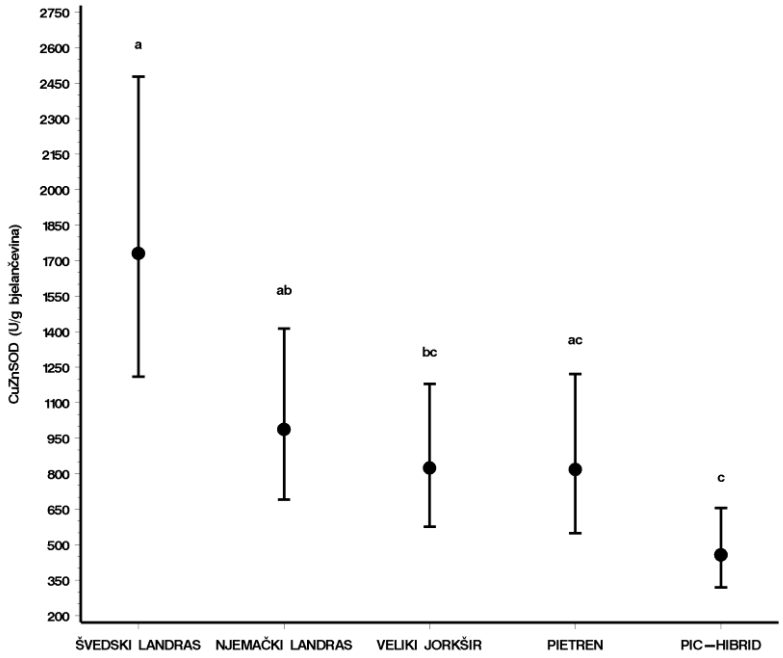
Usporedbom rezultata, nakon statističke analize, utvrđeno je da se prosječne vrijednosti aktivnosti MnSOD-a u ispranim spermijima istraživanih pasmina nerasta nisu značajnije razlikovale među skupinama (P>0,05).

4.4.5. AKTIVNOST BAKAR, CINK SUPEROKSID DISMUTAZE

Rezultati istraživanja aktivnosti bakar, cink superoksid dismutaze (CuZnSOD) u ispranim spermijima nerasta različitih pasmina i PIC-hibrida prikazani su na Slici 5.25. te u Tablici 9. 25.

Najveća srednja vrijednost CuZnSOD među istraživanim skupinama zabilježena je u švedskoga landrasa i iznosila je 1731,69 U/g bjelančevina u ispranim spermijima (1209,99 – 2478,35 U/g bjelančevina), a najmanja srednja vrijednost zabilježena je u skupini PIC-hibrida i iznosila je 457,95 U/g bjelančevina (319,99 – 655,41 U/g bjelančevina). Neznatna odstupanja u aktivnosti CuZnSOD-a zabilježena su u skupinama nerasta pietren gdje su vrijednosti iznosile 818,58 U/g bjelančevina (548,27 – 1222,16 U/g bjelančevina) i velikoga jorkšira gdje su iznosile 824,79 U/g bjelančevina u ispranim spermijima (576,31 – 1180,42 U/g bjelančevina). Nerasti pasmine njemačkoga landrasa imali su aktivnost CuZnSOD-a u ispranim spermijima od 987,90 U/g bjelančevina (690,27 – 1413,85 U/g bjelančevina), odnosno nešto veću od onih u prethodno navedenih skupina nerasta.

Uočene razlike srednjih vrijednosti aktivnosti CuZnSOD u ispranim spermijima među skupinama švedskog landrasa i PIC-hibrida utvrđene su i statističkom analizom na razini značajnosti od P<0,001, gdje je skupina švedskog landrasa imala najveću utvrđenu vrijednost. Nadalje, aktivnost CuZnSOD u ispranim spermijima skupine švedskog landrasa bila je značajno veća od one u velikog jorkšira (P<0,05). Te su vrijednosti također bile više u njemačkog landrasa u odnosu na PIC-hibride (P<0,05).



Slika 5.25. Aktivnost bakar, cink superoksid dismutaze (CuZnSOD) u ispranim spermijima nerasta različitih pasmina i PIC-hibrida. Različita slova u eksponentu označavaju statističku značajnost između skupina na razini P<0,05 i P<0,001.

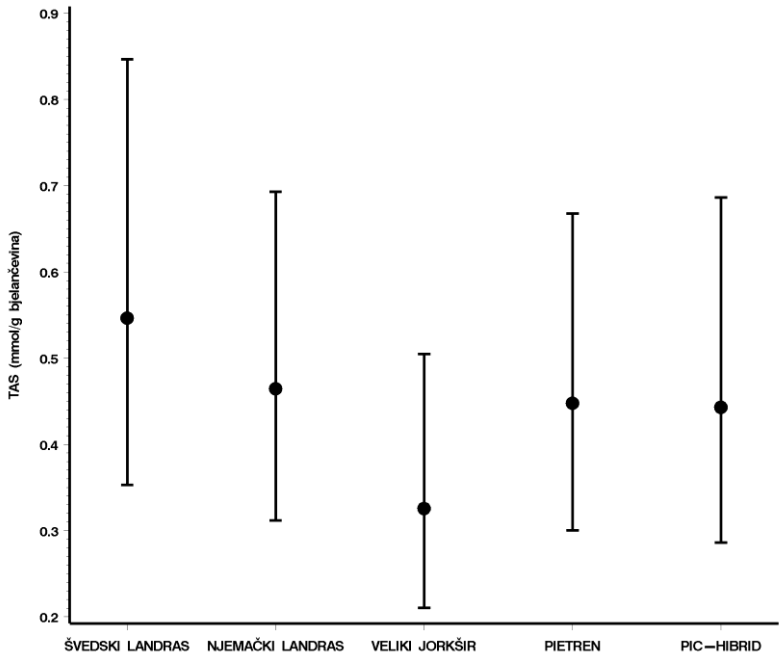
5.5. POKAZATELJI ANTIOKSIDACIJSKE ZAŠTITE U SPERMIJIMA VELIKE GIBLJIVOSTI (>90%)

5.5.1. KONCENTRACIJA UKUPNOG ANTIOKSIDACIJSKOGA STATUSA

Rezultati istraživanja koncentracije ukupnog antioksidacijskoga statusa (TAS) u spermijima velike gibljivosti (>90%) u nerasta različitih pasmina i PIC-hibrida prikazani su na Slici 5.26. te u Tablici 9.26.

Prosječna vrijednost koncentracije TAS-a u spermijima velike gibljivosti u nerasta pasmine švedskoga landrasa bila je 0,55 mmol/g bjelančevina (0,35 – 0,85 mmol/g bjelančevina), što je ujedno bila i najveća vrijednost utvrđena u istraživanih skupina. Suprotno tomu, prosječna vrijednost koncentracije TAS-a u skupini velikoga jorkšira bila je najmanja srednja vrijednost i iznosila je 0,33 mmol/g bjelančevina (0,21 – 0,50 mmol/g bjelančevina). Promatramo li usporedno skupine PIC-hibrida s 0,44 mmol/g bjelančevina (0,29 – 0,69 mmol/g bjelančevina), pietrena s 0,45 mmol/g bjelančevina (0,30 – 0,67 mmol/g bjelančevina) te njemačkoga landrasa s 0,46 mmol/g bjelančevina (0,31 – 0,69 mmol/g bjelančevina) uočljiva je sličnost prosječnih vrijednosti koncentracija TAS-a u spermijima velike gibljivosti među tim skupinama.

Usporedbom dobivenih rezultata, nakon statističke analize u istraživanih su skupina utvrđene najveće razlike između švedskog landrasa i velikoga jorkšira, no te razlike, kao i one među ostalim skupinama, nisu bile statistički značajne (P>0,05).



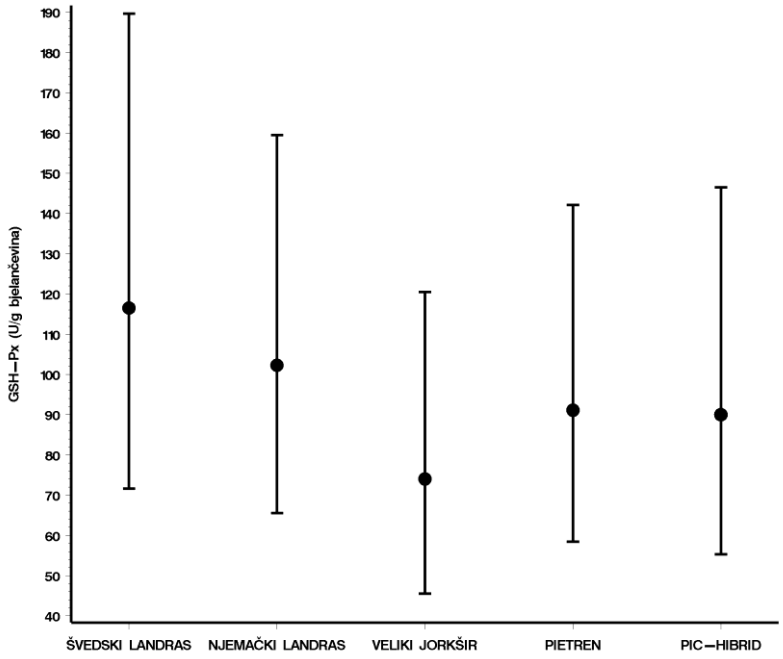
Slika 5.26. Koncentracija ukupnog antioksidacijskoga statusa (TAS) u spermijima velike gibljivosti (>90%) u nerasta različitih pasmina i PIC-hibrida.

5.5.2. AKTIVNOST UKUPNE GLUTATION PEROKSIDAZE

Rezultati istraživanja aktivnosti ukupne glutation peroksidaze (GSH-Px) u spermijima velike gibljivosti (>90%) u nerasta različitih pasmina i PIC-hibrida prikazani su na Slici 5.27. te u Tablici 9. 27.

U skupini švedskoga landrasa utvrđena je najveća srednja vrijednost aktivnosti GSH-Px u spermijima velike gibljivosti (>90%), a iznosila je 116,55 U/g bjelančevina (71,63 – 189,64 U/g bjelančevina). Najmanja pak srednja vrijednost aktivnosti GSH-Px u spermijima velike gibljivosti utvrđena je u skupini nerasta pasmine velikoga jorkšira, a iznosila je 74,06 U/g bjelančevina (45,51 – 120,50 U/g bjelančevina). Manje razlike u GSH-Px vrijednostima zabilježene su među skupinama PIC-hibrida 90,02 U/g bjelančevina (55,32 – 146,47 U/g bjelančevina) te pietrena 91,14 U/g bjelančevina (58,44 – 142,13 U/g bjelančevina). Približno slična, ali ipak nešto viša aktivnost GSH-Px utvrđena je u spermijima velike gibljivosti u nerasta pasmine njemačkoga landrasa i iznosila je 102,30 U/g bjelančevina (65,59 – 159,54 U/g bjelančevina).

Usporedbom vrijednosti aktivnosti GSH-Px u spermijima velike gibljivosti u nerasta različitih pasmina i PIC-hibrida nisu utvrđene statistički značajne razlike (P>0,05).



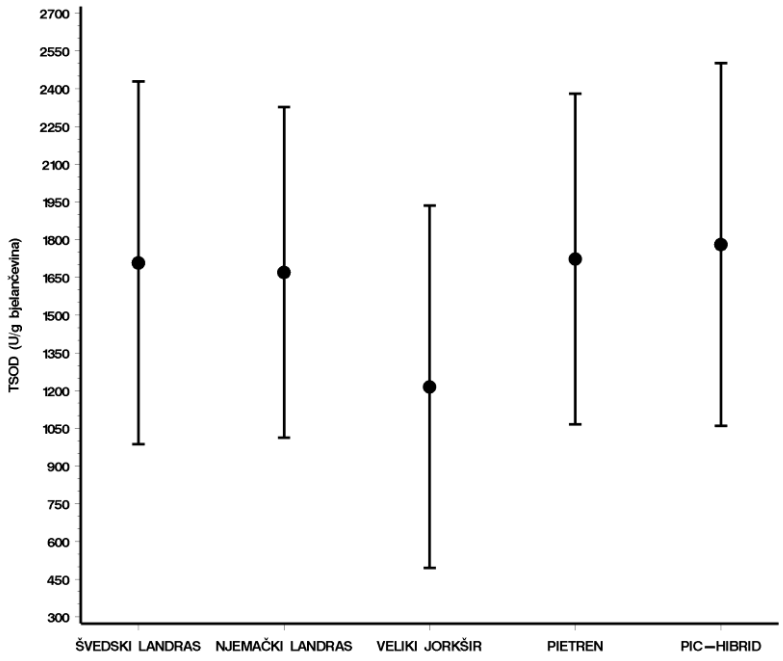
Slika 5.27. Aktivnost ukupne glutation peroksidaze (GSH-Px) u spermijima velike gibljivosti (>90%) u nerasta različitih pasmina i PIC-hibrida.

5.5.3. AKTIVNOST UKUPNE SUPEROKSID DISMUTAZE

Rezultati istraživanja aktivnosti ukupne superoksid dismutaze (TSOD) u spermijima velike gibljivosti (>90%) u nerasta različitih pasmina i PIC-hibrida prikazani su na Slici 5.28. te u Tablici 9. 28.

Srednja vrijednost aktivnosti TSOD-a u spermijima velike gibljivosti u nerasta skupine PIC-hibrida iznosila je 1780,67 U/g bjelančevina (1060,14 – 2501,20 U/g bjelančevina) i predstavlja najveću utvrđenu vrijednost među istraživanim skupinama. No, ta se vrijednost neznatno razlikovala od vrijednosti utvrđene u pietrena od 1723,17 U/g bjelančevina (1065,42 – 2380,92 U/g bjelančevina) te u švedskoga landrasa od 1707,71 U/g bjelančevina (987,18 – 2428,24 U/g bjelančevina). Slična, ali manja vrijednost TSOD-a utvrđena je u nerasta njemačkoga landrasa i iznosila je 1669,87 U/g bjelančevina (1012,12 – 2327,62 U/g bjelančevina), dok je najmanja srednja vrijednost TSOD-a u spermijima velike gibljivosti zabilježena u nerasta veliki jorkšir i iznosila je 1214,80 U/g bjelančevina (494,27 – 1935,33 U/g bjelančevina).

Usporedbom vrijednosti TSOD-a u spermijima velike gibljivosti u nerasta različitih pasmina i PIC-hibrida zabilježene su razlike među skupinama, no te razlike nisu bile i statistički značajne (P>0,05).



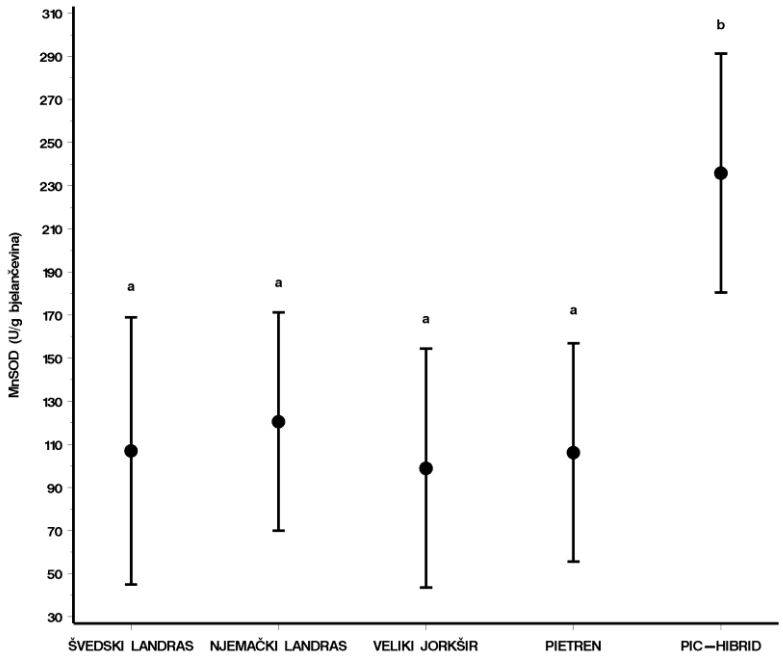
Slika 5.28. Aktivnost ukupne superoksid dismutaze (TSOD) u spermijima velike gibljivosti u nerasta različitih pasmina i PIC-hibrida.

5.5.4. AKTIVNOST MANGANSKE SUPEROKSID DISMUTAZE

Rezultati istraživanja aktivnosti manganske superoksid dismutaze (MnSOD) u spermijima velike gibljivosti (>90%) u nerasta različitih pasmina i PIC-hibrida prikazani su na Slici 5.29. te u Tablici 9.29.

Aktivnost MnSOD-a u spermijima velike gibljivosti imala je najveću srednju vrijednost u PIC-hibrida, a i iznosila je 235,85 U/g bjelančevina (180,39 – 291,30 U/g bjelančevina), a najmanju u nerasta skupine veliki jorkšir koja je iznosila 98,89 U/g bjelančevina (43,44 – 154,35 U/g bjelančevina). Gotovo jednake vrijednosti aktivnosti MnSOD-a zabilježene su u spermijima velike gibljivosti u nerasta pasmine pietren od 106,17 U/g bjelančevina (55,55 – 156,79 U/g bjelančevina) i nerasta švedski landras od 106,98 U/g bjelančevina (44,98 – 168,98 U/g bjelančevina). Približno sličnu, ali ipak nešto veću aktivnost MnSOD-a od prethodno opisanih skupina imala je pasmina njemački landras, a iznosila 120,52 U/g bjelančevina (69,90 – 171,14 U/g bjelančevina).

Usporedbom vrijednosti MnSOD-a u spermijima velike gibljivosti u nerasta različitih pasmina i PIC-hibrida utvrđeno je da su vrijednosti u skupini PIC-hibrida bile značajno veće u odnosu na skupine švedskog i njemačkog landrasa ($P<0,05$), te u odnosu na skupine velikog jorkšira i pietrena ($P\leq0,01$).



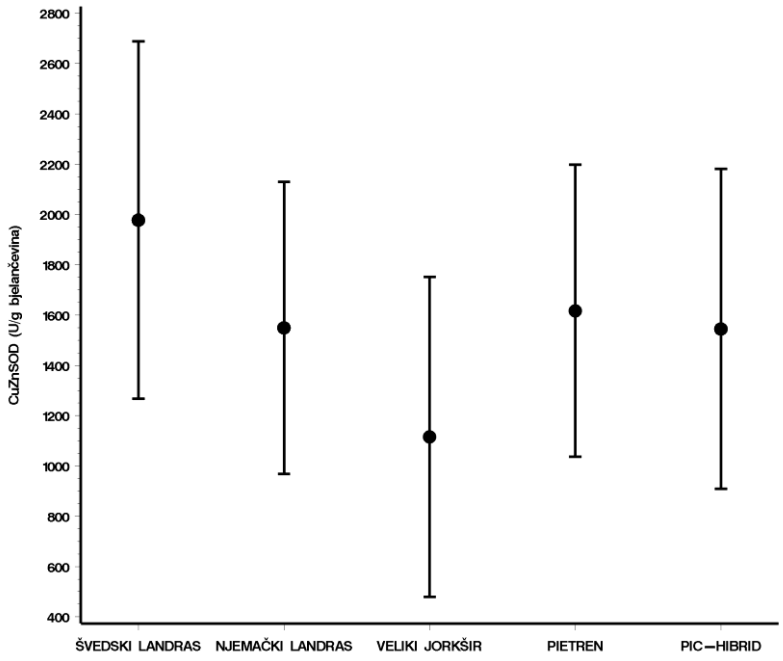
Slika 5.29. Aktivnost manganske superoksid dismutaze (MnSOD) u spermijima velike gibljivosti u nerasta različitih pasmina i PIC-hibrida. Različita slova u eksponentu označavaju statističku značajnost između skupina na razini $P<0,05$ i $P\leq0,01$.

5.5.5. AKTIVNOST BAKAR, CINK SUPEROKSID DISMUTAZE

Rezultati istraživanja aktivnosti bakar, cink superoksid dismutaze (CuZnSOD) u spermijima velike gibljivosti (>90%) u nerasta različitih pasmina i PIC-hibrida prikazani su na Slici 4.30. te u Tablici 9.30.

Aktivnosti CuZnSOD-a u spermijima velike gibljivosti u skupini pasmine švedskoga landrasa imala je najveću srednju vrijednost od 1977,52 U/g bjelančevina (1266,73 – 2688,31 U/g bjelančevina), a najmanja srednja vrijednost od 1115,90 U/g bjelančevina (480,15 – 1751,65 U/g bjelančevina) zabilježena je u skupini nerasta velikoga jorkšira. Manje razlike u vrijednostima CuZnSOD-a utvrđene su među skupinama PIC-hibrida 1544,83 U/g bjelančevina (909,08 – 2180,58 U/g bjelančevina) i u njemačkoga landrasa 1549,35 U/g bjelančevina (969,00 – 2129,71 U/g bjelančevina). Približno slična, ali veća vrijednost nego u prethodno navedenim skupinama nerasta zabilježena je u spermijimaa velike gibljivosti u pietrena, a iznosila je 1617,00 U/g bjelančevina (1036,64 – 2197,36 U/g bjelančevina).

Usporedbom vrijednosti aktivnosti CuZnSOD-a u spermijima velike gibljivosti u nerasta četiriju različitih pasmina i PIC-hibrida nisu utvrđene statistički značajne razlike (P>0,05).



Slika 5.30. Aktivnost bakar, cink superoksid dismutaze (CuZnSOD) u spermijima velike gibljivosti (>90%) u nerasta različitih pasmina i PIC-hibrida.

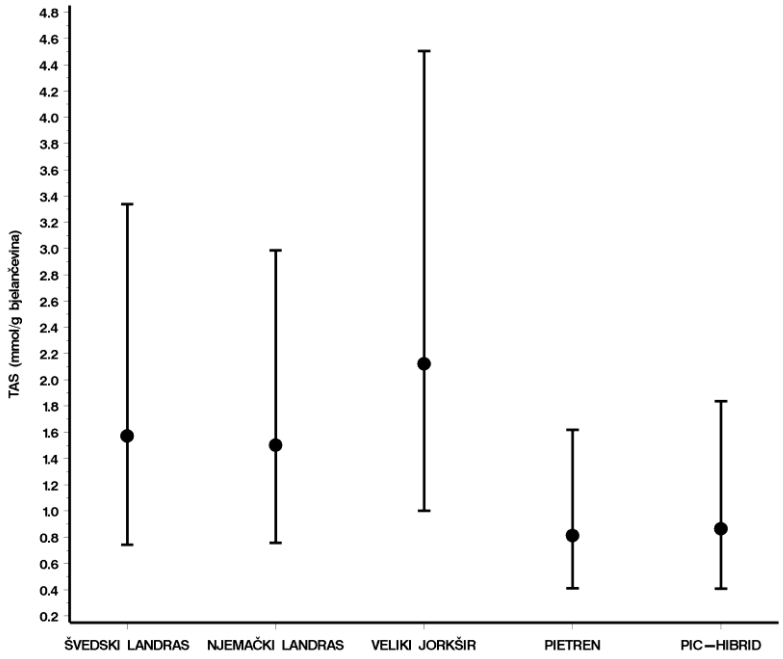
5.6. POKAZATELJI ANTIOKSIDACIJSKE ZAŠTITE U PATOLOŠKIH OBLIKA SPERMIJA

5.6.1. KONCENTRACIJA UKUPNOG ANTIOKSIDACIJSKOGA STATUSA

Rezultati istraživanja koncentracije ukupnog antioksidacijskoga statusa (TAS) u patoloških oblika spermija nerasta različitih pasmina i PIC-hibrida prikazani su na Slici 5.31. te u Tablici 9.31.

U istraživanju koncentracije TAS-a u patoloških oblika spermija najveća vrijednost među skupinama zabilježena je u velikoga jorkšira i iznosila je 2,12 mmol/g bjelančevina (1,00 – 4,50 mmol/g bjelančevina). Na Slici 5.31. uočljiva je i najmanja vrijednost TAS-a u patoloških oblika spermija u skupini nerasta pasmine pietren od 0,81 mmol/g bjelančevina (0,41 – 1,62 mmol/g bjelančevina), a gotovo jednake vrijednosti zabilježene su u nerasta PIC-hibrida od 0,86 mmol/g bjelančevina (0,41 – 1,83 mmol/g bjelančevina). Malo veće vrijednosti koncentracije TAS-a od prethodno spomenutih skupina imali su nerasti pasmine njemačkoga landrasa, a ona je iznosila 1,50 mmol/g bjelančevina (0,76 – 2,99 mmol/g

bjelančevina) te nerasti pasmine švedskoga landrasa, a ona je iznosila 1,57 mmol/g bjelančevina (0,74 – 3,34 mmol/g bjelančevina).



Slika 5.31. Koncentracija ukupnog antioksidacijskoga statusa (TAS) u patoloških oblika spermija u nerasta različitih pasmina i PIC-hibrida.

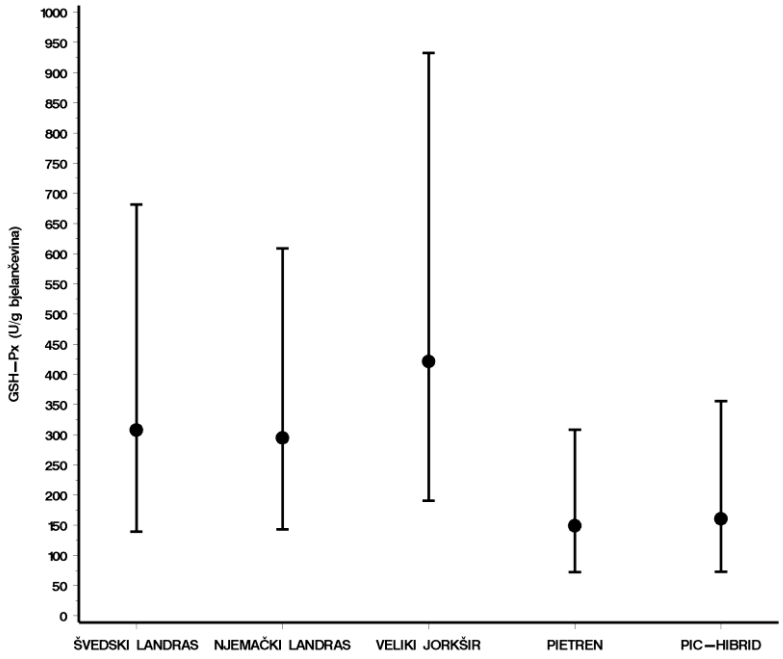
Usporedbom vrijednosti koncentracije TAS-a u patoloških oblika spermija nerasta različitih pasmina i PIC-hibrida nisu utvrđene statistički značajne razlike (P>0,05).

5.6.2. AKTIVNOST GLUTATION PEROKSIDAZE

Rezultati istraživanja aktivnosti glutation peroksidaze (GSH-Px) u patoloških oblika spermija u nerasta različitih pasmina i PIC-hibrida prikazani su na Slici 5.32. te u Tablici 9.32.

Srednja vrijednost aktivnosti GSH-Px u patoloških oblika spermija u nerasta pasmine velikoga jorkšira iznosila je 421,56 U/g bjelančevina (190,61 – 932,31 U/g bjelančevina) i istodobno je bila najveća vrijednost utvrđena među istraživanim skupinama. S druge strane, nerasti pasmine pietren imali su najmanju aktivnost GSH-Px među skupinama, a ona je iznosila 149,44 U/g bjelančevina (72,41 – 308,41 U/g bjelančevina). Malo veće vrijednosti od onih u pietrena zabilježena je u nerasta PIC-hibrida, a iznosila je 160,87 U/g bjelančevina (72,74 – 355,77 U/g bjelančevina). Neznatne razlike u aktivnosti GSH-Px u patoloških oblika spermija zamijećene su u švedskoga i njemačkoga landrasa, te je vrijednost u švedskoga landrasa iznosila 308,03 U/g bjelančevina (139,28 – 681,24 U/g bjelančevina), a u

njemačkoga landrasa 294,96 U/g bjelančevina (142,92 – 608,75 U/g bjelančevina) (Slika 4.32.).



Slika 5.32. Aktivnost ukupne glutation peroksidaze (GSH-Px) u patoloških oblika spermija nerasta 4 različitih pasmina i PIC-hibrida.

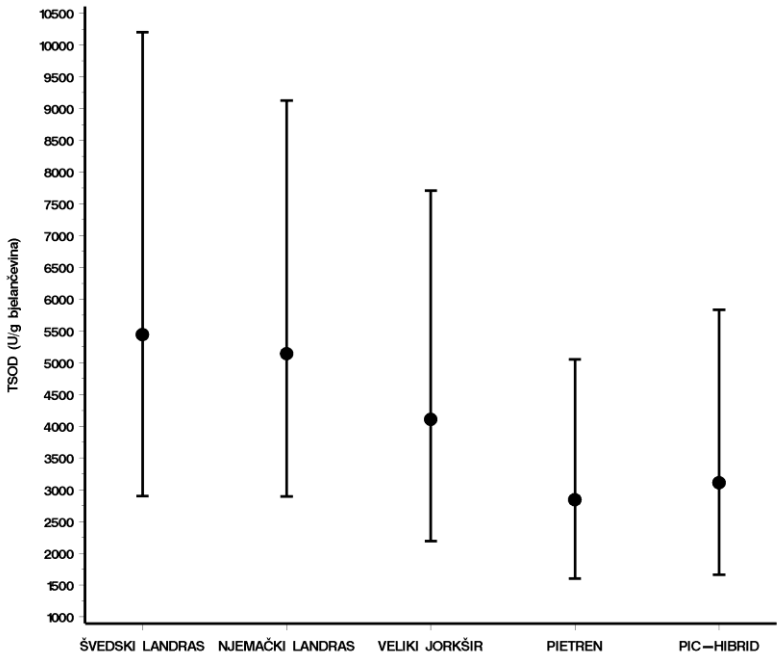
Usporedbom vrijednosti aktivnosti GSH-Px u patoloških oblika spermija nerasta različitih pasmina i PIC-hibrida zabilježene su razlike među skupinama, ali te razlike nisu bile i statistički značajne (P>0,05).

5.6.3. AKTIVNOST UKUPNE SUPEROKSID DISMUTAZE

Rezultati istraživanja aktivnosti ukupne superoksid dismutaze (TSOD) u patoloških oblika spermija nerasta različitih pasmina i PIC-hibrida prikazani su na Slici 5.33. te u Tablici 9.33.

Srednja vrijednost aktivnosti TSOD-a u patoloških oblika spermija u nerasta skupine švedskoga landrasa bila je 5443,16 U/g bjelančevina (2903,34 – 10204,76 U/g bjelančevina), što je ujedno bila najveća vrijednost zabilježena među istraživanim skupinama. Nešto manje vrijednosti TSOD-a zabilježene su u nerasta pasmine njemačkoga landrasa, velikoga jorkšira i PIC-hibrida, a vrijednost je u njemačkoga landrasa iznosila 5143,12 U/g bjelančevina (2897,72 – 9128,45 U/g bjelančevina), u velikoga jorkšira 4110,91 U/g bjelančevina (2192,73 – 7707,08 U/g bjelančevina), a u PIC-hibrida 3113,10 U/g bjelančevina (1660,51 – 5836,40

U/g bjelančevina). Istodobno je u nerasta pasmine pietren zabilježena aktivnost TSOD-a od 2845,28 U/g bjelančevina (1603,08 – 5050,04 U/g bjelančevina), što je najmanja srednja vrijednost tog enzima u patoloških oblika spermija među skupinama.



Slika 5.33. Aktivnost ukupne superoksid dismutaze (TSOD) u patoloških oblika spermija nerasta 4 različitih pasmina i PIC-hibrida.

Nakon statističke obrade podataka o srednjim vrijednostima aktivnosti TSOD-a u patoloških oblika spermija nerasta različitih pasmina i PIC-hibrida utvrđene razlike među skupinama nisu bile statistički značajne (P>0,05).

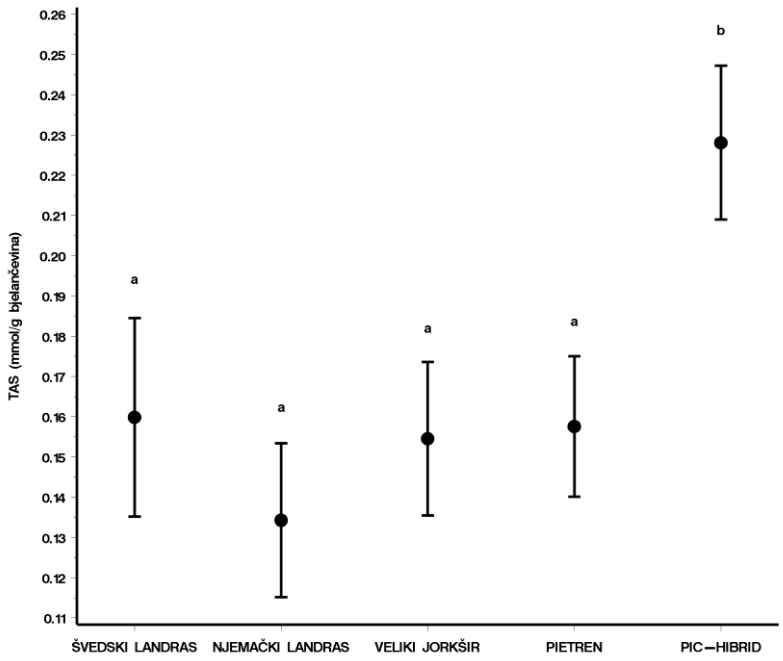
5.7. POKAZATELJI ANTIOKSIDACIJSKE ZAŠTITE U SPERMIJIMA VRLO MALE GIBLJIVOSTI (<20%)

5.7.1. KONCENTRACIJA UKUPNOG ANTIOKSIDACIJSKOGA STATUSA

Rezultati istraživanja koncentracije ukupnog antioksidacijskoga statusa (TAS) u spermijima vrlo male gibljivosti (<20%) u nerasta različitih pasmina i PIC-hibrida prikazani su na Slici 5.34. te u Tablici 9.34.

Najveća srednja vrijednost koncentracije TAS-a u spermijima vrlo male gibljivosti utvrđena je u nerasta PIC-hibrida i iznosila je 0,23 mmol/g bjelančevina (0,21 – 0,25 mmol/g bjelančevina), a najmanja srednja vrijednost utvrđena je u nerasta njemačkoga landrasa i iznosila je 0,13 mmol/g bjelančevina (0,12 – 0,15 mmol/g bjelančevina). Jednake srednje

vrijednosti TAS-a zabilježene su u spermijima vrlo male gibljivosti u nerasta švedskoga landrasa od 0,16 mmol/g bjelančevina (0,14 – 0,18 mmol/g bjelančevina) i pietrena od 0,16 mmol/g bjelančevina (0,14 – 0,18 mmol/g bjelančevina), dok je u pasmine velikoga jorkšira koncentracija TAS-a iznosila 0,15 mmol/g bjelančevina (0,14 – 0,17 mmol/g bjelančevina), što je nešto malo manja vrijednost u odnosu na dvije prethodno navedene skupine nerasta.



Slika 5.34. Koncentracija ukupnog antioksidacijskoga statusa (TAS) u spermijima vrlo male gibljivosti (<20%) u nerasta različitih pasmina i PIC-hibrida. Različita slova u eksponentu označavaju statističku značajnost između skupina na razini P<0,01 i P<0,001.

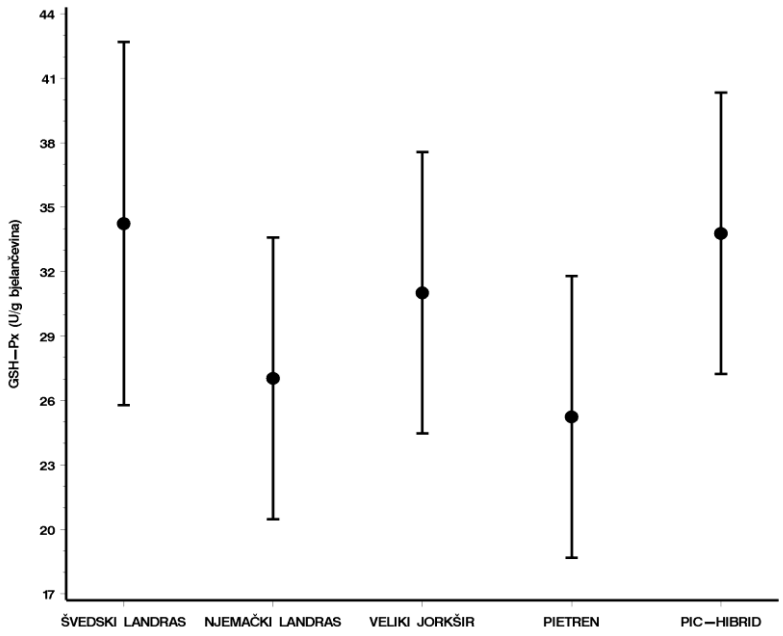
Usporedbom vrijednosti koncentracije TAS-a u spermijima vrlo male gibljivosti utvrđene su statistički značajno veće vrijednosti u skupini PIC-hibrida u odnosu na skupine njemačkoga landrasa, pietrena i velikoga jorkšira na razini P<0,001 te u švedskoga landrasa na razini P<0,01.

5.7.2. AKTIVNOST GLUTATION PEROKSIDAZE

Rezultati istraživanja aktivnosti glutation peroksidaze (GSH-Px) u spermijima vrlo male gibljivosti (<20%) u nerasta različitih pasmina i PIC-hibrida prikazani su na Slici 5.35. te u Tablici 9.35.

Srednja vrijednost aktivnosti GSH-Px u spermijima vrlo male gibljivosti u nerasta skupine švedskoga landrasa iznosila je 34,24 U/g bjelančevina (25,78 – 42,70 U/g bjelančevina), što je najveća vrijednost među istraživanim skupinama. No, ta se vrijednost

neznatno razlikovala od one u PIC-hibrida gdje aktivnost GSH-Px iznosila 33,78 U/g bjelančevina (27,23 – 40,34 U/g bjelančevina). Nešto manja aktivnost GSH-Px od prethodno navedenih skupina zabilježena je u nerasta velikoga jorkšira i iznosila je 31,02 U/g bjelančevina (24,46 – 37,57 U/g bjelančevina) (Slika 5.35.). Najmanje aktivnosti GSH-Px u spermijima vrlo male gibljivosti utvrđene su u skupinama njemačkoga landrasa i u pietrena, a ta je vrijednost u njemačkoga landrasa iznosila 27,03 U/g bjelančevina (20,48 – 33,59 U/g bjelančevina), a u pietrena 25,24 U/g bjelančevina (18,69 – 31,80 U/g bjelančevina).



Slika 5.35. Aktivnost ukupne glutation peroksidaze (GSH-Px) u spermijima vrlo male gibljivosti (<20%) nerasta različitih pasmina i PIC-hibrida. Različita slova u eksponentu označavaju statističku značajnost između skupina na razini P<0,05, P<0,01 i P<0,001.

Nakon statističke obrade podataka za srednje vrijednosti aktivnosti GSH-Px u spermijima vrlo male gibljivosti u nerasta različitih pasmina i PIC-hibrida utvrđene razlike među skupinama nisu bile statistički značajne (P>0,05).

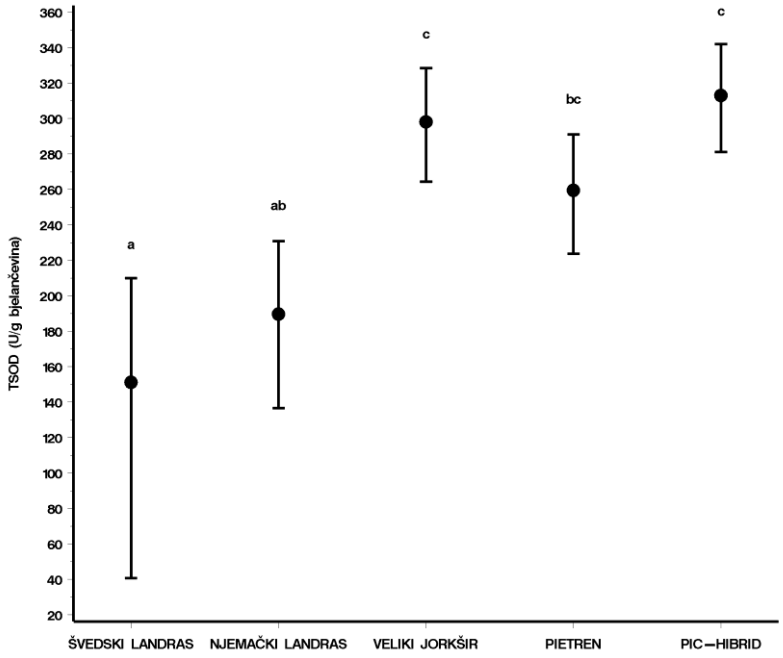
5.7.3. AKTIVNOST UKUPNE SUPEROKSID DISMUTAZE

Rezultati istraživanja aktivnosti ukupne superoksid dismutaze (TSOD) u spermijima vrlo male gibljivosti (<20%) u nerasta različitih pasmina i PIC-hibrida prikazani su na Slici 5.36. te u Tablici 9.36.

Srednja vrijednost aktivnosti TSOD-a u spermijima vrlo male gibljivosti u PIC-hibrida iznosila je 313,12 U/g bjelančevina (281,17 – 342,09 U/g bjelančevina) i najveća je utvrđena

vrijednost među istraživanim skupinama. No, te se vrijednost neznatno razlikuje od one u spermijima male gibljivosti u nerasta velikoga jorkšira, gdje je aktivnost TSOD-a iznosila 298,16 U/g bjelančevina (264,41 – 328,46 U/g bjelančevina). Istodobno je najmanja srednja vrijednost aktivnosti TSOD-a od 151,25 U/g bjelančevina (40,63 – 210,01 U/g bjelančevina) utvrđena u nerasta pasmine švedskoga landrasa. Promatramo li usporedbeno vrijednost u skupini njemačkoga landrasa, za aktivnost TSOD-a koja je iznosila 189,74 U/g bjelančevina (136,64 – 230,94 U/g bjelančevina) i pietrena, gdje je aktivnost iznosila 259,58 U/g bjelančevina (223,72 – 291,06 U/g bjelančevina), uočljivo je da je veća aktivnosti TSOD-a u pietrena u odnosu na njemačkoga landrasa.

Usporedbom vrijednosti aktivnosti TSOD-a u spermijima vrlo male gibljivosti utvrđene su statistički značajno niže vrijednosti u pasmini švedskoga landrasa u odnosu na skupine velikoga jorkšira i PIC-hibrida na razini P<0,001 te pietrena na razini P<0,05. Također su utvrđene statistički značajno niže vrijednosti u skupini njemačkoga landrasa u odnosu na skupine velikoga jorkšira i PIC-hibrida (P<0,01).



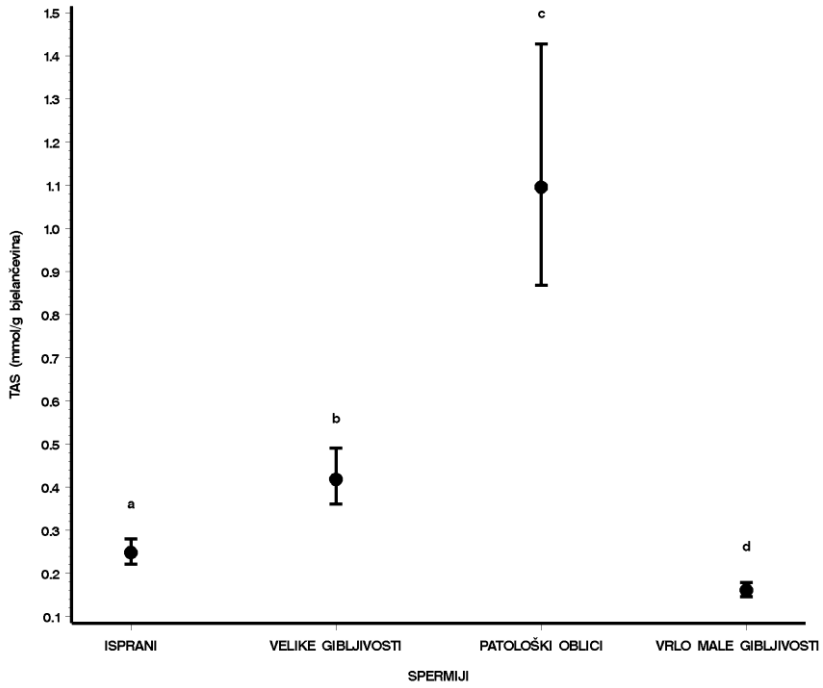
Slika 5.36. Aktivnost ukupne superoksid dismutaze (TSOD) u spermijima vrlo male gibljivosti (<20%) u nerasta različitih pasmina i PIC-hibrida. Različita slova u eksponentu označavaju statističku značajnost između skupina na razini P<0,05, P<0,01 i P<0,001.

5.8. POKAZATELJI ANTIOKSIDACIJSKE ZAŠTITE U SPERMIJA RAZLIČITIH MORFOLOGIJSKIH OBLIKA I GIBLJIVOSTI

Rezultati istraživanja antioksidacijskoga statusa u ispranim spermijima te izoliranih spermijima različitih morfologijskih oblika i gibljivosti u nerasta uključenih u ovo istraživanje prikazani su na Slikama 5.37. - 5.42. kao srednja vrijednost uz 95%-tni interval pouzdanosti srednje vrijednosti te u Tablicama 9.37. - 9.42.

5.8.1. KONCENTRACIJA UKUPNOG ANTIOKSIDACIJSKOGA STATUSA

Rezultati istraživanja koncentracije ukupnog antioksidacijskoga statusa (TAS) u spermijima (isprani spermiji, spermiji velike gibljivosti, patološki oblici spermija, spermiji vrlo male gibljivosti) u nerasta uključenih u ovo istraživanje prikazani su na Slici 5.37 te u Tablici 9.37.



Slika 5.37. Koncentracija ukupnog antioksidacijskoga statusa (TAS) u spermijima različitih morfologijskih oblika i gibljivosti u svih istraživanih skupina nerasta. Različita slova u eksponentu označavaju statističku značajnost između uzoraka na razini P<0,001.

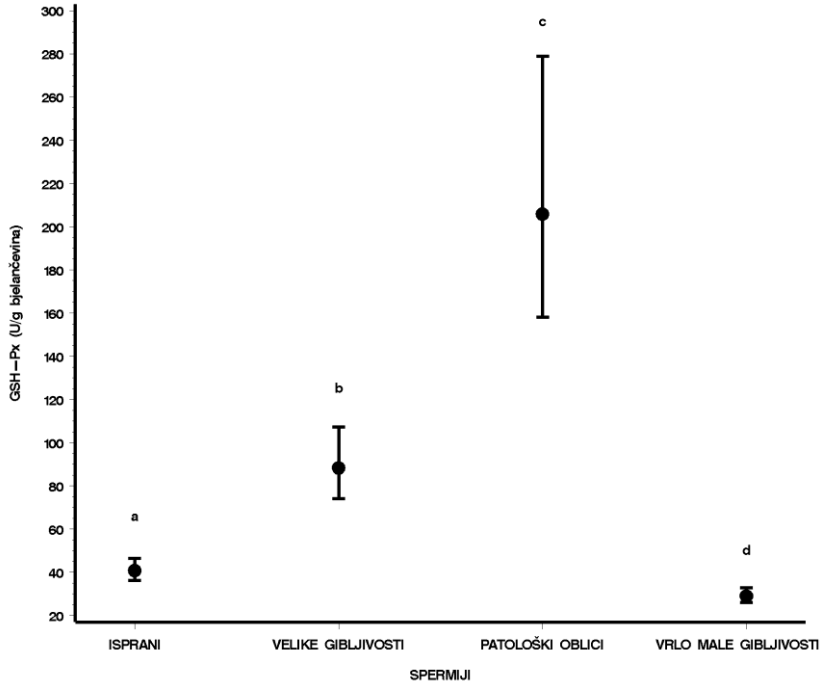
Izrazito najveća srednja vrijednost koncentracije TAS-a utvrđena je u patoloških oblika spermija i iznosila je 1,10 mmol/g bjelančevina (0,87 – 1,43 mmol/g bjelančevina). Istodobno je najmanja srednja vrijednost koncentracije TAS-a zabilježena u spermijima vrlo male gibljivosti, i to od 0,16 mmol/g bjelančevina (0,15 – 0,18 mmol/g bjelančevina). Srednja

vrijednost koncentracije TAS-a u ispranih spermija bila je 0,25 mmol/g bjelančevina (0,22 – 0,28 mmol/g bjelančevina), a u spermijima velike gibljivosti zabilježena je veća koncentracija TAS-a u odnosu na isprane spermije, te je iznosila 0,42 mmol/g bjelančevina (0,36 – 0,49 mmol/g bjelančevina).

Statističkom analizom utvrđene su značajne razlike koncentracije TAS-a između svih dobivenih frakcija spermija. Tako je koncentracija TAS-a u patološkim oblicima spermija bila značajno viša od onih u ispranih spermija te uzorcima spermija velike i male gibljivosti (P<0,001). Istovremeno, koncentracija TAS-a u uzorcima spermija velike gibljivosti bila je značajno viša od one u ispranih spermija i spermija vrlo male gibljivosti (P<0,001), a u ispranih spermija bila je značajno viša od one u spermija vrlo male gibljivosti (P<0,001).

5.8.2. AKTIVNOST GLUTATION PEROKSIDAZE

Rezultati istraživanja aktivnosti glutation peroksidaze (GSH-Px) u spermijima (isprani spermiji, spermiji velike gibljivosti, patološki oblici spermija, spermiji vrlo male gibljivosti) nerasta uključenih u ovo istraživanje prikazani su na Slici 5.38. te u Tablici 9.38.



Slika 5.38. Aktivnost ukupne glutation peroksidaze (GSH-Px) u spermijima različitih morfologijskih oblika i gibljivosti u svih skupina istraživanih nerasta. Različita slova u eksponentu označavaju statističku značajnost između uzoraka na razini P<0,001.

Izrazita najveća vrijednost aktivnosti GSH-Px u patoloških oblika spermija u svih skupina nerasta bila je 205,85 U/g bjelančevina (158,18 – 278,84 U/g bjelančevina), a najmanja je vrijednost zabilježena u spermijima vrlo male gibljivosti i iznosila je 29,03 U/g bjelančevina (25,92 – 32,73 U/g bjelančevina). Srednja vrijednost aktivnosti GSH-Px u ispranim spermijima bila je 40,82 U/g bjelančevina (36,15 – 46,46 U/g bjelančevina), a u spermijima velike gibljivosti bila je 88,37 U/g bjelančevina (74,07 – 107,24 U/g bjelančevina).

Statističkom analizom ustvrđene su značajne razlike u aktivnosti GSH-Px između svih dobivenih frakcija spermija. Tako je aktivnost GSH-Px u patološkim oblicima spermija bila značajno viša od onih u ispranim spermijima te uzorcima spermija velike i male gibljivosti ($P<0,001$). Istovremeno, aktivnost GSH-Px u uzorcima spermija velike gibljivosti bila je značajno veća od one u ispranim spermijima i spermijima vrlo male gibljivosti ($P<0,001$), a u ispranim spermijima bila je značajno veća od one u spermijima vrlo male gibljivosti ($P<0,001$).

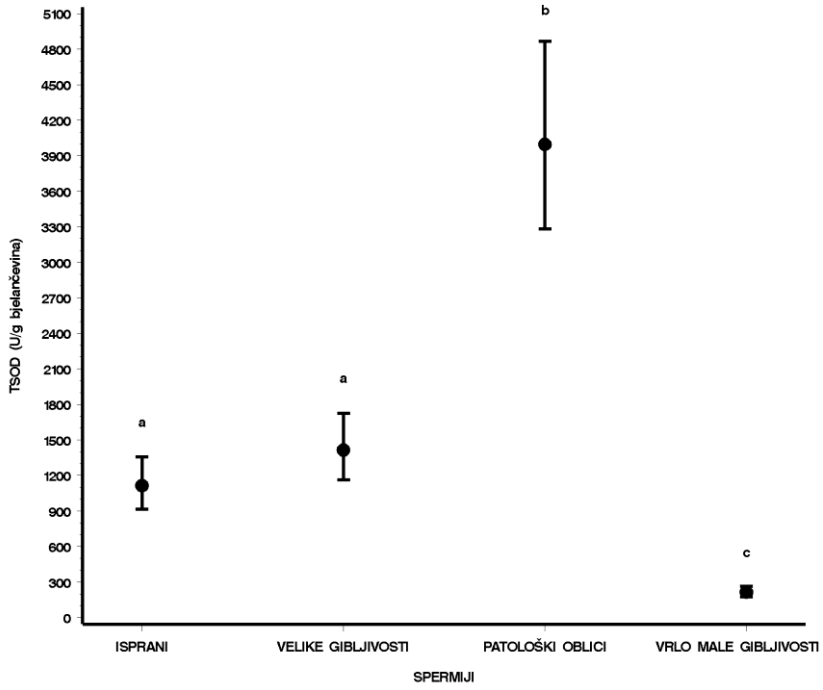
5.8.3. AKTIVNOST UKUPNE SUPEROKSID DISMUTAZE

Rezultati istraživanja aktivnosti ukupne superoksid dismutaze (TSOD) u spermijima (isprani spermiji, spermiji velike gibljivosti, patološki oblici spermija, spermiji vrlo male gibljivosti) u nerasta uključenih u ovo istraživanje prikazani su na Slici 5.39. te u Tablici 9.39.

Aktivnosti TSOD-a u uzorcima spermija patoloških oblika je najveća srednja vrijednost te je iznosila 3996,38 U/g bjelančevina (3282,43 – 4865,62 U/g bjelančevina), a najmanja je srednja vrijednost aktivnosti TSOD-a bila u spermijima vrlo male gibljivosti i iznosila je 215,59 U/g bjelančevina (176,15 – 263,85 U/g bjelančevina). U ispranim spermijima srednja vrijednost aktivnosti TSOD-a iznosila je 1114,61 U/g bjelančevina (915,49 – 1357,05 U/g bjelančevina), a u spermijima velike gibljivosti 1415,86 U/g bjelančevina (1162,92 – 1723,82 U/g bjelančevina).

Usporedbom vrijednosti TSOD-a u različitim uzorcima spermija utvrđene su statistički značajne razlike. Spermiji patoloških oblika imali su značajno veću aktivnost TSOD-a u odnosu na uzorke ispranih spermija te spermijima velike i male gibljivosti ($P<0,001$). Uzorci spermija vrlo male gibljivosti imali su značajno manju aktivnost TSOD-a u odnosu na isprane spermije, spermije velike gibljivosti te spermije patoloških oblika ($P<0,001$). Aktivnost TSOD-a u ispranih spermija značajno je manja u odnosu na uzorke patoloških oblika spermija te značajno veća u odnosu na one u uzorcima spermija vrlo male gibljivosti ($P<0,001$).

Istodobno je aktivnost TSOD-a u spermijima velike gibljivosti bila statistički značajno manja u odnosu na uzorke patoloških oblika spermija, a značajno veća u odnosu na uzorke spermija vrlo male gibljivosti (P<0,001). Među uzorcima ispranih spermija i spermija velike gibljivosti nije utvrđena statistički značajna razlika (P>0,05).

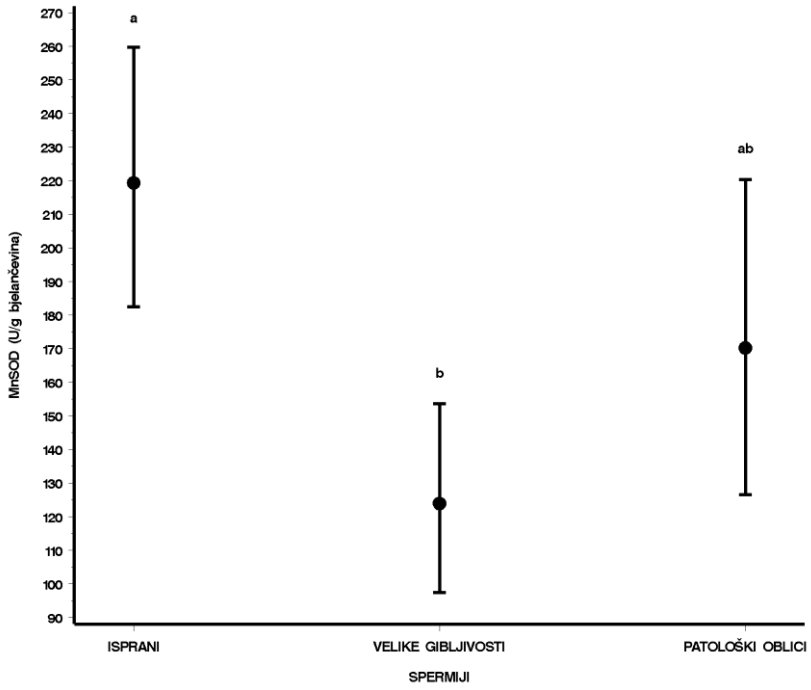


Slika 5.39. Aktivnost ukupne superoksid dismutaze (TSOD) u spermijima različitih morfologijskih oblika i gibljivosti u svih skupina istraživanih nerasta. Različita slova u eksponenata označavaju statističku značajnost između uzoraka na razini P<0,001.

5.8.4. AKTIVNOST MANGANSKE SUPEROKSID DISMUTAZE

Rezultati istraživanja aktivnosti manganske superoksid dismutaze (MnSOD) u spermijima (isprani spermiji, spermiji velike gibljivosti i patološki oblici spermija) u svih nerasta uključenih u ovo istraživanje prikazani su na Slici 5.40. te u Tablici 9.40.

Najveća vrijednost aktivnosti MnSOD među različitim uzorcima spermija zabilježena je u ispranih spermija te je iznosila 219,37 U/g bjelančevina (182,49 – 259,64 U/g bjelančevina), a najmanja u spermijima velike gibljivosti te je iznosila 123,96 U/g bjelančevina (97,49 – 153,61 U/g bjelančevina). U uzorcima patoloških oblika spermija aktivnost MnSOD bila je 170,24 U/g bjelančevina (126,57 – 220,37 U/g bjelančevina).



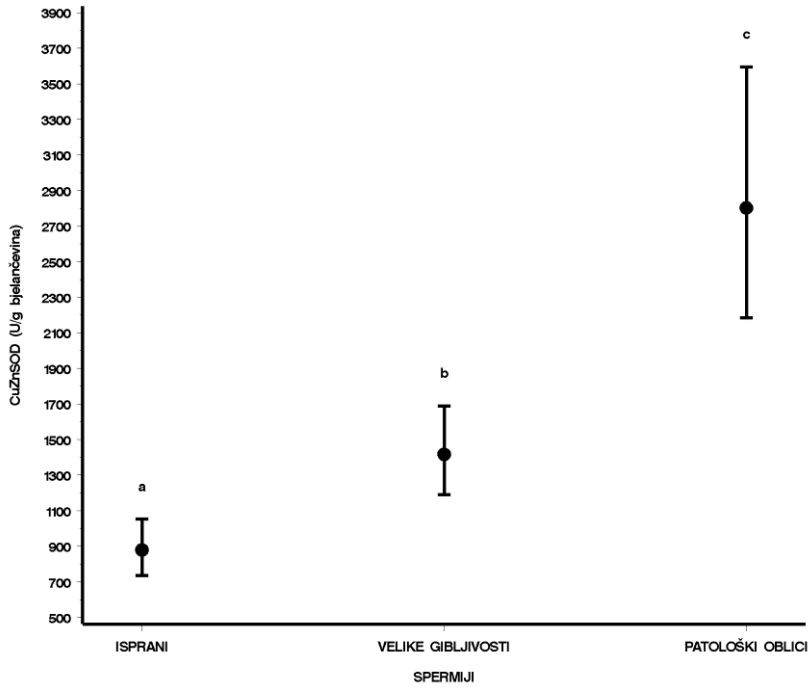
Slika 5.40. Aktivnost manganske superoksid dismutaze (MnSOD) u spermijima različitih morfologijskih oblika i gibljivosti u svih istraživanih skupina nerasta. Različita slova u eksponentu označavaju statističku značajnost između uzoraka na razini P<0,001.

Usporedbom vrijednosti aktivnosti MnSOD u različitim uzorcima spermija utvrđene su statistički značajno veće vrijednosti u ispranim spermijima u odnosu na spermije velike gibljivosti (P<0,001).

5.8.5. AKTIVNOST BAKAR, CINK SUPEROKSID DISMUTAZE

Rezultati istraživanja aktivnosti bakar, cink superoksid dismutaze (CuZnSOD) u spermijima (isprani spermiji, spermiji velike gibljivosti i patološki oblici spermija) u svih nerasta uključenih u ovo istraživanje prikazani su na Slici 4.41. te u Tablici 9.41.

U uzorcima patoloških oblika spermija aktivnost CuZnSOD iznosila je 2802,53 U/g bjelančevina (2184,91 – 3594,74 U/g bjelančevina) te se na Slici 4.40. vidi da je to najveća vrijednost među različitim uzorcima spermija. U ispranim je spermijima aktivnost enzima bila je 880,41 U/g bjelančevina (735,10 – 1054,44 U/g bjelančevina), što je najmanja vrijednost među različitim uzorcima spermija. U spermija velike gibljivosti izmjerena aktivnosti CuZnSOD bila je 1417,91 U/g bjelančevina (1190,79 – 1688,33 U/g bjelančevina).



Slika 5.41. Aktivnost bakar, cink superoksid dismutaze (CuZnSOD) u spermijima različitih morfologijskih oblika i gibljivosti u svih istraživanih skupina nerasta. Različita slova u eksponentu označavaju statističku značajnost između uzoraka na razini P<0,001.

Usporedbom aktivnosti CuZnSOD u različitim uzorcima spermija utvrđene su statistički značajne razlike, te je tako aktivnost tog enzima bila značajno veća u patoloških oblika spermija u odnosu na uzorke spermija velike gibljivosti i ispranih spermija (P<0,001). S druge pak strane, u uzorcima ispranih spermija utvrđena je značajno manja aktivnost enzima u odnosu na uzorke spermija velike gibljivosti te uzorke spermija patoloških oblika (P<0,001).

6. RASPRAVA

U posljednjih je četrdeset godina umjetna oplodnja svinja imala najznačajniji utjecaj u umjetnom odabiru (selekciji) na temelju kvantitativnih i kvalitativnih genetskih odlika što je rezultiralo brzim napretkom u svinjogojskoj industriji (DYCK i sur., 2011.). Uspjeh umjetnog osjemenjivanja ovisan je o identifikaciji i selekciji nerasta čija se reproduktivna svojstva ocjenjuju temeljem libida, sposobnosti za sparivanjem (spolni refleksi) i nadprosječnom kakvoćom sjemena (OKERE i sur., 2005.). Obzirom na ograničeni broja doza koje se mogu dobiti iz jednog ejakulata, samo oni nerasti koji kontinuirano daju sjeme izvrsne kakvoće uključeni su u programe umjetnog osjemenjivanja (CIERESZKO i sur., 2000.). Sparivanje rasplodnih jedinki mora rezultirati graviditetom i prasenjem legla s velikim brojem živorođene prasadi. Kakvoća sjemena nerasta može značajno varirati (25 - 30%) tijekom godine, od jedinke do jedinke te od ejakulata do ejakulata iste jedinke uslijed egzogenih (godišnje doba, učestalost uzimanja ejakulata, smještaj, stres, hranidba itd.) i endogenih (životna dob, pasmina, neuroendokrini status itd.) čimbenika (CIERESZKO i sur., 2000.; KNOX, 2003.; STANČIĆ i sur., 2003.; SMITAL, 2009.; WOLF i SMITAL, 2009a.). Kakvoća sperme može se mijenjati radi navedenih čimbenika koji utječu na aktivnost spermatogeneze, ali i radi pojave bolesti reproduktivnog sustava. Analizom sperme procjenjuju se potencijali plodnosti mužjaka, kakvoća sjemena i mogući uzroci neplodnosti. Kako bi osigurali primjerenu kakvoću doza za umjetno osjemenjivanje, potrebna je redovita procjena kakvoće sjemena (RODRÍGUEZ i sur., 2013.).

6.1. STANDARDNE PROCJENE EJAKULATA

Volumen sjemena je fizikalni pokazatelj, a određuje se u svrhu procjene njegove prikladnosti za razrjeđivanje i konzerviranje za primjenu u umjetnom osjemenjivanju. Volumen se ocjenjuje odmah nakon uzimanja ejakulata. U nerasta se volumen ejakulata razlikuje u odnosu na: životnu dob, pasminu, jedinku, godišnje doba, prehranu, zdravstveno stanje, način prikupljanja ejakulata, čimbenike stresa, veličinu testisa itd. (CIERESZKO i sur., 2000.; STANČIĆ i sur., 2003.; SMITAL, 2009.).

U ovom istraživanju najveći je prosječni volumen sjemena zabilježen u rasplodnih nerasta pasmine njemački landras 123,33 mL, a najmanji volumen sjemena izmjeren je u PIC-hibrida 72,00 mL, koji su i bili nešto mlađi od ostalih nerasta (u dobi od 18 mjeseci). U preostalih skupina nisu zabilježena veća odstupanja srednjih vrijednosti, pa je u nerasta

pasmine švedski landras srednja vrijednost volumena sjemena bila 100,00 mL, u nerasta pasmine veliki jorkšir 102,00 mL, a u pietrena 96,67 mL. Raspon izmjerenih volumena ejakulata nerasta različitih pasmina i PIC-hibrida u ovom istraživanju bio je sukladan rasponu volumena ejakulata nerasta koji su dobili WOLF i SMITAL, (2009a.), a manji od navoda KNOXA (2003.). U ovom se istraživanju volumen sjemena razlikovao među skupinama, a napose među skupinama njemačkog landrasa i PIC-hibrida, ali te razlike nisu bile statistički značajne (P>0,05). Dobiveni su rezultati slični rezultatima WOLFA i SMITALA (2009a.) kao i TĂPĂLOAGĂ i sur. (2013.) koji su utvrdili razlike među pasminama, ali razlike nisu bile statistički značajne. Istodobno SONDERMAN i LUEBBE (2008.) navode da osim individualnih razlika među nerastima, postoje i razlike među pasminama te među linijama nerasta, što su svojim rezultatima potvrdili KAWĘCKA i sur. (2008.) i SMITAL (2009.) ustanovivši statistički značajne razlike u kvaliteti i kvantiteti sjemena između različitih pasmina nerasta i njihovih križanaca. KAWĘCKA i sur. (2008.) su značajne razlike između pasmina i njihovih križanaca utvrdili u volumenu ejakulata, progresivnoj gibljivosti i koncentraciji spermija.

Većina je autora utvrdila najbolju kakvoću sjemena nerasta u jesenskom i zimskom razdoblju (CIERESZKO i sur., 2000.; SMITAL, 2009.; TĂPĂLOAGĂ i sur., 2013.), dok su STANČIĆ i sur. (2003.) ustvrdili tendenciju smanjenja volumena ejakulata nerasta u razdoblju proljeća i ljeta s najmanjim volumenom u jesenskom razdoblju, a najvećim volumenom u zimi. Svi navedeni autori navode da je sveukupna kakvoća sjemena nerasta najlošija u ljetnom razdoblju. Ovo je istraživanje provedeno u jesenskom razdoblju, stoga nije moguće usporediti dobivene rezultate te odrediti utjecaj godišnjeg doba na kakvoću sjemena.

WOLF i SMITAL, (2009a.) navode da se volumen sjemena povećava do životne dobi od oko dvije godine i približno mjeri 100 mL, a nakon toga ostaje konstantan, što je u skladu sa dobivenim rezultatima ovoga istraživanja, gdje je prosječna vrijednost volumena svih ejakulata iznosila približno 100 mL, a nerasti su bili u dobi od 18 do 40 mjeseci. SAVIĆ (2014.) pak navodi da se koncentracija, volumen i ostali pokazatelji sperme nerasta povećavaju sve do dobi nerasta od 3,5 godine. STANČIĆ i sur. (2003.) su utvrdili tendenciju povećanja volumena ejakulata s dobi nerasta, ali povećanje nije bilo značajno, a raspon starosti nerasta bio je od 10 do 56 mjeseci. KAWĘCKA i sur. (2008.) su utvrdili povećanje volumena ejakulata sa starenjem nerasta u pasmine durok, križanaca otac durok, a majka pietren kao i križanaca majka durok, a otac pietren, dok se u nerasta pasmine pietren volumen ejakulata gotovo i nije mijenjao starenjem, što ukazuje da postoji genetski utjecaj na povećanje volumena ejakulata starenjem nerasta. Prethodni nalaz potvrđuju i rezultati

WOLFA i SMITALA (2009a.) koji su ustanovili da je volumen ejakulata, od svih pokazatelja, najviše pod utjecajem genetike. U našem istraživanju životna dob nerasta nije imala utjecaja na volumen ejakulata, niti na ostale pokazatelje sjemena, a nerasti uključeni u istraživanje bili su u optimalnoj rasplodnoj dobi.

Budući da ejakulati sa većim volumenom mogu sadržavati mali postotak progresivno gibljivih odnosno funkcionalnih spermija, analiza sperme samo na temelju volumena nije dovoljna te je stoga potrebno uzeti u obzir i sve ostale značajke ejakulata (SAVIĆ, 2014.). Tako su KNECHT i sur. (2014.) utvrdili najveći volumen sjemena u nerasta pasmine poljski veliki jorkšir, između različitih istraživanih pasmina, no u analizi drugih značajki sperme, nerasti ove pasmine imali su najlošije rezultate.

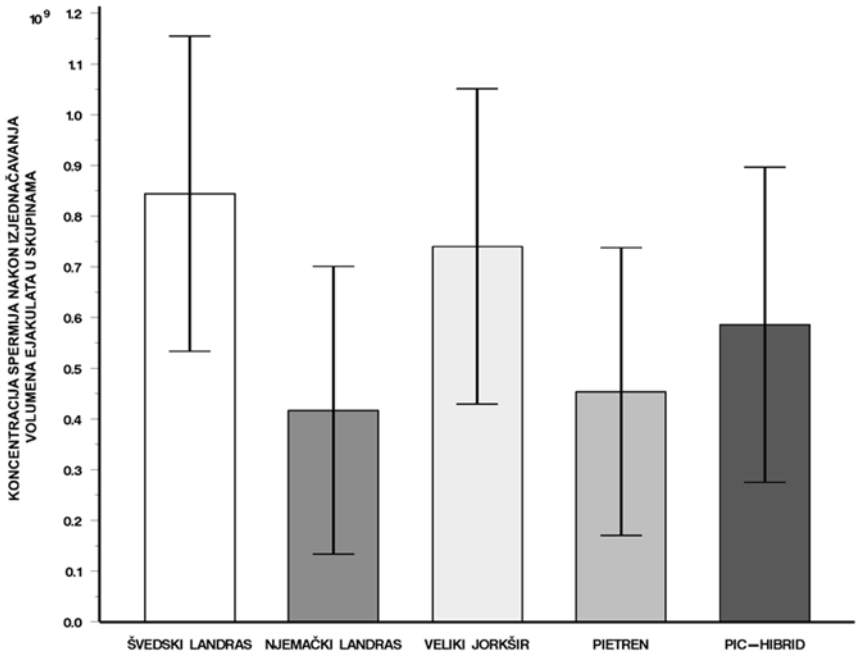
Gustoća sjemena, odnosno koncentracija spermija u ejakulatu najznačajniji je pokazatelj u obradi ejakulata nerasta, a služi kao pristup za praćenje zdravlja i reproduktivnog potencijala nerasta. Mnogi autori navode da godišnje doba, učestalost uzimanja ejakulata, pasmina, starost i okolišni čimbenici utječu na koncentraciju spermija u nerasta (CIERESZKO i sur., 2000.; STANČIĆ i sur., 2003.; KAWĘCKA, i sur., 2008.; KONDRACKI i sur., 2012.).

U ovom je istraživanju najviša prosječna vrijednost gustoće sjemena među skupinama dobivena u PIC-hibrida i iznosila je 0,82 x 10^9/mL, a najniža je vrijednost zabilježena u njemačkog landrasa 0,35 x 10^9/mL. Malo viša vrijednost koncentracije spermija od skupine njemačkog landrasa zabilježena je u pietrena i iznosila je 0,47 x 10^9/mL. Podjednake prosječne vrijednosti koncentracije spermija zabilježene su u nerasta pasmine švedski landras od 0,79 x 10^9/mL te u velikog jorkšira od 0,74 x 10^9/mL. Koncentracija spermija nerasta različitih pasmina i PIC-hibrida u našem istraživanju određena je fotometrom te je bila u rasponu od 0,05 do 0,9 x 10^9/mL (50 do 900 x 10^3/ mm3) sukladno navodima WOLFA i SMITALA (2009a.).

Statistički značajno manju vrijednost koncentracije spermija imala je skupina njemačkog landrasa u odnosu na švedskog landrasa i velikog jorkšira na razini $P<0,05$, dok je statistički manja vrijednost koncentracije spermija na razini $P<0,01$ utvrđena u njemačkog landrasa u odnosu na PIC-hibrida. Slične rezultate, odnosno statistički značajne razlike u koncentraciji spermija između nerasta različitih pasmina i križanaca dobili su CIERESZKO i sur. (2000.), KAWĘCKA i sur. (2008.) i SMITAL (2009.), dok WOLF i SMITAL (2009a.) te TĂPĂLOAGĂ i sur. (2013.) nisu utvrdili statistički značajne razlike u gustoći ejakulata između različitih pasmina nerasta. TĂPĂLOAGĂ i sur. (2013.) u istraživanju su ustanovili neznatan utjecaj životne dobi na koncentraciju spermija i volumen sjemena nerasta, odnosno

koncentracija i volumen nerasta u dobi od dvije godine bila je minimalno veća od onih u jednogodišnjaka. Slično navode WOLF i SMITAL (2009a.), koji tvrde da porast koncentracije spermija nerasta započinje u dobi od 5 do 8 mjeseci i traje sve do godine dana, a nakon toga slijedi dugotrajno umjereno smanjivanje koncentracije spermija sve do treće godine starosti, kada koncentracija spermija postaje ustaljena. U ovom istraživanju nije zabilježen utjecaj dobi na osobine ejakulata nerasta, i to moguće zbog dobi nerasta koji su bili uključeni u ovo istraživanje u kojem nema značajnijih varijacija u koncentraciji spermija prema navodima spomenutih autora.

TĂPĂLOAGĂ i sur. (2013.) su utvrdili razlike u koncentraciji među pasminama nerasta, ali razlike nisu bile statistički značajne. Nadalje, nerasti pasmine pietren imali su najveću koncentraciju spermija, ali i najmanji volumen, dok su nerasti pasmine landras imali najveći volumen te najmanju koncentraciju spermija. Slični rezultati ustvrđeni su i u ovom istraživanju, gdje su nerasti PIC-hibrida imali najmanji volumen uz najveću koncentraciju spermija, a nerasti pasmine njemački landras imali su najveći volumen uz najmanju koncentraciju spermija. Kada se volumen ejakulata izjednači na jednaki volumen u svim istraživanim skupinama nerasta, tada razlike u koncentraciji spermija među skupinama nisu statistički značajne, a najveću koncentraciju imali su nerasti skupine švedskog landrasa, a najmanju i dalje nerasti njemačkog landrasa (Slika 6.1.).



Slika 6.1. Koncentracija spermija nakon izjednačavanja volumena ejakulata u skupinama.

Utjecaj godišnjeg doba na koncentraciju spermija navode autori SMITAL (2009.) i CIERESZKO i sur. (2000.) koji su najnižu koncentraciju spermija utvrdili u nerasta u kolovozu, a najveću u razdoblju od ožujka do svibnja. U novijim istraživanjima STANČIĆ i sur. (2012.) navode da su volumeni ejakulata, koncentracija spermija, ukupni broj i progresivna gibljivost spermija znatno manji u toplijim godišnjim dobima, a time je i broj dobivenih doza za osjemenjivanje po ejakulatu gotovo dvostruko manji od onih dobivenih u hladnijim godišnjim dobima. Ovo istraživanje provedeno je u jesenskom razdoblju te su koncentracije spermija istraživanih nerasta i hibrida bile znatno veće od gornje vrijednost raspona prema CERGOLJU i SAMARDŽIJI (2006.). To se vjerojatno dogodilo i uslijed povoljnog utjecaja godišnjeg doba, dok su prema KNOXU (2003.) volumeni ejakulata istraživanih nerasta bili ispod donje vrijednosti raspona, što ukazuje da je manji volumen ejakulata kompenziran većom koncentracijom spermija.

Učestalost prikupljanja sperme utječe na njezine kvantitativne i kvalitativne pokazatelje. Razdoblje između dva prikupljanja ejakulata ima veliki utjecaj na koncentraciju sperme (WOLF i SMITAL, 2009a.). Prema navodima nekih istraživača, optimalan razmak između dva skoka za neraste u eksploataciji je 3 do 5 dana, a za mlade neraste treba biti dulji razmak, i to najmanje 7 dana (SAVIĆ, 2014.). Produljenjem spomenutog razdoblja sa 2 na 6, odnosno 10 dana, koncentracija sperme se povećava približno za 100 x 10^3, odnosno 150 x 10^3 spermija po mm^3. Volumen je ejakulata pod manjim utjecajem razdoblja između dva prikupljanja ejakulata, a ustvrđeno je blago povećanje kada se razdoblje prikupljanja produljuje od 2 na 7 dana. Razdoblje dulje od 12 dana ima za posljedicu smanjenje udjela gibljivih spermija te povećanje udjela abnormalnih spermija u ejakulatu. Prihvatljiv volumena ejakulata izmjeren je kada je razdoblje između dvaju prikupljanja ejakulata bilo 3 dana, a rezerve spermija u repu epididimisa obnovile su se nakon 5 do 7 dana, dok je za potpunu obnovu spermija bilo potrebno 10 do 11 dana (SMITAL, 2009.). Nerasti u ovom istraživanju bili su u režimu prikupljanja ejakulata dva puta tjedno što je u suglasju sa nekim istraživačima koji su se bavili sličnom problematikom (FRANGEÎ i sur., 2005.).

Određivanje progresivne gibljivosti spermija u procjeni ejakulata pokazatelj je kakvoće i broja oplodno sposobnih spermija. Gibljivost spermiju omogućava oplodnju, odnosno mogućnost prodora u jajnu stanicu te je stoga određivanje progresivne gibljivosti spermija vrlo značajan pokazatelj u procjeni ejakulata rasplodnjaka (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.). Radi kiselog medija spermiji su u epididimisu u stanju anabioze i ne gibaju se sve do trenutka miješanja s alkalnim sekretom prostate nakon čega uslijedi progresivno, odnosno pravocrtno gibanje spermija, pri čemu se spermiji rotiraju oko uzdužne

osi prema naprijed s brzim pokretima repa lijevo-desno. Ejakulati nerasta koji se razrjeđuju za umjetno osjemenjivanje moraju imati minimalno 70% progresivno gibljivih spermija, a oni ejakulati koji nemaju zadovoljavajući postotak progresivno gibljivih spermija odbacuju se (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.; FRUNZĂ i sur., 2008.).

U ovom su istraživanju ustvrđene vrijednosti koje ukazuju da je progresivna gibljivost spermija u uzorku nativnog ejakulata nerasta pasmine pietren iznosila 79,29% i bila je najveća srednja vrijednost u svih skupina, dok je najniža srednja vrijednost bila u skupini velikog jorkšira i iznosila je 74,03%. Zabilježene srednje vrijednosti progresivne gibljivosti spermija bile su u švedskog landrasa 75,29%, u njemačkoga landrasa 78,55% te u PIC-hibrida 78,14%. Suprotne rezultate ovom istraživanju, dobili su KAWĘCKA i sur. (2008.), koji su ustvrdili da su nerasti pasmine pietren imali najmanju progresivnu gibljivost spermija, dok su nasuprot ovom istraživanju i u istraživanju STANČIĆA i sur. (2003.), nerasti pasmine pietren imali najveću progresivnu gibljivost. Dobiveni različiti rezultati u navedenim istraživanjima mogli bi se pripisati različitoj životnoj dobi istraživanih nerasta pasmine pietren te usporedbom nerasta pasmine pietren sa različitim pasminama i križancima nerasta uključenim u istraživanja.

Usporedbom dobivenih vrijednosti nisu utvrđene značajnije razlike progresivne gibljivosti spermija između nerasta različitih pasmina i PIC-hibrida ($P>0,05$). Slične rezultate našem istraživanju, odnosno male, statistički neznačajne razlike između pasmina dobili su GERFEN i sur. (1994.) te WOLF i SMITAL (2009a.). Nasuprot našem istraživanju KAWĘCKA i sur. (2008.) i SMITAL (2009.) utvrdili su značajne razlike između pasmina i njihovih križanaca u progresivnoj gibljivosti spermija istraživanih nerasta. Dobiveni različiti rezultati provedenih studija mogli biti se pripisati metodi za procjenu progresivne gibljivosti spermija, odnosno subjektivnoj procjeni pretražitelja.

Godišnje doba prema nekim autorima ima utjecaj na progresivnu gibljivost spermija. Tako su STANČIĆ i sur. (2003.) te STANČIĆ i sur. (2012.) utvrdili da je progresivna gibljivost spermija istraživanih nerasta najmanja u jesen, koju tumače tzv. toplinskim šokom. Riječ je o direktnim štetnim utjecajima visoke temperature okoliša i dulje dnevne svijetlosti u toplijem razdoblju godine, na spermatogenezu i spermiogenezu te na sintezu testosterona, koje se mogu pojaviti i dva mjeseca nakon djelovanja temperaturnog šoka. Nasuprot tome, WOLF i SMITAL (2009a.) su utvrdili da godišnja doba imaju vrlo mali utjecaj na progresivnu gibljivost spermija nerasta, kao i razdoblje između dvaju prikupljanja. SMITAL (2009.) štoviše navodi da se i progresivna gibljivost spermija stabilizira već nakon tri dana po prikupljanju ejakulata.

U ovom istraživanju godišnje doba, pa niti režim prikupljanja ejakulata nisu imali značajni utjecaj na dobivene rezultate. Prema rezultatima WOLFA i SMITALA (2009a.) progresivna se gibljivost smanjuje, kada je razdoblje između prikupljanja ejakulata veće od 12 dana te ravnomjerno sa životnom dobi od 8 do 48 mjeseci starosti (SAVIĆ, 2014.). STANČIĆ i sur. (2003.) su pak ustvrdili suprotno, odnosno tendenciju povećanja progresivne gibljivosti spermija sa životnom dobi nerasta. Prosječna vrijednost progresivne gibljivosti istraživanih nerasta bila je 75% u životnoj dobi nerasta od 10 do 18 mjeseci, a u razdoblju od 19 do 56 mjeseci starosti nerasta bila je 79% i nije se mijenjala. Prema navedenom istraživanju, nerasti su u ovom istraživanju bili u životnoj dobi u kojoj je progresivna gibljivost spermija veća nego u nerasta mlađih od 19 mjeseci, te su bili u rasponu životne dobi kada nisu utvrđene promjene u progresivnoj gibljivosti.

6.2. BIOKEMIJSKI POKAZATELJI U SJEMENOJ PLAZMI

Istraživanjima u nerasta i u drugih životinjskih vrsta te u ljudi utvrđeno je nekoliko biokemijskih pokazatelja koji bi mogli imati kliničko značenje. Primjerice, pokazatelji funkcije ili disfunkcije testisa i/ili akcesornih spolnih žlijezda ili se pak odnose na kakvoću sjemena i rasplodnu učinkovitost ili neplodnost. Spoznaje o fiziološkim značajkama spermija i sjemene plazme te utjecaj pasmine, linije i pojedinačnih značajki rasplodnjaka, preduvjet su za uspješno unapređenje reprodukcijske učinkovitosti te nasljeđivanje najboljih značajki genoma sjemena. Poznavanje kemijskog sastava sjemene plazme važno je pri odabiru razrjeđivača, koji održava i produljuje životni vijek spermija tijekom čuvanja sjemena.

Lipidi, odnosno masne tvari stanične membrane spermija i sjemene plazme ključni su za funkciju spermija. Lipidi u ejakulatu, a napose fosfolipidi i kolesterol, važni su za strukturu i funkciju stanične membrane spermija (CROSS, 1998.), nadalje imaju i značajnu funkciju u metabolizmu, kapacitaciji, hiperaktivaciji i akrosomskoj reakciji spermija te oplodnji jajne stanice (JUYENA i STELLETTA, 2012.). Izvorom se lipida u sjemenoj plazmi smatraju prostata, epididimisi i spermiji (PICKETT I KOMÁREK, 1966.; JACYNO i sur., 2009.). U nedostatku supstrata za glikolizu, endogeni i egzogeni lipidi imaju značajnu funkciju u opskrbi spermija energijom za njihovu gibljivost i održivost (SCOTT i DAWSON, 1968.; JUYENA i STELLETTA, 2012.).

Rezultati ovog istraživanju ukazuju na značajni utjecaj pasmine na koncentraciju triacilglicerola u sjemenoj plazmi istraživanih nerasta. Srednja vrijednost koncentracije triacilglicerola u sjemenoj plazmi nerasta PIC-hibrida najveća je vrijednost među istraživanim

skupinama te je iznosila 0,19 mmol/L, dok je najniža srednja vrijednost zabilježena u skupini pasmine pietrena i iznosila je 0,03 mmol/L. Nerasti skupina njemačkog landrasa i velikog jorkšira imali su podjednake koncentracije triacilglicerola u sjemenoj plazmi te je ona u njemačkog landrasa iznosila 0,05 mmol/L, a u velikog jorkšira 0,06 mmol/L. Prosječna koncentracija triacilglicerola u sjemenoj plazmi nerasta pasmine švedskog landrasa veća je od one u njemačkog landrasa i velikog jorkšira te je iznosila 0,14 mmol/L.

U sjemenoj plazmi nerasta različitih pasmina i PIC-hibrida statističkom obradom podataka ustvrđene su značajno veće vrijednosti triacilglicerola u skupini PIC-hibrida u odnosu na skupine pietrena ($P<0,01$) i njemačkog landrasa ($P<0,05$). Istodobno, statistički značajno niže vrijednosti utvrđene su u nerasta pasmine pietren u odnosu na neraste pasmine švedski landras ($P<0,05$). Suprotno našim podacima, GUTZMIRTL (2013.) nije utvrdio statistički značajne razlike u koncentracijama triacilglicerola u sjemenoj plazmi među nerastima različitih linija PIC-hibrida. Prosječna vrijednost koncentracija triacilglicerola u sjemenoj plazmi nerasta različitih linija PIC-hibrida bila je u rasponu od 0,17 do 0,23 mmol/L, tako je i prosječna vrijednost koncentracije triacilglicerola u sjemenoj plazmi nerasta PIC-hibrida u ovom istraživanju bila unutar navedenog raspona. Nadalje, GUTZMIRTL (2013.) je ustvrdio značajne individualne razlike u koncentraciji triacilglicerola u sjemenoj plazmi istraživanih nerasta, što je u suglasju s ovim istraživanjem gdje su utvrđene velike individualne razlike u koncentraciji triacilglicerola u sjemenoj plazmi nerasta unutar jedinki iste pasmine, osim unutar skupine PIC-hibrida. Utjecaj dobi na koncentraciju triacilglicerola u sjemenoj plazmi nerasta nije utvrđen, kao ni u ovom istraživanju. Nadalje, GUTZMIRTL (2013.) je ustvrdio pozitivnu korelaciju koncentracije triacilglicerola u sjemenoj plazmi s ukupnim brojem i brojem gibljivih spermija u jedinici volumena ejakulata te negativnu korelaciju koncentracije triacilglicerola u sjemenoj plazmi sa volumenom ejakulata. VIGON i sur. (1992.) su ustvrdili različito podrijetlo triacilglicerola u sjemenoj plazmi. GUTZMIRTL (2013.) dobivenu negativnu korelaciju koncentracije triacilglicerola u sjemenoj plazmi sa volumenom ejakulata tumači pretežnim epididimalnim podrijetlom triacilglicerola u sjemenoj plazmi nerasta.

ÇEVIK i sur. (2007.) su utvrdili značajno veću koncentraciju triacilglicerola u sjemenoj plazmi normospermičnih prema oligospermičnim bikovima. KELSO i sur. (1997.) su u sjemenoj plazmi starijih bikova ustvrdili manju koncentraciju triacilglicerola nego u mlađih, dok je u spermijima mlađih bikova bila gotovo dvostruko manja koncentracija triacilglicerola prema starijima. Dobiveni se rezultati mogu protumačiti većom inkorporporacijom triacilglicerola u spermije starijih bikova, što uzrokuje smanjenje

koncentracije triacilglicerola u sjemenoj plazmi starijih bikova (ABDEL AZIZ i sur. ,1983.; ARGOV i sur. 2007.).

Povećana koncentracija triacilglicerola u sjemenoj plazmi, pozitivno je povezana s plodnošću jedinki (ABDEL AZIZ i sur., 1983.; ÇEVIK i sur., 2007.; GUTZMIRTL, 2013.). ARGOV i sur. (2007.) u svom istraživanju navode da su triacilgliceroli nužni u metabolizamu spermija te da je velika koncentracija triacilglicerola povezana s dobrom kakvoćom sjemena. Navedeno upućuje da nerasti skupine PIC-hibrida imaju najbolju kakvoću sjemena.

Rezultati ovog istraživanju ukazuju na značajni utjecaj pasmine na koncentraciju ukupnog kolesterola u sjemenoj plazmi istraživanih nerasta. Najveća srednja vrijednost koncentracije ukupnog kolesterola u sjemenoj plazmi, pripada skupini nerasta PIC-hibrida i iznosila je 0,159 mmol/L. Najnižu pak, srednju vrijednost koncentracije ukupnog kolesterola imala je skupina nerasta njemačkog landrasa i to 0,008 mmol/L. Malu, ali ipak nešto veću koncentraciju ukupnog kolesterola od njemačkog landrasa, imala je skupina nerasta pietren, a iznosila je 0,025 mmol/L. Skupine nerasta pasmina švedski landras i veliki jorkšir imale su manja odstupanja koncentracije ukupnog kolesterola u sjemenoj plazmi nego prethodno navedene skupine, a te su vrijednosti iznosile za švedskog landrasa 0,040 mmol/L, a velikog jorkšira 0,062 mmol/L.

U ovom istraživanju zabilježena je statistički značajno veća koncentracija kolesterola u sjemenoj plazmi PIC-hibrida u odnosu na njemačkog landrasa ($P<0,001$) i pietrena ($P<0,01$), te značajno manja u njemačkog landrasa u odnosu na velikog jorkšira i švedskog landrasa ($P<0,05$).

GUTZMIRTL (2013.) je utvrdio statistički značajne razlike u koncentracijama kolesterola u sjemenoj plazmi među nerastima različitih linija PIC-hibrida, a raspon srednjih vrijednosti kretao se od 0,03 do 0,07 mmol/L. Nerasti su PIC-hibrida u ovom istraživanju imali daleko veću srednju vrijednost koncentracije ukupnog kolesterola u sjemenoj plazmi koja je iznosila 0,159 mmol/L. Prosječna vrijednost koncentracije kolesterola u sjemenoj plazmi nerasta koju navode DIACONESCU i sur. (2014.) iznosi 0,116 mmol/L (2,08 mg/100mL) te su vrijednosti slične koncentraciji u PIC-hibrida u ovom istraživanju. Nadalje, GUTZMIRTL (2013.) u provedenom istraživanju nije ustvrdio utjecaj životne dobi na koncentraciju kolesterola u sjemenoj plazmi nerasta kao ni BEER-LJUBIĆ i sur. (2009.) u sjemenoj plazmi bikova, što je u skladu sa ovim istraživanjem. U navedenom istraživanju GUTZMIRTL (2013.) štoviše nije utvrdio značajna individualna odstupanja u koncentraciji navedenog pokazatelja, dok su u ovom istraživanju ustvrđene velike individualne razlike u koncentraciji ukupnog kolesterola u sjemenoj plazmi nerasta među jedinkama iste pasmine.

BAILEY i sur. (2008.) navode da dodavanje kolesterola u razrjeđivače sjemena zaštitno djeluje na spermije tijekom procesa zamrzavanja-odmrzavanja, inhibira preuranjenu akrosomsku reakciju i pospješuje preživljavanje i gibljivost spermija. Slično navodi i CROSS (1996.). Prema navodima CROSSA (1998.) te JACYNA i sur. (2009.) ejakulirani spermiji dobivaju dodatni kolesterol iz sjemene plazme, kojeg inkorporiraju u staničnu membranu, a stanične membrane spermija nerasta koje sadrže veću količinu kolesterola otpornije su na osmotski „šok“ (JACYNO i sur., 2009.). U ovom smo istraživanju među pasminama i hibridima nerasta utvrdili značajne razlike u koncentraciji kolesterola u sjemenoj plazmi, a što bi moglo ukazivati na posredni zaštitni utjecaj u preživljavanju spermija te utjecati na kakvoću sjemena u nerasta sa značajno većom koncentracijom kolesterola u sjemenoj plazmi.

Pozitivan utjecaj veće koncentracije kolesterola u sjemenoj plazmi rasplodnih mužjaka potkrijepljuju i rezultati istraživanja JACYNO-a i sur. (2009.) gdje je koncentracija kolesterola u sjemenoj plazmi nerasta pozitivno korelirala sa gibljivošću, koncentracijom i ukupnim brojem spermija, dok je negativno korelirala sa udjelom morfološki promijenjenih spermija. Slične rezultate utvrdio je i GUTZMIRTL (2013.), gdje je koncentracija kolesterola u sjemenoj plazmi nerasta također pozitivno korelirala s brojem spermija u ejakulatu te postotkom progresivno gibljivih spermija.

Kako je koncentracija ukupnog kolesterola u sjemenoj plazmi bikova bila je veća u godišnjem dobu kada je kakvoća ejakulata boljih svojstava, odnosno manja u godišnjem dobu kada je kakvoća ejakulata lošijih svojstava. BEER-LJUBIĆ i sur. (2009.) su zaključili da je mjerenje koncentracije kolesterola u sjemenoj plazmi bikova potencijalni biokemijski pokazatelj kakvoće sperme. Slične rezultate dobili su ARGOV i sur. (2007.), odnosno veću koncentraciju ukupnog kolesterola u sjemenoj plazmi bikova u zimskom razdoblju, te manju u ljetnom razdoblju.

Značajno veća koncentracija kolesterola u sjemenoj plazmi PIC-hibrida u odnosu na njemačkog landrasa i pietrena, mogla bi upućivati na njihovu bolju kakvoću sjemena.

U ovom istraživanju najviša srednja vrijednost koncentracije HDL-kolesterola u sjemenoj plazmi zabilježena je u skupini PIC-hibrida i iznosila je 0,038 mmol/L, a najniža vrijednost utvrđena je u skupini nerasta pasmine njemačkog landrasa i iznosila je 0,016 mmol/L. Njemačkom landrasu približno slične vrijednosti koncentracije HDL-kolesterola u sjemenoj plazmi zabilježene su u švedskog landrasa i iznosila je 0,018 mmol/L. Manje razlike u vrijednostima zabilježene su među skupinama velikog jorkšira s koncentracijom HDL-kolesterola od 0,026 mmol/L i pietrena s koncentracijom od 0,024 mmol/L.

Usporedbom vrijednosti koncentracije HDL-kolesterola u sjemenoj plazmi nerasta različitih pasmina i PIC-hibrida nisu utvrđene značajne razlike (P>0,05).

Rezultati ovog istraživanja pokazali su utjecaj pasmine na koncentraciju LDL-kolesterola u sjemenoj plazmi istraživanih nerasta. Najveća srednja vrijednost koncentracije LDL-kolesterola u sjemenoj plazmi utvrđena je u skupini PIC-hibrida, i to 0,21 mmol/L, a u skupini nerasta njemačkog landrasa utvrđena je najniža srednja vrijednost od 0,03 mmol/L. Veće vrijednosti koncentracije LDL-kolesterola u sjemenoj plazmi, pema onima u skupini njemačkog landrasa, zabilježene su u pietrena, i to 0,05 mmol/L, u švedskog landrasa 0,07 mmol/L te u velikog jorkšira 0,11 mmol/L.

Tako je u ovom istraživanju utvrđena značajno manja vrijednost koncentracije LDL-kolesterola u sjemenoj plazmi njemačkog landrasa u odnosu na PIC-hibrida (P<0,001) i velikog jorkšira (P<0,01). Statistički značajno viša vrijednost zabilježena je u PIC-hibrida u odnosu na pietrena (P<0,001) i švedskog landrasa (P<0,05).

U ovom istraživanju kolesterol je u sjemenoj plazmi nerasta distribuiran u dvije lipoproteinske frakcije (LDL i HDL), pri čemu je koncentracija LDL-kolesterola višestruko veća od koncentracije HDL-kolesterola, sukladno istraživanju BEER-LJUBIĆ i sur. (2009.). Nadalje, BEER-LJUBIĆ i sur. (2009.) su utvrdili najveću varijabilnost koncentracije LDL-kolesterola tijekom godišnjih razdoblja, i u starijih i mlađih bikova s time da je najveća koncentracija LDL-kolesterola u sjemenoj plazmi mlađih odnosno starijih bikova bila u zimskom razdoblju, te da veća koncentracija LDL-kolesterola pridonosi kakvoći sjemena bikova, u zimskom razdoblju kada se zna da je kakvoća sjemena dobra, dok u ljetnom razdoblju godine kada je kakvoća sjemena i gibljivost spermija lošija tada je i koncentracija LDL-kolesterola bila manja.

Lipoproteini male gustoće štite membrane spermija od oštećenja tijekom procesa smrzavanja-odmrzavanja, iako mehanizam djelovanja još uvijek nije potpuno poznat (BEER-LJUBIĆ i sur., 2009.; EL-SHARAWY i sur., 2012.). EL-SHARAWY i sur. (2012.) su ustvrdili da dodavanje LDL-a ekstrahiranog iz žutanjka jaja u razrjeđivače bikovskog sjemena doprinosi očuvanju gibljivosti spermija nakon odmrzavanja ejakulata, pa time i boljem očuvanju akrosomske i stanične membrane te većoj koncepciji krava. Jednako tako poznato je da su spermiji nerasta osjetljiviji na stres prouzročen tijekom procesa smrzavanja-odmrzavanja, a dodavanje LDL u razrjeđivače sjemena poboljšalo je kakvoću sjemena nakon odmrzavanja (JIANG i sur., 2007.).

DIACONESCU i sur. (2014.) su utvrdili da je koncentracija kolesterola u sjemenoj plazmi bikova višestruko veća od koncentracija kolesterola u sjemenoj plazmi nerasta (srednja

vrijednost koncentracija kolesterola bika bila je u bikova 25,5, a nerasta 2,1 mg/dL). Slično je zapaženo i usporedbom vrijednosti koncentracije ukupnog kolesterola, LDL-kolesterola i HDL-kolesterola u sjemenoj plazmi nerasta u našem istraživanju s vrijednostima navedenih pokazatelja u sjemenoj plazmi bikova (BEER-LJUBIĆ i sur., 2009.). Stoga, rezultati dobiveni u ovom istraživanju potvrđuju činjenicu da nerasti imaju malu koncentraciju kolesterola u sjemenoj plazmi, što je i vjerojatni uzrok velikog oštećenja spermija nerasta tijekom procesa smrzavanja-odmrzavanja sjemena. Nadalje, BEER-LJUBIĆ i sur. (2009.) su utvrdili pozitivnu korelaciju između gibljivosti spermija i razine LDL-kolesterola u sjemenoj plazmi mladih bikova, a ARGOV i sur. (2007.) su utvrdili veću koncentraciju kolesterola u sjemenu izvrsne kakvoće. Kolesterol se veže za LDL lipoproteinsku frakciju u sjemenoj plazmi, stoga bi određivanje koncentracije LDL-kolesterola u sjemenoj plazmi moglo biti vrijedan pokazatelj kakvoće sjemena. Sukladno navedenom, skupina nerasta PIC-hibrida sa značajnom većom koncentracijom LDL-kolesterola u odnosu na nerasta njemačkog landrasa i pietrena, upućuje da bi to mogao biti razlog za bolju kakvoću sjemena u PIC-hibrida.

U starih bikova utvrđena je negativna korelacija između gibljivosti spermija i HDL-kolesterola u sjemenoj plazmi u ljetnom razdoblju (BEER-LJUBIĆ i sur., 2009.). Koncentracija HDL-kolesterola je vrlo mala u sjemenoj plazmi, a HDL je lipoproteinska frakcija uključena u inicijalni proces kapacitacije (THERIEN i sur., 1998.). Smanjena gibljivost spermija značajka je loše kakvoće sjemena, što su u svojem istraživanju podacima potkrijepili ARGOV i sur. (2007.). Mala koncentracija HDL-kolesterola izmjerena je u sjemenu dobre kakvoće. U našem smo istraživanju također utvrdili male koncentracije HDL-kolesterola u sjemenoj plazmi svih istraživanih skupina nerasta, iako je najveća vrijednost utvrđena u PIC-hibrida, a najniža u njemačkog landrasa, no te razlike nisu bile značajne. S obzirom na nedostatne podatke u literaturi potrebna su daljnja istraživanja u tom području.

Prema rezultatima ovoga istraživanja nerasti skupine PIC-hibrida imali su najveće koncentracije svih istraživanih lipida u sjemenoj plazmi, dok su nerasti pasmine njemački landras imali najmanje koncentracije istraživanih lipida, osim koncentracije triacilglicerola, koja je također bila mala, ali su nerasti pasmine pietren imali još manju vrijednost od njemačkog landrasa.

Bjelančevine u sjemenoj plazmi imaju brojne značajne funkcije koje prethode oplodnji, kao što su: regulacija kapacitacije i akrosomske reakcije, uspostava spremnika spermija u jajovodu, modulacija imunosnog odgovora maternice te transport spermija unutar ženskog spolnog sustava, a sudjeluju i u interakciji i fuziji gameta (RODRIGUEZ-MARTÍNEZ i sur., 2011.; KOZIOROWSKA-GILUN i sur., 2011a.).

U ovom istraživanju najniža je srednja vrijednost koncentracije ukupnih bjelančevina zabilježena u sjemenoj plazmi nerasta velikoga jorkšira, i to 20,60 g/L, dok je u PIC-hibrida zabilježena najviša srednja vrijednost od 38,00 g/L. Približno jednake vrijednosti koncentracije ukupnih bjelančevina zabilježene su u pietrena i to 29,67 g/L, u švedskoga landrasa 29,60 g/L, te u njemačkoga landrasa 29,50 g/L.

Prosječna koncentracija ukupnih bjelančevina u sjemenoj plazmi najveću je vrijednost dosegla u skupini PIC-hibrida, a najmanju u velikoga jorkšira, no među skupinama nije bilo statistički značajnih razlika (P>0,05).

Dobiveni rezultati koncentracije ukupnih bjelančevina u sjemenoj plazmi s rasponom od 20,60 – 38,00 g/L slični su onima koje su dobili GERFEN i sur. (1994.) u sjemenoj plazmi nerasta, a koji su iznosili 27,2 – 34,8 g/L. Nadalje, GERFEN i sur. (1994.) također nisu utvrdili značajne razlike koncentracije ukupnih bjelančevina u sjemenoj plazmi nerasta različitih pasmina, kao što to nije utvrđeno niti u ovom radu.

Koncentracija albumina u sjemenoj plazmi nerasta pasmine švedski landras u ovom istraživanju bila je 6,06 g/L te se ističe kao najviša srednja vrijednost među skupinama, a u njemačkog landrasa koncentracija albumina iznosila je 3,67 g/L što je najniža srednja vrijednost među skupinama. Približno jednake vrijednosti albumina zabilježene su u ostalim skupinama nerasta, pa tako u velikog jorkšira iznose 4,36 g/L, u pietrena 4,47 g/L te u PIC-hibrida 4,84 g/L. Usporedbom dobivenih vrijednosti koncentracija albumina u sjemenoj plazmi među skupinama nerasta razlike nisu bile statistički značajne (P>0,05). GÜNDOĞAN (2006.) je utvrdio razlike u koncentracija albumina u sjemenoj plazmi među različitim pasminama ovnova koje također nisu bile statistički značajne.

Poznato je da bjelančevine sjemene plazme oblažu i štite spermije tijekom ejakulacije. Mnoge su studije dokazale da je mala koncentracija bjelančevina u sjemenoj plazmi povezana s lošom kakvoćom sjemena (WHITE i sur., 1987.). U istraživanju GÜNDOĞANA (2006.) utvrđena je pozitivna korelacija između opsega skrotuma, gibljivosti i koncentracije spermija sa koncentracijom ukupnih bjelančevina u sjemenoj plazmi ovnova. Bjelančevine sjemene plazme uglavnom su sastavljene od albumina i globulina, koji imaju svojstvo puferiranja, stoga, manja koncentracija bjelančevina u sjemenoj plazmi smanjuje njezin puferski kapacitet, te posljedično i kakvoću sperme (GÜNDOĞAN, 2006.). Osim toga, BARRIOS i sur. (2000.) navode da sposobnost smrzavanja sjemena pozitivno korelira s ukupnom koncentracijom bjelančevina u sjemenoj plazmi. DIACONESCU i sur. (2014.) navode da je koncentracija bjelančevina veća u sjemenoj plazmi bikova nego u sjemenoj plazmi nerasta, što je možda jedan od razloga dobre sposobnosti smrzavanja sjemena bika.

U ovom su istraživanju PIC-hibridi imali najveću koncentraciju ukupnih bjelančevina, što bi moglo ukazivati da sjeme PIC-hibrida ima bolju kakvoću i mogućnost smrzavanja, nego sjeme ostalih istraživanih pasmina.

KOZIOROWSKA-GILUN i sur. (2011a.) su utvrdili značajno veću koncentraciju bjelančevina u sjemenoj plazmi nerasta tijekom jeseni i zime u odnosu na proljeće i ljeto (41,9 : 31,9 mg/mL). Pri tome, sperma nerasta prikupljena u jesen ima bolja svojstva od one prikupljene u ljetnom razdoblju, jer veća koncentracija bjelančevina dovodi do bolje zaštite i očuvanja stabilnosti stanične membrane spermija (STRZEŻEK, 2002.). Povećana koncentracija albumina uz ostale specifične čimbenike u sjemenoj plazmi ima pozitivan učinak u poboljšanju gibljivosti spermija. U istraživanju GÜNDOĞAN (2006.) utvrđena je najveća koncentracija albumina kao i najveća gibljivosti spermija u jesenskom razdoblju. Nadalje, u tom je istraživanju omjer A/G bio velik (zbog koncentracije globulina) tijekom godišnjeg doba kada je i kakvoća sjemena bila lošijih svojstava (ljeto 0,96; zima 0,99), a u jesen je A/G omjer bio manji (0,95) zbog velike koncentracije globulina, uz primjereno bolju kakvoću sjemena.

U ovom je istraživanju dobiveni omjer A/G bio mali i znosio je za njemačkog landrasa 0,14; PIC-hibrida 0,15; pietrena 0,18; švedskog landrasa 0,26 i velikog jorkšira 0,27, što potkrepljuje spoznaju da je kakvoća sjemena nerasta u jesen bila boljih svojstava.

U ovom je istraživanju prosječna aktivnost kisele fosfataze (ACP) u sjemenoj plazmi nerasta iz skupine švedski landras bila 12,46 U/L te je bila najmanja srednja vrijednost među skupinama, dok je skupina nerasta pasmine pietren imala najveću prosječnu aktivnost ACP-a od 24,27 U/L. Aktivnost je ACP-a u sjemenoj plazmi nerasta njemačkoga landrasa bila 20,56 U/L, a podjednaka vrijednost aktivnosti enzima od 20,52 U/L zabilježena je i u skupini nerasta PIC-hibrida. Nadalje, aktivnost ACP-a u sjemenoj plazmi skupine velikoga jorkšira iznosila je 14,03 U/L.

Usporedbom dobivenih vrijednosti u ovom istraživanju nisu utvrđene statistički značajne razlike ($P>0,05$) u aktivnosti ACP-a u sjemenoj plazmi među skupinama nerasta. Dobiveni rezultati ovog istraživanja nisu u suglasju s rezultatima GUTZMIRTL (2013.) koji je u svojem istraživanju utvrdio statistički značajne razlike u aktivnosti ACP-a u različitih linija nerasta PIC-hibrida, a osim toga, aktivnost je ACP-a bila višestruko veća od one dobivene u ovom istraživanju. Razlike u prosječnim vrijednostima aktivnosti navedenog enzima mogle bi biti posljedica različitih okolišnih uvjeta, hranidbe, intenziteta iskorištavanja, postupaka uzimanja sperme ili metode određivanja enzima i njezine točnosti, koje se mogu razlikovati između pojedinih centara za umjetno osjemenjivanje. MITEVA i sur. (2010.)

također navode da se aktivnost ACP-a razlikuje među životinjskim vrstama te da jednako tako aktivnost ACP-a ovisi i o metodi određivanja. Nadalje, utvrdili su veću srednju vrijednost ACP-a u sjemenoj plazmi muškaraca (1031,9 U/L) u odnosu na magarca (11,5 U/L) i ovnova (18,7 U/L). Dobiveni rezultati ovog istraživanja najsličniji su rezultatima PESCH i sur. (2006.), u kojih je aktivnost ACP-a u sjemenoj plazmi konja iznosili 20 U/L. ACP-a u sjemenoj plazmi nerasta najvećim je udjelom iz epididimisa, što je u suglasju s negativnom korelacijom ACP-a i volumena ejakulata koju je utvrdio GUTZMIRTL (2013.). S obzirom na nedostatne podatke u literaturi potrebna su daljnja istraživanja u tom području.

U ovom istraživanju vrijednost aktivnosti ALP-a u sjemenoj plazmi nerasta pasmine švedski landras iznosila je 195148 U/L, te je bila najveća srednja vrijednost među skupinama. Najmanja srednja vrijednost aktivnosti ALP-a među skupinama utvrđena je u pasmini njemačkog landrasa i iznosila je 115587 U/L. Malo veću vrijednost od njemačkog landrasa imala je skupina velikoga jorkšira, gdje je aktivnost enzima bila 133062 U/L. Približno slične prosječne vrijednosti aktivnosti ALP-a u sjemenoj plazmi uočene su u skupinama pietrena od 169808 U/L te u PIC-hibrida od 177011 U/L.

Usporedbom dobivenih vrijednosti rezultata ovog istraživanja zamijećene su razlike u aktivnosti ALP-a u sjemenoj plazmi između skupina, ali te razlike nisu bile statistički značajne ($P>0,05$). Prema istraživanju kojeg je proveo GUTZMIRTL (2013.) aktivnost alkalne i kisele fosfataze, u sjemenoj plazmi, značajno se razlikovala među različitim linijama PIC-hibrida, a dobiveni rezultati nisu u suglasju sa ovim istraživanjem, iako su srednje vrijednosti bile slične vrijednostima ovog istraživanja. CLEMENTS i sur. (2010.) navode malu aktivnost ALP u nerasta s azoospermijom. BUCCI i sur. (2014.) su utvrdili da ALP doprinosi stabilizaciji membrane spermija, a ima i funkciju u metabolizmu ATP-a, stoga veća aktivnost alkalne fosfataze u sjemenoj plazmi upućuje na bolju kakvoću sjemena te bolju funkciju membrana spermija. U ovom istraživanju, daleko najveću aktivnost u odnosu na ostale određivane enzime u sjemenoj plazmi istraživanih nerasta imala je ALP. To potvrđuje nalaz BELL i LAKE (1962.) koji su ustvrdili najveću ALP u sjemenoj plazmi nerasta, a najmanju u muškaraca. Nadalje, isti autori ustvrdili su višestruko manju aktivnost ACP u odnosu na ALP u sjemenoj plazmi nerasta, a slični su rezultati dobiveni i u ovom istraživanju. Pozitivna korelacija ALP-a utvrđena je sa postotkom gibljivih spermija, a negativna sa volumenom ejakulata (PESCH i sur., 2006.; GUTZMIRTL, 2013.; LÓPEZ RODRÍGUEZ i sur., 2013.). Pozitivna korelacija ALP-a utvrđena sa postotkom gibljivih spermija može se protumačiti sudjelovanjem alkalne fosfataze u proizvodnji slobodne fruktoze u ejakulatu, koja nakon fruktolize osigurava energiju neophodnu za gibljivost spermija (STASIAK i sur.,

2010.). Dok je negativna korelacija ALP-a utvrđena s volumenom ejakulata uslijed najveće sinteze ALP-a u epididimisu nerasta i pasa (EINARSSON i sur., 1976.; BUCCI i sur., 2014.). Veća aktivnost ALP-a u sjemenoj plazmi nerasta ukazuje na bolju kakvoću sjemena istraživanih nerasta.

Rezultati ovog istraživanju ukazuju na značajni utjecaj pasmine na aktivnost GGT-a u sjemenoj plazmi istraživanih nerasta. Srednja vrijednost aktivnosti u sjemenoj plazmi nerasta skupine švedskoga landrasa, a koja je istodobno bila i najmanja srednja vrijednost među skupinama, iznosila je 4873 U/L. U nerasta njemačkoga landrasa zabilježena je najveća srednja vrijednost GGT-a među skupinama i iznosila je 14396 U/L. U nerasta je pasmine pietren srednja vrijednost GGT-a u sjemenoj plazmi iznosila 9821 U/L, a slična vrijednost od 10157 U/L zabilježena je u PIC-hibrida. Skupina velikoga jorkšira imala je manju aktivnost GGT-a od prethodno navedenih skupina, a vrijednost je iznosila 7050 U/L.

Tako su u ovom istraživanju, usporedbom dobivenih rezultata aktivnosti GGT-a, statistički značajna odstupanja utvrđena među skupinama švedskog i njemačkog landrasa. Pri tome je aktivnost GGT-a u sjemenoj plazmi njemačkoga landrasa bila značajno veća ($P<0,01$) nego u švedskoga landrasa. Usporedbom vrijednosti GGT-a u sjemenoj plazmi preostalih skupina nerasta, velikog jorkšira, pietrena i PIC-hibrida, nisu utvrđene statistički značajne razlike ($P>0,05$). GUTZMIRTL (2013.) je zabilježio značajne razlike među različitim linijama PIC-hibrida, a dobivene vrijednosti aktivnosti navedenog enzima bile su slične vrijednostima dobivenima u ovom istraživanju.

U ovom je istraživanju, najveću aktivnost u odnosu na ostale određivane enzime u sjemenoj plazmi nerasta imala ALP-a, a odmah nakon nje aktivnost GGT-a koja je također bila velika. Slobodni oblik GGT-a, u sjemenu, ima aktivnost 200 do 500 puta veću nego u serumu, a izlučuje se u lumen epididimisa (SELIGMAN i sur., 2005.). Aktivnosti enzima poput GGT-a i ALP-a odnose se na kakvoću sjemena i funkciju membrana te sudjeluju u različitim metaboličkim procesima tijekom dozrijevanja spermija (KUMAR i sur., 2000.; SELIGMAN i sur., 2005.; BUCCI i sur., 2014.). U ovom je istraživanju utvrđena najveća aktivnost ALP-a u sjemenoj plazmi nerasta švedskog landrasa, a najmanja u njemačkog landrasa, dok je pak najveća aktivnost GGT-a bila u njemačkog landrasa, a najmanja u švedskog landrasa. Dobiveni rezultati mogli bi ukazivati da spomenuti enzimi sudjeluju u očuvanju i zaštiti stanične membrane spermija, ali sa drukčijim mehanizmom djelovanja, te da se vjerojatno nadopunjuju. STEFANOV i sur. (2013.) su utvrdili korelaciju progresivne gibljivosti spermija sa smanjenjem aktivnosti LDH i GGT te smatraju da bi određivanje spomenutih enzima moglo pružiti dodatne informacije o reproduktivnom zdravlju i plodnosti

u nerasta. Slično, navode LÓPEZ RODRÍGUEZ i sur. (2013.) koji su dokazali pozitivnu korelaciju između aktivnosti GGT-a i ALP-a s progresivnom gibljivošću spermija. PESCH i sur. (2006.) smatraju da utvrđena korelacija između GGT-a i gibljivosti spermija može ukazivati na njegovu funkciju u zaštiti stanica od slobodnih radikala. Veliku aktivnost GGT-a u sjemenoj plazmi konja utvrdili su PESCH i sur. (2006.) te DOGAN i sur. (2009.), a veliku aktivnost ovoga enzima autori povezuju s dobrom kakvoćom sjemena.

U ovom se istraživanju aktivnost LDH u sjemenoj plazmi nerasta švedskoga landrasa ističe kao najmanja vrijednost među skupinama i prosječna je vrijednost iznosila 142,62 U/L. Vrijednost pak aktivnosti LDH u PIC-hibrida bila je 395,74 U/L te je ujedno bila i najveća srednja vrijednost. Malo manja vrijednost aktivnosti enzima LDH od skupine PIC-hibrida utvrđena je u njemačkoga landrasa te je uznosila 360,61 U/L. Još manju aktivnost LDH u sjemenoj plazmi od PIC-hibrida i njemačkoga landrasa imali su pietreni, i to 324,19 U/L. Skupina velikog jorkšira ističe se s manjom, ali ne i najmanjom aktivnosti LDH među skupinama, i iznosila je 183,48 U/L.

U ovom istraživanju utvrđene razlike među pasminama u aktivnosti LDH u sjemenoj plazmi, napose između švedskoga landrasa i PIC-hibrida, nisu bile statistički značajne ($P>0,05$). ASADPOUR-a (2012.) također nije utvrdio statistički značajne razlike u aktivnosti LDH u sjemenoj plazmi različitih pasmina ovnova.

Enzimi ALP, LDH te sorbitol dehidrogenaza nužni su za metaboličke procese koji osiguravaju energiju za preživljavanje, gibljivost i plodnost spermija. DIACONESCU i sur., (2014.) te PESCH i sur. (2006.) ustvrdili su korelaciju između aktivnosti LDH-a u sjemenoj plazmi konja sa gibljivosti, progresivnom gibljivosti i vitalnosti spermijima, što može ukazivati na to da izvanstanični LDH osigurava metabolizam spermija. Slobodni se oblik GGT izlučuje u tekućinu epididimisa te je višestruko veći od onog u serumu i sudjeluje u metabolizmu spermija, pa veća aktivnost upućuje na bolju kakvoću sjemena, a možda je sličnan mehanizam svojstven i LDH (SELIGMAN i sur., 2005.). DOGAN i sur. (2009.) su utvrdili negativnu korelaciju između volumena ejakulata i LDH te ALP u sjemenoj plazmi arapskih konja, što upućuje na podrijetlo LDH iz epididimisa koje su ustvrdili PONCE i sur. (2001.). Nadalje, PESCH i sur. (2006.) su izmjerili aktivnost LDH od 81,0 U/L u sjemenoj plazmi konja, što je višestruko manje od aktivnosti LDH koju smo izmjerili u sjemenoj plazmi nerasta u ovom istraživanju (142,62 - 395,74 U/L), dok su DOGAN i sur. (2009.) u sjemenoj plazmi arapskih konja utvrdili aktivnost LDH u rasponu od 787,50 do 810,06 U/L. ASADPOUR (2012.) je utvrdio značajne korelacije između aktivnosti LDH i preživljavanja spermija, tj. povećanja postotka živih i normalnih spermija bila je u korelaciji s povećanjem

LDH aktivnosti u sjemenoj plazmi ovnova. DUAN i GOLDBERG (2003.) smatraju da povećanje aktivnosti LDH u sjemenoj plazmi može biti pokazatelj oštećenja integriteta stanične membrane spermija, budući da je LDH unutarstanični enzim (MOORE i sur., 1976.). Dostupna literatura o spomenutoj tematici vrlo je oskudna, a oprečna su mišljenja o utjecaju veće aktivnosti LDH u sjemenoj tekućini na bolju ili lošiju kakvoću sjemena, pa je vrlo teško protumačiti dobivene rezultate. Nužno je stoga poduzeti detaljnija istraživanja u navedenom području. Skupina PIC-hibrida koja se u nekoliko važnih biokemijskih pokazatelja isticala s dobrim biokemijskim svojstvima sjemena, imala je i najveću aktivnost LDH, stoga smo skloniji mišljenju da veća LDH aktivnost ima pozitivan utjecaj na kakvoću sjemena.

U ovom je istraživanju aktivnosti CK u sjemenoj plazmi nerasta švedskog landrasa bila 6,47 U/L, a ujedno je to najmanja srednja vrijednost među nerastima svih istraživanih skupina. Skupina nerasta PIC-hibrida imala je najveću srednju vrijednost aktivnosti CK koja je iznosila 17,67 U/L. Skupina nerasta pasmine pietren imala je aktivnost CK od 12,58 U/L, što je manja vrijednost od one zabilježene u PIC-hibrida. Nerasti skupine njemačkog landrasa imali su aktivnost CK od 10,28 U/L, a slična je vrijednost zabilježena i u nerasta pasmine velikoga jorkšira, odnosno 10,09 U/L.

Usporedbom dobivenih vrijednosti razlike u aktivnosti CK u sjemenoj plazmi među skupinama nerasta nisu bile statistički značajne ($P>0,05$). U vrlo oskudnoj literaturi, i to u humanim istraživanjima, teško je razabrati da li je poželjna veća ili manja aktivnost CK u sjemenoj plazmi. Iako i dalje oskudna, istraživanja su više usmjerena na mjerenje CK aktivnosti u spermijima muškaraca, koja može biti pokazatelj kakvoće i zrelosti spermija u praćenju liječenja neplodnosti (HUSZAR i VIGUE, 1993.; HALLAK i sur., 2001.).

Poznato je da se CK nalazi u sjemenoj plazmi, gdje katalizira regeneraciju ATP-a nužnu za površinsku fosforilaciju spermija (LEE i sur., 1988.; TEIXEIRA i BORGES, 2012.). AL-JANABI i sur. (2012.) su u svojem istraživanju izmjerili aktivnost CK u sjemenoj plazmi astenospermičnih muškaraca, čija je srednja vrijednost iznosila 218,80 U/L. Malo veće vrijednosti izmjerili su ROLF i sur. (1998.) u sjemenoj plazmi plodnih muškaraca 276 U/L u odnosu na neplodne muškarce 140 U/L, ali razlike nisu bile značajne, dok su MIYAJI i sur. (2001.) u svom istraživanju navode srednju vrijednost aktivnosti CK u sjemenoj plazmi muškaraca od 661 U/L. U ovom istraživanju dobivene vrijednosti CK u sjemenoj plazmi nerasta višestruko su manje od onih iz dostupne literature, koja se odnose isključivo na humanu reprodukciju, moguće iz razloga jer je CK najvećim dijelom podrijetlom iz prostate, a muškarci imaju razvijeniju prostatu. KAVANAGH i DARBY (1983.) su u svojem istraživanju utvrdili da je podrijetlo CK u sjemenoj plazmi djelom iz prostate, ali i iz drugih

akcesornih spolnih žlijezda (GONZALEZ BUITRAGO i sur., 1980.). GONZALEZ BUITRAGO i sur. (1980.) su u sjemenoj plazmi plodnih muškaraca utvrdili srednju vrijednost CK od 333 U/L, dok su u dva slučaja muškaraca sa sekretornom azospermijom, nastalom uslijed kriptorhizma, utvrdili jako velike vrijednosti CK (2510 i 1280 IU/L) u sjemenoj plazmi, a u nekoliko muškaraca sa jakom oligoastenozoospermijom utvrđena je vrlo mala aktivnost CK. U ovom istraživanju najveću su aktivnost imali PIC-hibridi koji su u nekoliko biokemijskih pokazatelja dobre kakvoće sjemena imali najveće vrijednosti u sjemenoj plazmi, a ako se referiramo na podatke ROLFA i sur. (1998.) onda su veće vrijednosti aktivnosti CK povezane sa plodnošću. Nažalost zbog nedostupne literature dobivene rezultate teško je protumačiti. U humanoj reprodukciji ni velika ni mala aktivnost CK u sjemenoj plazmi muškaraca nije poželjna.

Sjemena plazma sadrži veliku koncentraciju elemenata u tragovima primjerice Ca, Mg, Cu, Zn i Se u vezanom i slobodnom obliku. Navedeni elementi u tragovima imaju vrlo značajnu funkciju i utječu na različite značajke sjemena, primjerice gibljivost spermija (SORENSEN i sur., 1999.; ABD-ALRAHMAN i ABDELLA, 2013.).

U sjemenoj su plazmi kationi Na, K, Ca i Mg važni u uspostavljanju osmotske ravnoteže, a osim toga esencijalni su elementi u tragovima sastavni dijelovi mnogih važnih enzima. Dakle, biokemijska je procjena sjemene plazme važan kriterij za procjenu plodnosti i dijagnostiku muških reproduktivnih poremećaja.

Rezultati ovog istraživanju ukazuju na značajni utjecaj pasmine na koncentraciju Ca u sjemenoj plazmi istraživanih nerasta. Srednja vrijednost koncentracije kalcija u sjemenoj plazmi nerasta najveća je bila u švedskog landrasa i iznosila je 1,33 mmol/L, a najmanja u njemačkog landrasa i iznosila je 0,73 mmol/L. Približno slične srednje vrijednosti koncentracije kalcija zabilježene su u pietrena (0,92 mmol/L), velikog jorkšira (0,95 mmol/L) te u PIC-hibrida (1,04 mmol/L).

U ovom istraživanju statističkom analizom utvrđene su značajne razlike srednjih vrijednosti koncentracije kalcija u sjemenoj plazmi među skupinama švedskog landrasa i njemačkog landrasa ($P<0,05$), gdje je skupina švedskog landrasa imala najveću vrijednost. U preostalih skupina nisu utvrđene statistički značajne razlike koncentracije kalcija u sjemenoj plazmi ($P>0,05$). MERT i sur. (2009.) su utvrdili promjene u koncentraciji kalcija i cinka te ostalih minerala u sjemenoj plazmi s obzirom na različite pasmine ovnova i razlike u godišnjem dobu (ljeto - jesen), dok ASADPOUR (2012.) nije utvrdio značajne razlike u koncentraciji Ca u sjemnoj plazmi različitih pasmina ovnova. Niti ÇEVİK i sur. (2007.) nisu utvrdili značajne razlike koncentracije Ca u sjemenoj plazmi različitih pasmina bikova, ali su

utvrdili značajno veću koncentraciju Ca u sjemenoj plazmi normozoospermičnih naspram oligoastenozoospermičnih bikova, a raspon dobivene koncentracije Ca bio je od 1,59 do 1,70 mmol/L (28,53 - 30,64 mg/dL). Ni, rezultati GUTZMIRTLA (2013.) nisu u suglasju sa ovim istraživanjem, jer među nerastima različitih linija PIC-hibrida nisu utvrđene statistički značajnu razlike u koncentraciji Ca u sjemenoj plazmi, ali su vrijednosti koncentracije Ca u sjemenoj plazmi spomenutih nerasta bile slične onima dobivenim u sjemenoj plazmi nerasta u ovom istraživanju.

Odavno je poznato da je izvanstanični kalcij potreban za uspješnu oplodnju. Dokazano je da Ca, točnije Ca^{2+}, nužan u održanju značajki spermija, kao što su: održivost, gibljivost, progresivna gibljivost, kapacitacija i akrosomska reakcija (HONG i sur., 1984.). Spermijima su za održavanje normalne gibljivosti neophodni unutarstanični Ca^{2+} kao i kalcij iz sjemene plazme, uz brojne druge čimbenike, primjerice bjelančevine iz sjemene plazme (PRIEN, 1991.). BREITBART (2003.) te WITTE i SCHÄFER-SOMI (2007.) također naglašavaju značaj kalcija, kolesterola, bikarbonata i progesterona u indukciji kapacitacije i akrosomske reakcije u spermijima sisavaca. Muškarci sa smanjenom gibljivošću spermija imaju smanjenu koncentraciju Ca^{2+} u sjemenoj plazmi u odnosu na muškarce s normalnom gibljivošću spermija (PRIEN, 1991.; LOGOGLU i sur., 1997.; HAMAD i sur., 2014.). PESCH i sur. (2006.) su u sjemenoj plazmi pastuha utvrdili srednju vrijednost koncentracije ukupnog kalcija od 2,9 mmol/L, dok je ASADPOUR (2012.) izmjerio u sjemenoj plazmi ovnova koncentraciji Ca u rasponu od 0,55 - 0,62 mmol/L (9,95 - 11,20 mg/L), a ÇEVİK i sur. (2007.) u sjemenoj plazmi bikova koncentraciju Ca od 1,59 do 1,70 mmol/L. U ovom istraživanju u sjemenoj plazmi nerasta izmjerena je koncentracija Ca u rasponu od 0,73 - 1,33 mmol/L. Najveću koncentraciju Ca u sjemenoj plazmi imali su pastusi, zatim bikovi, pa nerasti, a najmanju ovnovi. U daljnjem bi istraživanju trebalo utvrditi fiziološki raspon koncentracije Ca u sjemenoj plazmi nerasta kako bi koncentracija Ca uz ostale biokemijske pokazatelje mogla poslužiti kao pokazatelj kakvoće sjemena.

U ovom je istraživanju najveću vrijednost koncentracije magnezija od 19,78 mmol/L u sjemenoj plazmi, imala skupina švedskog landrasa, a najmanju srednju vrijednost od 14,91 mmol/L imala je pasmina nerasta njemačkog landrasa. Među preostalim promatranim skupinama uočljiva je sličnost prosječnih vrijednosti koncentracija magnezija u sjemenoj plazmi te one u skupini pietrena iznose 15,90 mmol/L, PIC-hibrida 16,24 mmol/L i velikog jorkšira 16,68 mmol/L.

U ovom se istraživanju prosječne vrijednosti koncentracije magnezija u sjemenoj plazmi razlikuju među skupinama, napose među skupinama švedskog i njemačkog landrasa,

ali te razlike nisu bile statistički značajne (P>0,05). Rezultati su GUTZMIRTLA (2013.) u suglasju su s našima, te nije utvrđena statistički značajna razlika u koncentraciji Mg u sjemenoj plazmi nerasta različitih linija PIC-hibrida. Srednje su vrijednosti koncentracije Mg u sjemenoj plazmi nerasta u ovom istraživanju bile u rasponu od 14,91 do 19,78 mmol/L, dok su srednje vrijednosti u istraživanju GUTZMIRTLA (2013.) bile u rasponu od 6,26 do 6,75 mmol/L. ÇEVIKA i sur. (2007.) također nisu ustvrdili značajne razlike u koncentraciji Mg između bikova pasmina holstein i smeđeg švicarskog goveda.

Mg je značajan kation koji se nalazi u gotovo svim enzimskim sustavima, a ima i funkciju u spermatogenezi te u gibljivosti spermija (SORENSEN i sur., 1999.; WONG i sur., 2001.; ÇEVIK i sur., 2007.; ABD-ALRAHMAN i ABDELLA, 2013.). Prema WONGU i sur. (2001.), Mg se smatra pokazateljem stanja sekreta sjemenih vezikula. U istraživanju ÇEVIKA i sur. (2007.) skupina bikova s oligospermijom imala je značajno manju koncentraciju Mg u odnosu na bikove sa normospermijom. Slično je nađeno i u muškaraca u kojih je koncentracija kalcija i magnezija u sjemenoj plazmi bila značajno veća u skupini plodnih muškaraca u odnosu na skupinu neplodnih muškaraca (WONGU i sur. 2001.; BASSEY i sur., 2013.).

Veća koncentracija Mg i Se u sjemenoj plazmi nerasta povezana je s manjim stupnjem oštećenja stanične membrane spermija i manjim brojem spermija s proksimalnom citoplazmatskom retencijom (LÓPEZ RODRÍGUEZ i sur., 2013.). Nerasti s dobrom kakvoćom sjemena ima li su veću koncentraciju Mg u sjemenoj plazmi od onih sa lošom kakvoćom. Značajno je veća koncentracija Mg u sjemenoj plazmi nerasta s dobrom kakvoćom sjemena bila krajem ljeta, a manja početkom ljeta (LÓPEZ RODRÍGUEZ i sur., 2013.). U ovom istraživanju nerasti pasmine švedski landras imali su najveću koncentraciju Mg kao i Ca u sjemenoj plazmi, dok su nerasti pasmine njemački landras imali najmanju, što bi moglo ukazivati na bolju kakvoću sjemena nerasta švedskog landrasa u odnosu na neraste njemačkog landrasa.

U ovom istraživanju prosječne vrijednosti koncentracije cinka u sjemenoj plazmi nerasta neznatno su se razlikovale (veliki jorkšir 107,22 mmol/L, švedski landras 106,62 mmol/L, PIC-hibrid 106,04mmol/L i njemački landras 105,71 mmol/L). Najveće razlike koncentracije cinka u sjemenoj plazmi u odnosu na navedene skupine, zabilježene su u pasmini pietren, gdje je koncentracija cinka iznosila 102,68 mmol/L, što je ujedno bila i najniža srednja vrijednost među skupinama.

Nakon statističke obrade podataka srednjih vrijednosti koncentracije cinka u sjemenoj plazmi različitih pasmina nerasta i PIC-hibrida nisu utvrđene statistički značajne razlike

(P>0,05). LÓPEZ RODRÍGUEZ i sur. (2013.) su u sjemenoj plazmi nerasta dobre kakvoće sjemena izmjerili koncentraciju Zn u rasponu od 46,64 - 59,72 mmol/L (1690,4 - 2164,6 μg/dL), što je manje od koncentracije Zn koja je utvrđena u ovom istraživanju.

Zn je mikronutrijent, koji ima važnu funkciju u fiziologiji spermija, u proizvodnji i/ili održivosti spermija u prevenciji razgradnje te stabilizaciji stanične membrane spermija. Nadalje, ima funkciju i u stabilizaciji kromatina u jezgre spermija, gibljivosti spermija, a djeluje i antioksidativno (LIPENSKÝ i sur., 2014.). Minerali kao što su cink i selen (strukturna komponenta superoksid dismutaze odnosno glutation peroksidaze), povezani su s kakvoćom sjemena u muškaraca, zbog njihovih antioksidativnih svojstava (BEDWAL i BAHUGUNA, 1994.; CHIA i sur., 2000.; POWELL, 2000.; RODRÍGUEZ i sur., 2013.).

LÓPEZ RODRÍGUEZ i sur. (2013.) navode negativnu korelaciju koncentracije Zn u sjemenoj plazmi nerasta s udjelom spermija s abnormalnim repom. Vrlo je vjerojatno da Zn utječe na kvalitetu sperme na različite načine, ali ga je teško povezati s jednim pokazateljem. Uočena je značajno različita koncentracija Zn u sjemenoj plazmi u uzorcima koji su prikupljeni na početku ljeta u odnosu na one prikupljene krajem ljeta. Veća koncentracija cinka izmjerena je u sjemenoj plazmi nerasta s boljom kvalitetom sjemena u odnosu na one sa lošijom.

U ovom su istraživanju utvrđene podjednake vrijednosti koncentracije Zn u sjemenoj plazmi među skupinama istraživanih nerasta, izuzev pasmine pietren koja je imala najmanju koncentraciju Zn, ali i najmanju aktivnost TSOD u sjemenoj plazmi. Cink je pak strukturna komponenta CuZnSOD, koja čini većinu vrijednosti TSOD-a, pa dobiveni rezultati potvrđuju da su nerasti pietrena imali lošiju antioksidativnu zaštitu sjemena plazme u odnosu na ostale skupine nerasta.

6.3. POKAZATELJI ANTIOKSIDACIJSKE ZAŠTITE

Oksidacijski je stres, odnosno prekomjerno stvaranje ROS-a u ejakulatu, jedan od najučestalijih uzroka neplodnosti u mužjaka. Stoga je u normalnim, fiziološkim uvjetima za preživljavanje i normalnu funkciju spermija, neophodna osjetljiva ravnoteža između stvaranja i uklanjanja slobodnih radikala (SHINDE i sur., 2012.). Antioksidansi su tvari koje štite stanice od oštećenja uzrokovanih slobodnim radikalima. Interferencijom antioksidansi stabiliziraju slobodne radikale te tako priječe neželjene učinke slobodnih radikala (SHINDE i sur., 2012.).

U normalnim fiziološkim funkcijama, postoji dinamička interakcija između prooksidativnih i antioksidativnih tvari u ejakulatu. Prekomjerno stvaranje reaktivnih kisikovih spojeva može nadvladati zaštitni antioksidacijski mehanizam i u dvosloju stanične membrane spermija, inicirati promjene u lipidima i/ili bjelančevinama te izazvati promjene u DNK-a, što smanjuje gibljivost i preživljavanje spermija (AITKEN i sur., 1995.). Kako bi se zaštitili od negativnih učinaka ROS-a, spermiji i sjemena plazma imaju nekoliko mehanizama kojima neutraliziraju slobodne radikale, a oni uključuju enzimske i neenzimske antioksidativne sustave koji djeluju sinergijski kako bi spriječili štetne učinke nusproizvoda aerobnog metabolizma (OGBUEWU i sur., 2010.). Ejakulat sisavaca (prvenstveno sjemena tekućina) sadrži mnoge spojeve s neenzimskim antioksidativnim djelovanjem (primjerice askorbinsku kiselinu, α-tokoferol, taurin i albumine) (ALVAREZ i STOREY, 1983.). Međutim, i antioksidativni enzimi imaju značajniju funkciju u zaštiti spermija od reaktivnih kisikovih spojeva (OGBUEWU i sur., 2010.).

Rezultati ovog istraživanju ukazuju na značajan utjecaj pasmine na koncentraciju TAS-a u sjemenoj plazmi istraživanih nerasta. Koncentracija TAS-a u sjemenoj plazmi nerasta bila je najveću među skupinama u PIC-hibrida i iznosila je 1,85 mmol/L, a najmanju je vršnu vrijednost koncentracije TAS-a u sjemenoj plazmi nerasta imala skupina pietrena i to 1,31 mmol/L. Neznatno različite vrijednosti koncentracije TAS-a u sjemenoj plazmi zabilježene su u nerasta pasmine njemački landras (1,39 mmol/L) i nerasta skupine švedski landras (1,40 mmol/L). Približno sličnu, ali veću vrijednost od nalaza u ovih potonjih skupina nerasta imala je pasmina nerasta veliki jorkšir u koje je koncentracija TAS-a u sjemenoj plazmi iznosila 1,50 mmol/L.

Usporedbom vrijednosti koncentracije TAS-a u sjemenoj plazmi nerasta različitih pasmina i PIC-hibrida te statističkom obradom podataka, utvrđene su statistički značajno veće koncentracije u skupini PIC-hibrida u odnosu na pasminu pietren ($P<0,05$). Istodobno, koncentracija TAS-a u sjemenoj plazmi PIC-hibrida bila je veća od one u njemačkog landrasa, a te su razlike bile blizu statističke značajnosti ($P\leq0,05$).

Različite se životinjske vrste razlikuju u antioksidativnoj obrani od oksidativnog oštećenja u spermijima i u sjemenoj plazmi (STRZEZEK i sur., 1999.; KOWALOWKA i sur., 2008.). Dobiveni rezultati ovog istraživanju ukazuju da se i unutar iste životinjske vrste, različite pasmine te PIC-hibrid i međusobno razlikuju u antioksidativnoj zaštiti.

Koncentracija je TAS-a u sjemenoj plazmi i reproduktivnim tekućinama pod utjecajem antioksidativnog sustava, a sastoji se od SOD, CAT, GSH-Px, GSH i GSSG, koji štite spermije od lipidne peroksidacije (KOZIOROWSKA-GILUN i sur., 2011a.). Isti su autori

ustvrdili manju koncentraciju TAS-a u sjemenoj plazmi nerasta u razdoblju proljeće - ljeto (521,0 μM = 0,521 mmol/L) u odnosu na razdoblje jesen - zima (640,2 μM = 0,6402 mmol/L), no, razlike nisu bile statistički značajne. Uzorci sjemena u ovom istraživanju uzeti su u jesen, a koncentracija TAS-a u sjemenoj plazmi istraživanih skupina nerasta bila je veća od one u navedenom istraživanja, pa čak i od one u jesenskom razdoblju, te je bila u rasponu od 1,31 do 1,85 mmol/L.

STRZEZEK i sur. (2009.) pak navode da je koncentracija TAS-a u sjemenoj plazmi nerasta iznosila 0,6 mM (mmol/L), dok je u pastuha iznosila 2,09 mM, a obje su bile veće od one u pasa 0,46 mM. YENI i sur. (2010) su utvrdili da se TAS u sjemenoj plazmi ovnova nije značajno razlikovao u različitim godišnjim razdobljima, što je u suglasju s istraživanjem KOZIOROWSKA-GILUN i sur. (2011a.), te je bio u rasponu od 11,1 do 11,28 mmol/L. TAS u sjemenoj plazmi neplodnih muškaraca bio je značajno manji (2,15 U/L) od onoga u plodnih muškaraca (2,32 U/L), dok su neplodni muškarci imali veću koncentraciju ROS-a u sjemenoj plazmi (FINGEROVA i sur., 2007.). Slične su rezultate dobili VERIT i sur. (2009.) koji su ustvrdili veći ukupni oksidativni status, a manji TAS u sjemenoj plazmi neplodnih prema plodnim muškaracima. Nadalje, AM-IN i sur. (2011.) su utvrdili značajno veću koncentraciju TAS-a u sjemenoj plazmi nerasta s normalnim postotkom gibljivih spermija prema onima s manjim udjelom gibljivih spermija te pozitivnu korelaciju TAS-a s gibljivosti, održivosti, normalnom morfologijom i intaktnom staničnom membranom spermija.

STRZEZEK i sur. (1999.) su utvrdili povezanost ukupnih bjelančevina s TAS-om u sjemenoj plazmi nerasta. Slično je zamijećeno i u ovom istraživanju, gdje su PIC-hibridi mali najveću koncentraciju ukupnih bjelančevina kao i TAS-a u sjemenoj plazmi u odnosu na ostale skupine nerasta. Navedeno upućuje da je poželjna veća koncentracija TAS-a u sjemenoj plazmi te da su spermiji PIC-hibrida bili bolje zaštićeni od lipidne peroksidacije.

Prvu liniju obrane od štetnih učinaka ROS-a u reproduktivnom sustavu nerasta čine SOD, CAT i GSH-Px (STRZEZEK i sur., 1999.; SIKKA, 2004.; VERNET i sur., 2004.; KOWALOWKA i sur., 2008.; KOZIOROWSKA-GILUN i sur., 2011b.).

GSH-Px katalizira reakciju redukcije vodikovog peroksida ili organskih hidroperoksida u vodu i odgovarajući alkohol, uz oksidaciju reduciranog glutationa, koji je donor vodika. Tako je jedna od najvažnijih funkcija GSH-Px-a održavanje ravnoteže između ROS-a i antioksidansa, odnosno uključena je u uravnoteženje (balansiranje) homeostaze H_2O_2 u signalnim kaskadama (ZHANG i sur., 2012.; BRIGELIUS-FLOHÉ i MAIORINO, 2013.).

U ovom istraživanju srednja vrijednost aktivnosti GSH-Px u sjemenoj plazmi nerasta skupine PIC-hibrida od 262,00 U/L bila je ujedno i najviša vrijednost među istraživanim

skupinama. Suprotno tomu, u skupini nerasta pasmine pietren zabilježena je najmanja vrijednost i to 158,83 U/L. Promatramo li poredbeno pasminu švedskog landrasa čija je vrijednost GSH-Px iznosi 216,80 U/L i njemačkog landrasa s vrijednosti od 231,83 U/L, uočljiva je sličnost aktivnosti GSH-Px u sjemenoj plazmi. Malo manja vrijednost GSH-Px izmjerena je u sjemenoj plazmi nerasta pasmine veliki jorkšir i iznosila je 194,20 U/L.

Usporedbom rezultata, utvrđeno je da su se prosječne vrijednosti aktivnosti GSH-Px u sjemenoj plazmi nerasta razlikovale među skupinama, a napose među skupinama PIC-hibrida i pietrena, ali te razlike nisu bile statistički značajne ($P>0,05$).

Značaj GSH-Px-a u zaštiti spermija od prekomjerne količine ROS-a tijekom prolaska kroz epididimis, kao i nakon ejakulacije, očituje se u nekoliko važnih izoformi GSH-Px prisutnih na različitim lokacijama muškoga spolnog sustava (OKAMURA i sur., 1997.; URSINI i sur., 1999.; REJRAJI i sur., 2002.; BRIGELIUS-FLOHÉ i MAIORINO, 2013.).

KOZIOROWSKA-GILUN i sur. (2011a.) nisu utvrdili značajne razlike u aktivnosti GSH-Px tijekom godišnih doba u sjemenoj plazmi nerasta, u razdoblju proljeće - ljeto prosječna je aktivnost GSH-Px bila 0,23 U/mL, a u razdoblju jesen - zima 0,18 U/mL, što je višestruko manje od vrijednosti koje su dobivene u ovom istraživanju. JELEZARSKY i sur. (2008.) utvrdili su tri puta veću aktivnost GSH-Px u sjemenoj plazmi nerasta u odnosu na aktivnost u spermijima, što ukazuje na značaj sjemene plazme u izvanstaničnoj zaštiti spermija protiv lipine peroksidacije. GIANNATTASIO i sur. (2002.) su pak utvrdili desetak puta veću aktivnost GSH-Px u sjemenoj plazmi plodnih muškaraca u odnosu na neplodne. Veća aktivnost GSH-Px u sjemenoj plazmi pruža bolju izvanstaničnu antioksidativnu zaštitu spermija. U ovom su istraživanju PIC-hibridi imali najveću aktivnost GSH-Px u sjemenoj plazmi stoga spermiji PIC-hibridi imaju bolju izvanstaničnu antioksidativnu zaštitu, a nerasti iz skupine pietren najlošiju.

Jedan od najučinkovitijih unutarstaničnih enzimskih antioksidansa je superoksid dismutaza, koji katalizira dismutaciju superoksidnog radikala u kisik i u manje reaktivni vodikov peroksid. Peroksidi mogu biti razgrađeni reakcijom katalaze ili glutation peroksidaze. Superoksid dismutaza je antioksidativni enzim koji izravno djeluje na inhibiciju lipidne peroksidacije spermija (ALVAREZ i sur., 1987.).

U ovom istraživanju srednja vrijednost TSOD-a u sjemenoj plazmi nerasta pasmine veliki jorkšir od 0,20 U/mL bila je ujedno i najviša vrijednost u istraživanih skupina. Približno slične vrijednosti TSOD-a zabilježene su u sjemenoj plazmi nerasta švedskog i njemačkog landrasa te PIC-hibrida, gdje su vrijednosti u švedskog landrasa iznosile 0,19 U/mL, u

njemačkog landrasa 0,19 U/mL te PIC-hibrida 0,19 U/mL. Nerasti pasmine pietrena imaju najmanju aktivnost TSOD u sjemenoj plazmi među skupinama, i ona je iznosila 0,16 U/mL.

Nakon statističke obrade podataka srednjih vrijednosti aktivnosti TSOD-a u sjemenoj plazmi različitih pasmina nerasta i PIC-hibrida nisu utvrđene statistički značajne razlike među skupinama ($P>0,05$).

U dostupnoj literaturi nema istraživanja o utjecaju pasmine, odnosno hibrida na antioksidativni status u sjemenoj plazmi i spermijima, kako ni za nerasta tako niti za druge životinjske vrste, stoga rezultate ovog istraživanja nije moguće usporediti. Vrijednosti aktivnosti SOD-a u sjemenoj plazmi nerasta ovog istraživanja bile su višestruko manje u odnosu na rezultate STRZEŻEK i sur. (2004.), koji su u sjemenoj plazmi istraživanih nerasta utvrdili srednju vrijednost aktivnosti SOD-a od 96,63 U/cm^3 (U/mL) (KOWALOWKA i sur., 2008.). Jednako su tako KOZIOROWSKA-GILUN i sur. (2011a.) dobili veće vrijednosti SOD-a u sjemenoj plazmi istraživanih nerasta od onih u ovom istraživanju, ali manje od onih koje su dobili STRZEŻEK i sur. (2004.). Isti autori su utvrdili da je aktivnost SOD-a značajno veća u razdoblju proljeće - ljeto (39,4 U/mL) u odnosu na razbolje jesen - zima (29,8 U/mL).

Izuzev velike aktivnosti SOD-a u sjemenoj plazmi nerasta, enzimi iz skupine glutation peroksidaza nalaze se u ograničenim količinama. Smatra se da specifična antioksidativna svojstva bjelančevina sjemene plazme te prisustvo velike aktivnosti SOD-a u sjemenu nerasta nadoknađuju nedostatak antioksidansa male molekulske mase (KOWALOWKA i sur., 2008.; ZAKOŠEK PIPAN i sur., 2014.). Istraživanje KOWALOWKA i sur. (2008.) ukazuje na važnost zaštite SH-skupine katalitičkom aktivnošću SOD-a koja je prisutna u sjemenoj plazmi nerasta. SOD je najznačajniji antioksidans u sjemenoj plazmi nerasta te ima najveći kapacitet u uklanjanju slobodnih radikala, a razina aktivnosti SOD-a u sjemenoj plazmi oscilira tijekom godišnjih doba, te je znatno veća u proljeće i jesen, vjerojatno zbog razlika u pasmini, starosti nerasta ili individualnim varijacijama među nerastima (KOWALOWKA i sur., 2008.; KOZIOROWSKA-GILUN i sur., 2011a.).

Rezultati ovog istraživanja nisu u suglasju s navodima KOWALOWKA i sur. (2008.) te KOZIOROWSKA-GILUN i sur. (2011a.) koji navode da je aktivnost SOD-a u sjemenoj plazmi nerasta velika, a aktivnost GSH-Px mala. Naime, u ovom je istraživanju utvrđena velika GSH-Px aktivnost, a mala SOD aktivnost u sjemenoj plazmi istraživanih nerasta, i to višestruko u donosu na SOD. U ovom istraživanju aktivnosti SOD-a u sjemenoj plazmi istraživanih nerasta bila je podjednaka u svim skupinama, izuzev skupine pietrena koji su imali najmanju aktivnost SOD-a.

Smanjenje antioksidativnog kapaciteta u sjemenoj plazmi povezano je s pojačanom lipidnom peroksidacijom u membrani spermija, što rezultira oštećenjem oplodne sposobnost spermija. U ovom istraživanju najbolja sveukupna antioksidativna zaštita u sjemenoj plazmi utvrđena je u PIC-hibrida, a najmanja u pietrena. Nerasti skupine PIC-hibrida imali su i značajno veću koncentraciju ukupnog kolesterola, LDL-kolesterola, triacilglicerola u sjemenoj plazmi, a njihova je veća koncentracija povezana s dobrom kakvoćom sjemena te uspješnijom pohranom i očuvanjem sjemena. Najveće vrijednosti sveukupnih antioksidativnih pokazatelja u sjemenoj plazmi PIC-hibrida omogućavaju odgovarajuću zaštitu od lipidne peroksidacije svih navedenih lipida u sjemenoj plazmi te lipida u staničnoj membrani spermija.

Spermiji nerasta, u fosfolipidima stanične membrane, sadrže velike količine višestruko nezasićenih masnih kiselina te imaju relativno mali antioksidativni kapacitet, što ih čini, vrlo osjetljivima na oksidativna oštećenja (SANOCKA i KURPISZ, 2004.; KOWALOWKA i sur., 2008.). Oksidativni se status u stanici održava enzimskim i neenzimskim antioksidansima uz osiguravanje optimalne količine ROS-a koja je neophodna za fiziološku funkciju spermija. Antioksidansi su smješteni uglavnom u središnjem dijelu spermija, području oskudnom citoplazmom, te u tekućinama akcesornih spolnih žlijezda. Oskudni volumen citoplazme u središnjem dijelu spermija, ograničava i antioksidacijski kapacitet, stoga postoje ograničeni endogeni mehanizmi spermija koji nastoje poništiti nastala oštećenja. Izuzev navedenog, antioksidativni enzimi koji se nalaze u središnjem dijelu spermija ne mogu osigurati zaštitu membranskih lipida u glavi i repu spermija od peroksidativnog oštećenja (AITKEN, 1995.; KOWALOWKA i sur., 2008.). Spermiji ovise i o izvanstaničnoj antioksidativnoj zaštiti, koja je u interakciji s biokemijskim sastojcima sjemene plazme (KOWALOWKA i sur., 2008.; ZAKOŠEK PIPAN i sur., 2014.).

Rezultati ovog istraživanju ukazuju na značajni utjecaj pasmine na koncentraciju TAS-a u ispranih spermija istraživanih skupina nerasta. Najviša srednja vrijednost koncentracije TAS-a u ispranih spermija zabilježena je u nerasta švedskoga landrasa od 0,39 mmol/g bjelančevina, a najmanja vrijednost u nerasta PIC-hibrida od 0,18 mmol/g bjelančevina. Približno istovjetna vrijednost koncentracije TAS-a utvrđena je u nerasta skupine veliki jorkšir od 0,24 mmol/g bjelančevina i nerasta skupine njemački landras od 0,25 mmol/g bjelančevina. Malo veća vrijednost koncentracije TAS-a u odnosu na ove skupine nerasta zabilježena je u nerasta pasmine pietren i iznosila je 0,28 mmol/g bjelančevina.

Usporedbom vrijednosti koncentracije TAS-a u ispranih spermija nerasta različitih pasmina i PIC-hibrida statističkom su obradom podataka utvrđene statistički značajne razlike,

i pri tome su vrijednosti u skupini švedskog landrasa bile značajno veće u odnosu na skupine PIC-hibrida (P<0,01). Premda se i u ostalim skupinama koncentracija TAS-a u ispranih spermija nerasta razlikovala te razlike nisu bile statistički značajne (P>0,05).

Prisutnost i koncentracija antioksidansa u spermijima razlikuje se među životinjskim vrstama (STRZEZEK i sur., 2009.), a rezultati ovog istraživanja upućuju da postoje značajne razlike i unutar iste životinjske vrste ovisno o pasmini.

U ovom istraživanju utvrđena je značajna pozitivna korelacija TAS-a u spermijima s GSH-Px-om u spermijima (r = 0,942; P < 0,0001), SOD-om (r = 0,97192; P < 0,0001), CuZnSOD-om (r = 0,93478; P < 0,0001), te značajno negativna korelacija s TAS-om u sjemenoj plazmi (r = -0,58486; P = 0,0014). Dobivene pozitivne korelacije mogu se protumačiti rezultatima ovog istraživanja prema kojima su svi navedeni antioksidativni pokazatelji najveći u pasmine švedskog landrasa, a najmanji u PIC-hibrida. Dobivenu negativnu korelaciju TAS-a u spermijima s onom u sjemenoj plazmi mogu se protumačiti dobiveni rezultati, prema kojima nerasti PIC-hibrida imaju značajno najveću koncentraciju TAS-a u sjemenoj plazmi, a značajno najmanju koncentraciju TAS-a u spermijima.

Rezultati ovog istraživanju ukazuju na značajni utjecaj pasmine na aktivnosti GSH-Px u ispranih spermija istraživanih nerasta. Prosječna vrijednost aktivnosti GSH-Px u ispranih spermija nerasta pasmine švedski landras od 70,61 U/g bjelančevina bila je ujedno i najviša vrijednost, a najmanja vrijednost zabilježena je u nerasta skupine PIC-hibrida i iznosila je 24,51 U/g bjelančevina. Aktivnost GSH-Px u sjemenoj plazmi ostalih pasmina nerasta neznatno se razlikovala te je u njemačkog landrasa iznosila 42,78 U/g bjelančevina, u velikog jorkšira 43,54 U/g bjelančevina i u pietrena 44,43 U/g bjelančevina.

Uočene razlike najviših vrijednosti GSH-Px u ispranih spermija među skupinama švedskog landrasa i PIC-hibrida potvrđene su i statističkom analizom na razini značajnosti od P<0,001, a pri tome je skupina švedskog landrasa imala s najvišu vrijednosti. U ostalih skupina aktivnost GSH-Px u ispranih spermija bila je značajno veća u PIC-hibrida u odnosu na pietrena (P<0,05), dok su razlike između PIC-hibrida i njemačkog landrasa te velikog jorkšira bile na granici statističke značajnosti (P≤0,05).

Spermiji pastuha iznimno su dobro zaštićeni od oštećenja prouzročenih ROS-om u usporedbi sa spermijima nerasta, koji imaju ograničen antioksidacijski sustav u usporedbi s drugim životinjskim vrstama (STRZEZEK i sur., 1999.; KOWALOWKA i sur., 2008.; STRZEZEK i sur., 2009.). Jednako je tako, i enzimski antioksidativni zaštitni sustav od ROS-a u spermijima nerasta vrlo oskudan za razliku od mužjaka drugih vrsta, te ga čine velika aktivnost SOD-a i mala aktivnost GSH-Px. Katalaza nije nađena u spermijima nerasta i pasa

(STRZEZEK i sur., 2009.; KOZIOROWSKA-GILUN i sur., 2011b.). JELEZARSKY i sur. (2008.) su utvrdili prosječnu aktivnost GSH-Px u spermijima nerasta od 1,89 U/g bjelančevina, dok je u ovom istraživanju ona bila višestruko veća. Nadalje, isti autori utvrdili su višestruko veću aktivnost GSH-Px u sjemenoj plazmi nerasta prema dobivenoj GSH-Px aktivnosti u spermijima, što je sukladno sa ovim istraživanjem. Slično ovom istraživanju STRZEZEK i sur. (2009.) su u spermijima pasa ustvrdili malu aktivnost ukupne GSH-Px i fosfolipidne hidroperoksidne glutation peroksidaze (PHGSH-Px). Dok su MAJIĆ-BALIĆ i sur. (2012.) u spermijima bikova ustvrdili višestruko veću aktivnost GSH-Px u odnosu na aktivnost GSH-Px dobivenu u spermijima nerasta ovog istraživanja, što potvrđuje rezultate koje su ranije dobili STRZEZEK i sur. (1999.), KOWALOWKA i sur. (2008.), STRZEZEK i sur. (2009.).

U ovom je istraživanju najveća vrijednost aktivnosti TSOD-a u ispranih spermija izmjerena u nerasta švedskoga landrasa i iznosila je 1950,98 U/g bjelančevina, a najmanja vrijednost izmjerena je u ispranih spermija nerasta PIC-hibrida i iznosila je 619,60 U/g bjelančevina. Približno slične vrijednosti aktivnosti TSOD-a u ispranih spermija zabilježene su u skupinama velikog jorkšira, njemačkog landrasa i pietrena, te su u velikog jorkšira iznosile 1066,16 U/g bjelančevina, u njemačkog landrasa 1120,78 U/g bjelančevina i u pietrena 1191,00 U/g bjelančevina.

Usporedbom vrijednosti aktivnosti TSOD-a u ispranih spermija nerasta različitih pasmina i u PIC-hibrida statističkom obradom podataka utvrđene su statistički značajne razlike. Tako je aktivnost TSOD u ispranih spermija PIC-hibrida bila značajno manja u odnosu na švedskog landrasa ($P<0,001$) i pietrena ($P<0,05$).

Spermiji pastuha za razliku od nerasta imaju kompletni enzimski obrambeni sustav protiv ROS-a (SOD, CAT, GSH-Px), dok u pasa spermiji i spermalna frakcija ejakulata sadrže uglavnom SOD (STRZEZEK i sur., 2009.). S obzirom da spermiji nerasta imaju slabu enzimsku antioksidativnu zaštitu, taj nedostatak je nadoknađen antioksidansima male molekulske mase, i to s GSH i ERT. Navedeni su antioksidansi male molekulske mase u spermijima pastuha prisutni u znatno većoj koncentraciji nego u nerasta (STRZEZEK i sur., 2009.). U ovom istraživanju višestruko veća aktivnost SOD-a u donosu na aktivnost GSH-Px-a dobivena je u spermijima nerasta što je u skladu sa rezultatima STRZEZEK i sur. (2009.). Slične su rezultate utvrdili KOZIOROWSKA-GILUN i sur. (2011b.), koji su u spermijima iz repa epididimisa dobili veliku aktivnost SOD-a te malu aktivnost PHGSH-Px. U ovom istraživanju utvrđena je velika aktivnost SOD-a u spermijima nerasta, dok je u sjemenoj plazmi nerasta utvrđena mala aktivnost SOD-a. Suprotno navedenom, mala je aktivnost GSH-

Px-a utvrđena u spermijima nerasta, a velika je aktivnost GSH-Px-a utvrđena u sjemenoj plazmi nerasta. Rezultati dobiveni u ovom istraživanju upućuju na uzajamno nadopunjavanje dvaju navedenih antioksidativnih enzima, koji djeluju sinergijski u uklanjanju prekomjerne koncentracije ROS-a.

U ovom istraživanju prosječna vrijednost aktivnosti MnSOD-a u ispranim spermijima nerasta pasmine pietren bila je 270,25 U/g bjelančevina, a ujedno je to najviša vrijednost među skupinama, a najmanja vrijednost zabilježena je u skupini nerasta PIC-hibrida gdje je bila 158,13 U/g bjelančevina. Najsličnije vrijednosti aktivnosti MnSOD-a u ispranim spermijima utvrđene su u nerasta skupine njemačkoga landrasa od 197,68 U/g bjelančevina i u nerasta švedskoga landrasa od 213,47 U/g bjelančevina. Nešto malo veću aktivnost MnSOD-a od švedskoga landrasa imala je skupina velikoga jorkšira, a aktivnost je u ispranim spermijima iznosila 234,17 U/g.

Unutarstanična aktivnost MnSOD i CuZnSOD ovisi o tkivu i o životinjskoj vrsti, dok MnSOD ovisi i o broju mitohondrija u nekom tkivu. U središnjem su dijelu repa spermija mitohondriji, u kojima se stvara energija za gibljivost spermija. Mitohondriji čine primarno mjesto proizvodnje superoksida tijekom procesa staničnog disanja uslijed „bijega“ elektrona u lancu oksidativne fosforilacije (HALLIWELL i GUTTERIDGE, 2007.). Stoga je MnSOD najznačajniji enzim u uklanjanju superoksida unutar mitohondrijskog matriksa i smatra se ključnim enzimom koji deaktivira i detoksicira ROS u stanici pa tako i u spermijima, a nužan je za preživljavanje organizma i proizvodnju ATP-a u okruženju bogatom kisikom (ZHU i sur., 2012.). Od sve tri izoforme SOD-a, MnSOD je jedina neophodna za opstanak aerobnih organizama (CARLIOZ i TOUATI, 1986.; TODOROVIĆ, 2013.).

U ovom istraživanju najveća je aktivnost MnSOD-a u spermijima nerasta utvrđena u pasmine pietren, koji su ujedno imali i najveću gibljivost spermija među istraživanim pasminama i PIC-hibrida. Dobiveni rezultati upućuju da veća MnSOD aktivnost unutar mitohondrija spermija pruža bolju antioksidativnu unutarstaničnu zaštitu te bolju gibljivost spermija.

Usporedbom rezultata utvrđeno je da se prosječne vrijednosti aktivnosti MnSOD-a u ispranim spermijima nerasta nisu značajnije razlikovale među skupinama ($P>0,05$).

U ovom istraživanju najveća srednja vrijednost CuZnSOD među skupinama zabilježena je u švedskoga landrasa i iznosila je 1731,69 U/g bjelančevina u ispranim spermijima, a najmanja srednja vrijednost utvrđena je u skupini PIC-hibrida i bila je 457,95 U/g bjelančevina. Neznatna odstupanja u aktivnosti CuZnSOD-a zabilježena su u skupinama nerasta pietren gdje su vrijednosti iznosile 818,58 U/g bjelančevina i u velikoga jorkšira gdje

su iznosile 824,79 U/g bjelančevina u ispranim spermijima. Nerasti pasmine njemačkoga landrasa imali su aktivnost CuZnSOD-a u ispranim spermijima od 987,90 U/g bjelančevina, odnosno veću nego prethodno navedene skupine nerasta.

Uočene razlike srednjih vrijednosti aktivnosti CuZnSOD u ispranim spermijima među skupinama švedskog landrasa i PIC-hibrida utvrđene su i statističkom analizom na razini značajnosti od $P<0,001$, gdje je skupina švedskog landrasa imala najvišu vrijednost. Nadalje, aktivnost CuZnSOD u ispranim spermijima skupine švedskog landrasa bila je značajno veća od one u velikog jorkšira ($P<0,05$), te u ispranim spermijima njemačkog landrasa u odnosu na PIC-hibrida ($P<0,05$).

Bakar-cink dismutaza lokalizirana je u citosolu, ali je prisutna i u lizosomima, jezgri i u prostoru između unutarnje i vanjske membrane mitohondrija te u peroksisomima (OKADO-MATSUMOTO i FRIDOVICH, 2001.). CuZnSOD specifično katalizira dismutaciju superoksidnog aniona u kisik i vodikov peroksid. PEEKER i sur. (1997.) su utvrdili veliku aktivnost CuZnSOD te malu aktivnost MnSOD u spermijima muškaraca. Rezultati dobiveni u ovom istraživanju u suglasju su s navedenim autorima, pa je tako utvrđena velika aktivnost CuZnSOD te mala aktivnost MnSOD u spermijima nerasta. Obzirom na nedostatne podatke u literaturi potrebna su daljnja istraživanja u tom području.

Nerasti pasmine švedskoga landrasa imali su najveću aktivnost CuZnSOD-a kao i antioksidativnih pokazatelja TAS, GSH-Px, TSOD u spermijima, što upućuje na najbolju unutarstaničnu antioksidativnu zaštitu spermija spomenute pasmine. Nerasti PIC-hibrida imali su najmanju vrijednost svih antioksidativnih pokazatelja u spermijima, koja je kompenzirana najboljom sveukupnom antioksidativnom zaštitom u sjemenoj plazmi.

Najmanje vrijednosti svih pokazatelja antioksidacijskoga statusa u spermijima velike gibljivosti imali su nerasti pasmine velikog jorkšira, dok su nerasti pasmine švedskoga landrasa imali najveću vrijednost TAS-a, GSH-Px i CuZnSOD-a, a nerasti PIC-hibrida imali su najveće vrijenosti TSOD-a i MnSOD-a. Dobiveni rezultati ukazuju na bolju unutarstaničnu antioksidativnu zaštitu spermija velike gibljivosti pasmine švedskoga landrasa u odnosu na ostale skupine nerasta.

Najmanje su vrijednosti TAS-a u spermijima vrlo male gibljivosti imali nerasti pasmine njemačkog landrasa, GSH-Px nerasti pietrena, a TSOD nerasti pasmine švedski landras, dok su najveću vrijednost TAS-a i TSOD-a u spermijima vrlo male gibljivosti imali PIC-hibridi, a najveću GSH-Px nerasti pasmine švedski landras.

Najmanje su vrijednosti pokazatelja antioksidacijskoga statusa u patoloških oblika spermija imali nerasti pasmine pietren, dok su najveće vrijednosti TAS-a i GSH-Px-a u

patoloških oblika spermija imali nerasti velikog jorkšira, a vrijednost za TSOD bila je najveća u nerasta šveskog lanrasa.

Poremećaj ravnoteže između stvaranja i eliminacije ROS-a uzrokuje oksidacijski stres, a može nastati kao posljedica povećanog stvaranja oksidansa i/ili smanjene antioksidacijske zaštite. U nekim patološkim stanjima, primjerice u upalama reproduktivnoga sustava, aktivirani leukociti, ali i preteče zametnih stanica i/ili morfološki abnormalni spermiji prekomjerno stvaraju ROS, što dovodi do oksidacijskog stresa spermija u ejakulatu. Međutim, prekomjerne količine ROS-a mogu poremetiti strukturu i funkciju stanične membrane spermija (AITKEN, 1995.) i uzrokovati oštećenja lipidnog matriksa, koja su pak povezana s apoptozom te smanjenom gibljivosti spermija, smanjujući pri tome broj spermija i kakvoću sjemena (CHATTERJEE i GAGNON, 2001.; KOWALOWKA i sur., 2008.; KUMARESAN i sur, 2009.; ZAKOŠEK PIPAN i sur., 2014.). Suvišak citoplazme, u nezrelim spermijima, sadrži enzime koji potiču dodatno stvaranje ROS-a koji pak uzrokoju lipidnu peroksidaciju membrane spermija što može rezultirati neplodnošću (ALVAREZ i sur., 1987.; DE LAMIRANDE i GAGNON, 1995.; AITKEN i SAWYER, 2003.).

Neprimjereno male količine ROS-a jednako tako mogu rezultirati neplodnošću ometajući fiziološku funkciju ROS-a u regulaciji funkcije spermija. ROS se fiziološki stvaraju tijekom staničnog metabolizma. Male koncentracije ROS-a imaju pozitivan učinak i djeluju selektivno (DE LAMIRANDE i sur., 1997.). Male količine slobodnih radikala u ejakulatu poboljšavaju sposobnost vezivanja spermija za zona pellucidu, nadalje inkubacija spermija s malim koncentracijama vodikovog peroksida stimulira kapacitaciju spermija, hiperaktivaciju, akrosomsku reakciju i fuziju oocita (AITKEN i sur., 1989.; DE LAMIRANDE i GAGNON, 1993.; AITKEN i sur., 1995.; GRIVEAU i LE LANNOU, 1997.; FORD, 2004.; SANOCKA i KURPISZ, 2004.).

Koncentracija TAS-a te aktivnost TSOD-a i GSH-Px-a u ovom istraživanju bila je značajno veća ($P<0,001$) u patoloških oblika spermija u odnosu na spermije velike i vrlo male gibljivosti. Najniže vrijednosti TAS-a te TSOD-a i GSH-PX-a utvrđene su u spermijima vrlo male gibljivosti prema ostalim frakcijama spermija ($P<0,001$).

Isprani spermiji obuhvaćaju sve navedene frakcije i koriste se u umjetnom osjemenjivanju krmača. U ispranih su spermija svi istraživani antioksidacijski pokazatelji bili značajno veći od onih u spermija vrlo male gibljivosti, te značajno manji od onih u spermijima velike gibljivosti i u patoloških oblika spermija. Dobiveni rezultati ukazuju na smanjenu antioksidacijsku zaštitu spermija vrlo male gibljivosti u odnosu na spermije velike gibljivosti. BEER-LJUBIĆ i sur. (2012.) su u frakciji spermija bikova sa malom gibljivosti

utvrdili veću koncentraciju lipidnih peroksida u donosu na frakciju spermija velike gibljivosti. Značajno veće vrijednosti TAS-a te TSOD-a i GSH-Px-a u patoloških oblika spermija mogle bi ukazivati na pojačan antioksidativni obrambeni odgovor uslijed pojačanog stvaranja ROS-a u dotičnoj frakciji spermija. Dobivena frakcija spermija patoloških oblika sadrži morfološki abnormalne spermije, spermije s citoplazmatskom kapljicom, spermije odvojenih glava i repova, za koje je poznato da stvaraju prekomjernu količinu ROS-a što može rezultirati neplodnošću (ALVAREZ i sur., 1987.; DE LAMIRANDE i GAGNON, 1995.; AITKEN i SAWYER, 2003.). Slične rezultate dobili su AITKEN i sur. (1996.) koji su u Percoll frakciji velike gustoće sa spermijima velike gibljivosti utvrdili značajno manju aktivnost SOD-a te značajno manju koncentraciju lipidnih peroksida naspram Percoll frakcije male gustoće u kojoj su bili spermiji male gibljivosti, spermiji s citoplazmatskom kapljicom, morfološki abnormalni spermiji, leukociti i preteče zametnih stanica. Frakcija spermija velike gibljivosti i normalne morfologije ima primjenu u potpomognutoj oplodnji i embriotransferu, a rezultati antioksidacijskih pokazatelja i njihova usporedba među dobivenim frakcijama spermija može pomoći u objašnjenju uzroka neplodnosti.

7. ZAKLJUČCI

Rezultati istraživanja biokemijskih i antioksidativnih pokazatelja u sjemenoj plazmi te pokazatelja antioksidativne zaštite u spermijima rasplodnih nerasta različitih pasmina omogućuju sljedeće zaključke glede kakvoće sjemena nerasta:

1. Rezultati ovog istraživanju ukazuju na značajan utjecaj pasmine i hibrida na gustoću ejakulata, koncentraciju ukupnog kolesterola, LDL-kolesterola, triacilglicerola, kalcija, TAS-a, te aktivnost GGT-a u sjemenoj plazmi istraživanih nerasta.
2. Budući da su u ovom istraživanju nerasti PIC-hibrida imali najmanji volumen uz najveću koncentraciju spermija, a nerasti su pasmine njemački landras imali najveći volumen uz najmanju koncentraciju spermija, dobiveni rezultati ukazuju da manji volumen ejakulata može biti kompenziran većom koncentracijom spermija.
3. Određivanje biokemijskih pokazatelja u sjemenoj plazmi, napose masnih tvari omogućuje bolju procjenu kakvoće sjemena, a veća koncentracija rečenih masnih tvari omogućuje uspješniju pohranu i očuvanje sjemena. Kako su nerasti u ovom istraživanju imali male vrijednosti masnih tvari i ukupnih bjelančevina u sjemenoj plazmi dobiveni rezultati upućuju da je mala koncentracija masnih tvari i ukupnih bjelančevina u sjemenoj plazmi nerasta mogući uzrok slabije pohrane i očuvanja spermija po smrzavanju.
4. U ovom istraživanju najbolja sveukupna antioksidativna zaštita u sjemenoj plazmi utvrđena je u PIC-hibrida. Nerasti su PIC-hibrida istodobno imali i značajno veću koncentraciju ukupnog kolesterola, LDL-kolesterola, triacilglicerola u sjemenoj plazmi, a kojih je veća koncentracija povezana s dobrom kakvoćom sjemena te uspješnijom pohranom i očuvanjem sjemena. Dobiveni rezultati upućuju da nerasti PIC-hibrida imaju bolju mogućnost smrzavanja i čuvanja sjemena te bolju antioksidativnu zaštitu lipida od lipidne peroksidacije u sjemenoj plazmi te lipida u staničnoj membrani spermija u odnosu na ostale istraživane skupine nerasta.
5. Najmanja sveukupna antioksidativna zaštita u sjemenoj plazmi utvrđena je u nerasta pasmine pietren. Osim najmanjih vrijednosti TAS-a, GSH-Px-a i TSOD-a u pietrena je utvrđena i najmanja vrijednost koncentracije Zn u sjemenoj plazmi. S obzirom da je Zn strukturna komponenta Cu,ZnSOD-a, koji čini većinu vrijednosti TSOD-a, rezultati upućuju da nerasti pasmine pietren imaju slabiju antioksidativnu zaštitu lipida i bjelančevina od oksidativnih oštećenja u sjemenoj plazmi te u staničnim membranama spermija. Nadalje, kako je smanjena antioksidativna zaštita u sjemenoj

plazmi povezana s pojačanom lipidnom peroksidacijom u membrani spermija, dobiveni rezultati ukazuju da bi nerasti pasmine pietren mogli imati smanjenu oplodnu sposobnost spermija.

6. Vrijednosti istraživanih antioksidativnih pokazatelja u ispranim spermijima ovisile su o pasmini i hibridu. Nerasti su pasmine švedskoga landrasa imali najveću aktivnost TSOD-a, CuZnSOD-a, TAS-a i GSH-Px-a u spermijima što upućuje na najbolju unutarstaničnu antioksidativnu zaštitu spermija navedene pasmine. Nasuprot tome, nerasti su PIC-hibrida imali najmanje vrijednosti svih antioksidativnih pokazatelja u ispranim spermijima, a koja je kompenzirana najboljom sveukupnom antioksidativnom zaštitom u sjemenoj plazmi. Nadalje, u ovom je istraživanju utvrđena najveća aktivnost MnSOD-a u ispranim spermijima nerasta pasmine pietren, koji su ujedno imali i najveću gibljivost spermija među istraživanim pasminama i PIC-hibridima. Dobiveni rezultati upućuju da veća MnSOD aktivnost unutar mitohondrija spermija pruža bolju antioksidativnu zaštitu od nastalog ROS-a te utječe na bolju gibljivost spermija.
7. Rezultati ovog istraživanju ukazuju na značajan utjecaj pasmine i hibrida na pokazatelje antioksidativnog sustava u spermija vrlo male gibljivosti i to na koncentraciju TAS-a te aktivnost TSOD, a ne utječu na aktivnosti GSH-Px. Nasuprot tome, prema dobivenim rezultatima pasmina i hibrid ne utječu značajno na pokazatelje antioksidativnog sustava u patoloških oblika spermija i spermija velike gibljivosti (TAS, GSH-Px, TSOD i CuZnSOD), izuzev MnSOD-a.
8. Dobivene vrijednosti istraživanih antioksidativnih pokazatelja u spermijima velike gibljivosti svih nerasta uključenih u ovo istraživanje bile su značajno veće od onih u spermijima vrlo male gibljivosti. Stoga dobiveni rezultati ukazuju na smanjenu antioksidativnu zaštitu spermija s vrlo malom gibljivosti u odnosu na spermije velike gibljivosti. Budući da frakcija spermija velike gibljivosti i normalne morfologije ima primjenu u potpomognutoj oplodnji i embriotransferu, dobiveni rezultati antioksidativnih pokazatelja i njihova usporedba među dobivenim frakcijama spermija može pomoći u objašnjenju uzroka neplodnosti.

   Značajno veće vrijednosti TAS-a, SOD-a i GSH-Px-a utvrđene u patoloških oblika spermija svih nerasta uključenih u ovo istraživanje mogle bi ukazivati na pojačan antioksidativni obrambeni odgovor uslijed pojačanog stvaranja ROS-a u navedenoj frakciji spermija, te bi u narednim istraživanjima bilo uputno određivati i pokazatelje oksidacijskog stresa.

9. U ovom istraživanju utvrđena je velika aktivnost SOD-a u spermijima nerasta, a mala u sjemenoj plazmi. Suprotno navedenom, mala aktivnost GSH-Px-a utvrđena je u spermijima, a velika u sjemenoj plazmi nerasta. Rezultati dobiveni u ovom istraživanju upućuju na uzajamno nadopunjavanje dvaju navedenih antioksidativnih enzima u sjemenoj plazmi i spermijima, koji djeluju sinergijski u uklanjanju prekomjerne koncentracije ROS-a, a što potkrjepljuju i rezultati negativne korelacije TAS-a u spermijima sa onom u sjemenoj plazmi.
10. Rezultati ovog istraživanju ukazuju da postoje razlike među pasminama i PIC-hibridima u biokemijskim pokazateljima sjemene plazme i antioksidativnoj zaštiti spermija i sjemene plazme. Iako ni jedna pasmina nije imala najveće vrijednosti svih istraživanih pkazatelja, nerasti su PIC-hibrida i švedskog landrasa imali više pokazatelja dobre kakvoće sjemena i antioksidativne zaštite, dok su nerasti pietrena i njemačkog landrasa češće imali najmanje vrijednosti navedenih pokazatelja.

Rezultati će istraživanja, zasigurno imati i praktičnu primjenjivost osobito u boljoj mogućnosti smrzavanja sjemena PIC-hibrida. U budućim će se istraživanjima nastojati provjeriti dobivene rezultate te prilagoditi analitičke postupke.

8. POPIS LITERATURE

ABD-ALRAHMAN, D. A., A. M. ABDELLA (2013): Evaluation of seminal zinc, magnesium and calcium levels in infertile sudanese male with asthenozoospermia. Lab. Med. J. 1, 9 - 14.

ABDEL AZIZ, M. T., S. EL-HAGGAR, G. A. TAWADROUS, T. HAMADA, M. A. SHAWKY, K. S. AMIN (1983): Seminal lipids as energy substrate for the spermatozoa. Andrologia 15, 259 - 263.

AEBI, H. (1984): Catalase in vitro. Methods enzymol. 105, 121 - 126.

AGARWAL, A., A. RAMADAN, M. D. SALEH, M. A. BEDAIWY (2003): Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. Fertil. Steril. 4, 829 - 843.

AGRAWAL, Y. P., T. VANHA-PERTTULA (1988): Gamma-glutamyl transpeptidase, glutathione, and L-glutamic acid in the rat epididymis during postnatal development. Biol. Reprod. 38, 996 - 1000.

AITKEN, R. J., D. BUCKINGHAM, K. WEST, F. C. WU, K. ZIKOPOULOS, D. W. RICHARDSON (1992): Differential contribution of leukocytes and spermatozoa to the generation of reactive oxygen species in the ejaculates of oligozoospermic patients and fertile donors. J. Reprod. Fertil. 94, 451 - 462.

AITKEN, R. J., D. SAWYER (2003): The human spermatozoon - not waving but drowning. Adv. Exp. Med. Biol. 518, 85 - 98.

AITKEN, R. J., D. W. BUCKINGHAM, A. CARRERAS, D. S. IRVINE (1996): Superoxide dismutase in human sperm suspensions: relationship with cellular composition, oxidative stress, and sperm function. Free Radical Bio. Med. 21, 495 - 504.

AITKEN, R. J., D. W. BUCKINGHAM, J. BRINDLE, E. GOMEZ, H. W. G. BAKER, D. S. IRVINE (1995): Andrology: Analysis of sperm movement in relation to the oxidative stress created by leukocytes in washed sperm preparations and seminal plasma. Hum. Reprod. 10, 2061 - 2071.

AITKEN, R. J., J. S. CLARKSON (1987): Cellular basis of defective sperm function and its association with the genesis of reactive oxygen species by human spermatozoa. J. Reprod. Fertil. 81, 459 - 469.

AITKEN, R. J., J. S. CLARKSON, S. FISHEL (1989): Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation and human sperm function. Biol. Reprod. 41, 183 - 197.

AITKEN, R. J., K. WEST, D. W. BUCKINGHAM (1994): Leukocytic infiltration into the human ejaculate and its association with semen quality, oxidative stress and sperm function. J. Androl. 15, 343 - 352.

AKERBOOM, T. P. M., M. BILIZER, H. SIES (1982): The relationship of biliary GSSG efflux and intracellular GSSG content in perfused rat liver. J. Biol. Chem. 257, 4248 - 4252.

ALANI, G. T., H. D. EL YASEEN (2009): Creatine kinase activity and malondialdehyde in the seminal plasma of normospermic infertile males. J. Fac. Med. Baghdad. 51, 336 - 340.

AL-JANABI, A. S., F. A. AL-MEHDAWI, M. Q. AL-LAMI (2012): Relationship of seminal biochemical parameters and serum reproductive hormones with sperm function tests in asthenospermic patients. J. Med. J. 46, 97 - 107.

ALVAREZ, J. G., B. T. STOREY (1983): Taurine, hypotaurine, epinephrine and albumin inhibit lipid peroxidation in rabbit spermatozoa and protect against loss of motility. Biol. Reprod. 29, 548 - 555.

ALVAREZ, J. G., J. C. TOUCHSTONE, L. BLASCO, B. T. STOREY (1987): Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human

spermatozoa Superoxide dismutase as major enzyme protectant against oxygen toxicity. J. Androl. 8, 338 - 348.
AM-IN, N., R. N. KIRKWOOD, M. TECHAKUMPHU, W. TANTASUPARUK (2011): Lipid profiles of sperm and seminal plasma from boars having normal or low sperm motility. Theriogenology 75, 897 - 903.
ANTUNES, F., D. HAN., E. CADENAS (2002): Relative contributions of heart mitochondria glutathione peroxidase and catalase to H(2)O(2) detoxification in in vivo conditions. Free Radical Bio. Med. 33, 1260 - 1267.
ARGOV, N., D. SKLAN, Y. ZERON, Z. ROTH (2007): Association between seasonal changes in fatty-acid composition, expression of VLDL receptor and bovine sperm quality. Theriogenology 67, 878 - 885.
ARTS, E., J. KUIKEN, S. JAGER, D. HOEKSTRA (1993): Fusion of artificial membranes with mammalian spermatozoa. Specific involvement of the equatorial segment after acrosome reaction. Eur. J. Biochem. 217, 1001 - 1009.
ASADPOUR, R. (2012): Relationship between Mineral Composition of Seminal Plasma and Semen Quality in Various Ram Breeds. Acta. Sci. Vet. 40, 1027 - 1035.
ASAYAMA, K., I. M. BURR (1985): Rat superoxide dismutases. Purification, labeling, immunoassay, and tissue concentration. J. Biol. Chem. 260, 2212 - 2217.
ATIG, F., M. RAFFA, B.-A. HABIB, A. KERKENI, A. SAAD, M. AJINA (2012): Impact of seminal trace element and glutathione levels on semen quality of Tunisian infertile men. BMC Urol. 12, 2 - 8.
AVELDANO, M. I., N. P. ROTSTEIN, N. T. VERMOUTH (1992): Lipid remodeling during epididymal maturation of rat spermatozoa. Enrichment in plasmenylcholines containing long-chain polyenoic fatty acids of the n-9 series. Biochem. J. 283, 235 - 241.
AVISSAR, N., D. B. ORNT, Y. YAGIL, S. HOROWITZ, R. H. WATKINS, E. A. KERL, K. TAKAHASHI, I. S. PALMER, H. J. COHEN (1994): Human kidney proximal tubules are the main source of plasma glutathione peroxidase. Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 266, C367 - C375.
AVISSAR, N., J. N. FINKELSTEIN, S. HOROWITZ, J. C. WILLEY, E. COY, M. W. FRAMPTON, R. H. WATKINS, P. KHULLAR, Y. L. XU, H. J. COHEN (1996): Extracellular glutathione peroxidase in human lung epithelial lining fluid and in lung cells. Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol. 270, L173 - L182.
AVISSAR, N., J. R. SLEMMON, I. S. PALMER, H. J. COHEN (1991): Partial sequence of human plasma glutathione peroxidase and immunologic identification of milk glutathione peroxidase as the plasma enzyme. J. Nutr. 121, 1243 - 1249.
AWASTHI, Y. C., E. BEUTLER, S. K. SRIVASTAVA (1975): Purification and properties of human erythrocyte glutathione peroxidase. J. Biol. Chem. 250, 5144 - 5149.
AWDA, B. J., M. MACKENZIE-BELL, M. M. BUHR (2009): Reactive oxygen species and boar sperm function. Biol. Reprod. 81, 553 - 561.
BAILEY, J. L., C. LESSARD, J. JACQUES, C. BRÈQUE, I. DOBRINSKI, W. ZENG, H. L. GALANTINO-HOMER (2008): Cryopreservation of boar semen and its future importance to the industry. Theriogenology 70, 1251 - 1259.
BAO, Y., P. JEMTHB, B. MANNERVIKB, G. WILLIAMSON (1997): Reduction of thymine hydroperoxide by phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase and glutathione transferases. FEBS Lett. 410, 210 - 212.
BARHOUMI, R., J. A. BOWEN, L. S. STEIN, J. ECHOLS, R. C. BURGHARDT (1993): Concurrent analysis of intracellular glutathione content and gap junctional intercellular communication. Cytometry 14, 747 - 756.
BARONOS, S. (1971): Seminal carbohydrate in boar and stallion. J. Reprod. Fert. 24, 303 - 305.

BARRIOS, B., R. PEREZ-PE, M. GALLEGO, A. TATO, J. OSADA, T. MUINO-BLANCO, J. A. CEBRIAN-PEREZ (2000): Seminal plasma proteins revert the cold-shock damage on ram sperm membrane. Biol. Reprod. 63, 1531 - 1537.

BASSEY, I. E., O. E. ESSIEN, A. E. UDOH, I. U. IMO, I. O. EFFIONG (2013): Seminal plasma selenium, calcium, magnesium and zinc levels in infertile men. J. Med. Sci. 13, 483 - 487.

BEDWAL, R. S., A. BAHUGUNA (1994): Zinc, copper and selenium in reproduction. Experientia 50, 626 - 640.

BEER-LJUBIĆ, B., J. ALADROVIĆ, T. S. MARENJAK, I. MAJIĆ-BALIĆ, R. LAŠKAJ, S. MILINKOVIĆ-TUR (2012): Biochemical properties of bull spermatozoa separated in iodixanol density solution. Res. Vet. Sci. 92, 292 - 294.

BEER-LJUBIĆ, B., J. ALADROVIĆ, T. S. MARENJAK, R. LAŠKAJ, I. MAJIĆ-BALIĆ, S. MILINKOVIĆ-TUR (2009): Cholesterol concentration in seminal plasma as a predictive tool for quality semen evaluation. Theriogenology 72, 1132 - 1140.

BELL, J. D., P. E. LAKE (1962): A comparison of phosphomonoesterase activities in the seminal plasmas of domestic cock, turkey tom, boar, bull, buck, rabbit and of man. J. Reprod. Fertil. 3, 363 - 368.

BERLETT, B. S., E. R. STADTMAN (1997): Protein Oxidation in Aging, Disease, and Oxidative Stress. J. Biol. Chem. 272, 20313 - 20316.

BJÖRNSTEDT, M., J. XUE, W. HUANG, B. AKESSON, A. HOLMGREN (1994): The thioredoxin and glutaredoxin systems are efficient electron donors to human plasma glutathione peroxidase. J. Biol. Chem. 269, 29382 - 29384.

BLANCO, A., C. BURGOS, N. M. GEREZ DE BURGOS, E. E. MONTAMAT (1976): Properties of fhe testicular lactate dehydrogenase isoenzyme. Biochem. J. 153, 165 - 172.

BRAUN, J. P., P. BENARD, V. BURGAT, A. G. RICO (1983): Gamma glutamyl transferase in domestic animals. Vet. Res. Commun. 6, 77 - 90.

BREITBART, H. (2003): Signaling pathways in sperm capacitation and acrosome reaction. Cell. Mol. Biol. 49, 321 - 327.

BREITBART, H., B. SPUNGIN (1997): The biochemistry of the acrosome reaction. Mol. Hum. Reprod. 3, 195 - 202.

BRIGELIUS-FLOHÉ, R. (1999): Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. Free Radical Bio. Med. 27, 951 - 965.

BRIGELIUS-FLOHÉ, R., A. KIPP (2009): Glutathione peroxidases in different stages of carcinogenesis. Biochim. Biophys. Acta 1790, 1555 - 1568.

BRIGELIUS-FLOHÉ, R., M. MAIORINO (2013): Glutathione peroxidases. Biochim. Biophys. Acta 1830, 3289 - 3303.

BRINI, M., D. OTTOLINI, T. CALÌ, E. CARAFOLI (2013): Calcium in Health and Disease. In: Interrelations between Essential Metal Ions and Human Diseases. (Sigel, A., H. Sigel, R. K. O. Sigel, Eds.), Springer, Dorrecht, Heidelberg, New York, London, pp. 81 - 137.

BROEKHUIJSE, M. L. W. J., H. FEITSMA, B. A. GADELLA (2011): Field data analysis of boar semen quality. Reprod. Dom. Anim. 46, 59 - 63.

BRÜSSOW, K. P., J. RATKY, H. RORIGUEZ-MARTINEZ (2008): Fertilization and early embryonic development in the porcine fallopian tube. Reprod. Domest. Anim. 43, 245 - 251.

BUCCI, D., G. ISANI, E. GIARETTA, M. SPINACI, C. TAMANINI, E. FERLIZZA, G. GALEATI (2014): Alkaline phosphatase in boar sperm function. Andrology 2, 100 - 106.

BUONOCORE, G., PERRONE S., M. L. TATARANNO (2010): Oxygen toxicity: chemistry and biology of reactive oxygen species. Semin. Fetal. Neonatal. Med. 15, 186 - 190.

BURK, R. F., G. E. OLSON, V. P. WINFREY, K. E. HILL, D. YIN (2011): Glutathione peroxidase-3 produced by the kidney binds to a population of basement membranes in the

gastrointestinal tract and in other tissues. Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 301, G32 - G38.
CAMPBELL, J. R., M. D. KENEALYAND, K. L. CAMPBELL (2003): Anatomy and physiology of reproduction and related technologies in farm mammals. In: Animal Sciences. The Biology, Care and Production of Domestic Animals. (Campbell, J. R., M. D. Kenealyand, K. L. Campbell, Eds.), McGraw-Hill Companies Inc., New York, pp. 219 - 240.
CARLIOZ, A., D. TOUATI (1986): Isolation of superoxide dismutase mutants in Escherichia coli: is superoxide dismutase necessary for aerobic life? EMBO J. 5, 623 - 630.
CASTELLINI, C. (2008): Semen production and management of rabbit bucks. Proceedings of the 9th World Rabbit Congress, 10 - 13 June, Verona, Italy, pp. 1 - 14.
CATALÁ, A. (2006): An overview of lipid peroxidation with emphasis in outer segmentsof photoreceptors and the chemiluminescence assay. Int. J. Biochem. Cell B. 38, 1482 - 1495.
CATALÁ, A. (2009): Lipid peroxidation of membrane phospholipids generates hydroxy-alkenals andoxidized phospholipids active in physiological and/or pathological conditions. Chem. Phys. Lipids 157, 1 - 11.
CATALÁ, A. (2010): A synopsis of the process of lipid peroxidation since the discoveryof the essential fatty acids. Biochem. Biophys. Res. Comm. 399, 318 - 323.
CERGOLJ, M., M. SAMARDŽIJA (2006): Veterinarska andrologija. Veterinarski fakultet. Zagreb.
CEROLINI, S., A. MALDJIAN, F. PIZZI, T. M. GLIOZZI (2001): Changes in sperm quality and lipid composition during cryopreservation of boar semen. Reproduction 121, 395 - 401.
ÇEVIK, M., P. B. TUNCER, U. TASDEMIR, T. ÖZGÜRTAS (2007): Comparison of spermatological characteristics and biochemical seminal plasma parameters of normozoospermic and oligoasthenozoospermic bulls of two breeds. Turk. J. Vet. Anim. Sci. 31, 381 - 387.
CHABORY, E., C. DAMON, A. LENOIR, G. KAUSELMANN, H. KERN, B. ZEVNIK, C. GARREL, F. SAEZ, R. CADET, J. HENRY-BERGER, M. SCHOOR, U. GOTTWALD, U. HABENICHT, J. R. DREVET, P. VERNET (2009): Epididymis seleno-independent glutathione peroxidase 5 maintains sperm DNA integrity in mice. J. Clin. Invest. 119, 2074 - 2085.
CHABORY, E., C. DAMON, A. LENOR, J. HENRY-BERGER, P. VERNET, R. CADET, F. SAEZ, J. R. DREVET (2010): Mammalian glutathione peroxidases control acquisition and maintenance of spermatozoa integrity. J. Anim. Sci. 88, 1321 - 1331.
CHAMBERS, I., J. FRAMPTON, P. GOLDFARB, N. AFFARA, W. MCBAIN, P. R. HARRISON (1986): The structure of the mouse glutathione peroxidase gene: the selenocysteine in the active site is encoded by the 'termination' codon, TGA. EMBO J. 5, 1221 - 1227.
CHAN, S., B. GERSON, S. SUBRAMANIAM (1998): The role of copper, molybdenum, selenium, and zinc in nutrition and health. Clin. Lab. Med. 18, 673 - 685.
CHANCE, B., H. SIES, A. BOVERIS (1979): Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. Physiol. Rev. 59, 527 - 605.
CHATTERJEE, S., C. GAGNON (2001): Production of reactive oxygen species by spermatozoa undergoing cooling, freezing and thawing. Mol. Reprod. Dev. 59, 451 - 458.
CHAUDIERE, J., E. C. WILHELMSEN, A. L. TAPPEL (1984): Mechanism of selenium-glutathione peroxidase and its inhibition by mercaptocarboxylic acids and other mercaptans. J. Biol. Chem. 259, 1043 - 1050.

CHENG, W. H., Y. S. HO, B. A. VALENTINE, D. A. ROSS, G. F. COMBS JR., X. G. LEI (1998): Cellular glutathione peroxidase is the mediator of body selenium to protect against paraquat lethality in transgenic mice. J. Nutr. 128, 1070 - 1076.
CHIA, S. E., C. N. ONG, L. H. CHUA, L. M. HO, S. K. TAY (2000): Comparison of zinc concentrations in blood and seminal plasma and the various sperm parameters between fertile and infertile men. J. Androl. 21, 53 - 57.
CHU, F. F., J. H. DOROSHOW, R. S. ESWORTHY (1993): Expression, characterization, and tissue distribution of a newcellular selenium-dependent glutathione peroxidase, GSHPx-GI. J. Biol. Chem. 268, 2571 - 2576.
CHU, F. F., S. R. ESWORTHY (1995): The Expression of an Intestinal Form of Glutathione Peroxidase (GSHPx-GI) in Rat Intestinal Epithelium. Arch. Biochem. Biophys. 323, 288 - 294.
CIERESZKO, A., J. S. OTTOBRE, J. GLOGOWSKI (2000): Effects of season and breed on sperm acrosin activity and semen quality of boars. Anim. Reprod. Sci. 64, 89 - 96.
CLEMENTS, K. M., C. F. SHIPLEY, D. A. COLEMAN, E. J. EHRHART, W. M. HASCHEK, S. G. CLARK (2010): Azoospermia in an 8-month-old boar due to bilateral obstruction at the testis/epididymis interface. Can. Vet. J. 51, 1130 - 1134.
COLAGAR, A. H., E. T. MARZONY, M. J. CHAICHI (2009): Zinc levels in seminal plasma are associated with sperm quality in fertile and infertile men. Nutr. Res. 29, 82 - 88.
CONRAD, M., S. G. MORENO, F. SINOWATZ, F. URSINI, S. KOLLE, A. ROVERI, M. BRIELMEIER, W. WURST, M. MAIORINO, G. W. BORNKAMM (2005): The nuclear form of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase is a protein thiol peroxidase contributing to sperm chromatin stability. Mol. Cell. Biol. 25, 7637 - 7644.
COOKE, M. S., M. D. EVANS, M. DIZDAROGLU, J. LUNEC (2003): Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation and disease. FASEB J. 17, 1195 - 1214.
CROSS, N. L. (1996): Human seminal plasma prevents sperm from becoming acrosomally responsive to the agonist progesterone: cholesterol is the major inhibitor. Biol. Reprod. 54, 138 - 145.
CROSS, N. L. (1998): Role of cholesterol in sperm capacitation. Biol. Reprod. 59, 7 - 11.
CROSS, N. L. (2000): Sphingomyelin modulates capacitation of human sperm in vitro. Biol. Reprod. 63, 1129 - 1134.
CROSS, N. L. (2003): Decrease in order of human sperm lipids during capacitation. Biol. Reprod. 69, 529 - 534.
CUMMINS, J. M., A. M. JEQUIER, K. RAYMOND (1994): Molecular biology of human male infertility: Links with aging, mitochondrial genetics and oxidative stress. Mol. Rep. Dev. 37, 345 - 362.
ČEŘOVSKÝ, J., S. FRYDRYCHOVÁ, A. LUSTYKOVÁ, M. ROZKOT (2007): Relationship between abnormal spermatozoa and seminal plasma free amino acids in boars. Czech. J. Anim. Sci. 52, 44 - 49.
DAVIES, M. J. (2003): Singlet oxygen-mediated damage to proteins and its consequences. Biochem. Biophys. Res. Comm. 305, 761 - 770.
DAWSON, E. B., W. A. HARRIS, W. E. RANKIN, L. A. CHARPENTIER, W. J. MCGANIT (1987): Effect of ascorbic acid on male fertility. Ann. N. Y. Acad. Sci. 498, 312 - 323.
DE DUVE, C., P. BAUDHUIN (1966): Peroxisomes (microbodies and related particles). Physiol. Rev. 46, 323 - 357.
DE HAAN, J. B., C. BLADIER, P. GRIFFITHS, M. KELNER, R. D. O'SHEA, N. S. CHEUNG, R. T. BRONSON, M. J. SILVESTRO, S. WILD, S. S. ZHENG, P. M. BEART, P. J. HERTZOG, I. KOLA (1998): Mice with a homozygous null mutation for the most abundant glutathione peroxidase, Gpx1, show increased susceptibility to the

oxidative stress- inducing agents paraquat and hydrogen peroxide. J. Biol. Chem. 273, 22528 - 22536.
DE LAMIRANDE, E., C. GAGNON (1992): Reactive oxygen species and human spermatozoa. I. Effects on the motility of intact spermatozoa and on sperm axoneme and II. Depletion of adenosine triphosphate plays an important role in the inhibition of sperm motility. J. Androl. 13, 379 - 386.
DE LAMIRANDE, E., C. GAGNON (1993): A positive role for the superoxide anion in triggering hyperactivation and capacitation of human spermatozoa. Int. J. Androl. 16, 21 - 25.
DE LAMIRANDE, E., C. GAGNON (1995): Impact of reactive oxygen species on spermatozoa: a balancing act between beneficial and detrimental effects. Hum. Reprod. 10, 15 - 21.
DE LAMIRANDE, E., H. JIANG, A. ZINI, H. KODAMA, C. GAGNON (1997): Reactive oxygen species and sperm physiology. Rev. Reprod. 2, 48 - 54.
DEAN, R. T., S. FU, R. STOCKER, M. J. DAVIES (1997): Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. Biochem. J. 324, 1 - 18.
DEAR, T. N., K. CAMPBELL, T. H. RABBITTS (1991): Molecular cloning of putative odorant-binding and odorant-metabolizing proteins. Biochemistry 30, 10376 - 10382.
DIACONESCU, C., M. MATEI, G. TĂLPU, P. TĂPĂLOAGĂ (2014): Comparative physicochemical and biochemical characterization of bull and boar semen. Scientific Papers. Series D. Animal Science. LVII, 141 - 145.
DITTRICH, A. M., H. A. MEYER, M. KROKOWSKI, D. QUARCOO, B. AHRENS, S. M. KUBE, M. WITZENRATH, R. S. ESWORTHY, F. F. CHU, E. HAMELMANN (2010): Glutathione peroxidase-2 protects from allergen-induced airway inflammation in mice. Eur. Respir. J. 35, 1148 - 1154.
DOGAN, I., U. POLAT, Z. NUR (2009): Correlations between seminal plasma enzyme activities and semen parameters in seminal fluid of Arabian horses. Iran. J. Vet. Res. 10, 119 - 124.
DUAN, C., E. GOLDBERG (2003): Inhibition of lactate dehydrogenase C4 (LDHC4) blocks capacitation of mouse sperm in vitro. Cytogenet. Genome Res. 103, 352 - 359.
DYCK, M. K., G. R. FOXCROFT, S. NOVAK, A. RUIZ-SANCHEZ, J. PATTERSON, W. T. DIXON (2011): Biological markers of boar fertility. Reprod. Domest. Anim. 46, 55 - 58.
EBEL, H., T. GUNTHER (1980): Magnesium metabolism: a review. J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 18, 257 - 270.
EGHBALI, M., S. M. ALAVI-SHOUSHTARI, S. ASRI-REZAEI, M.-H. KHADEM ANSARI (2010): Calcium, magnesium and total antioxidant capacity (TAC) in seminal plasma of water buffalo (Bubalus Bubalis) bulls and their relationships with semen characteristics. Vet. Res. Forum 1, 12 - 20.
EINARSSON, S., B. GUSTAFSSON, I. SETTERGREN (1976): Alkaline phosphatase activity of epididymal contents in boars with normal or reduced spermatogenesis. Andrologia 8, 25 - 28.
ELCHURI, S., T. D. OBERLEY, W. QI, R. S. EISENSTEIN, L. J. ROBERTS, H. VAN REMMEN, C. J. EPSTEIN, T. T. HUANG (2005): CuZnSOD deficiency leads to persistent and widespread oxidative damage and hepatocarcinogenesis later in life. Oncogene 24, 367 - 380.
EL-SHARAWY, M. E., I. S. EL-SHAMAA, M. A. R. IBRAHIM, I. M. ABD EL-RAZEK, E. M. EL-SEIFY (2012): Effect of low density lipoproteins in extender on freezability and fertility of egyptian buffalo bull semen. Scientific Papers. Series D. Animal Science LV, 114 - 120 .

ESWORTHY, R. S., J. R. MANN, M. SAM, F. F. CHU (2000): Low glutathione peroxidase activity in Gpx1 knockout mice protects jejunum crypts from gamma-irradiation damage. Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 279, G426 - G436.

EVANS, M. D., M. DIZDAROGLU, M. S. COOKE (2004): Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance. Mutat. Res. 567, 1 - 61.

FABIOLA ARROTÉIA, K., P. V. GARCIA, M. F. BARBIERI, M. L. JUSTINO, L. A. VIOLIN PEREIRA (2012): The Epididymis: Embryology, Structure, Function and Its Role in Fertilization and Infertility. In: Embryology - Updates and Highlights on Classic Topics, (Violin Pereira, L., Ed.), ISBN: 978-953-51-0465-0, InTech, Available from: http://www.intechopen.com/books/embryology-updates-and-highlightson-classic-topics/the-epididymis-embryology-structure-function-and-its-role-in-fertilization-and-infertility (20.3. 2015.)

FAGONE, P., S. JACKOWSKI (2009): Membrane phospholipid synthesis and endoplasmic reticulum function. J. Lipid Res. 50, S311 - S316.

FINGEROVA, H., J. NOVOTNY, J. BARBORIK, J. BREZINOVA, M. SVOBODOVA, M. KRSKOVAD, I. OBORNA (2007): Antioxidant capacity of seminal plasma measured by tas randox®. Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky. Olomouc. Czech. Repub. 151, 37 - 40.

FLORIAN, S., K. WINGLER, K. SCHMEHL, G. JACOBASCH, O. J. KREUZER, W. MEYERHOF, R. BRIGELIUS-FLOHÉ (2001): Cellular and subcellular localization of gastrointestinal glutathione peroxidase in normal and malignant human intestinal tissue. Free Radical Res. 35, 655 - 663.

FORD, W. C. (2004): Regulation of sperm functions by reactive oxygen species. Hum. Reprod. Update 10, 387 - 399.

FORMAN, H. J., D. A. DICKINSON (2003): Oxidative signaling and glutathione synthesis. Biofactors 17, 1 - 12.

FRAGA, G. G., P. A. MOTCHNIK, M. K. SHIGENEGA (1991): Ascorbic acid protects against endogenous oxidative DNA damage in human sperm. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 11003 - 11006.

FRANGEÎ, R., T. GIDER, M. KOSEC (2005): Frequency of boar ejaculate collection and its Influence on semen quality, pregnancy rate and litter size. Acta Vet. Brno 74, 265 - 273.

FRIDOVICH, I. (1995): Superoxide radical and superoxide dismutases. Annu. Rev. Biochem. 64, 97 - 112.

FRUNZĂ, I., H. CERNESCU, G. KORODI (2008): Physical and chemical parameters of boar sperm. Lucrări Stiintifice Medicină Veterinară XLI (41), 634 - 640.

FUJII, J., Y. IUCHI, S. MATSUKI, T. ISHII (2003): Cooperative function of antioxidant and redox systems against oxidative stress in male reproductive tissues. Asian J. Androl. 5, 231 - 242.

FUNAHASHI, H., T. SANO (2005): Selected antioxidants improve the function of extended boar semen stored at 10 ºC. Theriogenology 63, 1605 - 1616.

FUNAHASHI, H., Z. MACHATY, R. S. PRATHER, B. N. DAY (1996): Gamma-glutamyl transpeptidase of spermatozoa may decrease oocyte glutathione content at fertilization in pigs. Mol. Reprod. Dev. 45, 485 - 490.

FÜRST, P. (1996): The role of antioxidants in nutritional support. Proc. Nutr. Soc. 55, 945 - 961.

GERFEN, R.W., B. R. WHITE, M. A. COTTA, M. B. WHEELER (1994): Comparison of the semen characteristics of fengjing, meishan and yorkshire boars. Theriogenology 41, 461 - 469.

GHYSELINCK, N. B., C. JIMENEZ, Y. COURTY, J. P. DUFAURE (1989): Androgen-dependent messenger RNA(S) related to secretory proteins in the mouse epididymis. J. Reprod. Fertil. 85, 631 - 639.

GIANNATTASIO, A., M. DE ROSA, R. SMERAGLIA ET AL., S. ZARRILLI, A. CIMMINO, B. DI ROSARIO, R. RUGGIERO, A. COLAO, G. LOMBARDI (2002.): Glutathione peroxidase (GPX) activity in seminal plasma of healthy and infertile males. J. Endocrinol. Invest. 25, 983 - 986.

GIROTTI, A. W. (1998): Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. J. Lipid Res. 39, 1529 - 1542.

GLOGOWSKI, J., D. R. DANFORTH, A. CIERESZKO (2002): Inhibition of Alkaline Phosphatase Activity of Boar Semen by Pentoxifylline, Caffeine, and Theophylline. J. Androl. 23, 783 - 792.

GOLDBERG, D. M. (1980): Structural, functional, and clinical aspects of gamma-glutamyltransferase. Crit. Rev. Clin. Lab. Sci. 12, 1 - 58.

GOLDSTEIN, D. A. (1990): Serum Calcium. In: Clinical Methods The History, Physical, and Laboratory Examinations. (Walker, H. K., W. Dallas Hall, J. Willis Hurst, Eds.), Butterworths, Boston, pp. 677.

GONZALEZ BUITRAGO, J. M., J. M. MIRALLES, M. H. MUŃOZ, S. MEZA, M. T. ALONSO, L. C. GARCIA DIEZ (1980): Seminal plasma creatine kinase activity in fertility studies. Arch. Androl. 5, 355 - 360.

GRIFFITH, O. W. (1999): Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis. Free Radical Bio. Med. 27, 922 - 935.

GRIVEAU, J. F., D. LE LANNOU (1997): Reactive oxygen species and human spermatozoa physiology and pathology. Int. J. Androl. 20, 61 - 69.

GUÉRAUD, F., M. ATALAY, N. BRESGEN, A. CIPAK, P. M. ECKL, L. HUC, I. JOUANIN, W. SIEMS, K. UCHIDA (2010): Chemistry and biochemistry of lipid peroxidation products. Free Radical Res. 44, 1098 - 1124.

GÜNDOĞAN, M. (2006): Some reproductive parameters and seminal plasma constituents in relation to season in Akkaraman and Awassi rams. Turk. J. Vet. Anim. Sci. 30, 95 - 100.

GUTZMIRTL, H. (2013): Utjecaj hibridne linije dobi i individualnih svojstava na biokemijski sastav sjemene plazme nerastova. Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, Hrvatska.

GUYTON, A. C., J. E. HALL (2006): Reprodukcijske i hormonske funkcije muškaraca; epifiza. U: Medicinska fiziologija. (Guyton, A. C., J. E. Hall, Eds.), Medicinska naklada, Zagreb, str. 996 - 1009.

HALLAK, J., R. K. SHARMA, F. F. PASQUALOTTO, P. RANGANATHAN, A. J. THOMAS, JR, A. AGARWAL (2001): Creatine kinase as an indicator of sperm quality and maturity in men with oligospermia. Urology 58, 446 - 445.

HALLIWEL, B., J. M. C. GUTTERIDGE (1999): Antioxidant defence enzymes: Catalase. U: Free radicals in biology and medicine. 3rd edition. Oxford University Press. Oxford. pp. 134 - 140.

HALLIWELL, B., J. M. C. GUTTERIDGE (2007): Free radicals in biology and medicine. 4th edition. Oxford University Press: Oxford.

HAMAD, A. W. R., H. I. AL-DAGHISTANI, W. D. SHQUIRAT, M. ABDEL-DAYEM, M. AL-SWAIFI (2014): Sodium, potassium, calcium and copper levels in seminal plasma are associated with sperm quality in fertile and infertile men. Biochem. Pharmacol. 3, 1 - 7.

HAMDI, S. A., O. I. NASSIF, M. S. ARDAWI (1997): Effect of marginal or severe dietary zinc deficiency on testicular development and functions of the rat. Arch. Androl. 38, 243 - 253.

HANKS, J. H. (1975): Hanks' balanced salt solution and pH control. Methods Cell Sci. 1, 3 - 4.

HEEREN, J., W. WEBER, U. BEISIEGEL (1999): Intracellular processing of endocytosed triglyceride-rich lipoproteins comprises both recycling and degradation. J. Cell Sci. 112, 349 - 359.

HERBETTE, S., P. ROECKEL-DREVET, J. R. DREVET (2007): Seleno-independent glutathione peroxidases. FEBS J. 274, 2163 - 2180.

HINKOVSKA, V. T., G. P. DIMITROV, K. S. KOUMANOV (1986): Phospholipid composition and phospholipid asymmetry of ram spermatozoa plasma membranes. Int. J. Biochem. 18, 1115 - 1121.

HO, Y. S., J. L. MAGNENAT, R. T. BRONSON, J. CAO, M. GARGANO, M. SUGAWARA, C. D. FUNK (1997): Mice deficient in cellular glutathione peroxidase develop normally and show no increased sensitivity to hyperoxia. J. Biol. Chem. 272, 16644 - 16651.

HONG, C. Y., B. N. CHIANG, P. TURNER (1984): Calcium ion is the key regulator of human sperm function. Lancet. 324, 1449 - 1451.

HORTON, J. W. (2003): Free radicals and lipid peroxidation mediated injury in burn trauma: the role of antioxidant therapy. Toxicology, 189, 75 - 88.

HOTZ, C., K. H. BROWN (2004): Assessment of the risk of zinc deficiency in populations and options for its control. Food Nutr. Bull. 25, 91 - 203.

HUACUJA, L., N. M. DELGADO, L. CALZADA, A. WENS, R. REYES, N. PEDRÓN, A. ROSADO (1981): Exchange of lipids between spermatozoa and seminal plasma in normal and pathological human semen. Arch. Androl. 7, 343 - 349.

HUIJGEN, H. J., G. T. B. SANDERS, R. W. KOSTER, J. VREEKEN, P. M. M. BOSSUYT (1997): The clinical value of lactate dehydrogenase in serum: a quantitative review. Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 35, 569 - 579.

HUSZAR, G., L. VIGUE (1990): Spermatogenesis related change in the synthesis of the creatine kinase B-type and M-type isoforms in human spermatozoa. Mol. Reprod. Dev. 25, 258 - 262.

HUSZAR, G., L. VIGUE (1993): Incomplete development of human spermatozoa is associated with increased creatine phosphokinase concentrations and abnormal head morphology. Mol. Reprod. Dev. 34, 292 - 298.

HUSZAR, G., L. VIGUE, M. CORRALES (1988b): Sperm creatine phosphokinase activity as a measure of sperm quality in normospermic, variablespermic and oligospermic men. Biol. Reprod. 38, 1061 - 1066.

HUSZAR, G., L. VIGUE, S. OEHNINGER (1994): Creatine kinase immunocytochemistry of human hemizona-sperm complexes: selective binding of sperm with mature creatine kinase-staining pattern. Fertil. Steril. 61, 136 - 142.

HUSZAR, G., L.VIGUE (1994): Correlation between the rate of lipid peroxidation and cellular maturity as measured by creatine kinase activity in human spermatozoa. J. Androl. 15, 71 - 77.

HUSZAR, G., M. CORRALES, L. VIGUE (1988a): Correlation between sperm creatine phosphokinase activity and sperm concentrations in normospermic and oligospermic men. Gamete. Res. 19, 67 - 75.

HUSZAR, G., M. SBRACIA, L. VIGUE, D. J. MILLER, B. D. SHUR (1997): Sperm plasma membrane remodeling during spermiogenetic maturation in men: relationship among plasma membrane β1,4-Galactosyltransferase, cytoplasmic creatine phosphokinase, and creatine phosphokinase isoform ratios. Biol. Reprod. 56, 1020 - 1024.

HWANG, C., A. J. SINSKY, H. F. LODISH (1992): Oxidized redox state of glutathione in the endoplasmic reticulum. Science 257, 1496 - 1502.

IBRAHIM, W., U. S LEE, H. C. YEN, D. K. ST CLAIR, C. K. CHOW (2000): Antioxidant and oxidative status in tissues of manganese superoxide dismutase transgenic mice. Free Radical Bio. Med. 397 - 402.
IRVINE, D. S. (1996): Glutathione as a treatment for male infertility. Rev. Reprod. 1, 6 - 12.
IWASAKI, A., C. GAGNON (1992): Formation of reactive oxygen species in spermatozoa of infertile patients. Fertil. Steril. 57, 409 - 416.
JACOB, C., P. G. WINYARD (2009): Redox signaling and regulation in biology and medicine. Wiley-VCH, Weinheim.
JACYNO, E., A. KOŁODZIEJ, M. KAWĘCKA, A. PIETRUSZKA, B. MATYSIAK, M. KAMYCZEK (2009): The relationship between blood serum and seminal plasma cholesterol content in young boars and their semen qualitative traits and testes size. Arch. Tierzucht 52, 161 - 168.
JELEZARSKI, L., C. H. VAISBERG, T. CHAUSHEV, E. SAPUNDJIEV (2008): Localization and characterization of glutathione peroxidase (GPx) in boar accessory sex glands, seminal plasma, and spermatozoa and activity of GPx in boar semen. Theriogenology 69, 139 - 145.
JIANG, Z. L., Q. W. LI, J. H. HU, W. Y. LI, H. W. ZHAO, S. S. ZHANG (2007): Improvement of the quality of boar cryopreservation semen by supplementing with low density lipoprotein in diluents. Cryobiology 54, 301 - 304.
JURKOVIĆ, S., J. OSREDKAR, J. MARC (2008): Molekularni utjecaj glutation-peroksidaza u antioksidacijskim procesima. Biochem. Medica 18, 162 - 174.
JUYENA N. S., C. STELLETTA (2012): Seminal plasma: an essential attribute to spermatozoa. J. Androl. 33, 536 - 551.
KAEOKET, K., K. TANTIPARINYAKUL, W. KLADKAEW, P. CHANAPIWAT, M. TECHAKUMPHU (2008): Effect of different antioxidants on quality of cryopreserved boar semen in different breeds. Thai J. Agr. Sci. 41, 1 - 9.
KAMP, G., G. BÜSSELMANN, N. JONES, B. WIESNER, J. LAUTERWEIN (2003): Energy metabolism and intracellular pH in boar spermatozoa. Reproduction 126, 517 - 525.
KAVANAGH, J. P., C. DARBY (1983): Creatine kinase and ATPase in human seminal fluid and prostatic fluid. J. Reprod. Fert. 68, 51 - 56.
KAWĘCKA, M., A. PIETRUSZKA, E. JACYNO, R. CZARNECKI, M. KAMYCZEK (2008): Quality of semen of young boars of the breeds Pietrain and Duroc and their reciprocal crosses. Arch. Tierz. 51, 42 - 54.
KAYA, A., M. ASKOY, T. TEKELI (2002): Influence of ejaculation frequency on sperm characteristics, ionic composition and enzymatic activity of seminal plasma in rams. Small Ruminant Res. 44, 153 - 158.
KEHRER, J. P. (2000): The Haber–Weiss reaction and mechanisms of toxicity. Toxicology 149, 43 - 50.
KELSO, K. A., A. REDPATH, R. C. NOBLE, B. K. SPEAKE (1997): Lipid and antioxidant changes in spermatozoa and seminal plasma throughout the reproductive period of bulls. J. Reprod. Fertil. 109, 1 - 6.
KEMAL DURU, N., M. MORSHEDI, S. OEHNINGER (2000): Effects of hydrogen peroxide on DNA and plasma membrane integrity of human spermatozoa. Fertil. Steril. 74, 1200 - 1207.
KESSOVA, I. G., Y. S. HO, S. THUNG, A. I. CEDERBAUM (2003): Alcohol-Induced Liver Injury in Mice Lacking Cu, Zn-Superoxide Dismutase. Hepatology 38, 1136 - 1145.
KING, G. J., J. W. MACPHERSON (1966): Alkaline and acid phosphatase activity, pH and osmotic pressure of boar semen. Can. J. Comp. Med. Vet. Sci. 30, 304 - 307.

KING, T. E., T. MANN (1959): Sorbitol metabolism in spermatozoa. Proc. R. Soc. Lond. Ser. B 151, 226 - 243.
KINGSLEY, P. D., J. C. WHITIN, H. J. COHEN, J. PALIS (1998): Developmental expression of extracellular glutathione peroxidase suggests antioxidant roles in deciduum, visceral yolk sac, and skin. Mol. Reprod. Dev. 49, 343 - 355.
KLEBANOFF, S. J., C. B. HAMON (1972): Role of myeloperoxidase - mediated antimicrobial systems in intact leukocytes. J. Reticuloendothel. Soc. 12, 170 - 196.
KNECHT, D., S. ŚRODOŃ, K. DUZIŃSKI (2014): The influence of boar breed and season on semen parameters. S. Afr. J. Anim. Sci. 44, 1 - 9.
KNOX, R. V. (2003): The anatomy and physiology of sperm production in boars. Published in the website: http://www.ansci.wisc.edu/jjp1/pig_case/html/library/boara&p.pdf (28.01.2015.).
KOHEN, R., A. NYSKA (2002): Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. Toxicol. Pathol. 30, 620 - 650.
KÖHRLE, J., R. GÄRTNER (2009): Selenium and thyroid. Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab. 23, 815 - 827.
KOLENC, D. (2010): Imunohistokemijska koekspresija 4-hidroksinonenala i prominina-1 u glijalnim tumorima mozga. Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, Hrvatska.
KOMAREK, R. J., B. W. PICKETT, E. W. GIBSON, R. G. JENSEN (1965): Lipids of porcine spermatozoa, seminal plasma and gel. J. Repro. Fertil. 9, 131 - 136.
KOMMISRUD, E., H. PAULENZ, E. SEHESTED, I. S. GREVLE (2002): Influence of boar and semen parameters on motility and acrosome integrity in liquid boar semen stored for five days. Acta. Vet. Scand. 43, 49 - 55.
KONDRACKI, S., A. WYSOKIŃSKA, D. BANASZEWSKA, E. WOŹNIAK (2005): Evaluation of spermiogram in domestic pigs. Reprod. Biol. 6, 93 - 98.
KONDRACKI, S., M. IWANINA, A. WYSOKIŃSKA, M. HUSZNO (2012): Comparative analysis of Duroc and Pietrain boar sperm morphology. Acta Vet. Brno 81, 195 - 199.
KOTWICKA, M., M. JENDRASZAK, J. B. WARCHOL (2002): Plasma membrane translocation of phosphatidylserine in human spermatozoa. Folia Histochem. Cytobiol. 40, 111 - 112.
KOWALOWKA, M., P. WYSOCKI, L. FRASER, J. STRZEZEK (2008): Extracellular Superoxide Dismutase of Boar Seminal Plasma. Reprod. Dom. Anim. 43, 490 - 496.
KOZARIĆ, Z. (1998): Spolni sustav. U: Veterinarska histologija (Bošnjak, M., ur.). Naklada Karolina. Zagreb, str. 195 - 211.
KOZIOROWSKA-GILUN, M., M. KOZIOROWSKI, J. STRZEŻEK, L. FRASER (2011a): Seasonal changes in antioxidant defence systems in seminal plasma and fluids of the boar reproductive tract. Reprod. Biol. 11, 37 - 47.
KOZIOROWSKA-GILUN, M., M. KOZIOROWSKI, L. FRASER, J. STRZEZEK (2011b): Antioxidant defence system of boar cauda epididymidal spermatozoa and reproductive tract fluids. Reprod. Domest. Anim. 46, 527 - 533.
KRYUKOV, G. V., S. CASTELLANO, S. V. NOVOSELOV, A. V. LOBANOV, O. ZEHTAB, R. GUIGÓ,V. N. GLADYSHEV (2003): Characterization of mammalian selenoproteomes. Science 300, 1439 - 1443.
KULKA, P., H. P. NISSEN, H. W. KREYSEL (1984): Triglycerides and phospholipids - relation to fertility. Andrologia. 16, 48 - 51.
KUMAR, R. T, A. L. WISEMAN, G. KALA, S. V. KALA, M. M. MATZUK, M. W. LIEBERMAN (2000): Reproductive defects in g-glutamyl transpeptidase deficient mice. Endocrinology 141, 4270 - 4277.

KUMARESAN, A., G. KADIRVEL, K. M. BUJARBARUAH, R. K. BARDOLOI, A. DAS, S. KUMAR, S. NASKAR (2009): Preservation of boar semen at 18 °C induces lipid peroxidation and apoptosis like changes in spermatozoa. Anim. Reprod. Sci. 110, 162 - 171.
LANDIS, G. N., J. TOWER (2005): Superoxide dismutase evolution and life span regulation. Mech. Ageing Dev. 126, 365 - 379.
LEBOVITZ, R. M., H. ZHANG, H. VOGEL, J. CARTWRIGHT, JR., L. DIONNE, N. LU, S. HUANG, M. M. MATZUK (1996): Neurodegeneration, myocardial injury, and perinatal death in mitochondrial superoxide dismutase-deficient mice. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 93, 9782 - 9787.
LEE, H. J., W. S. FILLERS, M. R. IYENGAR (1988): Phosphocreatine, an intracellular high-energy compound, is found in the extracellular fluid of the seminal vesicles in mice and rats. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 7265 - 7269.
LENAZ, G. (1998): Role of mitochondria in oxidative stress and ageing. Biochim. Biophys. Acta 1366, 53 - 67.
LENZI, A., M. PICARDO, L. GANDINI, F. LOMBARDO, O. TERMINALI, S. PASSI, F. DONDERO (1994): Glutathione treatment of dyspermia: effect on the lipoperoxidation process. Hum. Reprod. 9, 2044 - 2050.
LEWIS, S. E. M., P. M. BOYLE, K. A. MCKINNEY (1995): Total antioxidant capacity of seminal plasma is different in fertile and infertile men. Fertil. Steril. 64, 868 - 870.
LI, S. S. L., W. M. FITCH, Y. C. E. PAN, F. S. SHARIEF (1983): Evolutionary relationships of vertebrate lactate dehydrogenase isozymes A4 (muscle), B4 (heart), and C4 (testis). J. Biol. Chem. 258, 7029 - 7032.
LIPENSKÝ, J., A. LUSTYKOVÁ, S. FRYDRYCHOVÁ, E. VÁCLAVKOVÁ, M. ROZKOT, J. ČEŘOVSKÝ (2014): Seminal plasma zinc concentration in relation to sperm quality parameters in boars. Research in Pig Breeding 8, 29 - 31.
LOGOGLU, G., A. KENDIRCI, T. ÖZGÜNEN (1997): The role of seminal calcium in male infertility. J. Islamic Acad. Sci. 10, 25 - 27.
LÓPEZ RODRÍGUEZ, A., T. RIJSSELAERE, J. BEEK, P. VYT, A. VAN SOOM, D. MAES (2013): Boar seminal plasma components and their relation with semen quality. Syst. Biol. Reprod. Med. 59, 5 - 12.
LORNAGE, J., J. F. GUERIN, J. C. CZYBA, Y. MENEZO (1983): Influence of cations and albumin on human spermatozoa. Arch. Androl. 10, 119 - 125.
LU, S. C. (2000): Regulation of glutathione synthesis. Curr. Top. Cell Regul. 36, 95- 116.
LU, S. C. (2013): Glutathione synthesis. Biochim. Biophys. Acta 1830, 3143 - 3153.
LUBOS, E., J. LOSCALZO, D. E. HANDY (2011): Glutathione peroxidase-1 in health and disease: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. Antioxid. Redox Signal. 15, 1957 - 1997.
LJUBIČIĆ, I., L. RADIN, I. ŽURA ŽAJA, J. PEJAKOVIĆ HLEDE, S. MILINKOVIĆ-TUR (2013): Slobodni radikali, oksidacijski stres i parazitarne bolesti. Veterinarska stanica 44, 285 - 297.
MAEDA, K., K. OKUBO, I. SHIMOMURA, K. MIZUNO, Y. MATSUZAWA, K. MATSUBARA (1997): Analysis of an expression profile of genes in the human adipose tissue. Gene 190, 227 - 235.
MAIORINO, M., F. URSINI, V. BOSELLO, S. TOPPO, S. C. TOSATTO, P. MAURI, K. BECKER, A. ROVERI, C. BULATO, L. BENAZZI, A. DE PALMA, L. FLOHÉ (2007): The thioredoxin specificity of Drosophila GPx: a paradigm for a peroxiredoxin-like mechanism of many glutathione peroxidases. J. Mol. Biol. 365, 1033 - 1046.

MAJIĆ-BALIĆ, I., S. MILINKOVIĆ-TUR, M. SAMARDŽIJA, S. VINCE (2012): Effect of age and environmental factors on semen quality, glutathione peroxidase activity and oxidative parameters in Simmental bulls. Theriogenology 78, 423 - 431.

MALINOUSKI, M., S. KEHR, L. FINNEY, S. VOGT, B. A. CARLSON, J. SERAVALLI, R. JIN, D. E. HANDY, T. J. PARK, J. LOSCALZO, D. L. HATFIELD, V. N. GLADYSHEV (2012): High-resolution imaging of selenium in kidneys: a localized selenium pool associated with glutathione peroxidase 3. Antioxid. Redox Signal. 16, 185 - 192.

MANN, T. (1954): The biochemistry of semen. Methuen and Co. Ltd. London.

MARGIS, R., C. DUNAND, F. K. TEIXEIRA, M. MARGIS-PINHEIRO (2008): Glutathione peroxidase family – an evolutionary overview. FEBS J. 275, 3959 - 3970.

MARKLUND, S. L. (1982): Human copper-containing superoxide dismutase of high molecular weight. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 79, 7634 - 7638.

MARKLUND, S. L. (1984a): Extracellular superoxide dismutase in human tissues and human cell lines. J. Clin. Invest. 74, 1398 - 1403.

MARKLUND, S. L. (1984b): Extracellular superoxide dismutase and other superoxide dismutase isoenzymes in tissues from nine mammalian species. Biochem. J. 222, 649 - 655.

MARKOVIĆ, F. (2005): Učinci levamisola i homeopatskog pripravaka traumeel® na imunostimulaciju i kakvoću sperme nerastova. Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, Hrvatska.

MARTINEZ, P., A. MORROS (1996): Membrane lipid dynamics during human sperm capacitation. Frontm. Biosci. 1, d103 - 117.

MASELLA, R., R. DI BENEDETTO, R. VARI, C. FILESI, C. GIOVANNINI (2005): Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. J. Nutr. Biochem. 16, 577 - 586.

MATES, J. M., F. SÁNCHEZ-JIMÉNEZ (1999): Antioxidant enzymes and their implications in pathophysiologic processes. Front. Biosci. 4, D339 - 345.

MATZUK, M. M., L. DIONNE, Q. GUO, T. R. KUMAR, R. M. LEBOVITZ (1998): Ovarian function in superoxide dismutase 1 and 2 knockout mice. Endocrinology 139, 4008 - 4011.

Mc CORD, J. M., I. FRIDOVICH (1969): Superoxide dismutase an enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). J. Biol. Chem. 244, 60409 - 60455.

MEISTER , A. (1988): Glutathione metabolism and its selective modification. J. Biol. Chem. 33, 17205 - 17208.

MEREDITH, M. J., D. J. REED (1982): Status of the mitochondrial pool of glutathione in the isolated hepatocyte. J. Biol. Chem. 257, 3747 - 3753.

MERT, H., K. KARAKUS, A. YILMAZ, T. AYGUN, N. MERT, B. APAYDIN, E. SEYHAN (2009): Effects of genotype on testis, semen quality, and mineral composition of semen in various ram breeds. Biol. Trace Elem. Res. 132, 93 - 102.

MESEGUER, M., N. GARRIDO, J. A. MARTÍNEZ-CONEJERO, C. SIMÓN, ANTONIO PELLICER, J. REMOHÍ (2004): Relationship between standard semen parameters, calcium, cholesterol contents, and mitochondrial activity in ejaculated spermatozoa from fertile and infertile males. J. Assist. Reprod. Genet. 21, 445 - 451.

MILLS, G. C. (1957): Hemoglobin catabolism. I. Glutathione peroxidase, an erythrocyte enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown. J. Biol. Chem. 229, 189 - 197.

MITEVA, R., D. ZAPRYANOVA, IV. FASULKOV, S. YOTOV, T. MIRCHEVA (2010): Investigations on acid phosphatase activity in the seminal plasma of humans and animals. Trakia J. Sci. 8, 20 - 23.

MIYAJI, K., S. KANEKO, H. ISHIKAWA, T. AOYAGI, K. HAYAKAWA, M. HATA, M. OOHASHI, A. IZAWA, M. MURAI (2001): creatine kinase isoforms in the seminal plasma and the purified human sperm. Syst. Biol. Reprod. Med. 47, 127 - 134.

MONIEM, K. A., T. D. GLOVER (1972): Alkaline phosphatase in the cytoplasmic droplet of mammalian spermatozoa. J. Reprod. Fertil. 29, 65 - 69.

MONTAGNON, D., B. VALTAT, F. VIGNON, M. H. KOLL-BACK (1990): Secretory proteins of human seminal vesicles and their relationship to lipids and sugars. Andrologia 22, 193 - 205.

MOORE, H. D. M., G. A. HALL, K. G. HIBBITT (1976): Seminal plasma proteins and the reaction of spermatozoa from intact boars and from boars without seminal vesicles to cooling. J. Reprod. Fert. 47, 39 - 45.

MORAN, J. M., L. MADEJÓN, C. ORTEGA FERRUSOLA, F. J. PEÑA (2008): Nitric oxide induces caspase activity in boar spermatozoa. Theriogenology 70, 91 - 96.

MRUK, D. D., B. SILVESTRINI, M. Y. MO, C. Y. CHENG (2002): Antioxidant superoxide dismutase - A review: Its function, regulation in the testis, and role in male fertility. Contraception 65, 305 - 311.

MRUK, D., C. H. CHENG, Y. H. CHENG, M. Y. MO, J. GRIMA, B. SILVESTRINI, W. M. LEE, C. Y. CHENG (1998): Rat testicular extracellular superoxide dismutase: Its purification, cellular distribution, and regulation. Biol. Reprod. 59, 298 - 308.

MURASE, T., N. IMAEDA, H. YAMADA, K. MIYAZAWA (2007): Seasonal changes in semen characteristics, composition of seminal plasma and frequency of acrosome reaction induced by calcium and calcium ionophore A23187 in Large White boars. J. Reprod. Dev. 53, 853 - 865.

NGUYEN, V. D., M. J. SAARANEN, A. R. KARALA, A. K. LAPPI, L. WANG, I. B. RAYKHEL, H. I. ALANEN, K. E. SALO, C. C. WANG, L. W. RUDDOCK (2010): Two endoplasmic reticulum PDI peroxidases increase the efficiency of the use of peroxide during disulfide bond formation. J. Mol. Biol. 406, 503 - 515.

NIKODEMUS, D., D. LAZIC, M. BACH, T. BAUER, C. PFEIFFER, L. WILTZER, E. LAIN, E. SCHÖMIG, D. GRÜNDEMANN (2011): Paramount levels of ergothioneine transporter SLC22A4 mRNA in boar seminal vesicles and cross-species analysis of ergothioneine and glutathione in seminal plasma. J. Physiol. Pharmacol. 62, 411 - 419.

ODET, F., C. DUAN, W. D. WILLIS, E. H. GOULDING, A. KUNG, E. M. EDDY, E. GOLDBERG (2008): Expression of the gene for mouse lactate dehydrogenase C (Ldhc) is required for male fertility. Biol. Reprod. 79, 26 - 32.

OEHNINGER, S., P. BLACKMORE, M. MAHONY, G. HODGEN (1995): Effects of hydrogen peroxide on human spermatozoa. J. Assist. Reprod. Genet. 12, 41 - 47.

OGBUEWU, I. P., N. O. ALADI, I. F. ETUK, M. N. OPARA, M. C. UCHEGBU, I. C. OKOLI, M. U. ILOEJE (2010): Relevance of oxygen free radicals and antioxidants in sperm production and function. Res. J. Vet. Sci. 3, 138 - 164.

OKADO-MATSUMOTO, A., I. FRIDOVICH (2001): Subcellular distribution of superoxide dismutases (SOD) in rat liver: Cu,Zn-SOD in mitochondria. J. Biol. Chem. 276, 38388 - 38393.

OKAMURA, N., Y. IWAKI, S. HIRAMOTO, M. TAMBA, S. BANNAI, Y. SUGITA, P. SYNTIN, F. DACHEUX, J. L. DACHEUX (1997): Molecular cloning and characterization of the epididymisspecific glutathione peroxidase-like protein secreted in the porcine epididymal fluid. Biochim. Biophys. Acta 1336, 99 - 109.

OKERE, C., A. JOSEPH, M. EZEKWE (2005): Seasonal and genotype variations in libido, semen production and quality in artificial insemination boars. J. Anim. Vet. Adv. 4, 885 - 888.

OLLERO, M., R. D. POWERS, J. G. ALVAREZ (2000): Variation of docosahexaenoic acid content in subsets of human spermatozoa at different stages of maturation: implications for sperm lipoperoxidative damage. Mol. Reprod. Develop. 55, 326 - 334.
OLSON, G. E., J. C. WHITIN, K. E. HILL, V. P. WINFREY, A. K. MOTLEY, L. M. AUSTIN, J. DEAL, H. J. COHEN, R. F. BURK (2010): Extracellular glutathione peroxidase (Gpx3) binds specifically to basement membranes of mouse renal cortex tubule cells. Am. J. Physiol. Renal Physiol. 298, F1244 - F1253.
OOKHTENS, M., N. KAPLOWITZ (1998): Role of the liver in interorgan homeostasis of glutathione and cyst(e)ine. Semin. Liver Dis. 18, 313 - 329.
OSREDKAR, J. (2012): Oksidativni stres. Zdrav. Vestn. 81, 393 - 406.
PALLADINO, M. A., B. T. HINTON (1994): Expression of multiple gamma-glutamyl transpeptidase messenger ribonucleic acid transcripts in the adult rat epididymis is differentially regulated by androgens and testicular factors in a region-specific manner. Endocrinology 135, 1146 - 1156.
PARDO, C. A., Z. XU, D. R. BORCHELT, D. L. PRICE, S. S. SISODIA, D. W. CLEVELAND (1995): Superoxide dismutase is an abundant component in cell bodies, dendrites, and axons of motor neurons and in a subset of other neurons. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 954 - 958.
PARKS, J. E., D. V. LYNCH (1992): Lipid composition and thermotropic phase behaviour of boar bull stallion and rooster sperm membranes. Cryobiol. 29, 255 - 266.
PARKS, J. E., R. H. HAMMERSTEDT (1985): Developmental changes occuring in the lipids of ram epididymal spermatozoa plasma membrane. Biol. Reprod. 32, 653 - 658.
PASTERNAK, K., J. KOCOT, A. HORECKA (2010): Biochemistry of magnesium. J. Elementol. 15, 601 - 616.
PAULEZ, H., E. KOMMISRUD, P. O. HOFMO (2000): Effect of long-term storage at different temperatures on the quality of liquid boar semen. Reprod. Domest. Anim. 35, 83 - 89.
PEEKER, R., L. ABRAMSSON, S. L. MARKLUND (1997): Superoxide dismutase isoenzymes in human seminal plasma and spermatozoa. Mol. Hum. Reprod. 3, 1061 - 1066.
PERRY, A. C., R. JONES, L. S. NIANG, R. M. JACKSON, L. HALL (1992): Genetic evidence for an androgen-regulated epididymal secretory glutathione peroxidase whose transcript does not contain a selenocysteine codon. Biochem. J. 285, 863 - 870.
PESCH, S., M. BERGMANN, H. BOSTEDT (2006): Determination of some enzymes and macro- and microelements in stallion seminal plasma and their correlations to semen quality. Theriogenology 66, 307 - 313.
PFEIFER, H., M. CONRAD, D. ROETHLEIN, A. KYRIAKOPOULOS, M. BRIELMEIER, G. W. BORNKAMM, D. BEHNE (2001): Identification of a specific spermnuclei selenoenzyme necessary for protamine thiol cross-linking during spermmaturation. FASEB J. 15, 1236 - 1238.
PHAM-HUY, L. A., H. HE, C. PHAM-HUY (2008): Free radicals, antioxidants in disease and health. Int. J. Biomed. Sci. 4, 89 - 96.
PICKETT, B. W., KOMAREK R. J. (1966): Lipid and dry weight of bovine seminal plasma and spermatozoa from first and second ejaculates. J. Dairy. Sci. 50, 742 - 746.
PONCE, R. H., C. S. CARRIAZO, N. T. VERMOUTH (2001): Lactate dehydrogenase activity of rat epididymis and spermatozoa: Effect of constant light. Eur. J. Histochem. 45, 141 - 150.
POWELL, S. R. (2000): The antioxidant properties of zinc. J. Nutr. 130, 1447S - 1454S.
PRIEN, S. D. (1991): A comparative study of calcium utilization in human and porcine spermatozoa. PhD Thesis, Texas Tech University, Lubbock, Texas, USA.

PRIEN, S. D., CH. D. LOX, R. H. MESSER, F. D. DELEON (1990): Seminal concentrations of total and ionized calcium from men with normal and decreased motility. Fertil. Steril. 54, 171 - 172.
PUGLISI, R., I. MACCARI, S. PIPOLO, M. CONRAD, F. MANGIA, C. BOITANI (2012): The nuclear form of glutathione peroxidase 4 is associated with sperm nuclear matrix and is required for proper paternal chromatin decondensation at fertilization. J. Cell. Physiol. 227, 1420 - 1427.
RAHA, S., B. H. ROBINSON (2000): Mitochondria, oxygen free radicals, disease and ageing. Trends Biochem. Sci. 25, 502 - 508.
RAHAL, A., A. KUMAR, V. SINGH, B. YADAV, R. TIWARI, S. CHAKRABORTY, K. DHAMA (2014): Oxidative Stress, Prooxidants, and Antioxidants: The Interplay. Biomed Res. Int. vol. 2014, Article ID 761264, 19 pages http://dx.doi.org/10.1155/2014/761264 (3.2.2015.)
REECE, W. O. (2004): Dukes' physiology of domestic animals. 12th ed., Cornell University Press. Ithaca, London.
REJRAJI, H., P. VERNET, J. R. DREVET (2002): GPX5 is present in the mouse caput and cauda epididymidis lumen at three different locations. Mol. Reprod. Dev. 63, 96 - 103.
RIESENBECK, A. (2011): Review on international trade with boar semen. Reprod. Domest. Anim. 46, 1 - 3.
RIFFO, M. S., M. PARRAGA (1997): Role of phospholipase A2 in mammalian sperm-egg fusion: development of hamster oolemma fusibility by lysophosphatidylcholine. J. Exp. Zool. 279, 81 - 88.
ROCA, J., M. J. RODRI´GUEZ, M. A. GIL, G. CARVAJAL, E. M. GARCIA, C. CUELLO, J. M. VAZQUEZ, E. A. MARTINEZ (2005): Survival and in vitro fertility of boar spermatozoa frozen in the presence of superoxide dismutase and/or catalase. J. Androl. 26, 15 - 24.
RODRÍGUEZ-GIL, J. E. (2013): Biological aspects of the mature boar spermatozoon. In: Boar Reproduction (Bonet, S. et al., Eds.), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp. 49 - 64.
RODRIGUEZ-MARTINEZ, U. H., KVIST, J. ERNERUDH, L. SANZ, J. J. CALVETE (2011): Seminal plasma proteins: what role do they play? Am. J. Reprod. Immunol. 66, 11 - 22.
ROLDAN, E. R. S. (1998): Role of phospholipases during sperm acrosomal exocytosis. Front. Biosci. 3, D1109 - D1119.
ROLF, C., H. M. BEHRE, T. G. COOPER, B. KOPPERS, E. NIESCHLAG (1998): Creatine kinase activity in human spermatozoa and seminal plasma lacks predictive value for male fertility in in vitro fertilization. Fertil. Steril. 69, 727 - 734.
ROOKE, J. A., C-C. SHAO, B. K. SPEAKE (2001): Effects of feeding tuna oil on the lipid composition of pig spermatozoa and in vitro characteristics of semen. Reproduction 121, 315 - 322.
ROSSELLI, M., R. K. DUBEY, B. IMTHURN, E. MACAS, P. J. KELLER (1995): Effects of nitric oxide on human spermatozoa: Evidence that nitric oxide decreases sperm motility and induces sperm toxicity. Hum. Reprod. 10, 1786 - 1790.
SALZBERGER, Z., L. M. LEWIN, R. SHALGI (1992): Loss of acid phosphatase from rat spermatozoa as a method for assessing the acrosome reaction. Andrologia 24, 155 - 159.
SANDSTRÖM, J., P. NILSSON, K. KARLSSON, S. L. MARKLUND (1994): 10-fold increase in human plasma extracellular superoxide dismutase content caused by a mutation in heparin-binding domain. J. Biol. Chem. 269, 19163 - 19166.
SANOCKA, D., M. KURPISZ (2004): Reactive oxygen species and sperm cells. Reprod. Biol. Endocrinol. 2, 1 - 7.

SAS INSTITUTE INC. URL: http://support.sas.com/onlinedoc/913/docMainpage.jsp. (29. September 2012).
SAVIĆ, R. R. (2014): Fenotipska i genetska varijabilnost plodnosti nerasta. Doktorska disertacija, Univerzitet u Beogradu, Beograd, Srbija.
SCHNEIDER, M., H. FORSTER, A. BOERSMA, A. SEILER, H. WEHNES, F. SINOWATZ, C. NEUMULLER, M. J. DEUTSCH, A. WALCH, M. HRABE DE ANGELIS, W. WURST, F. URSINI, A. ROVERI, M. MALESZEWSKI, M. MAIORINO, M. CONRAD (2009): Mitochondrial glutathione peroxidase 4 disruption causes male infertility. FASEB J. 23, 3233 - 3242.
SCHRINER, S. E., N. J. LINFORD, G. M. MARTIN, P. TREUTING, C. E. OGBURN, M. EMOND, P. E. COSKUN, W. LADIGES, N. WOLF, H. VAN REMMEN, D. C. WALLACE, P. S. RABINOVITCH (2005): Medecine: Extension of murine life span by overexpression of catalase targeted to mitochondria. Science 308, 1909 - 1911.
SCOTT, T. W., R. M. C. DAWSON (1968): Metabolism of phospholipids by spermatozoa and seminal plasma. Biochem. J. 108, 457 - 463.
SEBASTIAN, S. M., S. SELVARAJ, M. M. ARULDHAS, P. GOVINDARAJULU (1987): Pattern of neutral and phospholipids in the semen of normospermic, oligospermic and azoospermic men. J. Reprod. Fert. 79, 373 - 378.
SELIGMAN, J., G. L. NEWTON, R. C. FAHEY, R. SHALGI, N. S. KOSOWER (2005): Nonprotein thiols and disulfides in rat epididymal spermatozoa and epididymal fluid: role of gamma-glutamyl-transpeptidase in sperm maturation. J. Androl. 26, 629 - 637.
SELIGMAN, J., G. L. NEWTON, R. C. FAHEY, R. SHALGI, N. S. KOSOWER (2005): Nonprotein thiols and disulfides in rat epididymal spermatozoa and epididymal fluid: role of g-glutamyl-transpeptidase in sperm maturation. J. Androl. 26, 629 - 637.
SHARPE, R. L., M. DROLET, D. L. MACLATCHY (2006.): Investigation of de novo cholesterol synthetic capacity in the gonads of goldfish (Carassius auratus) exposed to the phytosterol. Reprod. Biol. Endocrin. 4, 1 - 11.
SHINDE, A., J. GANU, P. NAIK (2012): Effect of free radicals & antioxidants on oxidative stress. J. Dent. Allied Sci. 1, 63 - 66.
SIES, H. (1997): OXIDATIVE STRESS: Oxidative stress: oxidants and antioxidants. Exp. Physiol. 82, 291 - 295.
SIES, H., W. STAHL, A. SEVANIAN (2005): Nutritional, dietary and postprandial oxidative stress. J. Nutr. 135, 969 - 972.
SIKKA, S. C. (1996.): Oxidative stress and role of antioxidants in normal and abnormal sperm function. Front. Biosci. 1, 78 - 86.
SIKKA, S. C. (2004): Role of oxidative stress and antioxidants in andrology and assisted reproductive technology. J. Andrology 25, 5 - 18.
SMITAL, J. (2009): Effects influencing boar semen. Anim. Reprod. Sci. 110, 335 - 346.
SMITAL, J., L. L. DE SOUSA, A. MOHSEN (2004): Differences among breeds and manifestation of heterosis in AI boar sperm output. Anim. Reprod. Sci. 80, 121 - 130.
SONDERMAN, J. P., J. J. LUEBBE (2008): Semen production and fertility issues related to differences in genetic lines of boars. Theriogenology 70, 1380 - 1383.
SORENSEN, M. B., I. A.BERGDAHL, N. H. HJOLLUND, J. P. BONDE, M. STOLTENBERG, E. ERNST (1999): Zinc, magnesium and calcium in human seminal plasma fluid: relations to other semen parameters and fertility. Mol. Hum. Reprod. 5, 331 - 337.
SOUCEK, D. A., J. C.VARY (1984): Some properties of acid and alkaline phosphatases from boar sperm plasma membranes. Biol. Reprod. 31, 687 - 693.
SPITZ, D. R., L. W. OBERLEY (1989): An assay for superoxide dismutase activity in mammalian tissue homogenates. Analitical Biochem. 179, 8 - 18.

STALLCUP, O. T. (1965): Acid and alkaline phosphatase activity in bovine semen as related to fertility. J. Dairy. Sci. 48, 752 - 754.
STANČIĆ, B., A. BOŽIĆ, I. STANČIĆ, S. DRAGIN, I. RADOVIĆ, M. PETROVIĆ (2012): Effect of worm and cold period of the year on boar semen quality parameters. Contemporary Agriculture 61, 163 - 168.
STANČIĆ, B., M. GAGRČIN, I. RADOVIĆ (2003): Uticaj godišnje sezone, rase i starosti nerastova na kvalitet sperme. 1. Nativna sperma. Biotech. Anim. Husbandry 19, 17 - 23.
STASIAK, K., B. JANICKI, B. KUPCEWICZ (2010): Biologic parameters of polar fox (Alopex lagopus L.) semen during the breeding season. Turk. J. Vet. Anim. Sci. 34, 327 - 331.
STEFANOV, R., D. ABADJIEVA, M. CHERVENKOV, E. KISTANOVA, D. KACHEVA, P. TAUSHANOVA, B. GEORGIEV (2013): Enzyme activities and motility of boar spermatozoa during 72-hour lowtemperature storage. Bulg. J. Vet. Med. 16, 237 - 242.
STEINMAN, H. M., L. WEINSTEIN, M. BRENOWITZ (1994): The manganese superoxide dismutase of Escherichia coli K-12 associates with DNA. J. Biol. Chem. 269, 28629 - 28634.
STEVANOVIĆ, J., S. BOROZAN, S. JOVIĆ, I. IGNJATOVIĆ (2011): Fiziologija slobodnih radikala. Vet. glasnik 65, 95 - 107.
STRÅLIN, P., S. L. MARKLUND (2000): Multiple cytokines regulate the expression of extracellular superoxide dismutase in human vascular smooth muscle cells. Atherosclerosis 151, 433 - 441.
STRZEŻEK, J. (2002): Secretory activity of boar seminal vesicle glands. Reprod. Biol. 2, 243 - 265.
STRZEZEK, J., D. HOLODY, J. TORSKA, W. DEMIANOWICZ, P. WYSOCKI (1995a): Postvasectomy changes in the biochemical composition of the boar seminal plasma. Reprod. Domest. Anim. 31, 247 - 248.
STRZEŻEK, J., L. FRASER, M. KUKLIŃSKA, A. DZIEKOŃSKA, M. LECEWICZ (2004): Effects of dietary supplementation with polyunsaturated fatty acids and antioxidants on biochemical characteristics of boar semen. Reprod. Biol. 4, 271 - 287.
STRZEZEK, J., S. LAPKIEWICZ, M. LECEWICZ (1999): A note on antioxidant capacity of boar seminal plasma. Anim. Sci. Pap. Rep. 17, 181 - 188.
STRZEZEK, R., M. KOZIOROWSKA-GILUN, M. KOWALÓWKA, J. STRZEZEK (2009): Characteristics of antioxidant system in dog semen. Pol. J. Vet. Sci. 12, 55 - 60.
STRZEŽEK, J., W. KORDA, J. GLOGOWSKI, P. WYSOCKI, K. BORKOWSKI (1995b): Influence of semen-collection frequency on sperm quality in boars, with special reference to biochemical markers. Reprod. Domestic Anim. 30, 85 - 94.
SURAI, P. F. (2006): Selenium in nutrition and health. Nottingham University Press, Nottingham.
SWAMINATHAN, R. (2003): Magnesium metabolism and its disorders. Clin. Biochem. Rev. 24, 47 - 66.
ŠTEFAN, L., T. TEPŠIĆ, T. ZAVIDIĆ, M. URUKALO, D. TOTA, R. DOMITROVIĆ (2007): Lipidna peroksidacija - uzroci i posljedice. Medicina 43, 84 - 93.
ŠVERKO, A. (2011): Povezanost pojavnosti i proširenosti bubrežnog karcinoma i tkivne ekspresije citokroma P450. Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, Hrvatska.
TAKAHASHI, K., N. AVISSAR, J. WHITIN, H. COHEN (1987): Purification and characterization of human plasma glutathione peroxidase: a selenoglycoprotein distinct from the known cellular enzyme. Arch. Biochem. Biophys. 256, 677 - 686.

TĂPĂLOAGĂ, P. R., A. ŞONEA, A. IANCU, E. MITRĂNESCU (2013): Researches regarding age, breed and collecting season influence in quality and quantity boars semen. Scientific Papers. Series D. Animal Science LVI, 161 - 165.
TEIXEIRA, A. M., G. F. BORGES (2012): Creatine kinase: structure and function. Braz. J. Biomotricity 6, 53 - 65.
THÉRIEN, I., R. MOREAU, P. MANJUNATH (1998): Major proteins of bovine seminal plasma and high-density lipoprotein induce cholesterol efflux from epididymal sperm. Biol. Reprod. 59, 768 - 776.
THOMAS, J. P., P. G. GEIGER, M. MAIORINO, F. URSINI, A. W. GIROTTI (1990): Enzymatic reduction of phospholipid and cholesterol hydroperoxides in artificial bilayers and lipoproteins. Biochim. Biophys. Acta 1045, 252 - 260.
TODOROVIĆ, A. U. (2013): Ekspresija antioksidativnih enzima i transkripcionog faktora Nrf2 kod pacijentkinja sa benigno, premaligno i maligno transformisanim endometrijumom. Doktorska disertacija, Univerzitet u Beogradu, Beograd, Srbija.
TOPPO, S., S. VANIN, V. BOSELLO, S. C. TOSATTO (2008): Evolutionary and structural insights into the multifaceted glutathione peroxidase (Gpx) superfamily. Antioxid. Redox Signal. 10, 1501 - 1514.
TSAKMAKIDIS, I. A., A. G. LYMBEROPOULOS, T. A. KHALIFA (2010): Relationship between sperm quality traits and field-fertility of porcine semen. J. Vet. Sci. 11, 151 - 154.
TURNER, R. M. O., S. M. McDONNELL (2003): Alkaline phosphatase in stallion semen: characterization and clinical applications. Theriogenology 60, 1 - 10.
TURRENS, J. F., J. D. CRAPO, B. A. FREEMAN (1984): Protection against oxygen toxicity by intravenous injection of liposome-entrapped catalase and superoxide dismutase. J. Clin. Invest. 73, 87 - 95.
ÚBEDA, J. L., M. V. FALCETO, Y. DAHMANI, R. MOZO-MARTÍN, J. A. BASCUAS, (2010): Practical review on reproductive testis pathology in boar. Proceedings of the 21st International Pig Veterinary Society Congress, 18 - 21 July, Vancouver, Canada, pp. 71.
UCHIDA, K. (2003): 4-Hydroxy-2-nonenal: A product and mediator of oxidative stress. Prog. Lipid Res. 42, 318 - 343.
URNER, F., SAKKAS, D. (2003): Protein phosphorylation in mammalian spermatozoa. Reproduction 125, 17 - 26.
URSINI, F., M. MAIORINO, C. GREGOLIN (1985): The selenoenzyme phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. Biochim. Biophys. Acta. 839, 62 - 70.
URSINI, F., M. MAIORINO, C. GREGOLIN (1986): Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. Int. J. Tissue React. 8, 99 - 103.
URSINI, F., M. MAIORINO, M. VALENTE, L. FERRI, C. GREGOLIN (1982): Purification from pig liver of a protein which protects liposomes and biomembranes from peroxidative degradation and exhibits glutathione peroxidase activity on phosphatidylcholine hydroperoxides. Biochim. Biophys. Acta 710, 197 - 211.
URSINI, F., S. HEIM, M. KIESS, M. MAIORINO, A. ROVERI, J. WISSING, L. FLOHÉ (1999): Dual function of the selenoprotein PHGPx during sperm maturation. Science 285, 1393 - 1396.
UTOMO, A., X. JIANG, S. FURUTA, J. YUN, D. S. LEVIN, Y. C. WANG, K. V. DESAI, J. E. GREEN, P. L. CHEN, W. H. LEE (2004): Identification of a novel putative non-selenocysteine containing phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (NPGPx) essential for alleviating oxidative stress generated from polyunsaturated fatty acids in breast cancer cells. J. Biol. Chem. 279, 43522 - 43529.
VADNAIS, M. L., K. P. ROBERTS (2007): Effects of seminal plasma on coolinginduced capacitative changes in boar sperm. J. Androl. 28, 416 - 422.

VALKO, M., C. J. RHODES, J. MONCOL, M. IZAKOVIC, M. MAZUR (2006): Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. Chem. Biol. Interact. 160, 1 - 40.
VALLORANI, C., M. SPINACI, D. BUCCI, C. TAMANINI, G. GALEATI (2010): Effects of antioxidants on boar spermatozoa during sorting and storage. Anim. Reprod. Sci. 122, 58 - 65.
VAN EEDEN, S. F., M. E. KLUT, B. A. WALKER, J. C. HOGG (1999): The use of flow cytometry to measure neutrophil function. J. Immunol. Methods 232, 23 - 43.
VASQUEZ, J. M., E. R. S. ROLDAN (1997): Phospholipid metabolism in boar spermatozoa and role of diacylglycerol species in the de novo formation of phosphatidylcholine. Mol. Reprod. Dev. 47, 105 - 112.
VERIT, F. F., A. VERIT, H. CIFTCI, O. EREL, H. ÇELIK (2009): Paraoxonase-1 activity in subfertile men and relationship to sperm parameters. J. Androl. 30, 183 - 189.
VERNET, P., R. J. AITKEN, J. R. DREVET (2004): Antioxidant strategies in the epididymis. Mol. Cell Endocrinol. 216, 31 - 39.
VIGNON, F., A. CLAVERT, M. H. KOLL-BACK, P. REVILLE (1992): On the glandular origin of seminal plasma lipids in man. Andrologia 24, 341 - 343.
WABERSKI, D., J. A. GUILEN-SOAREZ, E. BANDEIRA DE ARRUDA, K. F. WEITZE (1996): Effect of a transcervical infusion of seminal plasma on the fertilizing competence of low numbers of boar spermatozoa under controlled AI-ovulation intervals. Anim. Reprod. Sci. 44, 165 - 173.
WAGNER, B. A., G. R. BUETTNER, C. P. BURNS (1994): Free radical mediated lipid peroxidation in cells: Oxidizability is a function of cell lipid bis-allylic hydrogen content. Biochemistry 33, 4449 - 4453.
WALLIMANN, T., H. MOSER, B. ZURBRIGGEN, G. WEGMANN, H. M. EPPENBERGER (1986): Creatine kinase isoenzymes in spermatozoa. J. Muscle. Res. Cell Motil. 7, 25 - 34.
WALLIMANN, T., M. WYSS, D. BRDICZKA, K. NICOLAY, H. M. EPPENBERGER (1992): Intracellular compartmentation, structure and function of creatine kinase isoenzymes in tissues with high and fluctuating energy demands: the 'phosphocreatine circuit' for cellular energy homeostasis. Biochem. J. 281, 21 - 40.
WALLIMANN, T., W. HEMMER (1994): Creatine kinase in non-muscle tissues and cells. Mol. Cell. Biochem. 133/134, 193 - 220.
WALTON, P. A., M. PIZZITELLI (2012): Effects of peroxisomal catalase inhibition on mitochondrial function. Front. Physiol. 3, 1 - 10.
WANG, X., R. K. SHARMA, A. GUPTA, V. GEORGE, A. J. THOMAS, T. FALCONE, A. AGARWAL (2003a): Alterations in mitochondria membrane potential and oxidative stress in infertile men: a prospective observational study. Fertil. Steril. 80, 844 - 850.
WANG, X., R. K. SHARMA, S. C. SIKKA, A. J. THOMAS JR, T. FALCONE, A. AGARWAL (2003b): Oxidative stress is associated with increased apoptosis leading to spermatozoa DNA damage in patients with male factor infertility. Fertil. Steril. 80, 531 - 535.
WEERACHATYANUKUL, W., M. RATTANACHAIYANONT, E. CARMONA, A. FURIMSKY, A. MAI, A. SHOUSHTARIAN, S. SIRICHOTIYAKUL, H. BALLAKIER, A. LEADER, N. TANPHAICHITR (2001): Sulfogalactosylglycerolipid is involved in human gamete interaction. Mol. Reprod. Dev. 60, 569 - 578.
WELLS, P. G., G. P. McCALLUM, C. S. CHEN, J. T. HENDERSON, C. J. J. LEE, J. PERSTIN, T. J. PRESTON, M. J. WILEY, A. W. WONG (2009): Oxidative stress in developmental origins of disease: teratogenesis, neurodevelopmental deficits, and cancer. Toxicol. Sci. 108, 4 - 18.

WHITE, I. G., P. GOH, J. K. VOGLMAYR (1987): Effect of male reproductive tract fluids and proteins on the metabolism and motility of ram spermatozoa. Arch. Androl. 19, 115 - 125.

WHITFIELD, J. B. (2001): Gamma glutamyl transferase. Crit. Rev. Clin. Lab. Sci. 38, 263 - 355.

WHITIN, J. C., S. BHAMRE, D. M. THAM, H. J. COHEN (2002): Extracellular glutathione peroxidase is secreted basolaterally by human renal proximal tubule cells. Am. J. Physiol. Renal Physiol. 283, F20 - F28.

WHO (2010): World Health Organization: WHO laboratory manual for the examination of human sperm and semen-cervical mucus interaction. 5th ed., WHO Press, Geneva.

WINGLER, K., M. BOCHER, L. FLOHÉ, H. KOLLMUS, R. BRIGELIUS-FLOHÉ (1999): mRNA stability and selenocysteine insertion sequence efficiency rank gastrointestinal glutathione peroxidase high in the hierarchy of selenoproteins. Eur. J. Biochem. 259, 149 - 157.

WINTERBOURN, C. C., A. STERN (1987): Human red cells scavenge extracellular hydrogen peroxide and inhibit formation of hypochlorous acid and hydroxyl radical. J. Clin. Invest. 80, 1486 - 1491.

WISE, T., L. D. YOUNG, W. G. POND (1993): Reproductive endocrine and organ weight differences of swine selected for high or low serum cholesterol. J. Anim. Sci. 71, 2732 - 2738.

WITTE, T. S., S. SCHÄFER-SOMI (2007): Involvement of cholesterol, calcium and progesterone in the induction of capacitation and acrosome reaction of mammalian spermatozoa. Anim. Reprod. Sci. 102, 181 - 193.

WOLF, J., J. SMITAL (2009a): Effects in genetic evaluation for semen traits in Czech Large White and Czech Landrace boars. Czech J. Anim. Sci. 54, 349 - 358.

WOLF, J., J. SMITAL (2009b): Quantification of factors affecting semen traits in artificial insemination boars from animal model analyses. J. Anim. Sci. 87, 1620 - 1627.

WONG, W. Y., G. FLIK, P. M. GROENEN, D. W. SWINKELS, C. M. THOMAS, J. H. COPIUS-PEEREBOOM, H. M. MERKUS, R. P. STEEGERS-THEUNISSEN (2001):The impact of calcium, magnesium, zinc, and copper in blood and seminal plasma on semen parameters in men. Reprod. Toxicol. 15, 131 - 136.

WU, G., Y. Z. FANG, S. YANG, J. R. LUPTON, N. D. TURNER (2004): Glutathione metabolism and its implications for health. J. Nutr. 134, 489 - 492.

WUERGES, J., J. W. LEE, Y. I. YIM, H. S. YIM, SA-OUK KANG, K. DJINOVIC CARUGO (2004): Crystal structure of nickel-containing superoxide dismutase reveals another type of active site. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101, 8569 - 8574.

WYSOCKI, P., J. STRZEZEK (2003): Purification and characterization of a protein tyrosine acid phosphatase from boar seminal vesicle glands. Theriogenology 59, 1011 - 1025.

WYSOCKI, P., J. STRZEZEK (2006): Isolation and biochemical characteristics of a molecular form of epididymal acid phosphatase of boar seminal plasma. Theriogenology 66, 2152 - 2159.

WYSOKIŃSKA, A., S. KONDRACKI, D. BANASZEWSKA (2009): Morphometrical characteristics of spermatozoa in Polish Landrace boars with regard to the number of spermatozoa in an ejaculate. Reprod. Biol. 9, 271 - 282.

YADAV, S. B., A. N. SURYAKAR, A. D. HUDDEDAR, P. P. DURGAWALE, P. S. SHUKLA (2006): Antioxidant treatment a new therapeutic approach to reversible male infertility. Biomed. Res. 17, 175 - 178.

YAMADA, Y., G. V. LIMMON, D. ZHENG, N. LI, L. LI, L. YIN, V. T. CHOW, J. CHEN, B. P. ENGELWARD (2012): Major shifts in the spatio-temporal distribution of lung antioxidant enzymes during influenza pneumonia. PLoS One 7, e31494.

YASTE OLIVER, M. (2008): New insights into boar sperm function and survival from integrated field and laboratory studies. PhD Thesis. University de Girona, Girona, Spain.
YENI, D., M. GUNDOGAN, I. H. CIGERCI, F. AVDATEK, A. F. FIDAN (2010): Seasonal variation of oxidative stress parameters in ram seminal plasma. J. Anim. Vet. Adv. 9, 49 - 54.
YOKOYAMA, H. (2007): Gamma glutamyl transpeptidase (gammaGTP) in the era of metabolic syndrome. Nihon Arukoru Yakubutsu Igakkai Zasshi (in Japanese) 42, 110 - 124.
YOUNG, I. S., J. V. WOODSIDE (2001): Antioxidants in health and disease. J. Clinc. Pathol. 54, 176 - 186.
ZAKOŠEK PIPAN, M., J. MRKUN, M. KOSEC, A. NEMEC SVETE, P. ZRIMŠEK (2014): The effect of dialysis on the lipid peroxidation and antioxidant status of boar seminal plasma during liquid preservation. Vet. arhiv 84, 129 - 141.
ZALATA, A. A., A. B. CHRISTOPHE, C. E. DEPUYDT, F. SCHOONJANS, F. H. COMHAIRE (1998): White blood cells cause oxidative damage to the fatty acid composition of phospholipids of human spermatozoa. Int. J. Andro. 21, 154 - 162.
ZANEVELD, L. J., C. J. DE JONGE, R. A. ANDERSON, S. R. MACK (1991): Human sperm capacitation and the acrosome reaction. Hum. Reprod. 6, 1265 - 1274.
ZDUŃCZYK, S., T. JANOWSKI, A. RAŚ, W. BARAŃSKI (2011): Concentrations of oestrogens in blood plasma and seminal plasma of boars during the postpuberal period. Pol. J. Vet. Sci. 14, 539 - 544.
ZHANG, L., X. NING, L. CHEN, C. LI, F. LIU, Q. WANG, H. WU, J. ZHAO (2012): Molecular cloning and expression analysis of a selenium-independent glutathione peroxidase identified from Manila clam *Venerupis philippinarum*. Aquacult. Res. 43, 1176 - 1183.
ZHANG, R. S., H. J. SUN, L. W. ZHENG (2010): Correlation of the contents of trace elements in male body fluids with sperm quality. Zhonghua Nan Ke Xue. 16, 1019 - 1022.
ZHAO, R. P., C. L. XIONG (2005): Zinc content analysis in serum, seminal plasma and spermatozoa of asthenozoospermic and oligoasthenozoospermic patients. Zhonghua Nan Ke Xue. 11, 680 - 682.
ZHU, Y., S. H. PARK, O. OZDEN, H. S. KIM, H. JIANG, A. VASSILOPOULOS, D. R. SPITZ, D. GIUS (2012): Exploring the electrostatic repulsion model in the role of Sirt3 in directing Mn-SOD acetylation status and enzymatic activity. Free Radic. Biol. Med. 53, 828 - 833.

9. PRILOZI

9.1. TABLICE

Tablica 9.1.1. Volumen sjemena rasplodnih nerasta različitih pasmina i PIC-hibrida (mL).

	Švedski landras	Njemački landras	Veliki jorkšir	Pietren	PIC-hibrid
N	5	6	5	6	5
Minimum	70,00	80,00	70,00	50,00	50,00
Maksimum	200,00	160,00	140,00	140,00	80,00
M	100,00	123,33	102,00	96,67	72,00
SD	56,13	34,45	28,64	35,02	13,04
SE	25,10	14,06	12,81	14,30	5,83
Medijan	80,00	120,00	100,00	100,00	80,00
Q1	70,00	100,00	80,00	70,00	70,00
Q3	80,00	160,00	120,00	120,00	80,00
KV%	56,13	27,73	28,07	36,23	18,11

Tablica 9.1.2. Progresivna gibljivost spermija u nativnom uzorku sjemena nerasta različitih pasmina i PIC-hibrida (%).

	Švedski landras	Njemački landras	Veliki jorkšir	Pietren	PIC-hibrid
N	5	6	5	6	5
Minimum	70,00	70,00	70,00	75,00	70,00
Maksimum	85,00	85,00	75,00	85,00	80,00
M	75,00	78,00	74,00	79,17	78,00
SD	6,12	5,16	2,24	3,76	4,47
SE	2,74	2,11	1,00	1,54	2,00
Medijan	75,00	80,00	75,00	80,00	80,00
Q1	70,00	75,00	75,00	75,00	80,00
Q3	75,00	80,00	75,00	80,00	80,00
KV%	8,17	6,59	3,02	4,75	5,73

Tablica 9.1.3. Gustoća sjemena u nerasta različitih pasmina i PIC-hibrida (10^9/mL).

	Švedski landras	Njemački landras	Veliki jorkšir	Pietren	PIC-hibrid
N	5	6	5	6	5
Minimum	0,35	0,25	0,54	0,25	0,48
Maksimum	0,98	0,51	1,00	0,87	0,98
M	0,79	0,35	0,74	0,47	0,82
SD	0,28	0,10	0,20	0,23	0,22
SE	0,13	0,04	0,09	0,09	0,01
Medijan	0,97	0,32	0,67	0,43	0,96
Q1	0,65	0,27	0,60	0,28	0,72
Q3	0,98	0,40	0,89	0,57	0,97
KV%	36,12	29,33	26,36	49,02	26,70

Tablica 9.1.4. Aktivnost alkalne fosfataze u sjemenoj plazmi nerasta različitih pasmina i PIC-hibrida (U/L).

	Švedski landras	Njemački landras	Veliki jorkšir	Pietren	PIC-hibrid
N	5	6	5	6	5
Minimum	83400	79200	63900	79800	134700
Maksimum	427500	192900	240600	309300	238200
M	232740	123500	153660	196150	180780
SD	148147	50771	84342	106495	41364
SE	66253	20727	37719	43476	18499
Medijan	165600	100950	153000	199500	190800
Q1	136800	85200	75300	103500	146700
Q3	350400	181800	235500	285300	193500
KV%	64	41	55	54	23

Tablica 9.1.5. Aktivnost kisele fosfataze u sjemenoj plazmi nerasta različitih pasmina i PIC-hibrida (U/L).

	Švedski landras	Njemački landras	Veliki jorkšir	Pietren	PIC-hibrid
N	5	6	5	6	5
Minimum	7,00	12,00	6,00	14,00	17,00
Maksimum	20,00	47,00	40,00	67,00	33,00
M	13,40	22,83	17,40	28,50	21,20
SD	5,41	12,69	13,45	20,05	6,69
SE	2,42	5,18	6,01	8,18	2,99
Medijan	14,00	19,00	14,00	21,00	18,00
Q1	9,00	15,00	9,00	15,00	18,00
Q3	17,00	25,00	18,00	33,00	20,00
KV%	40,40	55,57	77,28	70,34	31,54

Tablica 9.1.6. Aktivnost γ-glutamil transferaze u sjemenoj plazmi nerasta različitih pasmina i PIC-hibrida (U/L).

	Švedski landras	Njemački landras	Veliki jorkšir	Pietren	PIC-hibrid
N	5	6	5	6	5
Minimum	3100	8100	4300	3750	7350
Maksimum	8450	31300	15850	18500	13100
M	5160	16375	7920	11258	10340
SD	2035	9226	4688	5885	2124
SE	910	3767	2097	2403	950
Medijan	4650	13500	5850	10400	10000
Q1	4100	9300	5200	6750	9850
Q3	5500	2250	8400	17750	11400
KV%	40	56	59	52	21

Tablica 9.1.7. Aktivnost kreatin kinaze u sjemenoj plazmi nerasta različitih pasmina i PIC-hibrida (U/L).

	Švedski landras	Njemački landras	Veliki jorkšir	Pietren	PIC-hibrid
N	5	6	5	6	5
Minimum	5,00	4,00	5,00	4,00	9,00
Maksimum	9,00	29,00	29,00	23,00	25,00
M	6,60	12,50	12,20	14,67	18,80
SD	1,52	8,92	9,58	7,50	6,65
SE	0,68	3,64	4,28	3,06	2,97
Medijan	6,00	10,50	9,00	15,50	18,00
Q1	6,00	7,00	8,00	9,00	17,00
Q3	7,00	14,00	10,00	21,00	25,00
KV%	22,98	71,33	78,50	51,14	35,36

Tablica 9.1.8. Aktivnost laktat dehidrogenaze u sjemenoj plazmi nerasta različitih pasmina i PIC-hibrida (U/L).

	Švedski landras	Njemački landras	Veliki jorkšir	Pietren	PIC-hibrid
N	5	6	5	6	5
Minimum	85,00	99,00	97,00	100,00	302,00
Maksimum	198,00	1141,00	413,00	719,00	809,00
M	148,40	481,83	208,60	380,50	427,00
SD	43,25	382,33	124,65	212,72	214,37
SE	19,34	156,09	55,74	86,84	95,87
Medijan	165,00	380,50	165,00	321,50	340,00
Q1	128,00	221,00	135,00	302,00	331,00
Q3	166,00	669,00	233,00	519,00	351,00
KV%	29,14	79,35	59,75	55,91	50,20

Tablica 9.1.9. Koncentracija ukupnih bjelančevina u sjemenoj plazmi nerasta različitih pasmina i PIC-hibrida (g/L).

	Švedski landras	Njemački landras	Veliki jorkšir	Pietren	PIC-hibrid
N	5	6	5	6	5
Minimum	18,00	22,00	6,00	11,00	35,00
Maksimum	41,00	38,00	34,00	56,00	41,00
M	29,60	29,50	20,60	29,67	38,00
SD	9,53	6,57	11,74	15,55	2,55
SE	4,26	2,68	5,25	6,35	1,14
Medijan	29,00	29,00	18,00	25,50	38,00
Q1	23,00	23,00	14,00	22,00	36,00
Q3	37,00	36,00	31,00	38,00	40,00
KV%	32,19	22,25	56,98	52,42	6,71

Tablica 9.1.10. Koncentracija albumina u sjemenoj plazmi nerasta različitih pasmina i PIC-hibrida (g/L).

	Švedski landras	Njemački landras	Veliki jorkšir	Pietren	PIC-hibrid
N	5	6	5	6	5
Minimum	4,00	2,50	2,70	1,30	3,90
Maksimum	8,00	4,40	6,30	6,50	5,40
M	6,06	3,67	4,36	4,47	4,84
SD	1,67	0,70	1,29	2,06	0,63
SE	0,75	0,29	0,58	0,84	0,28
Medijan	6,00	3,70	4,20	5,00	5,10
Q1	4,90	3,40	4,10	2,80	4,50
Q3	7,40	4,30	4,50	6,20	5,30
KV%	27,55	19,10	29,53	46,14	13,03

Tablica 9.1.11. Koncentracija ukupnog kolesterola u sjemenoj plazmi nerasta različitih pasmina i PIC-hibrida (mmol/L).

	Švedski landras	Njemački landras	Veliki jorkšir	Pietren	PIC-hibrid
N	5	6	5	6	5
Minimum	0,012	0,005	0,028	0,007	0,076
Maksimum	0,133	0,012	0,181	0,092	0,390
M	0,057	0,009	0,080	0,040	0,189
SD	0,050	0,004	0,063	0,037	0,126
SE	0,022	0,002	0,028	0,015	0,056
Medijan	0,041	0,010	0,079	0,026	0,174
Q1	0,021	0,005	0,028	0,009	0,092
Q3	0,078	0,012	0,083	0,078	0,211
KV%	86,81	40,13	78,31	93,92	66,70

Tablica 9.1.12. Koncentracija HDL-kolesterola u sjemenoj plazmi nerasta različitih pasmina i PIC-hibrida (mmol/L).

	Švedski landras	Njemački landras	Veliki jorkšir	Pietren	PIC-hibrid
N	5	6	5	6	5
Minimum	0,002	0,008	0,021	0,012	0,026
Maksimum	0,042	0,030	0,040	0,069	0,053
M	0,021	0,017	0,027	0,027	0,038
SD	0,017	0,009	0,008	0,022	0,010
SE	0,008	0,004	0,003	0,009	0,005
Medijan	0,016	0,016	0,023	0,019	0,036
Q1	0,011	0,010	0,023	0,013	0,033
Q3	0,036	0,024	0,027	0,030	0,040
KV%	79,27	48,77	28,71	80,67	26,64

Tablica 9.1.13. Koncentracija LDL-kolesterola u sjemenoj plazmi nerasta različitih pasmina i PIC-hibrida (mmol/L).

	Švedski landras	Njemački landras	Veliki jorkšir	Pietren	PIC-hibrid
N	5	6	5	6	5
Minimum	0,03	0,02	0,07	0,02	0,17
Maksimum	0,16	0,06	0,21	0,10	0,39
M	0,08	0,04	0,12	0,06	0,22
SD	0,05	0,02	0,05	0,03	0, 10
SE	0,02	0,01	0,02	0,01	0,04
Medijan	0,07	0,03	0,10	0,06	0,18
Q1	0,06	0,02	0,10	0,04	0,18
Q3	0,09	0,04	0,11	0,08	0,18
KV%	59,85	42,17	45,12	48,60	43,56

Tablica 9.1.14. Koncentracija triacilglicerola u sjemenoj plazmi nerasta različitih pasmina i PIC-hibrida (mmol/L).

	Švedski landras	Njemački landras	Veliki jorkšir	Pietren	PIC-hibrid
N	5	6	5	6	5
Minimum	0,02	0,02	0,04	0,02	0,14
Maksimum	0,28	0,20	0,10	0,06	0,25
M	0,18	0,07	0,06	0,04	0,20
SD	0,10	0,07	0,02	0,02	0, 06
SE	0,05	0,03	0,01	0,01	0,03
Medijan	0,18	0,04	0,05	0,03	0,21
Q1	0,17	0,03	0,05	0,02	0,14
Q3	0,24	0,12	0,07	0,06	0,25
KV%	55,85	97,05	36,78	47,25	28,11

Tablica 9.1.15. Koncentracija kalcija u sjemenoj plazmi nerasta različitih pasmina i PIC-hibrida (mmol/L).

	Švedski landras	Njemački landras	Veliki jorkšir	Pietren	PIC-hibrid
N	5	6	5	6	5
Minimum	0,93	0,66	0,54	0,43	0,99
Maksimum	1,89	0,81	1,29	1,63	1,10
M	1,36	0,74	0,96	0,96	1,04
SD	0,43	0,06	0,27	0,43	0, 43
SE	0,19	0,03	0,12	0,18	0,02
Medijan	1,30	0,75	0,99	0,94	1,05
Q1	0,97	0,66	0,98	0,60	1,01
Q3	1,69	0,78	1,01	1,22	1,06
KV%	31,51	8,51	27,95	44,97	4,15

Tablica 9.1.16. Koncentracija magnezija u sjemenoj plazmi nerasta različitih pasmina i PIC-hibrida (mmol/L).

	Švedski landras	Njemački landras	Veliki jorkšir	Pietren	PIC-hibrid
N	5	6	5	6	5
Minimum	7,50	10,20	10,90	5,00	10,00
Maksimum	28,80	18,10	23,80	26,60	20,90
M	20,66	15,10	17,02	16,85	16,46
SD	8,41	3,59	5,27	7,84	4,02
SE	3,76	1,47	2,36	3,20	1,80
Medijan	23,10	16,65	18,20	19,15	16,90
Q1	17,80	10,90	12,60	10,40	16,30
Q3	26,10	18,10	19,60	20,80	18,20
KV%	40,73	23,80	30,95	46,50	24,43

Tablica 9.1.17. Koncentracija cinka u sjemenoj plazmi nerasta različitih pasmina i PIC-hibrida (mmol/L).

	Švedski landras	Njemački landras	Veliki jorkšir	Pietren	PIC-hibrid
N	4	6	5	6	4
Minimum	95,19	98,10	105,99	82,81	100,69
Maksimum	112,30	108,84	109.68	111,16	108,51
M	106,73	105,74	107,22	102,96	106,07
SD	7,88	3,85	1,43	11,34	3,69
SE	3,94	1,57	0,64	4,63	1,84
Medijan	109,72	107,02	106,81	108,20	107,54
Q1	101,73	106,13	106,61	96,31	103,67
Q3	111,73	107,35	107,01	111,05	108,47
KV%	7,38	3,64	1,33	11,02	3,48

Tablica 9.1.18. Koncentracija ukupnog antioksidacijskoga statusa (TAS) u sjemenoj plazmi nerasta različitih pasmina i PIC-hibrida (mmol/L).

	Švedski landras	Njemački landras	Veliki jorkšir	Pietren	PIC-hibrid
N	5	6	5	6	5
Minimum	1,31	1,23	1,46	1,03	1,45
Maksimum	1,49	1,58	1,56	1,51	4,83
M	1,40	1,41	1,50	1,34	2,73
SD	0,07	0,15	0,04	0,17	1,71
SE	0,03	0,06	0,02	0,07	0,77
Medijan	1,41	1,43	1,49	1,35	1,56
Q1	1,37	1,28	1,48	1,31	1,45
Q3	1,45	1,52	1,50	1,50	4,37
KV%	5,12	10,57	2,35	13,01	62,70

Tablica 9.1.19. Aktivnost ukupne glutation peroksidaze (GSH-Px) u sjemenoj plazmi nerasta različitih pasmina i PIC-hibrida (U/L).

	Švedski landras	Njemački landras	Veliki jorkšir	Pietren	PIC-hibrid
N	5	6	5	6	5
Minimum	105,00	95,00	124,00	48,00	126,00
Maksimum	358,00	512,00	303,00	322,00	462,00
M	216,80	231,83	194,20	158,83	262,00
SD	117,32	149,44	67,59	95,96	140,20
SE	52,47	61,01	30,23	39,17	62,70
Medijan	200,00	193,00	172,00	144,00	291,00
Q1	105,00	131,00	165,00	100,00	129,00
Q3	316,00	267,00	207,00	195,00	302,00
KV%	54,12	64,46	34,81	60,41	53,51

Tablica 9.1.20. Aktivnost ukupne superoksid dismutaze (TSOD) u sjemenoj plazmi nerasta različitih pasmina i PIC-hibrida (U/L).

	Švedski landras	Njemački landras	Veliki jorkšir	Pietren	PIC-hibrid
N	5	6	5	6	5
Minimum	0,16	0,18	0,16	0,06	0,17
Maksimum	0,21	0,21	0,22	0,21	0,21
M	0,19	0,19	0,20	0,16	0,19
SD	0,02	0,01	0,02	0,07	0,02
SE	0,01	0,005	0,01	0,03	0,01
Medijan	0,20	0,19	0,19	0,19	0,19
Q1	0,17	0,18	0,19	0,09	0,18
Q3	0,21	0,20	0,22	0,21	0,21
KV%	11,84	6,33	11,53	43,21	8,28

Tablica 9.1.21. Koncentracija ukupnog antioksidacijskoga statusa (TAS) u ispranih spermija nerasta različitih pasmina i PIC-hibrida (mmol/g bjelančevina).

	Švedski landras	Njemački landras	Veliki jorkšir	Pietren	PIC-hibrid
N	5	6	5	6	5
Minimum	0,29	0,17	0,18	0,19	0,14
Maksimum	0,55	0,52	0,34	0,37	0,22
M	0,41	0,27	0,25	0,28	0,18
SD	0,12	0,14	0,07	0,07	0,03
SE	0,06	0,06	0,03	0,03	0,01
Medijan	0,34	0,20	0,21	0,30	0,18
Q1	0,33	0,19	0,20	0,22	0,17
Q3	0,53	0,34	0,29	0,32	0,19
KV%	29,83	51,47	28,28	23,22	17,25

Tablica 9.1.22. Aktivnost ukupne glutation peroksidaze (GSH-Px) u ispranih spermija nerasta različitih pasmina i PIC-hibrida (U/g bjelančevina).

	Švedski landras	Njemački landras	Veliki jorkšir	Pietren	PIC-hibrid
N	5	6	5	6	5
Minimum	53,59	30,09	30,27	27,08	18,19
Maksimum	92,64	87,11	72,26	57,69	31,14
M	72,47	46,22	45,67	45,90	24,88
SD	18,63	22,00	16,56	11,84	4,64
SE	8,33	8,98	7,41	4,83	2,08
Medijan	63,85	35,78	40,52	49,96	24,73
Q1	59,96	33,00	35,31	36,13	24,13
Q3	92,33	55,56	50,00	54,59	26,19
KV%	25,71	47,61	36,26	25,78	18,67

Tablica 9.1.23. Aktivnost ukupne superoksid dismutaze (TSOD) u ispranih spermija nerasta različitih pasmina i PIC-hibrida (U/g bjelančevina).

	Švedski landras	Njemački landras	Veliki jorkšir	Pietren	PIC-hibrid
N	5	6	5	6	5
Minimum	1332,83	698,05	777,07	739,10	465,91
Maksimum	2784,53	2503,02	1689,20	1684,46	865,71
M	2037,69	1246,64	1114,97	1235,61	632,11
SD	671,22	690,64	386,20	346,26	145,13
SE	300,18	281,95	172,71	141,36	64,91
Medijan	1730,81	922,03	913,28	1325,34	609,24
Q1	1614,14	836,80	861,62	920,08	593,29
Q3	2726,14	1597,88	1333,66	1419,34	626,39
KV%	32,94	55,40	34,64	28,02	22,96

Tablica 9.1.24. Aktivnost manganske superoksid dismutaze (MnSOD) u ispranih spermija nerasta različitih pasmina i PIC-hibrida (U/g bjelančevina).

	Švedski landras	Njemački landras	Veliki jorkšir	Pietren	PIC-hibrid
N	5	5	5	4	5
Minimum	142,27	136,21	140,06	165,88	134,22
Maksimum	266,50	328,22	496,19	366,31	193.32
M	220,92	211,59	264,68	283,25	159,57
SD	60,91	88,68	152,18	93,38	24,16
SE	27,24	39,66	68,06	46,69	10,81
Medijan	263,46	164,85	176,84	300,40	156,55
Q1	167,60	143,73	166,81	208,40	140,59
Q3	264,77	284,94	343,48	358,09	173,16
KV%	27,57	41,91	57,50	32,97	15,14

Tablica 9.1.25. Aktivnost bakar, cink superoksid dismutaze (CuZnSOD) u ispranih spermija nerasta različitih pasmina i PIC-hibrida (U/g bjelančevina).

	Švedski landras	Njemački landras	Veliki jorkšir	Pietren	PIC-hibrid
N	5	5	5	4	5
Minimum	1190,56	554,32	610,26	570,21	325,32
Maksimum	2521,07	2174,80	1193,01	1318,15	692,55
M	1816,77	1117,01	850,29	875,93	472,54
SD	629,33	654,63	238,73	368,91	136,89
SE	281,44	292,76	106,76	184,45	61,22
Medijan	1563,21	798,55	773,22	807,68	436,74
Q1	1349,37	744,45	684,78	571,72	415,92
Q3	2459,64	1312,94	990,18	1180,14	492,17
KV%	34,64	58,61	28,08	42,12	28,97

Tablica 9.1.26. Koncentracija ukupnog antioksidacijskoga statusa (TAS) u spermija velike gibljivosti (>90%) nerasta različitih pasmina i PIC-hibrida (mmol/g bjelančevina).

	Švedski landras	Njemački landras	Veliki jorkšir	Pietren	PIC-hibrid
N	5	6	5	6	5
Minimum	0,22	0,26	0,24	0,26	0,30
Maksimum	1,18	1,41	0,47	0,71	0,73
M	0,65	0,55	0,34	0,47	0,46
SD	0,39	0,43	0,11	0,15	0,16
SE	0,18	0,18	0,05	0,06	0,07
Medijan	0,50	0,41	0,29	0,46	0,43
Q1	0,41	0,32	0,25	0,41	0,39
Q3	0,91	0,52	0,44	0,51	0,46
KV%	60,78	77,28	31,95	31,55	35,13

Tablica 9.1.27. Aktivnost ukupne glutation peroksidaze (GSH-Px) u spermija velike gibljivosti (>90%) nerasta različitih pasmina i PIC-hibrida (U/g bjelančevina).

	Švedski landras	Njemački landras	Veliki jorkšir	Pietren	PIC-hibrid
N	5	6	5	6	5
Minimum	37,52	56,74	46,37	48,86	56,12
Maksimum	266,67	329,34	120,65	144,48	156,61
M	143,28	124,05	78,75	95,83	95,20
SD	92,45	102,14	30,92	31,44	37,22
SE	41,34	41,70	13,83	12,83	16,64
Medijan	111,00	90,59	66,16	97,99	85,46
Q1	93,04	69,50	59,59	81,10	83,10
Q3	208,17	107,52	100,99	104,59	94,72
KV%	64,52	82,34	39,26	32,80	39,09

Tablica 9.1.28. Aktivnost ukupne superoksid dismutaze (TSOD) u spermija velike gibljivosti (>90%) nerasta različitih pasmina i PIC-hibrida (U/g bjelančevina).

	Švedski landras	Njemački landras	Veliki jorkšir	Pietren	PIC-hibrid
N	5	6	5	6	5
Minimum	200,57	603,26	759,42	949,62	1034,29
Maksimum	3064,40	2946,41	1915,60	2712,18	2833,33
M	1707,71	1669,87	1214,80	1723,17	1780,67
SD	1174,39	808,28	495,24	597,50	657,37
SE	525,20	329,98	221,48	243,93	293,99
Medijan	1751,30	1546,33	1097,83	1630,02	1704,71
Q1	925,36	1210,31	789,59	1425,05	1540,83
Q3	2596,92	2166,60	1511,55	1992,12	1790,19
KV%	68,78	48,40	40,77	34,67	36,92

Tablica 9.1.29. Aktivnost manganske superoksid dismutaze (MnSOD) u spermija velike gibljivosti (>90%) nerasta različitih pasmina i PIC-hibrida.

	Švedski landras	Njemački landras	Veliki jorkšir	Pietren	PIC-hibrid
N	4	6	5	6	5
Minimum	51,32	12,19	62,13	73,85	129,02
Maksimum	150,58	245,62	176,11	150,57	344,73
M	106,98	120,52	98,89	106,17	235,85
SD	41,61	74,50	47,65	26,19	85,45
SE	20,81	30,41	21,31	10,69	38,21
Medijan	113,00	119,53	80,96	106,51	261,95
Q1	78,23	101,85	63,21	86,91	172,47
Q3	135,73	124,40	112,07	112,68	271,06
KV%	38,90	61,81	48,18	24,67	36,23

Tablica 9.1.30. Aktivnost bakar, cink superoksid dismutaze (CuZnSOD) u spermija velike gibljivosti (>90%) nerasta različitih pasmina i PIC-hibrida.

	Švedski landras	Njemački landras	Veliki jorkšir	Pietren	PIC-hibrid
N	4	6	5	6	5
Minimum	874,03	591,07	696,21	862,71	861,82
Maksimum	2913,81	2826,95	1739,50	2561,61	2704,31
M	1977,52	1549,35	1115,90	1617,00	1544,83
SD	909,08	766,87	452,15	575,22	693,00
SE	454,54	313,07	202,21	234,83	309,92
Medijan	2061,11	1433,21	1035,70	1520,17	1359,98
Q1	1252,23	1090,71	708,63	1351,19	1269,77
Q3	2702,80	1920,98	1399,49	1886,14	1528,25
KV%	45,97	49,50	40,52	35,57	44,86

Tablica 9.1.31. Koncentracija ukupnog antioksidacijskoga statusa (TAS) u patoloških oblika spermija nerasta različitih pasmina i PIC-hibrida.

	Švedski landras	Njemački landras	Veliki jorkšir	Pietren	PIC-hibrid
N	5	6	5	6	5
Minimum	1,02	0,68	0,30	0,29	0,43
Maksimum	2,75	3,42	8,97	2,37	1,60
M	1,68	1,71	4,21	0,98	0,95
SD	0,70	0,97	4,15	0,71	0,45
SE	0,31	0,40	1,86	0,29	0,20
Medijan	1,54	1,44	2,79	0,77	0,87
Q1	1,15	1,10	0,69	0,77	0,69
Q3	1,95	2,19	8,28	0,92	1,15
KV%	41,67	56,92	98,69	72,63	47,12

Tablica 9.1.32. Aktivnost ukupne glutation peroksidaze (GSH-Px) u patoloških oblika spermija nerasta različitih pasmina i PIC-hibrida.

	Švedski landras	Njemački landras	Veliki jorkšir	Pietren	PIC-hibrid
N	5	6	5	6	5
Minimum	207,55	126,46	50,12	49,79	73,37
Maksimum	525,00	677,22	1931,03	439,66	306,18
M	327,59	339,94	878,44	182,11	179,63
SD	131,94	199,88	868,89	133,06	89,09
SE	59,01	81,60	388,58	54,32	39,84
Medijan	284,92	274,61	621,05	147,47	171,85
Q1	227,08	217,13	133,73	135,90	126,98
Q3	393,38	469,64	1656,25	172,36	219,76
KV%	40,28	58,80	98,91	73,07	49,60

Tablica 9.1.33. Aktivnost ukupne superoksid dismutaze (TSOD) u patoloških oblika spermija nerasta različitih pasmina i PIC-hibrida.

	Švedski landras	Njemački landras	Veliki jorkšir	Pietren	PIC-hibrid
N	5	6	5	6	5
Minimum	3167,36	2504,10	848,71	915,06	1489,40
Maksimum	9824,50	11304,43	13448,28	7607,33	5873,03
M	5893,82	5749,02	5980,25	3396,49	3456,07
SD	2659,96	3098,05	4971,47	2230,34	1694,85
SE	1189,57	1264,77	2223,31	910,53	757,96
Medijan	4762,85	4706,41	5068,42	2850,07	3155,70
Q1	4419,17	4205,98	2537,40	2778,49	2464,85
Q3	7295,22	7066,80	7998,44	3377,95	4297,38
KV%	45,13	53,89	83,13	65,67	49,04

Tablica 9.1.34. Koncentracija ukupnog antioksidacijskoga statusa (TAS) u spermija vrlo male gibljivosti (<20%) nerasta različitih pasmina i PIC-hibrida.

	Švedski landras	Njemački landras	Veliki jorkšir	Pietren	PIC-hibrid
N	3	5	5	6	5
Minimum	0,15	0,10	0,14	0,13	0,21
Maksimum	0,17	0,17	0,19	0,19	0,25
M	0,16	0,13	0,15	0,16	0,23
SD	0,01	0,03	0,02	0,02	0,01
SE	0,005	0,01	0,01	0,01	0,01
Medijan	0,16	0,13	0,15	0,16	0,23
Q1	0,15	0,12	0,14	0,14	0,22
Q3	0,17	0,15	0,16	0,17	0,24
KV%	5,28	20,54	12,92	13,70	6,20

Tablica 9.1.35. Aktivnost ukupne glutation peroksidaze (GSH-Px) u spermija vrlo male gibljivosti (<20%) nerasta različitih pasmina i PIC-hibrida.

	Švedski landras	Njemački landras	Veliki jorkšir	Pietren	PIC-hibrid
N	3	5	5	5	5
Minimum	23,97	18,78	25,54	20,03	22,22
Maksimum	41,76	34,57	36,19	29,94	48.69
M	34,24	27,04	31,02	25,24	33,78
SD	9,20	5,92	4,15	3,98	10,42
SE	5,31	2,65	1,86	1,78	4,66
Medijan	36,98	27,92	32,46	24,66	36,07
Q1	23,98	24,27	28,29	23,21	25,63
Q3	41,76	29,64	32,61	28,37	36,31
KV%	26,88	13,37	98,91	15,78	30,84

Tablica 9.1.36. Aktivnost ukupne superoksid dismutaze (TSOD) u spermija vrlo male gibljivosti (<20%) nerasta različitih pasmina i PIC-hibrida.

	Švedski landras	Njemački landras	Veliki jorkšir	Pietren	PIC-hibrid
N	4	6	5	6	5
Minimum	80,02	85,94	252,96	176,12	300,98
Maksimum	259,18	242,83	322,05	312,12	331,05
M	131,67	182,62	297,12	255,44	312,93
SD	85,95	56,43	27,87	50,59	12,41
SE	42,98	23,04	12,46	20,66	5,55
Medijan	93,74	186,03	310,25	261,59	312,85
Q1	80,17	166,72	287,04	222,58	301,95
Q3	183,17	228,16	313,30	298,66	317,80
KV%	65,28	30,90	9,38	19,81	3,96

Tablica 9.1.37. Koncentracija ukupnog antioksidacijskoga statusa (TAS) u spermija različitih morfologijskih oblika i gibljivosti u svih nerasta.

	Isprani spermiji	Spermiji velike gibljivosti	Patološki oblici spermija	Speriji vrlo male gibljivosti
N	27	27	27	24
Minimum	0,14	0,22	0,29	0,10
Maksimum	0,55	1,41	8,97	0,25
M	0,28	0,50	1,86	0,17
SD	0,11	0,28	2,11	0,04
SE	0,02	0,05	0,41	0,01
Medijan	0,22	0,43	1,15	0,16
Q1	0,19	0,30	0,77	0,14
Q3	0,34	0,51	2,19	0,19
KV%	41,30	56,80	113,08	22,81

Tablica 9.1.38. Aktivnost ukupne glutation peroksidaze (GSH-Px) u spermija različitih morfologijskih oblika i gibljivosti u svih nerasta.

	Isprani spermiji	Spermiji velike gibljivosti	Patološki oblici spermija	Speriji vrlo male gibljivosti
N	27	27	27	23
Minimum	18,19	37,52	49,79	18,78
Maksimum	92,64	329,34	1931,03	48,69
M	46,96	107,61	372,61	29,92
SD	20,94	66,33	443,30	7,27
SE	4,03	12,76	85,25	1,52
Medijan	40,52	92,30	219,76	28,37
Q1	30,27	66,17	135,90	24,27
Q3	57,69	111,00	439,66	36,07
KV%	44,60	61,64	118,97	24,31

Tablica 9.1.39. Aktivnost ukupne superoksid dismutaze (TSOD) u spermija različitih morfologijskih oblika i gibljivosti u svih nerasta.

	Isprani spermiji	Spermiji velike gibljivosti	Patološki oblici spermija	Speriji vrlo male gibljivosti
N	27	27	27	26
Minimum	465,91	200,57	848,71	80,02
Maksimum	2784,53	3064,40	13448,28	331,05
M	1252,49	1624,97	4871,25	238,66
SD	637,63	742,77	3104,45	81,39
SE	122,62	142,84	597,01	15,96
Medijan	963,40	1540,83	4297,38	256,07
Q1	777,07	1034,29	2778,49	176,12
Q3	1614,14	1992,12	7066,80	310,25
KV%	50,91	45,71	63,73	34,10

Tablica 9.1.40. Aktivnost manganske superoksid dismutaze (MnSOD) u spermija različitih morfologijskih oblika i gibljivosti u svih nerasta.

	Isprani spermiji	Spermiji velike gibljivosti	Patološki oblici spermija
N	24	26	14
Minimum	134,22	12,19	26,67
Maksimum	496,19	344,73	474,24
M	225,70	133,14	184,92
SD	95,84	75,19	166,12
SE	19,56	14,74	44,42
Medijan	175,00	116,07	107,45
Q1	150,14	86,91	51,09
Q3	275,72	150,58	389,38
KV%	42,46	56,47	89,84

Tablica 9.1.41. Aktivnost bakar, cink superoksid dismutaze (CuZnSOD) u spermija različitih morfologijskih oblika i gibljivosti u svih nerasta.

	Isprani spermiji	Spermiji velike gibljivosti	Patološki oblici spermija
N	24	26	14
Minimum	325,32	591,07	797,62
Maksimum	2521,07	2913,81	7133,09
M	1032,78	1546,61	3228,78
SD	623,89	678,61	1694,58
SE	127,32	133,06	453,10
Medijan	785,89	1397,26	2773,35
Q1	571,72	1035,70	2357,26
Q3	1315,55	1886,14	4029,79
KV%	60,41	43,88	52,48

9.2. POPIS KORIŠTENIH SKRAĆENICA

$^1O_2$ - singletni kisik

4-HNE - 4-hidroksi-2-nonenal

ACP - kisela fosfataza (engl. acid phosphatase)

ALP - alkalna fosfataza (engl. alkaline phosphatases)

ALT - alanin aminotransferaza (engl. alanine transaminase)

AST- aspartat aminotransferaza (engl. aspartate aminotransferase)

ATP - adenozin trifosfat

cAMP - ciklički adenozin monofosfat

CAT - katalaza (engl. catalase)

CGSH-Px ili GSH-Px-1 - citosolna i mitohondrijska glutation peroksidaza

CK - kreatin kinaza (engl. creatine kinase)

CuZnSOD - bakar-cink superoksid dismutaza

DHA - dokozaheksaenska kiselina

DNK - deoksiribonukleinska kiselina

EC-SOD - izvanstanična superoksid dismutaza

eGSH-Px ili GSH-Px-5 - epididimska glutation peroksidaza

ERT - L-ergotionein

$FADH_2$ - reducirani flavinadenindinukleotid

G-6-PDH - glukoza-6-fosfat dehidrogenaza (engl. glucose-6-phosphate dehydrogenase)

GGT - gama-glutamil transferaza (engl. gamma glutamyl transferase)

GIGSH-PX ili GSH-Px-2 - gastrointestinalna glutation peroksidaza

GSH - reducirani glutation

GSH-Px - glutation peroksidaza (engl. glutathione peroxidase)

GSH-Px-6 - olfaktorna glutation peroksidaza

GSH-Px-8 - glutation peroksidaza 8

GSSG - oksidirani disulfidni glutation

H_2O_2 - vodikov peroksid

HDL - lipoproteini velike gustoće (engl. high density lipoprotein)

HDL-kolesterol - kolesterol vezan na lipoproteine velike gustoće

HHE - 4-hidroksi-2-heksanal

LDH - laktat dehidrogenaza (engl. lactate dehydrogenase)

LDL - lipoproteini male gustoće (engl. low density lipoprotein)

LDL-kolesterol - kolesterol vezan na lipoproteine male gustoće

LPO - lipidna peroksidacija (engl. lipid peroxidation)

MDA - malondialdehid

MnSOD - manganska superoksid dismutaza

$NADP^+$ - oksidirani oblik nikotinamidnog dinukleotida

NADPH - nikotinamid adenin dinukleotid fosfat

NPGSH-Px ili GSH-Px-7 - neselenocisteinska fosfolipidna hidroperoksidna glutation peroksidaza

$O_2^{\bullet-}$ - superoksidni anion

$OH^{\bullet-}$ - hidroksilni radikal

PGSH-Px ili GSH-Px-3 - plazmatska (izvanstanična) glutation peroksidaza

PHGSH-Px ili GSH-Px-4 - fosfolipidna hidroperoksidna glutation peroksidaza

PUFA - višestruko nezasićene masne kiseline (engl. polyunsaturated fatty acid)

RDS - reaktivni dušikovi spojevi

RNK - ribonukleinska kiselina

ROS - reaktivni kisikovi spojevi (engl. reactive oxygen species)

SOD - superoksid dismutaza (engl. superoxide dismutase)

TAS - ukupni antioksidacijski status (engl. total antioxidant status)

VLDL - lipoproteini vrlo male gustoće (engl. very low density lipoprotein)

10. ŽIVOTOPIS

Ivona Žura Žaja rođena je 3. studenoga 1979. godine u Kopru u Sloveniji. Osnovno i srednje obrazovanje završila je u Poreču. Studij veterinarske medicine na Veterinarskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu upisala je 1998. godine. Dobitnica je rektorove nagrade 2003. za rad „Učestalost oblića iz reda Strongylata u nojeva u Hrvatskoj“. Studij je završila 2007. godine i započela sa radom u Veterinarskoj stanici u Sesvetama, kao pripravnik do 2008. godine od kada je zaposlena u Zavodu za fiziologiju i radiobiologiju Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu kao znanstvena novakinja na znanstvenoistraživačkom projektu „Antioksidansi u očuvanju zdravlja životinja i kvalitete animalnih namirnica“ (voditeljica: prof. dr. sc. Suzana Milinković-Tur), MZOŠ RH. 2008. godine upisala je poslijediplomski doktorski studij veterinarskih znanosti (temeljne i pretkliničke znanosti). U znanstveno istraživačkom radu bavi se istraživanjem pokazatelja antioksidativne zaštite u domaćih životinja, a ponajviše njegovim značajem za muški spolni sustav. Nadalje, istraživanjem utjecaja spolnih hormona na biokemijske pokazatelje i pokazatelje antioksidativne zaštite u krvi i u organima domaćih životinja. Bila je sudionica više nacionalnih i međunarodnih znanstvenih i stručnih skupova te autor i koautor 24 radova i sažetaka. Sudjeluje u izvođenju nastave na integriranom preddiplomskom i diplomskom studiju veterinarske medicine na predmetima „Fiziologija domaćih životinja I“ i „Fiziologija domaćih životinja II“. Prevela je tri poglavlja u priručniku „Priručni atlas anatomije čovjeka“ objavljenoga 2011. godine. 2012. godine završila je „Tečaj za osposobljavanje osoba koje rade s pokusnim životinjama i životinjama za proizvodnju bioloških pripravaka“. Tijekom 2014. godine boravila je četiri mjeseca u sklopu istraživačkih projekata pri Jedinici za molekulsku toksikologiju, Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada (voditelj dr.sc. Ivan Sabolić). Bila je članica organizacijskog odbora medunarodnog znanstvenog skupa „2nd International Scientific Meeting of Anatomy and Physiology fundamentals of Medicine“ 2014. godine. Sudobitnica je plaketa na međunarodnom sajmu inovacija Agro Arca za 2013. i 2014. godinu. Tijekom 2013. godine bila je suradnica u istraživanju „Zdravo stado preduvjet kvalitete i sigurne hrane životinjskog podrijetla“, Potpora istraživanjima, Sveučilište u Zagrebu, a tijekom 2014. suradnica u istraživanju „Ekspresija staničnih prijenosnika u jetri i bubrezima svinja“. Članica je Hrvatskog društva fiziologa i Hrvatske veterinarske komore. Udana je i majka dvoje djece.

Popis radova

Znanstveni radovi objavljeni u časopisu citiranom u tercijarnim publikacijama (Current Contents):

BAČIĆ, G., T. KARADJOLE, N. MAČEŠIĆ, S. VINCE, M. KARADJOLE, V. GJURČEVIĆ KANTURA, D. MIHELIĆ, I. ŽAJA (2006): Die Behandlug der Eiretention beim Grünen Leguan (Iguana iguana). Tierärztl. Umschau 61, 258-261.

Znanstveni radovi u časopisima citiranim u sekundarnim publikacijama (SCI expanded):

VILIĆ, M., P. KRALJEVIĆ, I. ŽURA ŽAJA, J. PEJAKOVIĆ HLEDE, S. MILJANIĆ, M. ŠIMPRAGA (2014): Concentration of proteins and protein fractions in blood plasma of chickens hatched from eggs irradiated with low dose gamma radiation. Vet. arhiv 84, 401-409.

Radovi u drugim časopisima

LJUBIČIĆ, I., L. RADIN, I. ŽURA ŽAJA, J. PEJAKOVIĆ HLEDE, S. MILINKOVIĆ-TUR (2013): Slobodni radikali, oksidacijski stres i parazitarne bolesti. Veterinarska stanica 44, 285-297.

Sudjelovanja na kongresima:

Znanstveni radovi s domaćeg znanstvenog skupa s međunarodnim sudjelovanjem objavljeni u zbornicima radova referiranim u bazama podataka CAB Abstracts i Animal Science:

PUŠIĆ, I., J. ALADROVIĆ, B. BEER-LJUBIĆ, I. ŽURA ŽAJA, S. MILINKOVIĆ-TUR, Z. JANJEČIĆ, D. BEDEKOVIĆ (2011): Učinak dodavanja organskog selena u hranu na antioksidativnu stabilnost ohlađenog mesa pilića. Zbornik, IX Simpozij Peradarski dani 2011. s međunarodnim sudjelovanjem, 11.-14. svibnja, Šibenik, Hrvatska, str. 64-70.

MILINKOVIĆ-TUR, S., N. POLJIČAK-MILAS, J. ALADROVIĆ, B. BEER LJUBIĆ, N. NOVAK, I. ŽURA ŽAJA (2009): Koncentracije serumskih bjelančevina i aktivnost aminotransferaza u jetri i bubrezima pačića tijekom gladovanja. Zbornik radova osmog simpozija Peradarski dani 2009. s međunarodnim sudjelovanjem, 25.- 28. ožujka, Poreč, Hrvatska, str. 227-234.

Kongresno priopćenje s međunarodnog znanstvenog skupa objavljeno u ostalim časopisima (sažeci):

ŽURA ŽAJA, I., I. MAJIĆ-BALIĆ, B. BEER LJUBIĆ, J. ALADROVIĆ, S. VINCE, M. SAMARDŽIJA, R. LAŠKAJ, M. VILIĆ, S. MILINKOVIĆ-TUR (2013): Antioxidative system parameters in boars seminal plasma and spermatozoa. 3rd Congress of Croatian Physiological Society and 1st Regional Congress of the Physiological Societies. 13. - 15. September, Rijeka, Croatia. Period. Biol. 115, Suppl. 2, pp. 60-60.

Kongresna priopćenja s međunarodnih skupova tiskana u zbornicima sažetaka:

MILINKOVIĆ-TUR, S., I. ŽURA ŽAJA, H. BRZICA, M. LJUBOJEVIĆ, G. BAČIĆ, K. ŠPIRANEC, J. ŠURAN, I. DEL VECHIO, S. MATEŠIĆ, A. SHEK-VUGROVEČKI, M. KARDUM, L. KOZAČINSKI, Ž. CVRTILA FLECK, N. POLJIČAK- MILAS (2014): Sex differences of antioxidant enzymes activities, lipid metabolism and lipid peroxidation in swine's slow-twitch muscle (m. psoas major). Book of abstracts of the 2nd International Scientific Meeting of Anatomy and Physilogy Fundementals of medicine, 16-17 June, Zagreb, Croatia, pp. 46-46.

BRZICA, H., I. ŽURA ŽAJA, M. LJUBOJEVIĆ, C. M. HERAK-KRAMBERGER, I. DELVECHIO, S. MILINKOVIĆ-TUR, S. ĆURKOVIĆ, S. VUKOVIĆ, K. ŠPIRANEC, G. BAČIĆ, N. MAČEŠIĆ, Z. BUDINŠĆAK, I. SABOLIĆ (2014): Expression of water channel AQP1 in pig kidneys is gender-dependent. Book of abstracts of the 2nd International Scientific Meeting of Anatomy and Physilogy Fundementals of medicine, 16-17 June, Zagreb, Croatia, pp. 31-31.

POLJIČAK-MILAS, N., K. SEVERIN, T. MAŠEK, J. ALADROVIĆ, B. BEER-LJUBIĆ, I. ŽURA ŽAJA, M. KARDUM, S. MILINKOVIĆ-TUR (2014): Antioxidant enzyme activities and oxidative stress biomarkers of pheasant capons. Book of Abstracts of the 2nd International Scientific Meeting of Anatomy and Physiology Fundamentals of Medicine, 16-17 June, Zagreb, Croatia, pp. 45-45.

ŽURA ŽAJA, I., I. MAJIĆ-BALIĆ, B. BEER LJUBIĆ, J. ALADROVIĆ, S. VINCE, M. SAMARDŽIJA, R. LAŠKAJ, M. VILIĆ, S. MILINKOVIĆ-TUR (2013): Antioxidative system parameters in boars spermatozoa separated in iodixanol density solution. Book of Abstracts The 5th International Congress „Veterinary science and profession", 3-4 October, Zagreb, Croatia, pp. 53-53.

ŽAJA, I., D. ŽUBČIĆ, Ž. ROMIĆ, D. GEREŠ, T. DRAGOJLOV (2007): Some biochemical indicators in the serum of clinically healthy Ferrets (Mustela putorius furo). U: Zbornik sažetaka radova, XIIIth European Fecava congress, 29. ožujka-1.travanja, Dubrovnik,Cavtat, Hrvatska, str. 104-104.

JURKIĆ, G., D. LJUBOJEVIĆ, I. ŽAJA (2003): Holistični veterinarski postupci u očuvanju zdravlja mliječnih krava na ekološkim farmama. Zbornik radova, IV. srednjoeuropski bujatrički kongres, 23.-27. travnja, Zagreb, Hrvatska, str. 509-510.

Kongresna priopćenja s domaćih znanstvenih i stručnih skupova s međunarodnim sudjelovanjem tiskana u zbornicima sažetaka:

BEER LJUBIĆ, B., J. ALADROVIĆ, I. MAJIĆ-BALIĆ, S. MILINKOVIĆ-TUR, I. ŽURA ŽAJA (2009): Procjena kvalitete i zrelosti spermija bikova razdvojenih u gradijentu gustoće otopine iodixanola. Zbornik sažetaka radova, Veterinarska znanost i struka, Znanstveno-stručni sastanak, 1. i 2. listopada, Zagreb, Hrvatska, str. 76-77.

ŽURA ŽAJA, I., I. MAJIĆ-BALIĆ, B. BEER LJUBIĆ, J. ALADROVIĆ, S. MILINKOVIĆ-TUR (2009): Mokraćna kiselina i albumini kao neenzimski antioksidansi u sjemenoj plazmi bikova. Zbornik sažetaka radova, Veterinarska znanost i struka, Znanstveno-stručni sastanak, 1. i 2. listopada, Zagreb, Hrvatska, str. 104-105.

ŽUBČIĆ, D., I. ŽAJA, G. JURKIĆ (2005): Holistična veterinarska medicina. Zbornik prvog kongresa studenata veterinarske medicine s međunarodnim sudjelovanjem, 14.-19. lipnja, Zagreb, Hrvatska, str. 14-14.

Kongresna priopćenja s međunarodnih skupova tiskano u zbornicima radova bez recenzije (stručni rad):

ŽAJA, I. (2004): Hiperestrogenizam u tvorica. Zbornik radova, 1. hrvatsko-slovenski simpozij o egzotičnim i divljim životinjama, 25.-27. studenoga, Zagreb, Hrvatska, str. 110-114.

ŽAJA, I. (2004): Amebijaza u gmazova. Zbornik radova, 1. hrvatsko-slovenski simpozij o egzotičnim i divljim životinjama, 25.-27. studenoga, Zagreb, Hrvatska, str. 158-162.

Kongresna priopćenja s međunarodnih skupova tiskana u zbornicima sažetaka bez recenzije:

ŽAJA, I., R. BECK, I. BATA, A. SHEK-VUGROVEČKI, J. JURKIĆ, V. GODIĆ, A. MARINCULIĆ (2005): Učestalost protozoona iz roda Giardia u životinja iz zoološkog vrta. Zbornik radova, 2. slovensko-hrvaški kongres o ljubiteljskih-egsotičnih in prostoživečih živali, 26.-28. rujna, Ljubljana, Slovenija, str. 105-105.

ŽAJA, I., I. BATA (2005): Avaskularna nekroza repa u zelene iguane. Zbornik radova, 2. slovensko-hrvaški kongres o ljubiteljskih-egsotičnih in prostoživečih živali, 26.-28. rujna, Ljubljana, Slovenija, str. 73-73.

ŽAJA, I., G. BAČIĆ, I. BATA, D. ŽUBČIĆ (2005): Iskustvo liječenja retencije jaja u zelene iguane. Zbornik radova, 2. slovensko-hrvaški kongres o ljubiteljskih-egsotičnih in prostoživečih živali, 26.-28. rujna, Ljubljana, Slovenija, str. 75-75.

SHEK-VUGROVEČKI, A., G. JURKIĆ, I. ŽAJA, D. VNUK (2005): Apscesi u patuljastog kunića. Zbornik radova, 2. slovensko-hrvaški kongres o ljubiteljskih-egsotičnih in prostoživečih živali, 26.-28. rujna, Ljubljana, Slovenija, str. 41-41.

SHEK-VUGROVEČKI, A., I. BATA, I. ŽAJA, A. MARINCULIĆ, G. JURKIĆ (2005): Ophyonissus natricis - uobičajena grinja gmazova kao rizik za sve ostale vrste životinja i ljude. Zbornik radova, 2. slovensko-hrvaški kongres o ljubiteljskih-egsotičnih in prostoživečih živali, 26.-28. rujna, Ljubljana, Slovenija, str. 67-67.

SHEK-VUGROVEČKI, A., G. BAČIĆ, G. JURKIĆ, I. ŽAJA, V. GODIĆ (2005): Mastektomija kao metoda liječenja tumora u štakora. Zbornik radova, 2. slovensko-hrvaški kongres o ljubiteljskih-egsotičnih in prostoživečih živali, 26.-28. rujna, Ljubljana, Slovenija, str. 40-40.

JURKIĆ, G., I. ŽAJA, A. SHEK-VUGROVEČKI, D. ŽUBČIĆ (2005): Pneumonija u zamorčića. Zbornik radova, 2. slovensko-hrvaški kongres o ljubiteljskih-egsotičnih in prostoživečih živali, 26.-28. rujna, Ljubljana, Slovenija, str. 39-39.

JURKIĆ, G., I. ŽAJA, A. SHEK-VUGROVEČKI, H. BOROŠAK, V. GODIĆ (2005): Ulcus corneae u patuljastog kunića. Zbornik radova, 2. slovensko-hrvaški kongres o ljubiteljskih-egsotičnih in prostoživečih živali, 26.-28. rujna, Ljubljana, Slovenija, str. 38-38.

JURKIĆ, G., H. BOROŠAK, D. STANIN, I. ŽAJA, A. SHEK-VUGROVEČKI (2005): Osteosinteza u činčile. Zbornik radova, 2. slovensko-hrvaški kongres o ljubiteljskih-egsotičnih in prostoživečih živali, 26.-28. rujna, Ljubljana, Slovenija, str. 37-37.