UTJECAJ EGZOGENOG MELATONINA NA BIOKEMIJSKE POKAZATELJE I ANTIOKSIDACIJSKI STATUS SJEMENE PLAZME FRANCUSKIH ALPSKIH JARČEVA IZVAN RASPLODNE SEZONE

Berta, Velimir

Doctoral thesis / Disertacija

2019

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:178:790377

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu
VETERINARSKI FAKULTET

VELIMIR BERTA

UTJECAJ EGZOGENOG MELATONINA NA BIOKEMIJSKE POKAZATELJE I ANTIOKSIDACIJSKI STATUS SJEMENE PLAZME FRANCUSKIH ALPSKIH JARČEVA IZVAN RASPLODNE SEZONE

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2019.



University of Zagreb
FACULTY OF VETERINARY MEICINE

VELIMIR BERTA

INFLUENCE OF EXOGENOUS MELATONIN ON BIOCHEMICAL PARAMETERS AND ANTIOXIDATIVE STATUS IN SEMINAL PLASMA OF ALPINE BUCKS OUT OF BREEDING SEASON

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2019.

Sveučilište u Zagrebu
VETERINARSKI FAKULTET

VELIMIR BERTA

UTJECAJ EGZOGENOG MELATONINA NA BIOKEMIJSKE POKAZATELJE I ANTIOKSIDACIJSKI STATUS SJEMENE PLAZME FRANCUSKIH ALPSKIH JARČEVA IZVAN RASPLODNE SEZONE

DOKTORSKI RAD

Mentori:
izv. prof. dr. sc. Silvijo Vince
izv. prof. dr. sc. Hrvoje Valpotić

Zagreb, 2019.

University of Zagreb
FACULTY OF VETERINARY MEICINE

VELIMIR BERTA

INFLUENCE OF EXOGENOUS MELATONIN ON BIOCHEMICAL PARAMETERS AND ANTIOXIDATIVE STATUS IN SEMINAL PLASMA OF ALPINE BUCKS OUT OF BREEDING SEASON

DOCTORAL THESIS

Supervisors:
associate professor Silvijo Vince
associate professor Hrvoje Valpotić

Zagreb, 2019.

Sveučilište u Zagrebu

VETERINARSKI FAKULTET

I Z J A V A

Ja, Velimir Berta, potvrđujem da je moj doktorski rad izvorni rezultat mojega rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio drugim izvorima do onih navedenih u radu.

_____

(potpis studenta)

Zagreb, 2019.

Zahvaljujem svojim mentorima izv. prof. dr. sc. Silviju Vince i izv. prof. dr. sc. Hrvoju Valpotić na uvijek dostupnoj pomoći i usmjeravanju tijekom izrade ovog rada te prenošenju stečenog iskustva.

Zahvaljujem doc. dr. sc. Ivoni Žura Žaja na pomoći kako u eksperimentalnom dijelu tako i prenošenjem iskustva u izradi vlastitog doktorskog rada.

Posebno zahvaljujem mom kolegi i dugogodišnjem prijatelju Vladimiru Nazansky bez čije pomoći ovaj rad ne bi bilo moguće izraditi.

Zahvaljujem se Veterinarskoj stanici d.d. Varaždin i njenim djelatnicima te djelatnicima Centra za umjetno osjemenjivanje goveda d.o.o. u Varaždinu.

Najiskrenije hvala mojoj supruzi Martini, kčeri Karli na strpljenju i razumjevanju tijekom izrade ovog rada. Veliko hvala mojim roditeljima na podršci i bezkompromisnoj financijskoj pomoći.

Doktorski rad posvećujem:

„Za tri žene mojeg života – za ženu koja mi je podarila život,

za ženu koja sa mnom dijeli život,

za ženu koja poslije nas nastavlja taj život.“

Peter Prange: Posljednji Harem (Der letzte Harem) 2007.

SAŽETAK

UTJECAJ EGZOGENOG MELATONINA NA BIOKEMIJSKE POKAZATELJE I ANTIOKSIDACIJSKI STATUS SJEMENE PLAZME FRANCUSKIH ALPSKIH JARČEVA IZVAN RASPLODNE SEZONE

Jedan od značajnijih čimbenika koji uvjetuju smanjenje pokretljivosti i sposobnosti oplodnje spermija su oksidativna oštećenja spermija koja nastaju kao posljedica djelovanja prekomjerne količine reaktivnih kisikovih spojeva (ROS). Prekomjerne količine ROS-a nastaju tijekom procesa manipulacije i krioprezervacije sjemena te prilikom upalnih stanja spolnih organa. Protutežu ROS-u u organizmu čine antioksidansi koji su prisutni u sjemenoj plazmi i spermijima. Nesrazmjer stvaranja slobodnih radikala i antioksidativne obrane organizma naziva se oksidativni stres koji može dovesti do oštećenja stanica i posljedično neplodnosti. Melatonin je molekula sa sposobnošću direktne i indirektne antioksidativne zaštite, sprječava lipidnu peroksidaciju u staničnim membranama, apoptozu spermija te štiti DNK-a i mitohondrije spermija od oštećenja koja mogu nastati zbog štetnog djelovanja ROS-a.

Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi utjecaj egzogenog melatonina na antioksidativnu zaštitu ejakulata jarčeva izvan rasplodne sezone praćenjem antioksidativne enzimske aktivnosti u sjemenu i različitih pokazatelja kvalitete ejakulata prije i poslije dubokog smrzavanja.

U istraživanju je bilo uključeno 12 jarčeva pasmine francuska alpina starosti 1,5-4 god. tijekom 6 pokusnih perioda (svaki period je trajao 2 tjedna) izvan rasplodne sezone. Jarčevi su nasumično bili podijeljeni u dvije skupine: kontrolna (n=6) i pokusna (n=6). Pokusnoj skupini jarčeva je krajem 2. perioda apliciran egzogeni melatonin (četiri implantata od 18 mg na bazu uške). Svim jarčevima se jedanput tjedno uzimao ejakulat pomoću umjetne vagine (ukupno 12 tjedana) u jutarnjim satima prilikom čega se procjenjivao libido. Ejakulatima se po uzimanju određivao volumen, koncentracija, pokretljivost, udio živih i abnormalnih spermija. U sjemenoj plazmi i spermijima su određene aktivnosti glutation reduktaze (GR), glutation peroksidaze (GSH-Px), superoksid dismutaze (SOD), katalaze (CAT) i koncentracija malondialdehida (MDA). Spermijima je nakon izdvajanja od sjemene plazme dodan komercijalni razrjeđivač s vitaminima E i C i bez vitamina te su kao takvi bili podvrgnuti procesu krioprezervacije. U smrznutom

sjemenu su nakon otapanja određivani pokretljivost i brzinski parametri spermija pomoću kompjuterske analize spermija, udio oštećenja plazmatske i akrosomske membrane, oštećenja DNK i oštećenja i depolarizacije mitohondrija protočnom citometrijom te udio živih spermija i različitih oblika abnormalnosti citološko-morfološkom pretragom.

U pokusnoj skupini jarčeva utvrđeno je neznačajno veća razina libida te značajno bolja pokretljivost spermija i udio živih spermija tijekom 3.–4. istraživanog perioda. Pokusna skupina jarčeva imala je značajno niže vrijednosti GR u spermijima i sjemenoj plazmi tijekom gotovo cijelog perioda istraživanja, značajno manju aktivnost GSH–Px u spermijima te veću u sjemenoj plazmi u zadnjem periodu istraživanja te značajno manju vrijednost SOD-a u spermijima tijekom zadnja tri perioda. Skupina jarčeva koja je primila melatonin imala je značajno veće vrijednosti omjera CAT/SOD, GSH–Px/SOD u sjemnoj plazmi i spermijima tijekom 6. perioda te značajno niže vrijednosti omjera GR/GSH–Px u spermijima tjekom 6. perioda i sjemenoj plazmi tijekom 5. istraživanog perioda. Pokusna skupina jarčeva imala je veću pokretljivost, progresivnu pokretljivost, udio živih i udio živih spermija s intaktnom akrosomom tijekom 3. perioda nakon otapanja sjemena. Isto tako, pokusna skupina je u 4. periodu istraživanja imala veću frekvenciju prelaska pravolinijske putanje u sekundi spermija u odnosu na kontrolnu skupinu.

Prema dobivenim rezultatima može se zaključiti da egzogeni melatonin ima pozitivan učinak na pokretljivost i udio živih spermija u svježem i odmrznutom ejakulatu neposredno nakon aplikacije melatonina. Egzogeni melatonin utjecao je na promjenu aktivnosti pojedinih antioksidacijskih enzima u određenim periodima istraživanja, a ponajviše na GR u sjemenoj plazmi i spermijima; SOD u spermijima te GSH-Px u sjemenoj plazmi i spermijima. Utvrđena je pozitivna korelacija CAT, GR, SOD u spermijima. Isto tako, egzogeni melatonin imao je značajan utjecaj i na omjere antioksidacijskih enzima u sjemenoj plazmi i spermijima u istom pokusnom periodu te bi se određivanje omjera u budućnosti moglo smatrati boljim pokazateljima oksidativnog stresa te dati bolji uvid u adaptaciju i stanje antioksidativnog sustava u odnosu na pojedinačno utvrđene aktivnosti antioksidativnih enzima. Po prvi puta je u spermijima jarčeva utvrđen atioksidativni status te je nađena pozitivna korelacija aktivnosti CAT, GR i SOD s oštećenjem DNK u spermijima.

Ključne riječi: melatonin, ejakulat, antioksidativni enzimi, pokazatelji kvalitete ejakulata, jarčevi

EXTENDED SUMMARY

INFLUENCE OF EXOGENOUS MELATONIN ON BIOCHEMICAL PARAMETERS AND ANTIOXIDATIVE STATUS IN SEMINAL PLASMA OF ALPINE BUCKS OUT OF BREEDING SEASON

The free radicals are atoms or molecules possessing in the outer shell of electronic envelope one or more unpaired electrons which makes them in biological sense extraordinary non stable and reactive. In this regard, it is well known that one of the most important factors which may predispose to their lower motility and fertilization capability of spermatozoa are their oxidative damages which are the consequence of activity of an excessive quantity of free radicals, particularly reactive oxygen species (ROS). Almost all cells of an organism, but primarily reproductive cells are constantly exposed to such excessive quantity of the ROS which are produced during process of manipulation and cryopreservation of spermatozoa and in the case of inflammatory states of genital organs. The counterbalance to such damaging ROS activities in an organism are antioxidant substances present in seminal plasma and spermatozoa. Disproportional production of free radicals and antioxidative protection of an organism is called oxidative stress which may lead to cell damage and consequently to infertility. The melatonin is the molecule with the capability of direct and indirect antioxidative protection. It also prevents lipid peroxidation of cell membranes, apoptosis of spermatozoa, and protects spermatozoa DNA and mitochondria from damage which may happen due to negative effects of the ROS. Also, in sheep and goats as polyestrous seasonal animals, melatonin is participating in the regulation of sexual cycle. The aim of this study was to determine the effect of exogenous melatonin on antioxidative protection of bucks ejaculate in non-breeding season by monitoring of antioxidative enzymatic activity in semen as well as various parameters of ejaculate quality before and after deep freezing, and to evaluate the effectiveness of supplementation of the commercial extender with vitamins E and C in particular doses before deep freezing.

In this study 12 bucks of French Alpine breed, aged from 1.5 to 4 years were included into 6 experimental periods (duration of each period was 2 weeks) out of reproductive season. The bucks were randomly assigned into two groups: the control (n =

6) and melatonin treated (n = 6) group. All bucks were in a good reproductive condition, kept and fed in almost identical macroclimatic and microclimatic conditions. At the end of second period the melatonin treated group of bucks received 4 implants of 18 mg of melatonin subcutaneously in the ear basis. The ejaculate was taken from the bucks on a weekly basis by artificial vagina (for 12 weeks in total) during morning hours and their libido was also assessed. For obtaining the ejaculate the synchronization of oestrus was performed in goats and they served as phantoms. In order to obtain the higher volumes of seminal plasma the ejaculate from each buck was taken two times consecutively within the interval not longer than 15 minutes. The ejaculates were collected into sterile graduated glass tubes. After sampling of the ejaculates, their volume and concentration, motility, proportions of vital and abnormal spermatozoa were determined. The concentration of spermatozoa was determined by electronic counter, their motility was assessed natively under binocular microscope with built-in sperm heater plate, proportions of live and dead spermatozoa were assessed based on supravital staining after Bloom, and for determining morphologically normal and pathologic forms of spermatozoa a commercial staining set after Farelly was used. After 10 minutes from taking of the ejaculates both were centrifuged in a shaded incubator (at 21°C) for 5 minutes at 2400 g. The supernatants from both ejaculates were taken by pipette, mixed and again centrifuged for 15 minutes at 2400 g. Following the second centrifugation the supernatant, *i.e.* seminal plasma was taken by pipette and cooled off to + 4°C, and soon after that to – 80°C in the freezer until analysed. The remaining spermatozoa were washed 3 times with saline and after each washing they were centrifuged for 5 minutes at 500 g. The activities of glutathione-reductase (GR), glutathione peroxidase (GSH-Px), superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and concentration of malondialdehyde (MDA) were determined. After the first centrifugation the rest of spermatozoa were added commercial synthetic diluent with or without supplementation of vitamins E and C, cooled off at + 4°C, transported to the Centre for artificial insemination where after equilibration for 24 hours the spermatozoa were deep frozen within the apparatus for automated deep freezing.

After thawing of frozen spermatozoa their motility and velocity parameters were determined by the computer analyses of spermatozoa. The proportion of the cells with damaged plasma and acrosome membrane, damaged DNA, damages and depolarization of mitochondria were assessed by the flow cytometry. The proportions of live spermatozoa

and spermatozoa with different forms of abnormalities were determined by the cytological-morphological examination.

In the melatonin treated group of bucks non-significant higher level of libido was determined. These bucks had significantly better motility of spermatozoa and a higher proportion of live spermatozoa during the 3rd and 4th period of the experiment. The melatonin treated group of bucks had significantly lower values of GR in the spermatozoa and the seminal plasma during almost all periods of experiment. In addition, significantly lower activity of GSH-Px in the spermatozoa and higher in the seminal plasma in the last period of the experiment as well as significantly lower value of SOD in spermatozoa during the last three periods of the experiment were determined. The group of bucks that received melatonin had significantly higher values of the ratios: CAT/SOD, GSH-Px/SOD in the seminal plasma and spermatozoa during 6th period of the experiment. In addition, same group had significantly lower values of the ratio GR/GSH-Px in the spermatozoa during 6th period and in the seminal plasma during 5th period of the experiment. The melatonin treated group of bucks had better motility, progressive motility, proportions of the live spermatozoa and the live spermatozoa with intact acrosome during 3rd period after thawing of the semen. Furthermore, the melatonin treated group of bucks had a higher percentage of beat cross frequency in the 4th period of the experiment. The thawed ejaculates with extender supplemented with vitamins E and C had a higher proportion of the spermatozoa with damaged plasma membrane as well as a lower total proportion of the live spermatozoa and the live spermatozoa with intact acrosome for the whole experimental period. However, when each of the 6 periods was separately observed there were no differences among ejaculates with or without the supplemented vitamins.

According to the obtained results it could be concluded that the exogenous melatonin had a positive effect on motility and proportion of live spermatozoa in fresh and thawed semen immediately after application of melatonin. The exogenous melatonin changed the activities of particular antioxidative enzyme in certain periods of the experiment, especially on GR and GSH-Px in the seminal plasma and spermatozoa and SOD in spermatozoa. Also, the exogenous melatonin had an significant influence on the ratios of antioxidative enzymes in the seminal plasma and the spermatozoa in the same experimental period, and thus, the precise determination of these ratios in the future could be considered as a better indicator of oxidative stress which may provide a better insight into adaptation and antioxidative status in regard to activities of single antioxidative

enzymes. In this study the antioxidative status in French Alpine buck spermatozoa was established for the first time and the positive correlation of CAT, GR and SOD activities with DNA damage in the spermatozoa was recorded.

Vitamin supplementation of extender before freezing did not improve the quality of ejaculates which could be the consequence of various endogenous and exogenous factors. Accordingly, it could be assumed that in this study the doses of applied vitamins E and C were not properly assessed, and thus the proper calibration of their doses should be emphasized in further research.

Key words: Melatonin, Semen, Antioksidative enzymes, Ejaculate quality parameters, Bucks

SADRŽAJ

1. UVOD 1
2. PREGLED DOSADAŠNJIH SPOZNAJA 3
2.1. REPRODUKTIVNI SUSTAV JARCA 3
2.2. OCJENE EJAKULATA I SPERMIJA 7
2.2.1. MAKROSKOPSKA OCJENA EJAKULATA 7
2.2.2. MIKROSKOPSKA OCJENA SPERMIJA 8
2.2.3. OCJENA KONCENTRACIJE SPERMIJA U EJAKULATU 9
2.2.4. OCJENA INTEGRITETA STANIČNE MEMBRANE SPERMIJA 10
2.2.5. OCJENA STATUSA AKROSOME SPERMIJA 13
2.2.6. MORFOLOŠKA OCJENA SPERMIJA 13
2.3. RAZRJEĐIVANJE I KONZERVIRANJE EJAKULATA 15
2.4. ULOGA MELATONINA I SEZONOST JARČEVA 17
2.5. REAKTIVNI KISIKOVI SPOJEVI I OKSIDACIJSKI STRES 20
2.5.1. LIPIDNA PEROKSIDACIJA 22
2.6. ANTIOKSIDACIJSKI ZAŠTINI MEHANIZMI 23
2.6.1. ENZIMATSKI ANTIOKSIDACIJSKI ZAŠTITINI MEHANIZMI 24
2.6.1.1. GLUTATION REDUKTAZA 25
2.6.1.2. GLUTATION PEROKSIDAZA 25
2.6.1.3 SUPEROKSID DISMUTAZA 27
2.6.1.4. KATALAZA 28
2.6.2. NEENZIMATSKI ANTIOKSIDACIJSKI ZAŠTINI MEHANIZMI 28
2.6.2.1. GLUTATION 29
2.6.2.2. VITAMIN C I E 30
3. OBRAZLOŽENJE TEME 32
4. MATERIJAL I METODE ISTRAŽIVANJA 33
4.1. ŽIVOTINJE, SMJEŠTAJ I HRANIDBA 33
4.2. DIZAJN POKUSA I POSTUPCI SA ŽIVOTINJAMA 34
4.3. POLUČIVANJE I POSTUPAK S EJAKULATOM 35
4.3.1. POLUČIVANJE EJAKULATA 35
4.3.2. OPREMA ZA POLUČIVANJE I POSTUPAK S EJAKULATOM 37
4.3.3. OCJENA NATIVNOG EJAKULATA 39

4.3.3.1. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE EJAKULATA 39
4.3.3.2. ODREĐIVANJE GIBLJIVOSTI SPERMIJA 39
4.3.3.3. OCJENA VITALNOSTI SPERMIJA U EJAKULATU 40
4.3.3.4. MORFOLOŠKA OCJENA SPERMIJA U EJAKULATU 40
4.3.3.5. IZDVAJANJE SJEMENE PLAZME 41
4.3.3.6. IZDVAJANJE SPERMIJA 41
4.3.3.7. SMRZAVANJE EJAKULATA 41
4.3.3.8. DODAVANJE VITAMINA U RAZRJEĐIVAČ 42
4.4. BIOKEMIJSKA ANALIZA SJEMENE PLAZME I SPERMIJA 42
4.4.1. ODREĐIVANJE POKAZATELJA ANTIOKSIDACIJSKOG STATUSA 43
4.4.1.1. AKTIVNOST GLUTATION PEROKSIDAZE 43
4.4.1.2. AKTIVNOST UKUPNE SUPEROKSID DISMUTAZE 43
4.4.1.3. AKTIVNOST GLUTATION REDUKTAZE 44
4.4.1.4. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE KATALAZE 44
4.4.2. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE MALONDIALDEHIDA 44
4.4.3. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE BJELANČEVINA 45
4.5. OCJENA EJAKULATA NAKON OTAPANJA 46
4.5.1. CITOLOŠKO ISPITIVANJE EJAKULATA 46
4.5.2. KOMPJUTERSKI POTPOMOGNNUTA ANALIZA EJAKULATA - CASA 46
4.5.3. PROTOČNA CITOMETRIJA 48
4.5.3.1. TEST INTEGRITETA MEMBRANE I AKROSOMA SPERMATOZOIDA 49
4.5.3.2. TEST PERMEABILNOSTI MEMBRANE SPERMATOZOIDA 50
4.5.3.3. PROCJENA STRUKTURNE STABILNOSTI KROMATINA 50
4.5.3.4. STUPANJ POLARIZACIJE MITOHONDRIJA - INTEGRITET MITOHONDRIJA 51
4.6. STATISTIČKA ANALIZA REULTATA 52
5. REZULTATI 54
5.1. LIBIDO JARČEVA I POKAZATELJI KVALITETE SVJEŽEG EJAKULATA 54
5.2. POKAZATELJI ANTIOKSIDACIJSKOG STATUSA SJEMENE PLAZME I SPERMIJA 60
5.3. POKAZATELJI KVALITETE EJAKULATA NAKON ODMRZAVANJA 70

5.3.1. SKUPNI POKAZATELJI KVALITETE EJAKULATA NAKON ODMRZAVANJA 70
5.3.2. POKAZATELJI GIBLJIVOSTI SPERMIJA 72
5.3.3. POKAZATELJI VITALNOSTI SPERMIJA 74
5.3.4. POKAZATELJI CITOLOŠKO-MORFOLOŠKE ANALIZE SPERMIJA 76
5.3.5. ODNOSI IZMEĐU ANTIKSIDACIJSKIH POKAZATELJA I POKAZATELJA KVALITETE EJAKULATA NAKON OTAPANJA 78
6. RASPRAVA 80
6.1. UTJECAJ MELATONINA NA POKAZATELJE KVALITETE EJAKULATA PRIJE PROCESA ZAMRZAVANJA 81
6.2. UTJECAJ MELATONINA NA ANTIOKSIDACIJSKI SUSTAV U SJEMENOJ PLAZMI I SPERMIJIMA 84
6.3. ANTIOKSIDANSI I POKAZATELJI KVALITETE EJAKULATA NAKON PROCESA SMRZAVANJA/ODMRZAVANJA 88
6.4. UTJECAJ VITAMINA C I E NA POKAZATELJE KVALITETE EJAKULATA NAKON PROCESA SMRZAVANJA/ODMRZAVANJA 95
7. ZAKLJUČCI 98
8. POPIS LITERATURE 100
9. POPIS KORIŠTENIH SKRAĆENICA 115
10. ŽIVOTOPIS 118

1. UVOD

Unazad tridesetak godina područje Varaždinske županije poznato je po intenzivnoj proizvodnji koza. Pasminski je do danas ostala najzastupljenija francuska alpina koja je uvezena iz Francuske sredinom devedesetih godina prošlog stoljeća (KATALINIĆ i sur., 1994.). Konstantnom težnjom za većom produktivnošću javlja se potreba za uvođenjem tehnologije intenzivnog uzoja koja neizostavno uključuje upravljanje fazama rasplođivanja, sakupljanje, obrada i konzerviranje jarčeve sperme te primjena umjetnog osjemenjivanja.

Velik broj živih bića na Zemlji ovise o kisiku. Kisik je neophodno potreban biljkama i životinjama za odvijanje staničnog metabolizma, međutim već krajem 19. stoljeća je po prvi puta opisana toksičnost kisika u laboratorijskih životinja (KNIGHT, 1998.). Toksićnost kisika očituje se u stvaranju slobodnih radikala. Slobodni radikali su atomi ili molekule koje posjeduju u vanjskoj ljusci elektronskog omotača jedan ili više nesparenih elektrona što ih u biološkom smislu čini izuzetno nestabilnim i reaktivnim. Od najznačajnijih biološki aktivnih radikala izdvajaju se reaktivni oblici kisika (ROS) i reaktivni oblici dušika (RNS). Za primarna mjesta nastanka ROS-a u organizmu smatraju se mitohondriji (SHARMA i sur., 2015.), iako BROWN i sur. (2011.) smatraju da su kvantitativno značajnija mjesta nastanka ROS-a endoplazmatski retikulum i peroksisomi, ukoliko se radi o stanicama jetre. Stanice organizma, a posebice reproduktivne stanice konstantno su izložene nepovoljnom djelovanju slobodnih radikala, čiju produkciju generiraju unutrašnji i vanjski čimbenici. Produkcija unutrašnjih čimbenika uključuje produkte staničnog metabolizama dok vanjski čimbenici uključuju zagađenje, dim cigareta, radioaktivno zračenje, alergene te razne suplemente u prehrambenoj industriji (MUT-SALUD i sur., 2015.).

Protutežu ROS-u u organizmu čine antioksidansi. Nesrazmjer produkcije slobodnih radikala i antioksidativne obrane organizma naziva se oksidativni stres (BRIESALSKI, 2000.). Antioksidansi su molekule koje su u mogućnosti inhibirati štetne oksidativne procese drugih molekula odnosno slobodnih radikala (ISLAM i PERVIN, 2011.). Antioksidativni mehanizmi su podijeljeni u tri razine obrane organizma. Prvu razinu čine antioksidativni enzimi kao što su glutation–peroksidaza (GSH-Px), katalaza (CAT), superoksid dismutaza (SOD) i dr. Druga razina uključuje neenzimatske mehanizme poput vitamina topljivih u mastima i vodi, glutation (GSH), a treću razinu uključuje lipaze,

peptidaze, proteaze, transferaze koje sudjeluju u popravku prouzročenih oštećenja staničnih organela (SURAI, 2002.).

Dubokim smrzavanjem kao metodom konzerviranja sjemena, spermije se podvrgava raznim nepovoljnim čimbenicima uključujući temperaturu, osmolaritet i posebice oksidativni stres (TARIQ i sur., 2005.). U strukturi fosfolipida staničnih membrana spermija životinja i ljudi velik udio čine višestruko nezasićene masne kiseline (SURAI, 2002.). Spomenuti sastav im omogućava izrazitu pokretljivost i savitljivost, ali ih čini i izrazito podložnim oksidativnom stresu. Oksidativni stres uzrokuje lipidnu peroksidaciju membrana stanica odnosno spermija kao reproduktivnih stanica živih bića te smatra jednim od najznačajnijih faktora smanjenja kvalitete duboko smrnutog sjemena prilikom samog procesa smrzavanja (KAEOKET i sur., 2008.; MORAN i sur., 2008.). Smrznuto sjeme sisavaca ima smanjenu sposobnost oplodnje za razliku od svježeg zbog smanjene vitalnosti nakon odmrzavanja odnosno čimbenika koji utječu na funkcionalni status preživjelih spermija poput stabilnost membrana, oksidacijsko oštećenje, integritet membranskih receptora, jezgrinu struktura i dr. (WATSON, 2000.). Vitamin C (askorbinska kiselina) i vitamin E (tokoferol) su najvažniji neenzimatski antioksidansi u sjemenoj plazmi, a suplementacija istih je dobro poznata metoda za poboljšanje vitalnosti i pokretljivositi duboko smrznutih spermija nakon njihovog otapanja (AZAWI i HUSSEIN, 2013.).

Melatonin (5-methoxy N-acetyltryptamine) je hormon kojega po noći luči mala endokrina žlijezda smještena u mozgu-epifiza. Može proći gotovo sve stanične membrane u organizmu i vezati se za specifične receptore (CEBRIÁN-PÉREZ, 2014.), a karakterizira ga izrazito kompleksan mehanizam djelovanja. U ovaca i koza kao sezonski poliestričnih životinja, sudjeluje u regulaciji spolnog ciklusa. Krajem 20. stoljeća je otkriveno da melatonin izravno sudjeluje u provođenju biološki aktivnih oblika slobodnih radikala u neaktivne oblike, a neizravno u stimuliranju funkcija antioksidativnih enzima (REITER i sur., 2000.). Lipidna peroksidacija jedan je od glavnih uzroka oštećenja spermija u ovna prilikom procesa dubokog smrzavanja. Utjecaj melatonina na redukciju spomenute peroksidacije i očuvanje integriteta staničnih membrana spermija te posljedično produljenje njihovog životnog vijeka dokazali su SILVA i sur. (2011.).

2. PREGLED DOSADAŠNJIH SPOZNAJA

2.1. REPRODUKTIVNI SUSTAV JARCA

Muški reproduktivni sustav u malih preživača sastoji se od jednog para jaja, izvan abdominalno smještenih jaja koje se nalaze u mošnji prekrivenoj finim dlačicama, fibroelastičnog uda smještenog u prepuciju te akcesornih spolnih žlijezdi. Skupinu akcesornih spolnih žlijezda u jarčeva čine sjemene vrećice smještene sa svake strane na kaudalnom dijelu dorzalne površine mokraćnog mjehura, prostata koja cijelim svojim dijelom obavija zdjelični dio mokraćnice dok se bulbouretralne žlijezde nalaze na dorzalnoj površini mokraćnice nasuprot ishijadičnog luka (SATHE i SHIPLEY, 2014.).

Sjemene vrećice izlučuju obilan i viskozan sekret koji sadrži limunsku kiselinu, fruktozu, sorbitol, bjelančevine i flavin, a koji predstavlja glavni izvor energije za spermije. Prostata izlučuje bistar, vodenasto-serozni sekret koji sadrži bjelančevine i limunsku kiselinu, lužnatog pH što je od posebnog značaja za pokretljivost spermija. Bulbouretralne žlijezde izlučuju sekret koji čisti te ispire mokraćnicu prije ejakulacije (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.).

Spolni ud u malih preživača je fibroelastične građe te ostaje rigidan i van erektilne faze (SATHE i SHIPLEY, 2014.). Spolni ud se sastoji od dva kraka korijena, trupa i glavića. Mokraćnica, koja se nalazi kaudalno od mošnje prema ventralnoj trbušnoj stijenci, tvori karakterističnu sigmoidalni zavoj koji se pod relaksacijom parnog mišića *m. retractor penis* ispravlja. Dužina glavića u jarca je u prosjeku 30-40 cm, a debljina u prosjeku 1 cm (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.). Specifičnost mokraćnice malih preživača je da ista strši iznad glavića u dužini od 2 do 3 cm. U mladih jarčeva koji nisu još dostigli spolnu zrelost dio mokraćnice je priraslicama vezan uz sam glavić, a ulaskom u pubertet dolazi do kidanja prethodno opisanih priraslica i posljedično oslobađanja dijela morkačnice (MOBINI i sur., 2002.).

Mošnja je kožna vreća u koju migriraju, za vrijeme intrauterinog razvoja ploda, jaja. Neodvojivo vezani uz jaja u mošnji se nalaze i nuzjaja, a sve zajedno obavija *tunica vaginalis propria* u čijoj šupljini se još nalaze pripadajuće krvne žile i živci, *m. cremaster* i sjemenovodi. Na nuzjajima se razlikuju glava, tijelo i rep. Budući da su jaja u jarčeva orijentirana u mošnji vertikalno, glava nuzjaja je smještena na proksimalnom polu jajeta, a rep je smješten na distalnom polu. Glava nuzjaja se sastoji od desetak izvodnih kanalića

promjera 100 do 300 nm, koji se spajaju u jedan kanal čiji zavoji čine tijelo i rep nuzjaja. SATHE i SHIPLEY (2014.) navode da je kanal nuzjajeta u prosjeku dužine 40 do 60 mm. Za prolazak spermija kroz nuzjaje kod jarčeva je potrebno 16 dana. Nuzjaje ima funkciju transporta spermija koje je potpomognuto peristaltičkim kontrakcijama i trepetjlikavim epitelom, zatim se u nuzjajetu odvija koncentracija i zrenje spermija koje uključuje obavijanje spermija lipoproteinskom ovojnicom za sprječavanje sljepljivanja spermija, skladištenje zrelih spermija koji ostaju u stanju fiziološke anabioze, 2 mjeseca živi i sposobni za oplodnju te funkciju regulacije izlučivanja spermija prilikom ejakulacije (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.).

Prosječna masa jaja u odraslog jarca je 130 do 160 grama (SATHE i SHIPLEY, 2014.). AHMAD i NOKES (1996.) su dokazali da je prosječni opseg jajeta jarca sanske pasmine u Velikoj Britaniji mjerenog preko mošnje u dobi od približno 170 dana i pri prosječnoj tjelesnoj masi od 31 kg iznosio 24,13 cm dok je prosječni promjer jajeta iznosio 54 mm. Opseg u sezonski poliestričnih jarčeva kao što su francuski alpski jarčevi može varirati ovisno o sezoni odnosno pada nekoliko centimetara kako rasplodna sezona odmiče (NUTI i McWHINNEY, 1987.).

Ispod prethodno spomenute serozne opne (*tunica vaginalis propria*) nalazi se *tunica albuginea*. To je čvrsta čahura sastavljena od fibroznog tkiva i glatkih mišićnih vlakana koja zrakasto prodire u jaje i dijeli potonji na režnjiće. U njima se nalaze izvijugani sjemeni kanalići u kojima se odvija proces spermiogeneze. Između režnjića se nalazi intersticij koji uključuje krvne i limfne žile te živce zajedno s razbacanim Leydigovim stanicama čija je funkcija u izlučivanju muških spolnih hormona (testosteron i dr.). Sjemeni kanalići sastoje se iz bazalne membrane pokrivene stanicama germinativnog epitela (spermatogonije), a između kojih se nalaze Sertolijeve potporne stanice koje imaju nutritivnu ulogu te nakon stimulacije folikulostimulirajućeg hormona produciraju estrogene, inhibin i dr. (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.).

Spermiogeneza u muških rasplodnjaka je proces koji rezultira produkcijom razvojnih oblika spremija, a u konačnici i spermija te time osigurava potencijalno osjemenjivanje većeg broja jedinki ženskog spola. Proces spermiogeneze u jarca traje u prosjeku 50-ak dana. Već za vrijeme intrauterinog razvoja u sjemenim kanilićima se nalaze gonociti i potporne stanice koje se, nakon rođenja, postupno transformiraju u spermatogonije i Sertolijeve stanice. Spermatogonije, koje čine većim dijelom germinativni epitel, su najslabije diferencirane stanice, najčešće okruglog oblika, promjera

10-14 μm, u čijoj citoplazmi je jezgra promjera oko 2 μm ispunjena finim kromatinskim granulama, a razlikuju se spermatogonije tipa A, B i I reda. Spermatogonije se dijele mitotičkom diobom tako da primjerice iz spermatogonije tipa A_1 nastaju spermatogonije tipa A_2, koje se tada mogu ponovno dijeliti ($A_2 \rightarrow A_3 \rightarrow I \rightarrow B_1 \rightarrow B_2$ itd.), a što je u zavisnosti o životinjskoj vrsti. Posljednja serija diobe spermatogonija rezultira produkcijom primarnih spermatocita koje se razlikuju od prethodnih spermatogonija jer podliježu redukcijskoj odnosno mejotičkoj diobi. Iz primarnih spermatocita koje sadrže diploidni broj kromosoma nastaju sekundarni spermatociti koje sadrže samo jedan par kromosoma odnosno haploidan broj te je time završena diferencijacija spola odnosno X ili Y kromosoma. Sekundarni spermatociti nastavljaju se mejotički dijeliti, a kao produkt nastaju spermatide. Diferencijacijom odnosno transformacijom spermatida i njihovim otpuštanjem u sjemene kanaliće nastaju kroz petnaestak dana spermiji (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.; BERNDTSON, 2014.).

Spermiji u lumenu sjemenih kanalića i daljnim prolaskom kroz nuzjaja, mokraćnicu i ženski reproduktivni trakt podliježu raznim maturacijskim, fiziološkim i biokemijskim promjenama koje im u konačnici daju mogućnost oplodnje jajne stanice. Na tom putu različiti nepovoljni vanjski čimbenici (ROS, temperatura, ionizacijska zračenja, razne kemikalije itd.) mogu imati negativni utjecaj na spermije (KAYA i sur., 2014.).

Iako su spermiji po obliku i veličini karakteristični za pojedine vrste, načelno su strukturalno slični (SULLIVAN, 1978.). Spermiji se sastoje od dva funkcionalno zavisna dijela: glave i repa.

Glava je ovalnog oblika s jasno naznačena dva segmenta. U prednjem dijelu se nalazi akrosoma, a u stražnjem dijelu post-akrosomsko područje. Spojni dio se naziva nuklearni prsten (KAYA i sur., 2014.). Glava predstavlja jezgru stanice s tankim slojem protoplazme u kojoj se nalazi kondenzirana DNK i specifični proteini (WARD i COFFEY, 1991.; HAZZOURI i sur., 2000.). Akrosoma je formirana iz Golgijevog aparata u početnim fazama spermiogeneze, sadrži vanjsku i unutrašnju membranu te pokriva u prosjeku 60% glave spermija. Sadrži specifične enzime: hijaluronidazu, proarkozin, acrozin, esteraze, neuraminidazu, kiselu fosfatazu, fosfolipaze, arilfosfatazu, β-N-acetilglukozaminidazu, arilaminidazu, kolagenazu i korona penetracijske enzime. Hijaluronidaza sudjeluje u digestji *cumulus oophorus*, korona penetracijski enzimi u penetraciji kroz *corona radiata* te akrozin i neuraminidaza u penetraciji *zona pellucida* (KAYA i sur., 2014.).

Rep se sastoji od spojnog dijela ili vrata, srednjeg dijela ili tijela, glavnog dijela i završnog dijela koji izgleda puput kista s 9 do 12 dlačica. Kratak vrat čini *capitulum* (proteinskog podrijetla) koji oblikom odgovara implantacijskoj udubini na glavi spermija, a na kojega se veže aksonema koja se proteže gotovo cijelom dužinom repa. Središte aksoneme čini par mikrotubula obavijenih s devet parova mikrotubula i vanjskim omotačem od gustih proteinskih vlakana. Sve ove strukture obavija fibrozni omotač (EDDY, 2006.). U središnjem dijelu, koji se proteže od kraja vrata do prstena koji dijeli središnji dio i glavni dio, je vanjski omotač aksoneme od gustih vlakana obavijen gusto zbijenim mitohondrijima. Glavna funkcija mitohondrija je generiranje energije za gibanje spermija. Dužina pokrivenosti središnjeg dijela mitohondrijima i njihov broj varira u zavisnosti od vrste. Glavni dio repa ujedno je i najduži, a karakterizira ga gubitak fibroznog omotača čiji izostanak omogućava bolju pokretljivost i gipkost tog dijela repa (KAYA i sur., 2014.).

Sperma ili ejakulat je viskozna tekućina koja se sastoji od celularne komponente (spermiji) i tekukuće komponente (sjemena plazma). Volumen ejakulata je specifičan za pojedine vrste, a u jarčeva u prosjeku iznosi 1ml. Celularna komponenta koja uključuje spermije naziva se spermatokrit koji u jarčeva iznosi više od 30%, a koncentracija spermija u jednom mililitru sperme iznosi 2-5 milijardi. U sjemenoj plazmi, osim spermija, se u fiziološkim uvjetima nalaze: epitelne stanice sluznica odvodnih puteva, leukociti, ugljikohidrati, proteini, aminokiseline, specifične dušične komponente te lipidi (SETCHELL, 2014.). SPRECHER i sur. (1999.) su dokazali da količina leukocita nije u bilo kakvoj korelaciji s primarnim abnormalnostima spermija ili količinom eventualno prisutnih reproduktivnih patogena. Za razliku od dominantog ugljikohidrata u serumu-glukoze, u sjemenoj plazmi je to fruktoza koju luče sjemene vrećice. Uz fruktozu i glukozu u sjemenoj plazmi se nalazi i inozitol. Nuzjaja izlučuju proteine sjemene plazme koji sudjeluju u procesu fertilizacije (SETCHELL, 2014.). Od osobitog značaja je spermozin koji ima sličnu ulogu poput miozina u mišićima, a sudjeluje u pretvaranju kemijske energije u mehaničku i time omogućuje gibanje spermija (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.). Aminokiseline specifične za sjemenu plazmu su glutaminska kiselina, glicerofosforilkolin, hipotaurin (u prevenciji staničnog oštečenja od ROS–a), karnitin, glicerilfosforilinozitol, betain i dr. (SETCHELL, 2014.). Od značajne količine lipida i fospolipida u jarčevoj sjemenoj plazmi najzastupljeniji je fosfolipid-kolin plazmalogen odnosno fosfatidalkolin. Posebica spomenutog proteina je ta da u strukturi sadrži visoku

koncentraciju višestrukonezasičene masne kiseline koje mogu biti izrazito podložne ROS-u. Značaj fospfolipida se očituje u funkciji prekursora trombocit-aktivirajućeg faktora (PAF) koji ima ulogu u pokretljivosti spermija i akrosomskoj reakciji. Od steroida najznačajniji su: progesteron, dihidrotestosteron, androstanedioli, estrogeni, testosteron i prostaglandini (SETCHELL, 2014.). Prostaglandini su 1930. godine dokazani, a ujedno tako i nazvani upravo iz razloga jer se smatralo da ih producira prostata, iako je kasnije dokazano da poglavito nastaju u sjemenim vrećicama i to upravo u jarčeva i bikova. GANJAM i AMANN (1976.) su dokazali da je koncentracija testosterona u sjemenoj plazmi jednaka onoj u krvnoj plazmi.

2.2. OCJENE EJAKULATA I SPERMIJA

Spermatogeneza odnosno produkcija sperme ne ovisi o učestalosti ejakulacija već viša frekvencija ejakulacija rezultira smanjenjem broja spermija po ejakulatu. U praksi se broj spermija po ejakulatu može povečati postupcima za podizanje libida koji uključuju draženje, lažno parenje (kada rasplodnjak gleda drugog raspolodnjaka kako skače) i sputavanje prilikom željenog skoka. Takvi postupci podižu razinu oksitocina i drugih hormona koji posljedično ubrzavaju transport sperme i emisiju iz ekstragonadalnih puteva. KNIGHT (1974.) je intravenoznom aplikacijom 10 i.j. oksitocina u ovna 10 minuta prije ejakulacije izazvao povećanje broja spermija u ejakulatu za 45% što je u pozitivnoj korelaciji s količinom fruktoze u ejakulatu i time dokazao da oksitocin izaziva stimulaciju akcesornih spolnih žlijeda. Veličina testisa je također u izrazitoj pozitivnoj korelaciji (0,98 za jarca) s dnevnom produkcijom sperme u zrelih rasplodnjaka (LEAL i sur., 2004.). Produkcija spreme postepeno raste nakon puberteta do maksimalnih vrijednosti pa do trenutka kada počinje postupno opadati kao posljedica starenja. Sezonske varijacije u produkciji spreme su posebno izražene kod sezonski poliestričnih životinja, a vezane su uz povečanje ili smanjenje veličine testisa. Ekstraabdominalni smještaj testisa u većine sisavaca omogućava adaptacijeske mehanizme termoregulacije.

2.2.1. MAKROSKOPSKA OCJENA EJAKULATA

Makroskopska analiza ejakulata započinje neposredno nakon njegova prikupljanja. U idealnim uvjetima ocjena ejakulata radi se unutar 30 minuta nakon polučivanja do

maksimun 1 sat. Makroskopska ocjena uključuje mjerenje volumena ejakulata koje se može sastojati od očitanja volumena uz pomoć graduiranog spermohvatača u koji je polučen ejakulat ili pak preciznim vaganjem te kasnije preračunavanjem, podrazumijevajući da je gustoća ejakulata 1 g/mL(AUGER i sur., 1995.).

Prosječni volumen ejakulata jarca je 1 mL a boje je žućkaste ili sivobijele. Miris je vrsno specifičan, a konzistencija se određuje od oka pa je tako fiziološki ejakulat jarca konzistencije vrhnja. Budući da je ejakulat preživača vrlo brzo nakon polučivanja podložan glikolizi, bitno je odmah nakon makroskopske ocjene odredtiti i pH ejakulata i to indikator papirom ili pomoću tekućine univerzalnog indikatora (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.).

2.2.2. MIKROSKOPSKA OCJENA SPERMIJA

Za obavljanje mikroskopske ocjene spermija potreban je mikroskop (preporučljiv je fazno-kontrastni) s mogućnošću povećavanja 200 i/ili 400 x i koji posjeduje ploču za grijanje predmentih stakala. Ocjenjuje se pokretljivost odnosno gibljivost spermija. Progresivno gibanje spermija određeno je gibanje spermija prema naprijed bilo da se radi o pravocrtnom ili krivolinijskom gibanju za razliku od kružnog i retrogradnog odnosno gibanja unatrag. Ocjena se izražava u postotcima gibljivih spermija. Specifičnost ejakulata preživača je pojava masovnog gibanja do kojeg dolazi zbog zajedničkog gibanja vrlo velikog broja negativno nabijenih spermija, a koje se označava kao vihorenje. Iako ocjenjivanje gibljivosti spermija iskusnoj osobi ne predstavlja velik problem, za objektivnu metodu određivanja gibljivosti spermija danas se koriste specijalni pribor i aparati-CASA (computer-assisted semen analysis) (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.).

KATZ i sur. (1985.) prvi puta u povijesti opisuju metodologiju za automatsku analizu porketljivosti spermija još davne 1985. godine kada su digitalizirane video mikrografske slike spermija i obrađene pomoću „Motion Analysis Corporation Expert Vision“ sustava. U današnje vrijeme postoje nekolicina proizvođača CASA sustava koji načelno čine fazno kontrastni mikroskop s grijačom pločom, standardizirana komorica, boje za bojenje spermija i računalo s posebno prilagođenim programom za obradu slika i videa. Prilikom analize uzorak ne smije biti manji od 200 spermija u uzorku, a poželjno je da bude obrađeno 400 spermija. Jedne od najčešće upotrebljavanih komorica za CASA sustav su „Leja“ komorice dubine svega 10-20 μm. Različiti autori su pokušavali dovesti u svezu odnosno korelaciju rezultate dobivene CASA obradom sa sposobnošću oplodnje,

međutim QUINTERO-MORENO i sur. (2004.) su pokazali da se prediktivna upotreba rezultata dobivenih CASA obradom sjemena svinja može postići primjenom analize korelacije između nekoliko parametara dobivenih obradom sperme i *in vivo* stope koncepcije dobivene nakon umjetne oplodnje. Određeni laboratoriji uspoređujući pojedine parametre progresivne pokretljivosti dobivene CASA obradom prije i nakon smrzavanja i ponovnog otapanja koriste dobivene podatke kao „stres" test u ocjenjivanju sperme.

2.2.3. OCJENA KONCENTRACIJE SPERMIJA U EJAKULATU

Zlatni standard za ocjenu koncentracije spermija u ejakulatu čine hemocitometri odnosno komorice za brojanje krvnih stanica od kojih je najpoznatija komorica po Thoma-i. Komorica ima oblik debele predmetnice na kojoj su nacrtane vodoravne i okomite linije, a koje tvore sitne kvadratiće i to 16 velikih kvadrata u kojima se nalaze 16 malih kvadratića. Prije stavljanja spermija na komoricu potrebno je iste usmrtiti sa 3%-tnom vodenom otopinom NaCl-a, zatim je potrebno jarčevu spermu razrijediti u miješalici za crvena krvna tjelešca 200 puta i tek tada napuniti komoricu. Broje se spermiji čije glave se drže desnog i gornjeg ili lijevog i donjeg ruba kvadratića, a za brojanje se koriste 4 kvadratića u dijagonali te peti koji se nalazi u bilo kojem od suprotnih kuteva. Koncentracija se izračunava kao umnožak izbrojanih spermija, stupnja razrjeđenja i faktora 50 (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.).

U današnje vrijeme se u centrima za umjetno osjemenjivanje najčešće upotrebljavaju kolorimetri, fotometri i spektrofotometri zbog jednostavnosti uporabe i brzine dobivanja relevantnih podataka. Takvi uređaji moraju biti često kalibrirani pa i vrsno kalibrirani ukoliko se koriste za različite životinjske vrste. FOOTE i sur. (1978.) su pojasnili kalibraciju fotometra upotrebom hemocitometra. Usprkos svestranoj uporabi fotometara u centrima za umjetno osjemenjivanje, za najtočniju odnosno najprecizniju metodu određivanja koncentracije spermija u ejakulatu putem aparata služe aparati za protočnu citometriju (EVENSON i sur., 1993.). U spomenutim uređajima stanice jedna po jedna prolaze kroz laserski čitač te se na taj način može isključiti lažno pozitivan rezultat dobiven pribrajanjem staničnog debsrisa odnosno krvotvornih stanica kao što je slučaj kod fotometara. Premda je protočna citometrija najpreciznija automatizirana metoda za određivanje koncentracije spermija u ejakulatu, njezina svestrana upotreba je limitirana cijenom uređaja te je do danas ostala u upotrebi samo u institutima i istraživačkim laboratorijima.

U novije vrijeme za ocjenu koncentracije spermija u ejakulatu i za ocjenu integriteta stanične membrane spermija sve se više koristi uređaj NucleoCounter SP-100. ANZAR i sur. (2009.) su proveli istraživanje ocjene koncentracije spermija na 78 ejakulata bikova putem hemocitometra, protočne citometrije i NucleoCounter SP-100 uređaja. Uspoređujući dobivene rezultate došli su do zaključaka da se NucleoCounter SP-100 može s jednakom pouzdanošću kao i protočna citometrija upotrebljavati za ocjenu koncentracije spermija u ejakulatu i za ocjenu integriteta stanične membrane spermija te isto tako upotrebljavati kao preciznija metoda za kalibraciju fotometara u usporedbi s hemocitometrom.

2.2.4. OCJENA INTEGRITETA STANIČNE MEMBRANE SPERMIJA

Očuvanje integriteta stanične membrane spermija od presudnog je značaja za preživljavanje spermija. Iako prilikom ocjene pokretljivosti, spermij može biti živ odnosno pokretan, u isto vrijeme može biti narušen integritet stanične membrane i time dovesti do kraćeg života i nemogućnosti izvršenja njegove jedine funkcije-oplodnje.

Načelno se razlikuju tri metode ocjene integriteta stanične membrane spermija:

1. Bojenje u bikova, nerastova i pastuha (GARNER i sur., 1994.; BRITO i sur., 2003.; FRASER i sur., 2001.; BRINSKO i sur., 2011.).
2. Inkubacija u hiper-osmotskom mediju u ovnova i pastuha (CURRY i WATSON, 1994.; DE LA CUEVA i sur., 1997.).
3. Inkubacija u hipo-osmotskom mediju u bikova, pasa, magaraca, ovnova, pastuha i purana (BREDDERMAN i FOOTE, 1969.; ROTA i sur., 2000.; QUINTERO-MORENO i sur., 2008.; HISHINUMA i SEKINE, 2003.; ROTA i sur., 2010.; CURRY i WATSON, 1994.; NEILD i sur., 1999.; DONOGHUE i sur., 1996.).

Metoda supravitalnog bojanja spermija po Bloom-u omogućuje određivanje postotka živih ili mrtvih spermija u ejakulatu. Na čisto, odmašćeno i zagrijano predmetno stakalce stavi se kap sperme, zatim se stavi dvostruko veća kap prethodno zagrijane 5%-tne vodene otopine eozina (crvena boja) i od nje dvostruko veća kap prethodno zagrijane 10%-tne otopine nigrozina (crna boja) te se na kraju sve zajedno lagano promiješa. Nakon toga se drugim predmetnim stakalcem koje ima brušeni rub, dotakne pomiješana tekućina i povlačenjem kapi razvuče tanki razmaz. Nakon sušenja razmaza, pod mikroskopom, vrši se ocjena živih odnosno mrtvih spermija. Potrebno je izbrojiti minimalno 200 spermija za

izračunavanje postotka živih odnosno mrtvih spermija. Budući da kroz staničnu membranu intaktnih spermija ne prolazi crvena boja, živi spemiji će ostati ne obojani no biti će vidljivi zbog otopine nigrozina koja služi kao kontrast (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.).

Spermiji sa svijetlo-crvenim i tamno-rozim glavama smatraju se mrtvim, a s bijelim i svijetlo-rozim glavama živim. Ukoliko dolazi do obojenja samo u regiji spojnog dijela glave i repa (regija vrata spermija), a ostatak glave spermija ostaje neobojan, takav se spermij smatra živim. Spomenuta pojava se naziva „leaky neck membrane“ odnosno u tom slučaju se ne radi o totalnoj dezintegraciji stanične membrane spermija odnosno mrtvom spermiju (WHO, 2010.).

Komercijalno dostupne boje kao što su fluorescentna boja SYBR-14 u kombinaciji s Propidij Jodidom koriste se za obradu sperme prilikom ocjene integriteta stanične membrane spermija putem protočne citometrije ili uz pomoć fluorescentnog mikroskopa. Boja SYBR-14 boji spermije sa neoštećenom staničnom membranom zeleno za razliku od Propidij Jodida koji oboji jezgru spermija s oštećenom staničnom membranom crveno. Dvostruko obojeni spermiji predstavljaju populaciju djelomično oštećenih spermija osnosno spermije u odumiranju (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.). GARNER i sur. (1994.) su zaključili da je bojanje preparata kombinacijom SYBR-14 i Propidij Jodida kao priprema za protočnu citometriju učinkovit alat za ocjenu integriteta stanične membrane spermija odnosno njihove održivosti bilo da se radi o svježoj ili duboko smrznutoj spermi. Protočna citometrija kao najskuplja i najzahtjevnija, zbog posebne obuke osoblja za rad na uređaju za protočnu citometriju metoda, spada u najprecizniju tehniku ocjene integriteta stanične membrane spermija (ODHIAMBO i sur., 2011.).

NucleoCounter SP-100 zbog jednostavnosi, točnosti i brzine (u prosjeku su potrebne 2 minute za određivanje koncentracije spermija u ejakulatu i ocjenu integriteta stanične membrane spermija), uporabe sve više zauzima mjesto u centrima za umjetno osjemenjivanje. Postupak ocjenjivanja prethodno spomenutog uređaja proveli su JOHANSSON i sur. (2008.), FOSTER (2009.), MORRELL i sur. (2010.), FOSTER i sur. (2011.a,b).

HOS test (Hypoosmotic swelling) je relativno jednostavna metoda koja se koristi prije svega za ocjenu funkcionalnog integriteta stanične membrane spermija. PETRUNKINA i sur. (2001.) su mišljenja da uprkos širokom rasponu rezultata testiranja spomenute metode, HOS test nije bolji prediktor plodnosti od ostalih, standardnih,

parametara ocjene ejakulata, premda HOS test ima posebnu ulogu u predviđanju mogućnosti boljeg odgovora na stres samih spermija. Osmotski šok nakon otapanja duboko smrznutog sjemena, a zbog prethodne izloženosti hipertoniji (dodavanje glicerola u svrhu krioprezervacije), može rezultirati oštećenjem stanične membrane spermija (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.). U hipoosmotskoj otopini HOS testa molekule vode prelaze u spermije kroz staničnu membranu tako da spermiji s funkcionalno intaktnom staničnom membranom bubre te posljedično dolazi do savijanja i uvrnuća spermijevih repića. Pod fazno kontrastnim mikroskopom moguće je razlučiti HOS pozitivne spermije (s intaktnom staničnom membranom) kod kojih je došlo do uvrnuća repića za razliku od HOS negativnih spermija koji ne bubre zbog oštećenja stanične membrane. Za pravilno izvođenje HOS testa od presudnog je značaja osmolaritet otopine koji mora biti takav da izazove najbolji učinak (da ne dovede do pucanja membrane intaktnih spermija) (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.). Potrebno je ocjeniti minimalno 200 spermija po uzorku.

Sve eukariotske stanice imaju u jezgri kromosome koji su vidljivi tek kad se stanica počne dijeliti, a građeni su od kromatina. Kromatin je sastavljen od dvočlane DNK i proteina. Promjene na kromatinu odnosno njegovo oštećenje, koje može biti izazvano različitim čimbenicima, značajno utječe na plodnost. Sekret akcesornih spolnih žlijezda kao izvor antioksidacijskih enzima ima važnu ulogu u očuvanju integriteta DNK prilikom oksidativnog stresa (WAI-SUM i sur., 2006.). WAI-SUM i sur. (2006.) su pokazali na *in vivo* primjeru, da je nakon amputacije akcesornih spolnih žlijezda u mužjaka zlatnog hrčka porasla učestalost DNK oštećenja. Spomenuta oštećenja DNK nisu imala za posljedicu nemogućnost oplodnje već su imala izravni utjecaj na razvoj embrija.

EVENSON i sur. (1980.) su krajem 20 stoljeća razvili „Sperm Cromatin Structure Assay“ (SCSA) test kojim je bilo moguće protočnom citometrijom uz akridin narančastu boju mjeriti postotak spermija sa fragmentiranom i denaturiranom DNK. Do danas je spomenuta tehnika ostala kao „Zlatni standard“ u mjerenju oštećenja DNK. Dvolančana DNK fluoresceira zeleno dok jednolančana DNK fluoresceira crveno, tako da se stupanj oštećenja DNK izražava kao omjer crvene fluorescencije naspram ukupne fluorescencije. Oštećenja ili promjene u stukturi kromatina, prema EVENSON i sur. (1994.), a i prema mnogim drugim autorima, imaju izravni utjecaj na plodnost.

2.2.5. OCJENA STATUSA AKROSOME SPERMIJA

Unatoč mnogim mjerljivim parametrima spermija uključujući njihovu strukturu i pokretljivost, do sada, niti jedan parametar pojedinačno nije pokazao tako visoku povezanost sa sposobnošću oplodnje kao što je to slučaj s rezultatima ocjene statusa akrosome spermija (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.). Samo spermiji sa funkcionalno aktivnom akrosomom mogu prodrijeti u jajnu stanicu. Iako se kao najpreciznija metoda ocjene statusa akrosome spermija u literaturi spominje prijenosna elektronska mikroskopija, u praksi se daleko češće upotrebljavaju različite boje i fluorescentni mikroskop ili pak protočna citometrija.

Bojenje Tripanskim modrilom u prošlosti je bila vrlo često korištena tehnika za ocjenu statusa akrosome spermija. Jednostavnost i niska cijena kao prednosti nasuprot čestih i nestalnih varijacija boje rezultirali su napuštanjem spomenute tehnike i uvođenje boljih (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.).

Uvođenjem lektinskog bojenja jasno se moglo spermije uz pomoć protočne citometrije ili fluorescentnim mikroskopom klasificirati u četiri razreda:

- živi spermiji s intaktnom akrosomom
- mrtvi spermiji s intaktnom akrosomom
- živi spermiji s akrosomskom reakcjom
- mrtvi spermiji s akrosomskom reakcijom.

Lektini su molekule biljnog podrijetla (najčešće kikirikija = PNA, graška = PSA, ricinusa = RCA itd.) koje mogu biti obilježene fluorescentnim markerom (npr. Fluorescin-izotiocijanat = FITC). Spomenute molekule posjeduju sposobnost vezivanja bilo na vanjsku membranu akrosome (PNA) ili pak na unutrašnji dio akrosome (PSA, RCA) (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.). MARTÍ i sur. (2000.) su dokazali da je metoda bojenja FITC-RCA jednostavna i pouzdana metoda ocjene statusa akrosome spermija u ovnova.

2.2.6. MORFOLOŠKA OCJENA SPERMIJA

Kao najpouzdanija metoda za morfološku ocjenu spermija upotrebljava se protočna citometrija, ali ona za sada ostaje kao metoda izbora samo u znanstvenim institucijama. Za morfološku ocjenu spermija potrebno je prethodno pripremiti uzorak, a s kojega je nakon pripreme uz upotrebu sjetlosnog ili fazno-kontrastnog mikroskopa pod povećanjem 400 x ili 1000x (imerzija) potrebno ocjeniti minimalno 200 spermija. Uočavanje morfoloških

osobitosti spermija pod svjetlosnim ili fazno-kontrastnim mikroskopom je gotovo nemoguće bez prethodnog bojenja uzorka. Danas na tržištu postoji čitav niz različith boja, a sukladno tome i tehnika za morfološku ocjenu spermija. Neke od metoda bojanja preparata uz morfološku ocjenu služe i za ocjenu integriteta stanične membrane spermija (npr. Eozin-nigrozin bojanje, toluidin plavo bojanje i dr.) pa i za ocjenu statusa akrosome spermija. Gotovo sve metode bojanja uključuju prethodno razrjeđivanje ejakulata i njegovu fiksaciju (npr. formalinom, etilnim alkoholom, plamenom itd.) što dovodi do prestanka gibanja spermija, ali i zadržavanja odnosno očuvanja njihove strukture.

BOERSMA i sur. (2001.) su usporedili sedam različitih tehnika u bojanju preparata za morfološku ocjenu spermija te utjecaj boje izvora svjetlosti i izbora povećanja za optimalnu procjenu morfologije spermija uz pomoć „Hamilton Thorne Research-IVOS“ morfološkog analizatora. U prvom dijelu spomenutog istraživanja istražene su tehnike bojanja:

- brzi Papanicolaou (PAP)
- brzi Papanicolaou s produženim vremenom bojanja (PAP+)
- Diff-Quick (DIF)
- hemotoksilin (HEM)
- Farelly (FAR)
- Spermac (SPER)
- modificirani GZIN (MGZIN).

Uzorci su bili pretraživani pod crvenim, zelenim i plavim izvorom svjetlosti, pod povećanjem 400 x i 1000 x (imerzija). U drugom dijelu istraživanja istražena je optimalna koncentracija spermija u uzorku za pretraživanje odnosno optimalno razrjeđenje. Predmetnim istraživanjem dokazano je da je optimalna koncentracija uzorka ejakulata za morfološku ocjenu spermija 200000-300000 spermija u μL, upotrebljavajući zeleni izvor svjelosti mikroskopa i povećanje od 400 x, dok je za optimalnu tehniku bojenja određena tehnika po Farelly-ju (FAR). Bojanje hematoksilinom (HEM) i brzim Papanicolaou-om sa produženim vremenom bojanja (PAP+) uz izvor svjetlosti crvene boje zadovoljavajuća je alternativa spomenutog bojanja.

Cilj morfološke ocjene spermija jest razlikovanje normalnih od patoloških oblika spermija. Razlikuju se primarni, nastali kao rezultat poremećaja za vrijeme spermiogeneze i sekundarni patološki oblici spermija nastali u epididimisu te kasnije tijekom prolaska kroz reproduktivni trakt. Naki autori spominju i tercijarne potološke oblike spermija

nastale postejakulacijski. Često u ocjeni nije moguće odrediti točan trenutak nastanka morfološkog defekta spermija ili pak ih bude više od jednog, tada se pribjegava jednostavnijoj klasifikaciji koja uključuje abnormalnosti glave spermija (premala, prevelika, kruškasta, uska itd.), kape (granulirana, otpala itd.), vrata (prelomljen itd.), spojnog dijela (tanak, kratak, debeo, presavijen itd.) i repa (zakržljali, zavrnuti itd.) (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.). Ovnovski ejakulat mora sadržavati barem 70% morfološki normalnih spermija, dok jarčevski ejakulat mora sadržavati barem 80% normalno klasificiranih spermija. RATHORE (1968.) spominje utjecaj povišene temperature okoliša kao čimbenik nastanka povećanog broja morfološki abnormlanih spermija u ejakulatu Merino ovnova i njihov utjecaj na smanjeni postotak koncepcije i veću pojavnost rane embrionalne smrtnosti u ovaca. SKALET i sur. (1988.) su pokazali da u mladih nubijskih jarčeva ulaskom u pubertet učestalost abnormalnih spermija može iznositi do 65% za razliku od spolno zrelih, osam mjeseci starih jarčeva gdje spomenuta učestalost pada ispod 12%. Bolesti odnosno razne infekcije također imaju utjecaj na produkciju abnormalnih spermija kao što je u slučaju infekcije s Brucella ovis koja uzrokuje produkciju spermija bez glave i uvrnutih repova (CAMERON i LAUERMAN, 1976.). REFSAL i sur. (1983.) su pokazali da degeneracija testisa također utječe na veću pojavnost abnnormalnih spermija u neplodnih američkih „LaMancha“ jarčeva. Pojavnost otpalih glava spermija također je zabilježena u nubijskih jarčeva s histološki dijagnosticiranom upalom sjemenih vrećica (AHMAD i sur., 1993.).

2.3. RAZRJEĐIVANJE I KONZERVIRANJE EJAKULATA

Duboko smrzavanje spermija kao metoda konzervacije otkrićem glicerola u svojstvu krioprotektora predstavlja revoluciju u umjetnom osjemenjivanju čovjeka i životinja (POLGE i sur., 1949.). Tako konzervirana sperma je mogla biti distribuirana svugdje u svijetu i pohranjena na jako dugo vremensko razdoblje.

Nakon ejakulacije i promjene pH sredine u kojoj se nalaze spermiji iz kisele u lužnatu dolazi do intenziviranja metabolizma spermija i intenziviranja njihovog gibanja. Takva pojava dovodi do ubrzane potrošnje energetskih resursa sadržanih u sjemenoj plazmi, ali i nakupljanja štetnih produkata staničnog metabolizma što neminovno dovodi do brzog propadanja spermija. Želeći održati što veći broj funkcionalno i morfološki očuvanih spermija potrebno je odmah po ejakulaciji, ejakulat što je moguće prije ohladiti i

sniziti pH. Uronjeni u tekući dušik (-196°C) spermijima se upotpunosti zaustavlju svi životni procesi pa sve do trenutka odmrzavanja. Da bi snizili pH i ohladili ejakulat, potrebno je isti razrijediti (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.).

Razrjeđivači su vodene otopine ili emulzije elektrolita, neelektrolita i ostalih dodataka koje povećavaju volumen ejakulata (mogućnost osjemenjivanja više plotkinja), snižavanju pH odnosno osiguravaju izotoniju naspram spermija, služe spermijima kao izvor energije (glukoza), kao kriopretektori (Lecitin-zaštita od temperaturnog šoka), a s dodatkom antibiotika služe i kao zaštita od štetnog djelovanja mikroorganizama i njihovih štetnih produkata. Od sintetskih razrjeđivača razlikuju se obični ili distenderi, zaštitni ili protektori i bioaktivni ili implementori. Distenderi sadrže elektrolite koji održavaju pH te im može biti dodan šećer (heksoza), protektori uz prethodno nabrojano sadrže i žumanjak te obavezno antibiotike ili sulfonamide dok implementori uz sve prethodno nabrojano sadrže još biološki aktivne tvari (hormin, enzim). Od prirodnih razrjeđivača najpoznatije je obrano kravlje mlijeko. Laktinini koji dovode do strukturalnih oštećenja spermija i posljedično smanjene pokretljivosti budu jednostavno neutralizirani pasterizacijom mlijeka. U tako pasterizirano i obrano mlijeko mogu biti dodani antibiotici i žumanjak (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.).

Smrt odnosno destrukcija stanica ovisi o veličini, mjestu i brzini stvaranja kristala leda prilikom postupka smrzavanja (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.). Padom temperature, voda u stanici ostaje u tekućem stanju sve do početka kristalizacije, koja uvijek započinje ekstracelularno odnosno do trenutka početka formiranja leda kada se molekule vode organiziraju u klastere te započinje lančana reakcija. Prilikom procesa zaleđivanja ekstracelularne vode dolazi do povezivanja kristalića što dovodi do koncentriranja otopljenih soli (npr. razrjeđivača) u novonastalim mikro-prostorima između spomenutih kristalića vode. Stanice odnosno spermiji osmotski reagiraju s koncentriranim ionima soli što posljedično dovodi do izvlačenja vode iz samih stanica i njihovom isušivanju koje pak ima povoljnu ulogu u očuvanju struktura stanica i sprječavanju njihovog razaranja. Proces isušivanja stanica je pod izravnim utjecajem brzine hlađenja. Ukoliko je brzina hlađenja prespora, zbog predugog kontakta stanica s koncentriranim ionima soli, dolazi do destrukcije proteina i lipida te posljedično stvaranja reaktivnih kisikovih spojeva (ROS). Ukoliko je brzina hlađenja prebrza, zbog velike količine intracelularne vode i posljedično stvaranja intracelularnih kristalića, dolazi do razaranja i smrti stanica (HOLT i PENFOLD, 2014.).

Smrzavanje spermija nije moguće bez upotrebe krioprotektora. Zaštita spermija od razornog djelovanja kristalića vode je uz upotrebu krioprotektora dovstruka. U prvom redu krioprotektori (permeabilni: dimetil sulfoksid (DMSO), glicerol, etilen glikol, metanol, etanol i dr.) ulaze u stanice i istiskivanjem vode iz stanica onemogućuju stvaranje intracelularnih kristalića. Nepermeabilni kriopretektori (saharoza, glukoza, galaktoza, polivinil alkohol, goveđi serumski albumin (BSA) i dr.) ostaju u ekstracelularnom prostoru stvarajući homogeniju strukturu odnosno onemogućavaju stvaranje većih mikro-prostora s koncentriranim ionima soli i onemogućavaju stvaranje kristalića leda (HOLT i PENFOLD, 2014.; CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.). Period ekvilibracije je vrijeme, koje može biti različito za pojedine krioprotektore, potrebno za ulazak krioprotektora u stanicu (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.). Toksičnost krioprotektora su istražili različiti autori. HAMMERSTEDT i GRAHAM (1992.) su opisali toksičnost glicerola za spermije peradi, a u koncentraciji većoj od 3% glicerola kod nerastovskog sjemena toksičnost su opisali GUTIERREZ-PEREZ i sur. (2009).

Vitrifikacija je postupak prilikom kojega je uz dodatak velikih koncentracija krioprotektora omogućen izrazito brz postupak smrzavanja spermija, a prilikom kojega je u potpunosti onemogućeno stvaranja kristalića leda (HOLT i PENFOLD, 2014.). Ipak postoji velika mogućnost stvaranja kristalića leda prilikom otapanja. Načelno se postupak sastoji, uz dodatak određenih suplemenata, od kapanja razrjeđene sperme direktno u tekući dušik. Negativni aspekt vitrifikacije leži i u mogućnosti mikrobiološke kontaminacije uzorka. Izbjegavanje spomenute kontaminacije pokazali su ISACHENKO i sur. (2005.).

Koncepcija u ovaca upotrebljavajući smrznuto sjeme je na zadovoljavajućoj razini ukoliko se sjeme aplicira laparoskopski u rog maternice. Aplikacija sjemena intracervikalno ne daje zadovoljavajuće rezultate. Kod umjetnog osjemenjivanja svinja sa smrznutim spermijima koji imaju relativno kratak životni vijek, a uzimajući u obzir relativno dugu ovulaciju rezultati isto tako mogu biti poražavajući. Prethodno nabrojano nameće zaključak da spermiji mogu preživjeti smrzavanje, ali nakon odmrzavanja očituju slabiji potencijal za oplodnju (HOLT i PENFOLD, 2014.).

2.4. ULOGA MELATONINA I SEZONOST JARČEVA

Epifiza je endokrina žlijezda koja luči hormon melatonin, a prvi se puta u povijesti vjerojatno spominje još u 3. stoljeću. Od tada pa do danas epifiza, a kanije i melatonin

predstavljaju neiscrpan izvor hipoteza znanstvenicima. Decartes je tijekom 17. stoljeća opisao epifizu kao treće oko odnosno mjesto ljudske mašte i zdravog razuma. Početkom 20. stoljeća prvi se puta melatonin dovodi u svezu s reprodukcijom. Sredinom 20. stoljeća otkrivena je veza cirkadičnog ritma (dan-noć) i metabolizma epifize (SIMONNEAUX i RIBELAYGA, 2003.). Danas se uz cirkadični i sezonski ritam melatonin dovodi u usku svezu s antioksidacijskim pokazateljima, a posebice s antioksidacijskim statusom sjemene plazme.

Melatonin je ubikvitarna molekula odnosno prisutna je u bakterijama, jednostaničnim organizmima, biljkama, beskralješnjacima i kralješnjacima (REITER i sur., 2013.). TAN i sur. (2013.) su pokazali da su mitohondriji u žitotinjskim stanicama i kloroplasti u biljkama mjesta najveće produkcije slobodnih radikala odnosno mjesta izrazito podložna oksidativnom stresu. S prethodnim u svezi, a kao zaštita od oksidativnog stresa, to su ujedno i mjesta vrlo visoke produkcije melatonina koji izravno i posredno sudjeluje u neutralizaciji štetnog djelovanja slobodnih radikala. Mjesta nastanka melatonina uz epifizu su: gastrointestinalni trakt, oko, limfociti, koštana srž, koža i folikul, s time da melatonin generiran na spomenutim mjestima ne ulazi u opću cirkulaciju već samo djeluje lokalno i to prvenstveno u antioksidativnoj zaštiti (SIMONNEAUX i RIBELAYGA, 2003.). Epifiza luči melatonin cirkadičnim (dan-noć) i sezonskim ritmom. U sisavaca melatonin se u cirkadičnom ritmu luči noću. Uloga cikličkog lučenja melatonina očituje se u omogućavanju prilagodbe organizama na dnevne i sezonske fiziološke fluktuacije odnosno u pružanju informacija organizmima o vremenu (SIMONNEAUX i RIBELAYGA, 2003.).

Sezonost je pojava u umjerenom klimatskom pojasu prisutna u malih preživača i cervida koju karekterizira pojavnost spolnog ciklusa u određeno vrijeme kako bi se osigurao dolazak na svijet potomstva u najoptimalnije godišnje doba-proljeće i ljeto, kada je prirodne hrane u umjerenom klimatskom pojasu u izobilju (SIMONNEAUX i RIBELAYGA, 2003.). Spomenutu pojavu također karakteriziraju velike razlike u spolnom ponašanju, veličini testisa muških rasplodnjaka te kvalitativnim i kvantitativnim promjenama ejakulata (SATHE i SHIPLEY, 2014.). Smanjenje dnevne svjetlosti nastale nakon ljetnog solsticija djeluje stimulativno na frekvenciju i amplitudu lučenja melatonina iz epifize. Spomenuto ima za posljedicu aktivaciju hipotalmo-hipofizarno-gonadalne osovine koja dovodi do povišenja razine testosterona u krvi, spermiogeneze i aktivnog spolnog ponašanja kako u muških tako i u ženskih jedniki. Okolišni čimbenici kao što su

temperatura i nutritivni faktori pa tako i društveni čimbenici (vizualni i olfaktorni utjecaj mužjaka i ženke) mogu imati povoljan ili negativan utjecaj na prethodno spomenuto potaknuto spolno ponašanje (ROSA i BRYANT, 2003.). Produženo noćno lučenje melatonina utječe također na pojačano lučenje GnRH te time posljedično dolazi do povišenja količene LH koji ima presudnu ulogu u ovarijalnom ciklusu i produkciji sperme (MISZTAL i sur., 2002.). Smanjivanjem noćnih perioda tijekom proljeća i ljeta što ima za posljedicu smanjeno lučenje melatonina dolazi (preko osovine hipotalamus-hipofiza-testisi) do pada kvalitete ejakulata u ovnova (LINCOLN i sur. 1990.). Nekolicina autora je pokazala da se egzogenom primjenom melatonina izvan rasplodne sezone se u ovnova može izazvati učinak kratkih dana odnosno povećanje razine gonadotropnih hormona, povećanje testisa, poboljšanje kvalitete sperme, povaćanje spermiogeneze i plodnosti (CEBRIÁN-PÉREZ i sur., 2014.). U rutinskoj upotrebi postoje ušni implantanti melatonina pa je tako u izradi ovog doktorskog rada korišten melatonin proizvođača Melovine®, CEVA, Libourne, Francuska. Vrlo je velika sličnost u sezonosti ovaca i koza s time da su u sanskih i alpino jarčeva zabilježene najviše razine testosterona u kasno ljeto i ranu jesen (SATHE i SHIPLEY, 2014.). Uzimajući u obzir saznanja o prirodnoj sezonosti, smještajem životinja u kontrolirane uvjete po pitanju svjetlosti moguće je na umjetan način utjecati na sezonost odnosno inducirati reproduktivnu aktivnost. Kombinirani program utjecaja na osvjetljenje i upotreba egzogenog melatonina pokazala se kao najbolji način aktivacije i zadržavanja spolne aktivnosti izvan rasplodne sezone (ZARAZAGA i sur., 2010; SAMARDŽIJA i sur., 2010.). Pozitivni učinci melatonina na spermije osim u ovaca i koza dokazani su i u čovjeka, svinja i konja što upućuje na činjenicu da predmetni učinci nisu isključivo vezani uz osovinu hipotalamus-hipofiza-testis već da melatonin izravno utječe na neutralizaciju negativnih učinaka slobodnih radikala, a neometanim prolaskom kroz stanične membrane spomenuti učinci su u jednakoj mjeri izraženi kako u intracelularnom tako i u ekstracelulanom prostoru (CEBRIÁN-PÉREZ i sur., 2014.).

In vitro suplemantacija melatonina u ejakulat rezultira: poboljšanom gibljivosti spermija u ljudi, poboljšanom kvalitetom određenih parametara spermija ovnova i svinja, smanjivanjem negativnih učinaka slobodnih radikala odnosno rezultira redukcijom lipidne peroksidacije membrana, redukcijom markera apoptoze i sprečavanjem fragmentacije DNK (CEBRIÁN-PÉREZ i sur., 2014.). Iz navedenih razloga još su SUCCU i sur. (2011.) pokazali da se dodatkom melatonina u razrjeđivač namijenjen za smrzavanje sperme u ovnova poboljšava funkcija spermija nakon odmrzavanja. Rezultati istraživanja su pokazali

da je nakon dodatka 1 mM melatonina bio veći postotak ukupno pokretljivih i progresivno pokretljivih spermija, viši postotak brzo i srednje brzo pokretljivih spermija, viša intracelularna ATP koncentracija i viši postotak spermija sa neoštećenom DNK. U prilog spomenutom, PERUMAL i sur. (2013.) su proveli istraživanje kojim je dokazano da suplementacija melatonina u razrjeđivač za spermu i naknadno hlađenje tako razrijeđene sperme na +5°C kroz 30 sati, kod poludivljeg Dulong goveda, rezultira manjim postotkom mrtvih spermija, abnormalnih spermija i spermija s oštećenom akrosomom.

SHARKEY i sur. (2009.) spominju ulogu melatonina u sinergiji s oksitocinom u upravljanju kontrakcijama miometrija dok PALACIN i sur. (2008.) usko povezuju melatonin s funkcijama jajnika i pozitivnom ulogom u preživljavanju embrija. Ulogu melatonina u upalnom i imunosnom odgovoru izazivajući kemotaksiju leukocita su pojasnili PEÑA i sur. (2007.).

2.5. REAKTIVNI KISIKOVI SPOJEVI I OKSIDACIJSKI STRES

Svaki atom je građen od protona i neutrona u jezgri i elektrona u vanjskom omotaču. Ukoliko je vanjska orbita atoma ispunjena elektronima, takva molekula odnosno atom se nalazi u stabilnoj formi. Atomi u prirodnim procesima često gube elektrone u vanjskim ljuskama i time kao nestabilni ulaze u kemijske reakcije s drugim atomima i molekulama kako bi opet postali stabilni na način da podijele elektrone vanjske orbite. Oksidacija je kemijska reakcija pri kojoj molekule ili tvari otpuštaju elektrone odnosno električni naboj nasuprot redukciji pri kojoj molekule ili tvari primaju elektrone. Reducens je tvar koja otpušta elektrone i pritom se oksidira, a oksidans je tvar koja prima elektrone i pritom se reducira. Naziv „oksidacija“ je povijesni iz razloga jer se nekad smatralo da prilikom spomenutog procesa dolazi do spajanja nekog kemijskog elementa s kisikom. Prethodno nabrojane kemijske reakcije (redox reakcije) prisutne su u mnogobrojnim procesima u prirodi kao što su fotosinteza, stanično disanje i dr. Slobodni radikali su atomi ili molekule koje posjeduju u vanjskoj ljusci jedan ili više nesparenih elektrona. U stanicama živih organizama pod utjecajem raznih vanjskih ili unutrašnjih čimbenika dolazi do pucanja molekularnih sveza i nastanka nestabilnih slobodnih radikala koji stupaju u kemijske reakcije s najbližim molekulama te time i njih čine nestabilnim. Spomenute reakcije rezultiraju nastankom sve većeg broja slobodnih radikala što u konačnici u

biološkom smislu dovodi do oštećenja intracelularnih makromolekula i stanične disfunkcije (ROBB i sur., 2014.).

U biokemijskom smislu najznačajniji slobodni radikali su reaktivni kisikovi spojevi (ROS). ROS primarno nastaju kao produkti staničnog metabolizma koji se odvija u mitohondrijima, ali mogu nastati pod utjecajem vanjskih čimbenika kao što je npr. ionizacijsko zračenje, različiti kemijski reagensi, UV zračenje, industrijska otapala i dr. (SHARMA i sur., 2015.). Od najznačajnijih ROS-a nastalih kao produkt staničnog metabolizma su hidrogen peroksid (H_2O_2), hipoklorna kiselina (HClO), hidroksil radikal (OH) i superoksid (O_2^-) (ISLAM i PERVIN, 2011.). Produkcija ROS-a u stanicama odnosno staničnim organelama može imati fiziološku i patofiziološku ulogu. Hiperprodukcija ROS-a dovodi do različitih akutnih i kroničnih bolesti. Primjerice oštećenjem neurona dovodi do neurodegenerativnih bolesti, oštećenjem β-stanica Langerhansovih otočića dolazi do dijabetesa i usko vezanih komplikacija, uzrokuje reumatiodni artritis, uzrokuje oštećenja raznih makromolekula (lipida, proteina, nukleinskih kiselina, ugljikohidrata i dr.), dovodi do kardiovaskularnih poremećaja (agregacija trombocita, disfunkcija endotela krvnih žila, ateroskleroza, hipertenzija i dr.), a kao inicijator apoptoze nefrona dovodi do nefrotoksičnosti (SHARMA i sur., 2015.). Nasuprot spomenutoj patološkoj ulozi, ROS sudjeluje u brojnim fiziološkim procesima vezanih uz metabolizam inzulina, autofagiju uz pomoć lizosomalnih enzima, fiziološku apoptozu određenih stanica (prilikom delaminacije endometrija kod menstruacije, fiziološke atrofije prostate nakon kastracije, involucije mliječne žlijezde, odumiranju epidermalnih stanica i dr.), imunološki sustav (eliminacija patogenih bakterija uz pomoć makrofaga) te kapacitaciju spermija (SHARMA i sur., 2015.).

Oksidativni stres kao posljedica djelovanja ROS-a je od primarnog značaja u procesu manipulacije, razrjeđivnja, hlađenja i smzravanja spermija. Sastav stanične membrane spremija koja im omogućava izrazitu pokretljivost i savitljivost, a koja u svojoj strukturi fosfolipida kao gradivnih elemenata sadrži velik udio višestruko nezasičenih masnih kiselina čini spremije izrazito podložne oksidativnom stresu (SURAI, 2002.). Tijekom krioprezervacije spermiji bivaju podvrgnuti temperatunom šoku i atmosferskom kisiku što ima za posljedicu lipidnu peroksidaciju staničnih membrana spermija. Spomenuta oštećenja membrana rezultiraju smanjenim potencijalom spermija za oplodnju. Hidrogen peroksid se smatra jednim od primarnih citotoksičnih slobodnih radikala za spermije (BAUMBER i sur., 2000.). BAUMBER i sur. (2002.) su istražili utjecaj

polimorfonuklearnih leukocita na konjske spremije odvojene od plazme i došli do zaključka da spomenuti leukociti u omjeru 2,5:1 naspram spermija značajno utječu na njihovu smanjenu pokretljivost.

2.5.1. LIPIDNA PEROKSIDACIJA

Spermiji su tijekom svog života konstantno pod utjecajem ROS-a, bilo da se radi o fiziološkoj produkciji kao rezultat staničnog metabolizma ili zbog utjecaja kisika prilikom procesa oplodnje. Za razliku od malih količina ROS-a koje potiču kapacitaciju i akrosomsku reakciju, visoke koncentracije dovode do lipidne peroksidacije koja je najizraženija u mitohondrijima, a koji se nalaze smješteni u središnjem dijelu spermija (MAJIĆ BALIĆ i sur., 2012.). NEAGU i sur. (2010.) su istraživali ulogu lipidne peroksidacije u spermijima pasa nakon krioprezervacije i odmrzavanja. Poznato je da su glavni izvor ROS-a mitohondriji. Istraživanje je pokazalo da lipidna peroksidacija nema značajnu ulogu prilikom smrzavanja i odmrzavanja sperme pasa štoviše nakon odmrzavanja su vrijednosti lipidne peroksidacije bile neznatno niže. Spomenutu pojavu objašnjava činjenica da smrzavanje spermija utječe na zaustavljanje procesa staničnog disanja u mitohondrijima i time rezultira smanjenjem produkcije ROS-a .

Omjer ukupnih lipida i proteina kao najznačajnijih gradivnih elemenata stanične membrane spermija je približno podjednak s time da su proteini diskontinuirano uronjeni u lipidni dvosloj. Lipidni dvosloj je građen od fosfolipida čije hidrofilne glave su okrenute prema intra i ekstracelularnom prostoru, dok je hidrofobni dio koji se sastoji od masnih kiselina smješten u središnjem dijelu lipidnog dvosloja. Upravo taj dio je podložan djelovanju slobodnih radikala. Prilikom maturacije spermija nerasta, bika, ovna i štakora dolazi do smanjenja zastupljenosti lipida u staničnoj membrani dok je smanjenje zastupljenosti količine kolesterola prisutno u ovna, štakora i hrčka (EDDY, 2006.). Udio višestruko nezasićenih masnih kiselina (dokozaheksaenske kiseline = DHA) u staničnoj membrani spermija značajno je veći u nezrelim spermijima u odnosu na zrele spermije što ukazuje na smanjenje udjela DHA tijekom procesa sazrijevanja spermija (OLLERO i sur., 2000.).

Prema BUEGE i AUST (1978.) lipidna peroksidacija u pravilu započinje otpuštanjem vodikovog elektrona s atoma nezasićene masne kiseline što ima za posljedicu stvaranje lipidnog radikala koji ponovno može izdvojiti atom vodika iz lipida u susjedstvu i dovesti do stvaranja lipidnog hidroperoksida ili stvaranja lipidnog endoperoksida.

Stvaranje lipidnog endoperoksida u nezasićenim masnim kiselinama dovodi do stvaranja malodialdehida kao raspadnog produkta.

ĐUKIĆ i sur. (2008.) spominju da kroz tri faze lipidne peroksidacije u kojima od lipida nastaje lipidni radikal pa peroksil radikal iz kojega se u konačnici stvara hidroperoksid i endoperoksid, kao glavni raspadni produkt nastaju aldehidi i to malondialdehid (MDA) i 4-hidroksinonenal (HNE). MDA prvenstveno nastaje kao raspadni produkt arahidonske i linolenske kiseline.

Malondialdehid nastao kao produkt lipidne peroksidacije nezasićenih masnih kiselina u reakciji s tiobarbiturnom kiselinom služi kao indikator određivanja opsega peroksidacijske reakcije prilikom apsorpcije crvene boje na 535 nm valne duljine (BUEGE i AUST, 1978.).

2.6. ANTIOKSIDACIJSKI ZAŠTINI MEHANIZMI

Protutežu ROS-u u organizmu odnosno stanicama čine antioksidansi. Atioksidansi su molekule koje mogu inhibirati štetne učinke oksidativnog stresa na način da budu sami oksidirani (ISLAM i PERVIN, 2011.). Stanice organizma su pod stalnim kako negativnim tako i pozitivnim utjecajem slobodnih radikala. Nemogućnošću organizma da se antioksidansima odupre štetnom djelovanju slobodnih radikala dolazi do oksidativnog stresa. Stanice posjeduju nekoliko mehanizama obrane od štetnog djelovanja ROS-a. Načelno se razlikuju endogeni enzimatski i neenzimatski zaštitni mehanizmi od egzogenih mehanizama (MUT-SALUD i sur., 2016.). Egzogeni antioksidansi dospijevaju u ogranizam najčešće alimentarnim putem, ali neki od njih mogu biti i sintetizirani u samom organizmu.

MUT-SALUD i sur. (2016.) razlikuju tri linije obrane organizma od slobodnih radikala. Prva linija sprečava nastajanje novih slobodnih radikala, a čine je enzimi (superoksid dismutaza, katalaza, glutation peroksidaza, glutation reduktaza), proteini koji vežu metale (feritin, ceruloplazmin) i metali (selen, bakar, cink). Druga linija prevenira lančanu reakciju slobodnih radikala, a čine je glutation, albumini, vitamini C i E, flavonidi i karoteni. Treću liniji čine enzimi koji „popravljaju“ oštećenja izazvana od slobodnih radikala na staničnim organelama, a čine je lipaze, proteaze, tranferaze i reduktaze.

U postupku dubokog smrzavanja spermija potrebno je ejakulat razrijediti razrjeđivačem kako bi se zaštitilo spermije od osmotskog i temperaturnog šoka, a ukoliko

se ejakulat i centrifugira neminovno dolazi do smanjene koncentracije antioksidansa. Suplementacijom različitih antioksidativnih enzima razrjeđivaču za ovnovo sjeme poboljšala se gibljivost i preživljavanje spermija, poboljšao se kapacitet spermija za oplodnju *in vitro*, reducirao se broj staničnih oštećenja te je bio veći broj spermija s intaktnom akrosomom (MAIA i sur., 2010.). Pozitivni učinak suplementacije različitih antioksidansa na određene paremetre spermija varira u zavisnosti od vrste i tipu razrjeđivača (TARIQ i sur., 2015.).

2.6.1. ENZIMATSKI ANTIOKSIDACIJSKI ZAŠTITINI MEHANIZMI

Iako male (fiziološke) količine ROS-a imaju pozitivne učinke u reprodukcijskom smislu prilikom hiperaktivacije spermija, kapacitacije i akrosomske reakcije, veća količina ROS-a nastala prilikom postupka smrzavanja-odmrzavanja sperme ima višestruko negativne učinke na spermije ukoliko se u spermijima i sjemenoj plazmi ne nalaze u dovoljnoj količini antioksidansi, poglavito antioksidativni enzimi.

ASHRAFI i sur. (2013.) su istražili utjecaj melatonina, prilikom razrjeđivanja i postupka smrzavanja-odmrzavanja bičje sperme, na aktivnost antioksidativnih enzima te pokazali da je aktivnost katalaze i superoksid dismutaze porasla nakon suplementacije melatonina dok se aktivnost glutation peroksidaze nije značajno razlikovala u pokusnoj i kontrolnoj skupini.

CASAO i sur. (2010.) su istražili sezonske varijacije razine melatonina, testosterona, superoksid dismutaze, glutation reduktaze, glutation peroksidaze i katalaze u sjemenoj plazmi sezonski poliestričnih ovnova te njihovu međuovisnost. Rezultati su pokazali pad razine melatonina i testosterona nakon zimskog solsticija i rast nakon ljetnog solsticija s maksimalnim vrijednostima u rasplodnoj sezoni. Značajna korelacija je zabilježena između razina spomenutih hormona i glutation reduktaze, superoksid dismutaze i katalaze.

CASAO i sur. (2013.) su istražili utjecaj egzogenog melatonina izvan rasplodne sezone na razinu endogenog melatonina, testosterona, 17-β estradiola te antioksidativnih enzima (glutation peroksidaze, glutation reduktaze, superoksid dismutaze i katalaze). Razine endogenog melatonina, testosterona i 17-β estradiola su bile značajno veće kao rezultat utjecaja egzogenog melatonina. Razine glutation peroksidaze i glutation reduktaze su isto tako značajno porasle za razliku od superoksid dismutaze i katalaze čije se razine nisu značajno razlikovale od kontrolne skupine.

2.6.1.1. GLUTATION REDUKTAZA

Glutation reduktaza (GR) odnosno glutation disulfid reduktaza je enzim koji katalizira redukciju glutation disulfida u dvije molekule glutationa (DEPONTE, 2013.). Nadalje isti autor navodi da spomenuti enzim ima tri supstrata odnosno tri molekule na koje djeluje, a to su NADPH, H^+, GSSG. Drugim riječima glutation reduktaza koristi NADPH, odnosno uz redukciju NADPH u oksidirani oblik ($NADP^+$), kako bi oksidirani oblik glutationa (GSSG) „obnovio" u reducirani oblik (GSH), dok GSH nadalje služi kao reducirajuća tvar, uz djelovanje glutation peroksidaze, za štetni vodikov peroksid te ga pretvara u vodu. Iako razina mitohondrijske glutation reduktaze ima značajniju ulogu od citosolne glutation reduktaze, funkcija spomenutog enzima nije od vitalnog značaja za mnoge prokariote i eukariote iz razloga jer su razvijeni različiti alternativni mehanizmi održavanja fiziološkog omjera GSH/GSSG navodi isti autor.

Najveća razina aktivnosti glutation redukataze u muškom reproduktivnom sustavu je primijećena u epididimisu, sjemnovodu, sjemenim vrećicama i prostati odnosno epitelnim stanicama muškog reproduktivnog sustava (KANEKO i sur., 2002.). Isti autori su proveli istraživanje kod štakora na kulturi stanica testisa koje je uključivalo suplementaciju inhibitora sinteze glutationa i glutation reduktaze te došli do rezultata da su spermatogene stanice manje osjetljive na spomenute inhibitore za razliku od sertolijevih stanica što nameće zaključak da je ujedno doprinos spomenutih enzima od manjeg značaja u spermatogenim stanicama. Epitelne stanice bogate enzimom glutation reduktazom štite spermije od oksidacije prilikom maturacije i skladištenja (KANEKO i sur., 2002.).

2.6.1.2. GLUTATION PEROKSIDAZA

Glutation peroksidazu (GSH-Px) čini skupina enzima čija glavna uloga je u redukciji lipidnih hidroperoksida u odgovarajuće alkohole i vodikovog peroksida u vodu uz oksidaciju reduciranog glutationa (TODOROVIĆ, 2013.). Široko rasprostranjena je u gotovo svim stanicama sisavaca, a načelno se razlikuju dvije forme po broju podjedinica, prirode vezivanja selena u aktivnom centru i različite katalitičke aktivnosti spomenutog enzima i to kao GSH-Px ovisne o selenu (GSH-Px1, GSH-Px2, GSH-Px3 i GSH-Px4) i GSH-Px neovisne o selenu (GSH-Px5, GSH-Px6, GSH-Px7 i GSH-Px8) (VALKO i sur., 2006.). Isti autor navodi da GSH-Px konkurira enzimu katalazi u neutralizaciji štetnog vodikovog peroksida kao glavni antioksidans prilikom niske razine oksidativnog stresa. Selen ovisne GSH-Px u sposobnosti su katalizirati redukciju organskih i neorganiskih

supstrata za razliku od selen neovisnih GSH-Px koje kataliziraju isključivo organske supstrate (TODOROVIĆ, 2013.).

GSH-Px1 je citosolna odnosno mitohondrijska peroksidaza. GSH-Px1 je homotetramer koji u aktivnom središtu svake od četiri identične podjedinice sadrži selenocistein te se nalazi u gotovo svim stanicama organizma, a najviše je zastupljen u tkivima s visokom koncentracijom vodik peroksidnih iona kao što su eritrociti, jetra, bubrezi i pluća (TODOROVIĆ, 2013.). GSH-Px1 se naziva prototipom enzima glutation peroksidaza te ima primarnu ulogu u zaštiti od oksidativnog stresa za razliku od ostalih izoformi (BRIGELIUS-FLOHÉ i MAIORINO, 2013.).

GSH-Px2 je gastrointestinalna peroksidaza, vrlo sličan GSH-Px1, uglavnom izražena u epitelu jednjaka, a kod čovjeka i u jetri gdje uglavnom ima funkciju zaštite od hranom unesenih hidroperoksida (BRIGELIUS-FLOHÉ i MAIORINO, 2013.). Isti autori navode da se visoke koncentracije GSH-Px2 nalaze i na bazi kripta kolona te resicama tankog crijeva premda na spomenutim mjestima nije od primarnog značaja u obrani od unesenih hranom hidroperoksida.

GSH-Px3 je također vrlo sličan strukturalno GSH-Px1, a naziva se plazmatska ili izvanstanična peroksidaza te se u plazmi nalazi u obliku glikoziliranog proteina (BRIGELIUS-FLOHÉ i MAIORINO, 2013.). Isti autori navode da se GSH-Px3 nalazi u proksimalnim savijenim kanalićima bubrega, u komoricama oka, štitnjači, masnom tkivu i amnionskoj tekućini. U epididimisu se sintetizira GSH-Px3 i otpušta se u lumen u kojem se nalaze pohranjeni spermiji dok se sintetiziran u bubrezima transportira do bazalnih membrana i drugih tkiva.

GSH-Px4 je za razliku od prethodnih peroksidaza monomer po strukturi, a prvotno je bio karakteriziran kao inhibicijski protein lipidne peroksidacije. Razlikuju se 3 izoforme: citosolni, mitohondrijski i spermatozoarni GSH-Px4 (BRIGELIUS-FLOHÉ i MAIORINO, 2013.). Najznačajnija uloga GSH-Px4 jest u sprječavanju lipidne peroksidacije biomembrana, a specifičnost očituje u aterogenezi sposobnošću redukcije hidorperoksida u HDL i LDL (TODOROVIĆ, 2013.). Iako je citosolna GSH-Px4 sveprisutna u stanicama, mitohondrijska i spermatozoarna prvenstveno se nalazi u testisima (BRIGELIUS-FLOHÉ i MAIORINO, 2013.). Spermatozoarna GSH-Px4 ima ulogu u stabilizaciji strukturalnog integriteta spermijskog kromatina navode isti autori. GSH-Px4 također sudjeluje kao neuroprotektiv odnosno štiti od produkcije lipidnih hidroperoksida koji su odgovorni za neurodegenerativne bolesti.

GSH-Px5 je selen neovisni homotetramer koji u središtu svake podjedinice sadrži cistein. U kombinaciji sa GSH-Px3 čini više od 95% ukupnog GSH-Px u epididimisu miševa, štakora, svinja, majmuna i ljudi stoga se i naziva epididimska GSH-Px (BRIGELIUS-FLOHÉ i MAIORINO, 2013.). Isti autori nadalje navode da se GSH-Px5 izlučuje u lumen epididimisa gdje se važe za glave spermija te time štiti spermije od peroksidnih oštećenja i preuranjene akrosomske reakcije prilikom pohrane.

GSH-Px6 je homotetramer koji kod čovjeka sadrži selenoprotein u strukturi dok kod glodavaca i ostalih vrsta sadrži cistein. Spomenuta peroksidaza se naziva još i olfaktorna peroksidaza premda je njegova uloga još uvijek nepoznanica (BRIGELIUS-FLOHÉ i MAIORINO, 2013.).

GSH-Px7 je monomer koji u katalitičkom odnosno aktivnom centru sadrži cistein, a opisan je citosolni protein te je kasnije pronađen i u lumenu endoplazmatskog retikuluma (BRIGELIUS- FLOHÉ i MAIORINO, 2013.).

GSH-Px8 je protein membrane endoplazmatskog retikuluma s najvećom koncentracijom u plućima, a čija koncentracija opada tijekom upale pluća te postepeno raste kako se tkivo pluća nakon upale regenerira (BRIGELIUS- FLOHÉ i MAIORINO, 2013.).

2.6.1.3 SUPEROKSID DISMUTAZA

Dismutaza reakcije je pojam koji uključuje oksidaciju i redukciju superoksidnih iona do molekula kisika i vodikovog peroksida (značajno manje toksičan od superoksida), a koji imaju izuzetno toksična svojstva. Razlikuju se unutarstanična bakar-cink superoksid dismutaza (koja se nalazi u citoplazmi, jezgri i peroksisomima), izvanstanična superoksid dismutaza, mitohondrijska superoksid dismutaza (DJORDJEVIĆ, 2004.).

Bakar-cink superoksid dismutaza (CuZnSOD) je enzim prisutan u gotovo svim stanicama sisavaca, a sastoji se od dvije identične podjedinice. Svaka od spomenutih podjedinica sadrži Cu i Zn s time da je Cu poglavito važan u katalitičkim reakcijama dok je Zn bitan u stabilizaciji enzimske konformacije. Najviša aktivnos CuZnSOD je primijećena u jetri i bubrezima (MARKLUND, 1984.). CuZnSOD pronađena u serumu i izvanstaničnoj tekućini s specifičnim afinitetom prema heparin-sulfatu se naziva izvanstanična superoksid dismutaza (EC SOD) (DJORDJEVIĆ, 2004.). Najviša aktivnost EC SOD-a je zabilježena u plućima, bubrezima i skeletnoj muskulaturi (MARKLUND, 1984.). Razina i aktivnost EC SOD je povezana sa mnogim patofiziološkim procesima kao što su razne upale,

ateroskleroza, hipertenzija, dijabetes, infarkt miokarda, reumatoidni artritis, i razni neurološki poremećaji (TODOROVIĆ, 2013.). Mangan superoksid dismutaza je enzim isključivo specifičan za mitohondrije stoga se i naziva mitohondrijska superoksid dismutaza (MnSOD). Najviša aktivnost MnSOD je zabilježena u respiratornim organima, jetri, bubrezima i miokardu (MARKLUND, 1984.). Glavna uloga MnSOD je mitohondrijska zaštita od ROS-a s time da i najniže razine ROS-a mogu inducirati tvorbu MnSOD-a (DJORDJEVIĆ, 2004.).

BUCAK i sur. (2010.) su pokazali da je aktivnost SOD bila značajno viša prilikom postupka smrzavanja-odmrzavanja ovnovog sjemena s dodatkom kurkumina u razrjeđivač prije smrzavanja sperme. Ipak razina lipidne peroksidacije nije bila značajno promijenjena u odnosu na kontrolnu skupinu prilikom dodatka kurkumina navode isti autori.

2.6.1.4. KATALAZA

Katalaza je tetramer odnosno enzim građen od 4 podjedinice od kojih svaka sadrži jednu molekulu hema. Enzim katalaza je prisutan u gotovo svim organizmima, a najveća aktivnost je zabilježena u jetri i crvenim krvnim zrncima dok unutarstanična lokacija katalaze je u peroksisomima i mitohonrijima (DJORDJEVIĆ, 2004.). Glavna uloga katalaze je razgradnja vodikovog peroksida na kisik i vodu (KIRKMAN i GAETANI, 1984.). Za razliku od ostalih antioksidativnih enzima, katalaza ima daleko najizraženiju sposobnost razlaganja vodikovog peroksida (VALKO i sur., 2006.). CÂMARA i sur. (2011.) su pokazali da suplementacija katalaze u razrjeđivač za sjeme ovna prilikom ohlađivanja na +5°C umanjuje negativne efekte temperature odnosno povoljno utječe na ukupnu pokretljivost spermija premda nije zabilježen utjecaj suplementacije katalaze na membransku funkciju spermija. Suplementacija aminokiseline cisteina u razrjeđivač za ovnovo sjeme u dozi od 5mM značajno je utjecalo na podizanje aktivnosti katalaze u procesu smrzavanja-odmrzavanja sjemena (BUCAK i sur., 2008.).

2.6.2. NEENZIMATSKI ANTIOKSIDACIJSKI ZAŠTINI MEHANIZMI

Načelno se neenzimatski antioksidansi dijele na topive u vodi (hidrofilne) i topive u mastima (hidrofobne). Hidrofilni antioksidansi izražavaju svoje djelovanje unutar stanica i krvnoj plazmi za razliku od hidrofobnih antioksidansa koji sudjeluju u očuvanju inegriteta staničnih membrana odnosno u sprječavanju oštećenja staničnih membrana od ROS-a. U

većini slučajeva antioksidansi djeluju sinergistički odnosno djelovanje jednog uvelike ovisi o djelovanju drugih antioksidansa (ISLAM i PERVIN, 2011.).

2.6.2.1. GLUTATION

Glutation (γ-glutamilcisteinglicin) je tripeptid sastavljen od aminokiselina glicina, cisteina i glutaminske kiseline (POMPELLA i CORTI, 2015.). Sintetizitra se isključivo u citosolu velikog broja živih organizama, a nalazi se u jezgri, endoplazmatskom retikulumu te od posebnog značenja je njegova uloga u mitohondrijima (RIBAS i sur., 2014.). Glutation je prisutan u stanicama u relativno visokim koncentracijama (približno 5mM) i to u dva oblika: reduciranom (GSH) i oksidiranom (GSSG) s time da oksidirani oblik čine dvije molekule reduciranog oblika povezane disulfidnim vezama (PIZZORNO, 2014.). Reducirani oblik je u mogućnosti „donirati" redukcijski evivalent (vodik, elektron) nestabilnim molekulama (ROS) te time i sam postaje reaktivan, ali zbog visoke koncentracije GSH u stanicama vrlo lako reagira s drugim reaktivnim GSH i time formira GSSG. Isti autor dalje navodi da ukoliko je omjer GSH/GSSG u stanicama 1:10, stanica je pod utjecajem oksidativnog stresa za razliku od „zdrave" stanice u kojima je taj omjer >100. Naznačajne uloge GSH koje spominje PIZZORNO (2014.) jesu da sudjeluje:

1) u izravnoj neutralizaciji slobodnih radikala (hidroksil, superokid i dr.)
2) kao kočimbenik nekolicine antioksidativnih enzima
3) u regeneraciji vitamina C i E
4) u eliminaciji odnosno transportu Hg iz stanica
5) u regulaciji stanične proliferacije i apoptoze
6) u funkciji i održavanju mitohondrijske DNK (sposobnost životinjskih vrsta da zaštiti svoju mitohondrijsku DNK je izravno proporcionalna dugovječnosti)
7) u neutralizaciji kemijskih toksina nastalih u prvoj fazi metabolizma jetre.

MISCHA i sur. (2010.) zaključuju da glutation ima značajnu ulogu u uklanjanju slobodnih radikala posebice hidrogen peroksida i hidroksil radikala u sinergiji s glutation reduktazom te time sudjeluje u očuvanju membrane spermija sprječavajući lipidnu peroksidaciju.

CÂMARA i sur. (2011.) u raspravi o negativnim učincima na brzinu kretanja spermija prilikom suplementacije GSH (400mM) u spermu ovna ohlađenu na +5°C kroz 24 sata, navode mogućnost utjecaja visoke koncentracije GSH na homeostazu kalcijevih

iona odnosno visoka koncentracija kalcijevih iona ima negativne učinke na spermije prilikom krioprezervacije sperme ovna.

2.6.2.2. VITAMIN C I E

Vitamin C neki organizmi ne mogu sami sintetizirati stoga ih je neophodno unositi u organizam alimentarnim putem (ISLAM i PERVIN, 2011.). Vitamin C je poznat po ulozi „donora“ elektrona i time sprječava nakupljanje slobodnih radikala, a posebice je učinkovit u eliminaciji superoksid anion radikala, hidrogen peroksida, hidroksila i drugih (MUT-SALUD i sur., 2016.). Koncentracija vitamina C u sjemenoj plazmi je više od deset puta veća od koncentracije u krvnoj plazmi, a iznosi 65% ukupne količine antioksidansa (TARIQ i sur., 2015.). Isti autori dalje navode da dodatkom 1 mM vitamina C i 0,1 mM vitamina E u žumanjčani razrjeđivač značajno smanjuje ROS u duboko smrznutoj spermi holštajn- frizijskog goveda. Dodatak vitamina C u razrjeđivač od obranog mlijeka i glicina prilikom smrzavanja sperme pastuha značajno djeluje na očuvanje integriteta staničnih membrna spermija što nameće zaključak da vitamin C inhibira lipidnu peroksidaciju membrana. Naprotiv prethodnoj tvrdnji dodatak vitamina C u razrjeđivač prilikom smrzavanja ljudske sperme nije polučio značajan rezultat. Iz prethodnog proizlazi zaključak da kvaliteta samog razrjeđivača ima presudnu ulogu da li će suplementacija određenog antioksidansa polučit pozitivan učinak. Vitamin C sudjeluje u očuvanju integriteta stanične membrane spermija prilikom temperaturnog šoka u procesu dubokog smrzavanja sperme, a ujedno smanjuje incidenciju pojave oštećenja DNK spermija (AZAWI i HUSSEIN, 2013.).

Vitamin E, zbog izrazite sposobnosti otapanja u mastima, ulazi u samu strukturu staničnih membrana te ih time stabilizira i štiti od lipidne peroksidacije (MUT-SALUD i sur., 2016.). Vitamin E se često spominje u literaturi vezanoj za reprodukciju kao anti-sterilitetni čimbenik i čimbenik koji uz vitamin C, a koji ima izravnu funkciju u metabolizmu kao reaktivator vitamina E, sudjeluje u ukljanjanju peroksil i alkaoksil radikala (TARIQ i sur., 2015.). Isti autori navode dalje da suplementacija vitamina E prilikom hlađenja sperme nerasta ima pozitivan učinak na pokretljivost spermija i mitohondrijski membranski potencijal kao i kod sperme ovna gdje ima pozitivan utjecaj na gibljivost i preživljavanje spermija, a zamjetno je smanjenje utjecaja oksidativnog stresa na spermije. Pozitivan utjecaj vitamina E na superoksid, peroksil i hidroksil radikale u očuvanju integriteta stanične membrane spermija i njihove pokretljivosti u dobokoj

smrznutoj spermi jarca također navode prethodno spomenuti autori. SILVA i sur. (2013.) su zaključili da dodatak Trolox-a (u vodi topljiv analog vitamina E) u žumanjčani razrjeđivač u koncentraciji 60 i 120 μM ima pozitivan učinak na integritet stanične membrane spermija, mitohondije i pokretljivost spermija ovna nakon krioprezervacije.

3. OBRAZLOŽENJE TEME

Intenzivna stočarska proizvodnja i visoka pasminska selekcioniranost predstavljaju sve veće prepreke i izazove kako znanstvenicima tako i samim uzgajivačima stoke. Oksidativni stres postaje vrlo značajan čimbenik u reprodukciji posebice muške neplodnosti. Mogućnost neutralizacije negativnih čimbenika oksidativnog stresa odnosno prekomjernog stvaranja slobodnih radikala prema dostupnoj literaturi pruža upotreba odnosno dodatak optimalne količine antioksidansa primjerice u razrjeđivače sjemena ili hranu. Primjenom egzogenog melatonina kao antioksidansa, ali i kao aktivatora produkcije antioksidativnih enzima otvara se mogućnost smanjenja posljedica oksidativnog stresa i/ili bolja mogućnost zaštite muških spolnih stanica prilikom procesa konzervacije. Nadalje, prema našem saznanju u dostupnoj literaturi nema podataka/istraživanja u kojima je istraživan učinak melatonina na antioksidacijsku zaštitu sjemena jarčeva u rasplodnoj sezoni kao ni izvan nje.

Ciljevi ovog istraživanja bili su:

1. Istražiti utjecaj egzogenog melatonina u jarčeva izvan sezone parenja na antioksidativnu enzimsku aktivnost sjemene plazme i spermija.
2. Utvrditi neposredni utjecaj melatonina na pokazatelje kvalitete ejakulata prije i poslije dubokog smrzavanja mjerenjem progresivne pokretljivosti spermija, funkcionalnog integriteta stanične membrane, morfološke abnormalnosti spermija, mitohondrijske aktivnosti, integriteta akrosomske membrane spermija i strukture stabilnosti kromatina spermija.
3. Istražiti učinak dodatka kombinacije antioksidansa (vitamin E i C) u razrjeđivač i to u dozama koje su u prethodnim istraživanjima polučile najbolje rezultate.

Hipoteza istraživanja temelji se na pretpostavci da će egzogeni melatonin u kombinaciji s vitaminima E i C poboljšati antioksidativnu zaštitu ejakulata koja bi se naročito trebala očitovati tijekom procesa konzervacije sjemena te da će se posljedično tome poboljšati kvaliteta sjemena i tako moguće utjecati na bolju plodnost prilikom umjetnog osjemenjivanja.

4. MATERIJAL I METODE ISTRAŽIVANJA

4.1. ŽIVOTINJE, SMJEŠTAJ I HRANIDBA

U eksperiment je bilo uključeno 12 klinički zdravih jarčeva pasmine francuska alpina starosti od 1.5 do 4 godine s tjelesnom masom od 40 do 60 kg. Životinje su bile smještene na tri obiteljske farme (po četiri jarčeva na svakoj farmi) na području djelovanja Veterinarske stanice d.d. Varaždin, područne ambulante Jalžabet, Varaždin, Hrvatska (46°18'15" sjeverno i 16°20'16" istočno). Obiteljske farme su jedna od druge udaljene unutar 5 km te je svaka farma imala otprilike 60-tak koza iste pasmine koje su držane u boksovima odvojeno od jarčeva. Sve životinje na farmama su držane u istim bioklimatskim uvjetima. Boksovi s jarčevima su bili dostatno osvijetljeni prirodnim svijetlom (svaki objekt je imao prozore i/ili dovodne otvore za zrak), a podovi su bili prekriveni steljom od slame. Jarčevi su bili dobre rasplodne kondicije te su u prethodnoj sezoni parenja ostvarili prosječnu koncepciju u koza od 92,5±10,6% s prosječnim brojem jaradi od 1,5±0,2 po kozi.

Jarčevi su na farmama hranjeni slično budući da su farme isto koncipirane kao obiteljska gospodarstva za držanje i uzgoj mliječnih koza. Jarčevi su svakodnevno dobivali livadno sijeno te otprilike 1 kg smjese. Najveći udio u smjesi je činio kukuruz (25%), zatim ječam (20%), pšenica (15%), zob (15%) te oko 23% komercijalne krmne smjese „KzO-Do“ (dopunska krmna smjesa za hranidbu koza i ovaca) i 2% dopunske krmne smjese „Ko-vi dar“, s visokim udjelom vitamina i minerala za koze i ovce (Koka, Varaždin, Hrvatska) (tablica 1.). Jarčevi su imali neograničen pristup (*ad libitum*) mineralnim blokovima (sol) i vodi. Pola dnevne porcije hrane su dobivali otprilike 1,5 h prije uzimanja ejakulata, a ostatak nekih 12 h kasnije.

Tablica 1. Sastav krmne smjese za jarčeve.

Dopunska krmna smjesa "KzO-Do"			Dopunska krmna smjesa "Ko-vi dar"	
sirove bjelančevine	30%		kalcij	29,9%
			fosfor	3%
			natrij	2%
sirova vlakna	20,9%		magnezij	2%
			bakar	8,32 mg
			cink	113 mg
sirova mast	1,7%		jod	1,15 mg
			željezo	75 mg
			magnezij	75 mg
pepeo	10,9%		selen	0,23 mg
			vitamin A	28800 IJ
			vitamin D	2950 IJ
natrij	0,7%		vitamin E	29 mg
			niacin	150 mg
			metionin	800 mg
			antioksidansi	11300 mg

Navedeni sastojci sadržani su u 1 kilogramu dopunske krmne smjese

4.2. DIZAJN POKUSA I POSTUPCI SA ŽIVOTINJAMA

Sa svake od tri farme su po dva jarca nasumično izabrana za kontrolnu skupinu životinja (ukupno šest jarčeva prosječne starosti 2.25±0.71 godina) te po dva jarca za pokusnu skupinu životinja (ukupno šest jarčeva prosječne starosti 2.64±0.84 godina). Izvođenje pokusa je trajalo od početka ožujka do kraja svibnja 2016. godine izvan rasplodne sezone (12 tjedana). Pokusni period od tri mjeseca je podijeljen na šest perioda od kojih je svaki trajao 15 dana. Početkom sezone (9 i 10 mjesec 2015. godine) te prije samog početka pokusa jarčevima je par puta uzet ejakulat umjetnom vaginom kako bi se navikli na osobu i polučivanje. Pokusnoj skupini životinja je krajem ožujka 2016. godine (4 tjedna od početka pokusa odnosno nakon prva dva perioda) aplicirano potkožno s vanjske strane uške četiri melatoninska implantata od 18 mg (ukupno 74 mg melatonina; Melovine®, CEVA, Libourne, Francuska) pomoću aplikatora za melatonin. Za vrijeme pokusa jarčevima se jednom tjedno u jutarnjim satima polučivao ejakulat. Obje skupine životinja su praćene zasebno od početka pokusa (prikupljanje podataka i statistička

analiza) kako bi se ustanovila eventualna varijabilnost između grupa. Zbog polučivanja ejakulata na svakoj farmi se inducirao estrus dvjema kozama koje su služile kao fantom. Koristio se standardni protokol sinkronizacije estrusa: intavaginalna aplikacija spužvice progestagena (40 mg; Fluorogestone acetate-FGA, Chronogest®, Intervet, Francuska) u periodu od 11 dana, te intramuskularna aplikacija prostaglandina (PGF2α) (75 μg; Estrumate®, Shering-Plough, Francuska) i konjskog korionskog gonadotropina (engl. *equine chorionic gonadotropin*, eCG), (400 IJ; Folligon®, Intervet, Nizozemska) 48 sati prije vađenja spužvice. Estrus se detektirao 24 do 30 sata nakon vađenja spužvice. Ukupno je po svakom periodu ejakulat uzet 12 puta u svakoj skupini (72 ejakulata po skupini u cijelom pokusnom periodu).

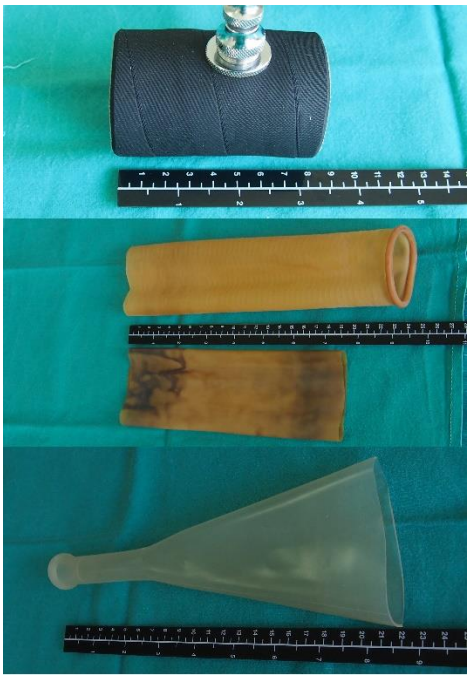
4.3. POLUČIVANJE I POSTUPAK S EJAKULATOM

4.3.1. POLUČIVANJE EJAKULATA

Ejakulat se svakom jarcu polučivao jedanput u tjedan dana pomoću umjetne vagine od strane uvijek iste osobe na koju su jarčevi bili navikli (slika 1.). Radi dobivanja većeg volumena sjemene plazme svakom jarcu je ejakulat uzet dva puta zaredom (u razmaku ne duljim od 15 minuta) prilikom tjednog prikupljanja ejakulata. Za polučivanje su korištene standardne umjetne vagine za jarčeve kojima je za potrebe ovog pokusa nešto skraćena vanjska tvrda guma i unutarnja mekana guma (oko 4 cm u duljinu) te ljevkasti gumeni nastavak od vagine do spermohvatača (slika 2.). To je napravljeno radi izbjegavanja kontakta ejakulata sa stijenkom unutarnje gumene navlake i gumenog lijevka umjetne vagine radi prikupljanja što veće količine ejakulata direktno u spermohvatač i skraćivanja vremena potrebnog za spuštanje ejakulata sa stijenki umjetne vagine u spermohvatač.



Slika 1. Polučivanje ejakulata jarcu uz prisustvo ženke u estrusu

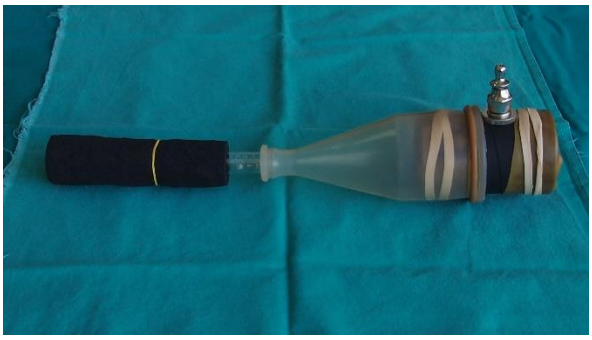


Slika 2. Dijelovi skraćene umjetne vagine za jarca

Kao spermohvatači su korištene sterilne staklene graduirane epruvete od 15 mL (slika 3.) Umjetne vagine su slagane prije odlaska na farmu i napunjene vodom zagrijanom na nešto više od 55°C kako bi unutrašnjost umjetne vagine imala temperaturu između 41°C i 43°C. Spermohvatač se umatao u crnu navlaku od spužve radi zaštite ejakulata od temperaturnog šoka i svjetla nakon polučivanja (slika 4.). Prilikom svakog skoka jarca bodovan je libido mužjaka, od 1 do 5 pomoću sljedećih karakteristika: 1 = jarac ne pokazuje nikakav interes za kozu u estrusu; 2 = jarac pokazuje interes za kozu tek kad dođe u njezinu neposrednu blizinu, njuška je, ali ne pokazuje aktivan refleks opasivanja (ne pokušava ju zaskočit); 3 = jarac pokazuje interes za kozu tek kad dođe u njezinu neposrednu blizinu, njuška je, pokušava je zaskočiti, ali mu za sve radnje treba puno vremena; 4 = jarac prilazi kozi, vrlo kratko je njuška, kratko se rasteže savijajući leđa i nakon toga skače na kozu; 5 = jarac već u odjeljku u kojem se nalazi pokazuje zanimanje za kozu koju samo može vidjeti, a prilikom izlaska iz odjeljka u svega par sekundi skače na kozu bez posebne pripreme.



Slika 3. Spermohvatač



Slika 4. Pripremljena umjetna vagina za jarca

4.3.2. OPREMA ZA POLUČIVANJE I POSTUPAK S EJAKULATOM

Da bi se s ejakulatom moglo postupati odmah nakon polučivanja na samoj farmi napravljen je modificirani prijenosni laboratorij (slika 5.) koji se sastojao od:

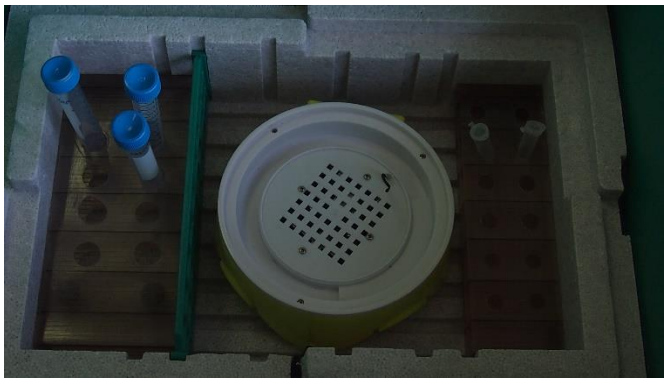
1. kutije za prijenos umjetnih vagina s ugrađenim grijačem i termostatom kako bi se spriječilo hlađenje prethodno pripremljenih umjetnih vagina (slika 6.)
2. prijenosnog hladnjaka za transport ejakulata
3. prijenosnog inkubatora namještenog na održavanje temperature od 21°C (slika 7.)
4. centrifuge namijenjene za centrifugiranje sadržaja u Eppendorf epruvetama na sobnoj temperaturi i zaštićene od utjecaja svjetla (slika 8.)
5. binokularnog mikroskopa „Axiostar Plus“ (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen, Njemačka) s grijačem odnosno spermotermom
6. fotometra „Accucell photometer tip 60CI0394“ (IMV technologies, Normandija, Francuska) za određivanje koncentracije spermija u ejakulatu
7. kutije s umjetnim vaginama
8. prijenosnog seta za bojenje po Bloom-u i Farelly-ju i ostale sitne opreme



Slika 5. Oprema prijenosnog laboratorija za polučivanje, ocjenu ejakulata i odvajanje sjemene plazme



Slika 6. Kutija za prijenos umjetnih vagina s ugrađenim grijačem i termostatom



Slika 7. Prijenosni inkubator za održavanje optimalne temperature



Slika 8. Centrifuga za Eppendorf epruvete

4.3.3. OCJENA NATIVNOG EJAKULATA

Odmah nakon polučivanja ejakulata izmjerio bi se volumen direktno s graduiranog spermohvatača. Zatim bi se ejakulat prebacio u Eppendorf epruvetu s konusnim dnom. Iz epruvete bi se uzelo 10 µL ejakulata za određivenje koncentracije te po kapljicu ejakulata za ocjenu pokretljivosti te za bojenje po Bloom-u i Farelly-ju.

4.3.3.1. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE EJAKULATA

Koncentracija spermija u 1 mL ejakulata određena je pomoću elektronskog brojača „Accucell photometer tip 60CI0394“ (IMV technologies, Normandija, Francuska). Uređaj je prije upotrebe bio kalibriran i podešen na postavke za brojanje spermija jarčeva. Odmah po uzimanju ejakulata ispipetiralo bi se 10 µL sjemena i razrijedilo u kivetu s 990 µL 0,9%-tne otopine NaCl-a. Ukupan broj spermija u ejakulatu izračunat je umnoškom volumena s koncentracijom spermija u 1 mL ejakulata, a ukupni funkcionalni broj spermija (engl. TFSF-total functional sperm fraction) izračunat je po sljedećoj formuli: TFSF=ukupan broj spermija u ejakulatu x gibljivi spermiji x spermiji normalne morfologije (RAMADAN i sur., 2009.).

4.3.3.2. ODREĐIVANJE GIBLJIVOSTI SPERMIJA

Gibljivost spermija procjenjena je u nativnom ejakulatu na dva načina uporabom binokularnog mikroskopa s ugrađenim spermotermom „Axiostar Plus“ (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen, Njemačka). Ispipetirala bi se kapljica ejakulata od 10 µL i stavila na prethodno zagrijanu predmetnicu. Odmah potom procjenilo se masovno gibanje spermija pod povećanjem od 100 x gdje je procjena izražena ocjenom od nula do četiri plusa (0 - potpuno mirovanje; + slabo valovito gibanje; ++ valovito gibanje; +++ jako

valovito gibanje; ++++ vihorenje (izmjenjuju se tamnije i svjetlije pruge koje se komešaju, nestaju i ponovno nastaju). Zatim bi se ista kapljica ejakulata prekrila staklenom pokrovnicom te bi se pod povećanjem od 200 x na istom mikroskopu procjenila gibljivost spermija u postotcima (%).

4.3.3.3. OCJENA VITALNOSTI SPERMIJA U EJAKULATU

Kako bi se terenski procijenio postotak živih i mrtvih spermija u ejakulatu rađeni su razmasci sjemena postupkom supravitalnog bojenja po Bloom-u primjenom boja eozin i nigrozin. Mala kapljica ejakulata bi se na zagrijanoj i odmašćenoj predmetnici lagano pomiješala pomoću mini pajete prvo s većom kapljicom zagrijanog eozina, a zatim s dvostruko većom kapljicom zagrijanog nigrozina. Takva kapljica bi se pomoću brušenog predmetnog stakla razvukla po predmetnici i osušila. Mrtvi spermiji s oštećenom staničnom membranom se nakon ovog postupka obojaju eozinom te prilikom mikroskopiranja budu crvene boje dok živi spermiji ostaju bijele boje koju je zbog kontrasta nigrozina lakše uočiti. Osušeni preparati spremili bi se u kutijicu za predmetna stakla te bi se procjena udjela živih spermija (%) određivala drugi dan u Centru za umjetno osjemenjivanje „Varaždin“ pomoću binokularnog mikroskopa „Olympus BX50F“ (Olympus, Tokyo, Japan) pod povećanjem od 200 x. Za procjenu vitalnosti ejakulata pregledano je najmanje 200 spermija.

4.3.3.4. MORFOLOŠKA OCJENA SPERMIJA U EJAKULATU

Za određivanje udjela (%) morfološki normalnih i patoloških oblika spermija korišten je postupak bojenja po Farelly-ju korištenjem gotovog komercijalnog kompleta (Minitube, Tiefenbach, Njemačka). Kapljica ejakulata bi se na odmašćenoj predmetnici razvukla pomoću brušenog predmetnog stakla i osušila. Potom bi se predmetnica s osušenim ejakulatom pomoću štipaljke uronila u otopinu za fiksaciju razmaza (otopina A) na 10 sekundi, zatim u otopinu anilinskog modrila (otopina B) na 20 sekundi te nakon ispiranja vodom u otopinu gencijan ljubičaste boje (otopina C) na 5 sekundi. Nakon zadnje otopine predmetnica se ponovno dobro ispire vodom te ostavlja da se osuši kroz 12 sati. Spermiji se nakon ovog postupka obojaju s plavo-ljubičastom kontrastnom bojom koja omogućuje diferencijalnu vizualizaciju glave, akrosome, ekvatorijalnog i središnjeg dijela te repa spermija. Osušeni preparati spremili bi se u kutijicu za predmetna stakla te bi se procjena udjela živih spermija (%) određivala sljedeći tjedan u Centru za umjetno

osjemenjivanje „Varaždin“ pomoću fazno-kontrasnog mikroskopa “Olympus BX50F“ (Olympus, Tokyo, Japan), prvo pod srednjim povećanjem, a potom pod imerzijom (povećanjem od 1000 x). Za ocjenu udjela morfološki normalnih i patoloških oblika glave i repa spermija u ejakulatu pregledano je najmanje 200 spermija po preparatu.

4.3.3.5. IZDVAJANJE SJEMENE PLAZME

Nakon polučivanja i uzimanja ejakulata za terensku ocjenu kvalitete, ejakulat bi se odložio na mirovanje minimalno 10 minuta u zatamnjeni inkubator (21°C). Nakon dolaska drugog ejakulata istog jarca izmjerio bi se samo volumen te bi se ejakulat prebacio u Eppendorf epruvetu s konusnim dnom i ostavio isto tako u inkubatoru na mirovanje. Poslije 10 minuta odmora u inkubatoru oba ejakulata bi se stavila centrifugirati 5 minuta na 2400 x g u centrifugi izoliranoj od utjecaja vanjskog svjetla i temperature. Potom bi se ispipetirao supernatant obje epruvete sterilnom plastičnom pipetom, spojio u čistu epruvetu te ponovo centrifugirao na istoj brzini vrtnje kroz 15 minuta kako bi se što bolje odvojila sjemena plazma od spermija. Nakon drugog centrifugiranja na isti način izdvojila bi se sjemena plazma u označenu eppendorf epruvetu i pohranila privremeno u prijenosni hladnjak (oko +4°C) te nakon odlaska s farme u zamrzivač na -80°C do analize.

4.3.3.6. IZDVAJANJE SPERMIJA

Nakon drugog centrifugiranja sjemene plazme te odvajanja supernatanta ostao bi manji talog sa spermijima koji se ispirao u fiziološkoj otopini tri puta u omjeru 1:2 (1 volumen spermija: 2 volumena fiziološke otopine) te nakon svakog ispiranja ponovo centrifugirao uz 500 x g tijekom 5 minuta i naposljetku nakon označavanja pohranio na -80 ^{o}C do analize.

4.3.3.7. SMRZAVANJE EJAKULATA

Nakon prvog izdvajanja sjemene plazme na talog spremija koji bi ostali u Eppendorf epruveti ulio bi se sintetski razrijeđivač za sjeme (bez žumanjka) AndroMed® (minitube, Njemačka, Ref. 13503/1200) na sobnoj temperaturi i polagano miješao dok se talog ne bi postupno odvojio s dna epruvete. Potom bi se spermiji razrijedili sa 10 mL razrijeđivača u većoj sterilnoj obilježenoj plastičnoj epruveti i pohranili prvo u transportni hladnjak pa nakon odlaska s farme u obični hladnjak (+4°C) na daljnje hlađenje kroz 24 h

prije smrzavanja u centru za umjetno osjemenjivanje Varaždin. Nakon 24 sata pajete su iz hladnjaka posložene na metalne rampe za duboko smrzavanje sjemena. Rampe sa sjemenom su tada prebačene u uređaj za automatsko duboko smrzavanje sjemena (DIGITCOOL 5300, serie: AD12211/D, INSTRUMENTS DE MEDICINE VETERINAIRE, FRANCE) na temperaturu od +4°C. Pajete su ostavljene 10 minuta za stabilizaciju temperature prije početka smrzavanja. Smrzavanje je obavljeno u 7 minuta do temperature od -133°C. Pad tempetarure po minutama je bio slijedeći: 0 min = +4°C; 1 min = -2°C; 2 min = -6°C; 3 min = -17°C; 4 min = -58°C; 5 min = -100°C; 6 min = -115°C; 7 min = -133°C. Obilježene pajete (40 pajeta po jednom ejakulatu) su tada ručno prebačene s rampi u goblete s tekućim dušikom (-196 °C) te su do analize pohranjene u kontejner s tekućim dušikom.

4.3.3.8. DODAVANJE VITAMINA U RAZRJEĐIVAČ

U trećem periodu pokusnog razdoblja (nakon aplikacije melatonina) pola ejakulata svakog jarca smrznuta je s dodatkom vitamina C (Askorbatna kiselina, Kemig d.o.o., Donja Zelina, Hrvatska, ref. br. 1501749) i vitamina E (Tokoferol, Kemig d.o.o., Donja Zelina, Hrvatska, ref. br. 1701488) u razrjeđivač. Tada se talog spermija postupno razrijedio sa 6 mL „AndroMed®“ razrjeđivača na sobnoj temperaturi te bi se podijelio na dva dijela od 3 mL u epruvete. U jedan dio dodalo bi se 2 mL (do 5 mL ukupnog volumena) razrjeđivača bez vitamina, a u drugi dio 2 mL razrjeđivača kojemu je prethodno dodano 60 mM vitamina E i 8,5 mg/mL vitamina C. Daljnji postupak smrzavanja ejakulata je bio isti te je od svakog jarca od 3. perioda nadalje smrznuto 20 pajeta s razrjeđivačem bez dodanih vitamina te 20 pajeta u čiji razrjeđivač su dodani vitamini.

4.4. BIOKEMIJSKA ANALIZA SJEMENE PLAZME I SPERMIJA

Neposredno prije biokemijskih analiza u uzorcima ispranih spermija, pripremljeni su stanični lizati kako bi se mogli odrediti prethodno navedeni pokazatelji. Uzorci spermija koji su bili pohranjeni na -80 ^{o}C do analiza bili su odmrznuti i resuspendirani u hladnoj destiliranoj vodi (jednaki omjer destilirane vode i spermija), pohranjeni u hladnjaku na 10 minuta, +4 ^{o}C te nakon toga centrifugirani 5 minuta na 2400 x g. Nadtalog tako pripremljenog uzorka korišten je za analize prethodno navedenih pokazatelja. Ukoliko je

bilo potrebno nadtalozi su se dodatno razrjeđivali prema uputama proizvođača za pojedini biokemijski pokazatelj.

U uzorcima sjemene plazme i spermija određeni su sljedeći antioksidacijski pokazatelji: glutation peroksidaza (engl. *glutathione peroxidase*, GSH-Px), ukupna superkosid dismutaza (engl. *total superoxide dismutase*, TSOD), glutation reduktaza (engl. *glutathione reductase*, GR) i katalaza (engl. *catalase*, CAT). Osim navedenih antioksidacijskih pokazatelja u uzorcima sjemene plazme i spermija određeni su koncentracija ukupnog malondialdehida (engl. *malondialdehyde*, MDA) i koncentracija bjelančevina.

4.4.1. ODREĐIVANJE POKAZATELJA ANTIOKSIDACIJSKOG STATUSA

4.4.1.1. AKTIVNOST GLUTATION PEROKSIDAZE

Aktivnost glutation peroksidaze (GSH-Px; E. C. 1.11.1.9) određena je komercijalnim kompletima Ransel (kat. br. RS505) tvrtke „Randox Laboratories“ (Crumlin, Ujedinjeno Kraljevstvo) na automatskom biokemijskom analizatoru Architectu c4000 (Abbott Laboratories, Illinois, USA) pri valnoj 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 i u ispranim spermijima. Aktivnost GSH-Px u sjemenoj plazmi izražena je u U/L, a u spermijima je izražena po gramu bjelančevina.

4.4.1.2. AKTIVNOST UKUPNE SUPEROKSID DISMUTAZE

Aktivnosti ukupne superoksid dismutaze (SOD; E. C. 1.15.1.1) određena je gotovim kompletima Ransod (kat. br. SD125) tvrtke „Randox Laboratories“ (Ujedinjeno Kraljevstvo) na automatskom biokemijskom analizatoru Architectu c4000 (Abbott Laboratories, Illinois, USA) pri valnoj dužini od 505 nm. Metoda se temelji na stvaranju superoksidnih radikala iz ksantina s pomoću ksantin oksidaze koji reagiraju sa 2-(4-

jodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-feniltetrazol kloridom i tvore formazan crveno obojenje. Aktivnost SOD mjeri se kao stupanj inhibicije ove reakcije.

Aktivnost SOD određena je u sjemenoj plazmi, gdje je izražena u U/mL, a u ispranim spermijima aktivnost SOD izražena je U/g bjelančevina.

4.4.1.3. AKTIVNOST GLUTATION REDUKTAZE

Aktivnosti glutation reduktaze (GR; E.C. 1.6.4.2) određena je gotovim kompletima Glutathione reductase (kat. br. GR2368) tvrtke „Randox Laboratories“ (Ujedinjeno Kraljevstvo) na automatskom biokemijskom analizatoru Architectu c4000 (Abbott Laboratories, Illinois, USA) pri valnoj dužini od 340 nm. U ovoj metodi GR katalizirala redukciju glutationa (GSSG) u prisutnosti NADPH, koji oksidira u $NADP^+$.

Aktivnost GR određena je u sjemenoj plazmi, gdje je izražena u U/L, a u spermijima aktivnost GR izražena je U/g bjelančevina.

4.4.1.4. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE KATALAZE

Katalaza (CAT; EC 1.11.1.6) je određena upotrebom kita „Cayman Catalase Assay“ (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, SAD) (kat. br. 700910) koji koristi peroksidatsku funkciju katalaze za određivanje enzimske aktivnosti. Metoda se temelji na reakciji enzima s metanolom u prisutnosti optimalne koncentracije peroksida. Formaldehid se mjeri spektrofotometrijski s 4-amino-3-hidrazino-5-merkapto-l, 2,4-triazolom (Purpald) kao kromogen. Purpald specifično oblikuje biciklički heterocikl s aldehidima koji nakon oksidacije mijenja boju od bezbojne do ljubičaste. Absorbancija uzoraka bila je očitana na instrumentu čitaču za mikrotitarske pločice HumaReader tzv. Microtiter plate reader (Human, Wiesbaden, Njemačka).

Vrijednost koncentracije katalaze u sjemenoj plazmi se izražava kao nmol/min/mL, a koncentracija katalaze u ispranim spermijima izražena je u nmol/min/g bjelančevina.

4.4.2. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE MALONDIALDEHIDA

Koncentracije ukupnog MDA u uzorcima sjemene plazme i spermijima jarčeva bila je izmjerena metodom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (De Grotto i sur., 2007) na TSP-130 sustavu (Thermo Separation Products, Inc, Thermo Fisher Scientific, Inc.,Waltham, MA, SAD). U 150 µl svakog uzorka dodalo se 50 µl vode i 50 µl natrijeve

lužine (3 N). Nakon 30 minuta inkubacije u tresućoj kupelji na 60 °C, dodalo se 250 µl 6%-tne fosfatne kiseline i 250 µl 0,8 %-tne tiobarbiturne kiseline. Pripremljeni uzorak se dalje inkubirao 45 minuta u kupelji temperature 90°C. MDA se ekstrahirao dodatkom 250 µl metanola i 100 µl 10% SDS-a te vorteksiranjem (intenzivnim miješanjem) u trajanju 30 s. Tako pripremljeni uzorci se 10 min centrifugiraju uz hlađenje na 4°C i 3600 o/min. Supernatant se odvajao za analizu u HPLC sustavu, od čega se 20 µl injicira u sustav. Pri analizi kromatografijom revernih faza koristitila se kolona Ascentis C18 (Supelco, Bellefonte, SAD) duljine 15 cm, promjera 4.6 mm sa česticama punila promjera 5 µm. Pokretna faza se sastojala od metanola i 50 mM vodene otopine kalijevog dihidrogenfosfata u omjeru 40:60 s dodatkom kalijeve lužine do postizanja pH od 6,8. Protok pokrete faze je 1 ml/min, vrijeme analize 10 minuta, a valna duljina UV detektora 532 nm. U navedenim uvjetima vrijeme zadržavanja je 3 minute. Pouzdanost i linearnost metode određuje se svaki dan kalibracijom s vanjskim standardom, 1,1,3,3 – tetraetoksipropanom, u koncentracijama 0.607, 1.5175, 3.035, 6.07, 15.175, 30.35 i 60.7 µM. Vrijednost koncentracije malondialdehida u sjemenoj plazmi se izražava kao U/mL, a koncentracija malondialdehida u ispranim spermijima izražena je u U/g bjelančevina.

4.4.3. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE BJELANČEVINA

Koncentracija ukupnih bjelančevina određena je upotrebom reagensa Total protein (Abbott Laboratories, Abbott Park, SAD, kat.br. 7D73-20) uz također Abbott kalibratore (MCC, Clinical Chemistry Multiconstituent Calibrator) level 1 i level 2. Koncentracija ukupnih bjelančevina u sjemenoj plazmi jarčeva određena je 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. Analiza je rađena ručnom metodom u mikrotitarskim pločicama prilagođena prema aplikaciji za analizatore (mali volumeni uzorka nisu se mogli primijeniti za automatski analizator) prema uputama proizvođača. To podrazumijeva da se slijedila Abbott metoda uz proporcionalno smanjenje volumena reagensa i uzorka, a absorbancija se očitavala na instrumentu čitaču za mikrototatske pločice HumaReader tzv. Microtiter plate reader (Human, Wiesbaden, Njemačka). Konstruirale su se kalibracijske krivulje i prema njima izračunavale koncentracije proteina.

Vrijednost koncentracije ukupnih bjelančevina u sjemenoj plazmi, ispranim spermijima izražena je u g/L.

4.5. OCJENA EJAKULATA NAKON OTAPANJA

Uzorci smrznutih ejakulata su analizirani u Naučnom institutu za veterinarstvo u Novom Sadu, Srbija. Otapanje duboko smrznutih ejakulata izvršeno je naglim uranjanjem pajete u vodenu kupelj (+38°C) kroz 30 sekundi. Pajete su obrisane filter papirom te je očitana oznaka pajete.

4.5.1. CITOLOŠKO ISPITIVANJE EJAKULATA

Nakon otapanja dio ejakulata iz pajete je uzet radi kompletne citološko-morfološke analize. U tu svrhu napravljeni su preparati za direktnu mikroskopiju supravitalnim bojenjem po Hancock-u (Hancock 2: tripan modrilo/eozin-nogrozin). Boja je napravljena prokuhavanjem 0,67 g eozina, 0,2 g tripan modrila i 10 g nigrozina u 100 mL vode. Kapljica ejakulata i podjednaka kapljica boje pomješani su na zagrijanom predmetnom stakalcu te je pomoću staklenog štapića napravljen razmaz koji je potom osušen na spermotermu. Razmasci su analizirani pomoću fazno-kontrasnog svjetlosnog mikroskopa (Olympus, Japan) s imerzijom pod povećanjem od 1000 puta. Analizom je određen odnos živih/mrtvih stanica, nalaz intaktnih i oštećenih akrosoma spermija, nalaz protoplazmatskih kapljica te nalaz primarnih, sekundarnih i ukupno patoloških formi spermatozoida (BARTH i OKO, 1989).

4.5.2. KOMPJUTERSKI POTPOMOGNUTA ANALIZA EJAKULATA - CASA

Kompjuterski potpomognuta analiza ejakulata (eng. computer assisted sperm analysis – CASA) napravljena je na aparatu ISAS Proiser, model V.1.2., Španjolska (slika 9.). Uzorak odmrznutog sjemena (5 µL) nanesen je na leje-komorice (Proiser, Valencija, Španjolska) dubine 20 µm koje su postavljene na grijano postolje mikroskopa. Nakon prestanka pasivnog gibanja spermija izvršeno je slikanje na svih sedam polja komorice. Program je podešen na analizu 25 slika u sekundi, a ukupna ekspozicija je trajala 2 sekunde (ukupno 50 sekvenci). Analizom je određena pokretljivost spermija (%),

progresivna pokretljivost (%), manježno kretanje (%) i različiti brzinski parametri (slika 10.):

- krivolinijska brzina (engl. VCL - curvilinear velocity) izražena u µm/s ili prosječna brzina spermija na njegovoj pravoj putanji;

- pravolinijska brzina (engl. VSL - straight-line velocity) izražena u µm/s ili prosječna brzina spermija na pravolinijskoj putanji (putanja koja spaja prvu i posljednju slikanu poziciju spermatozoida);

- prosječna brzina (engl. VAP - average path velocity) izražena u µm/s ili prosječna brzina spermija na njegovoj prosječnoj putanji (putanja se izračunava preko algoritma CASA uređaja kojom se ispravlja krivolinijsko gibanje spermatozoida;

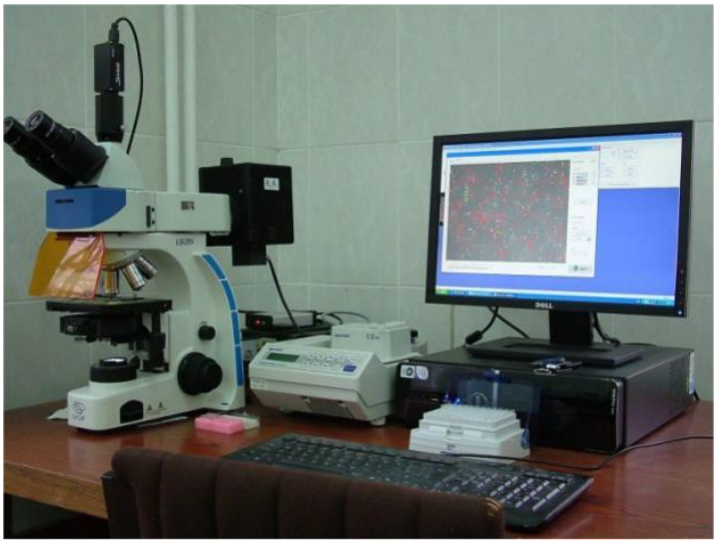
- amplituda lateralnog otklona glave u odnosu na prosječnu putanju (engl. ALH - amplitude of lateral head displacement) izražena u µm;

- indeks linearnosti (engl. LIN – linearity) izražen u % ili linearnost krivolinijske putanje, a izračunava se međusobnim odnosom pravolinijske i krivolinijske brzine (VSL/VCL);

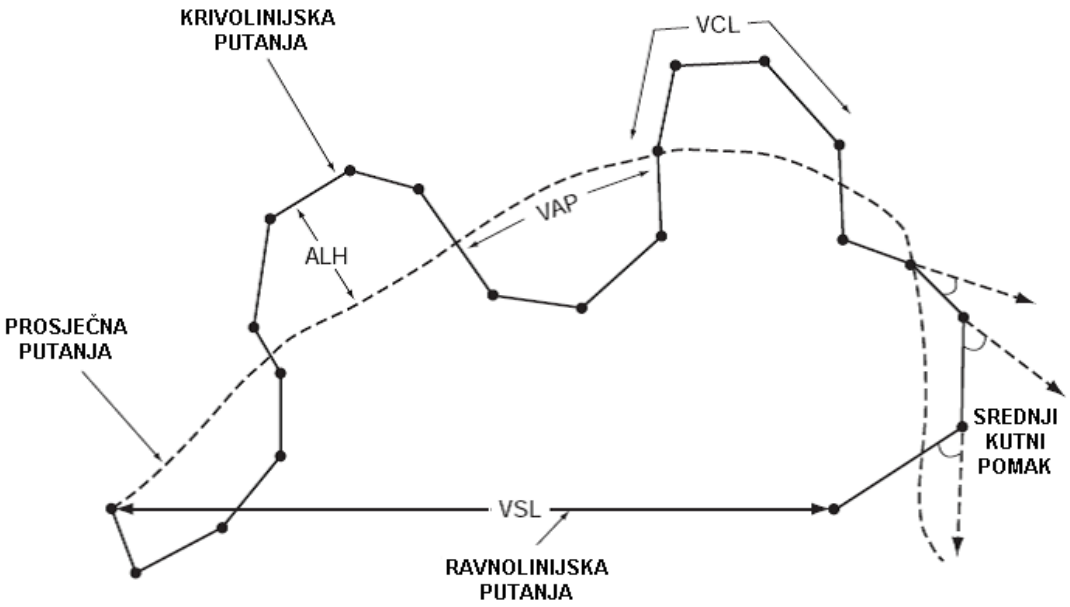
- indeks oscilacije (engl. WOB- wobble) izražen u % ili stupanj oscilacije prave putanje u odnosu na prosječnu putanju spermatozoida, a izračunava se međusobnim odnosom prosječne i krivolinijske brzine (VAP/VCL);

- pravolinijski indeks (engl. STR – straightness) izražen u % ili linearnost na prosječnoj putanji, a izračunava se međusobnim odnosom pravolinijske i prosječne brzine (VSL/VAP);

- frekvencija prelaska pravolinijske putanje u sekundi (engl. BCF – beat cross frequency) izražen u Hz ili prosječan broj prelazaka krivolinijske putanje preko pravolinijske putanje.



Slika 9. Kompjuterski analizator sperme (CASA).



Slika 10. Standardna terminologija različitih parametara mjerenih kompjuterski potpomognutom analizom sperme. (Izvor: WHO laboratory manual for the Examination and processing of human semen, 5. Izdanje, 138-9, World Health Organization, 2010).

4.5.3. PROTOČNA CITOMETRIJA

Svi parametri protočne citometrije rađeni su u Naučnom institutu za veterinarstvo u Novom Sadu, Srbija na aparatu „Guava EasyCyte", Guava Tecnologies Inc,

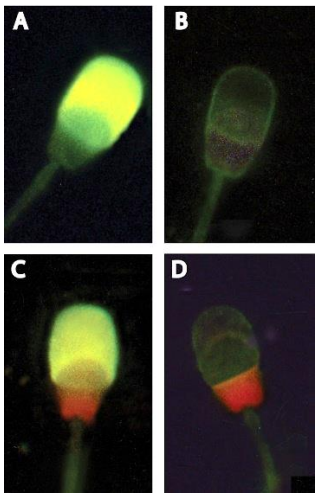
Hayward, Kalifornija, SAD (slika 11.), opremljenom programskom podrškom za analizu sjemena i obradu podataka (IMV Technologies, L′Aigle, Francuska).



Slika 11. Protočni citometar

4.5.3.1. TEST INTEGRITETA MEMBRANE I AKROSOMA SPERMATOZOIDA

Za analizu integriteta membrane i akrosoma spermatozoida korišten je propidium jodid (PI) od 2,4 mM (kit za procjenu živih/mrtvih spermija, L7011, Invitrogen), aglutinin iz kikirikija sa fluorescein izocijanat-om (PNA-FITC, L7381, Sigma) i pufer (EasyBuffer, IMV). U Eppendorf epruvetu ispipetirano je 4 µL sjemena, 2 µL PI, 1 µL PNA-FITC i 97 µL EasyBuffer-a. Otopina je dodatno razrijeđena sa 296 µL EasyBuffer-a do ukupnog volumena od 400 µL. Uzorci su zatim inkubirani na 37 °C u mraku kroz 10 minuta. Analizirano je oko 5000 stanica pomoću programa „Viability Acrosome setup“ (IMV). Osobina testa je da aglutinin iz kikirikija pomješan sa FITC bojom se veže i oboji akrosom spermatozoida (karbohidratne grupe glikoproteina) ukoliko je akrosomska membrana oštećena ili ako je akrosom reagirao, boja PI ulazi i oboji spermatozoide s oštećenom membranom. Na ovaj način spermatozoidi s neoštećenom akrosomom i membranom ostaju neobojeni, spermatozoidi s neoštećenom membranom, ali oštećenim akrosomom se oboje flourescirajuće zeleno, spermatozoidi s oštećenom membranom, ali neoštećenim akrosomom se oboje flourescirajuće crveno, a spermatozoidi s oštećenom membranom i akrosomom se oboje tako da je akrosom intenzivno zelene boje, a membrana-glava intenzivno crvene boje (slika 12.). Ukoliko akrosom nedostaje tada nema ni obojenja. Normalan akrosom ima slabu do osrednju flourescenciju.



Slika 12. Spermatozoidi obojeni PNA-FITC i PI bojama. A - živ spermatozoid s oštećenom akrosomom; B - netaknut sparmatozoid; C - mrtav spermatozoid s oštećenom akrosomom; D - mrtav spermatozoid bez akrosome.
(Preuzeto - SICILIANO i sur. - Prostasome-like vesicles stimulate acrosome reaction of pig spermatozoa. Reproductive biology and endocrinology (2008) 6, str 5. http://www.rbej.com/content/6/1/5)

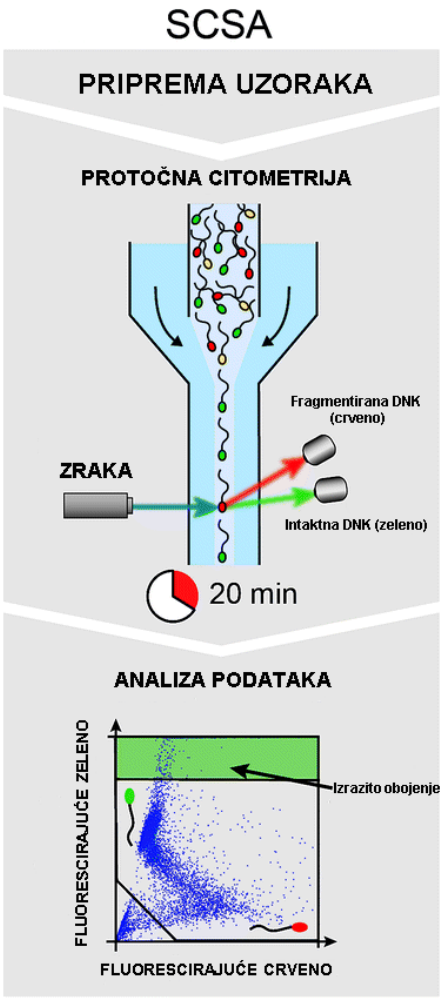
4.5.3.2. TEST PERMEABILNOSTI MEMBRANE SPERMATOZOIDA

Za analizu permeabilnosti membrane spermija (živi/mrtvi) korištene su boje SYBR14 i propidijum jodid (kit za procjenu živih/mrtvih spermija, L7011, Invitrogen). Za ovaj test boja SYBR14 je razrijeđena do koncentracije 1 mM sa dimetil-sulfoksid-om (DMSO), a PI s vodom do 2,4 mM. U Eppendorf epruvetu pomiješalo bi se 4 µL sjemena, 2 µL PI, 2 µL SYBR14 i 96 µL pufera (EasyBuffer, IMV). Zatim se otopina dodatno razrijedila sa 296 µL EasyBuffer-a do volumena od 400 µL. Otopina je inkubirana 10 minuta na 37 °C u mraku te je analizirano 5000 stanica u programu „Viability setup“ (IMV). Živi spermatozoidi se oboje flourescirajuće zelenom bojom jer SYBR14 prolazi kroz neoštećene membrane, a mrtvi spermatozoidi flourescirajuće crvenom bojom.

4.5.3.3. PROCJENA STRUKTURNE STABILNOSTI KROMATINA

Za analizu strukturne stabilnosti kromatina u jezgri korištena je boja akridin narančasta (A1301, Invitrogen) koja se mijenja u fluorescirajuće crvenu ako se veže za fragmentiranu DNK ili u fluorescirajuće zelenu ako se veže za intaktnu DNK. Postupak bojenja započinje tako da se 4 µL sjemena jarca pomiješa sa 196 µL TNE razrijeđivača

(mješavina 0,15 M NaCl, 0,01 M Tris-a i 1 mM EDTA) i 0,4 mL kiselog reagensa (0,1 % Triton X-100 i 0,08 N HCl). Za 30 sekundi u otopinu se dodalo 1,2 mL boje akridin narančaste (Sperm Chromatin Structure Assay - SCSA, IMV) (slika 13.). Očitanje se radilo 3 minute nakon dodavanja kiselog reagensa te je analizirano 2000 spermatozoida u triplikatu pomoću programa „Viability setup“ (IMV).

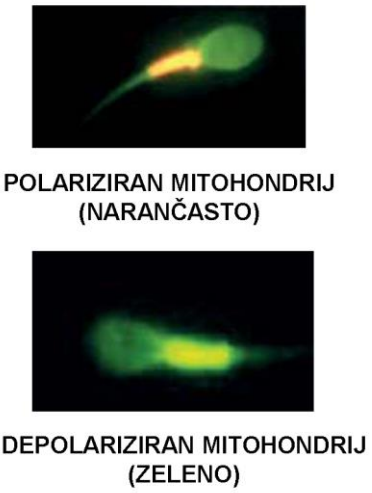


Slika 13. Prikaz analize strukturne stabilnosti kromatina u jezgri spermija (Slika preuzeta iz rada NOSRATI i sur., 2016.).

4.5.3.4. STUPANJ POLARIZACIJE MITOHONDRIJA - INTEGRITET MITOHONDRIJA

Za analizu aktivnosti mitohondrija upotrijebljen je reagens JC-1 odnosno flourescentna boja koja je osjetljiva na status membrane mitohondrija pa tako mijenja boju u narančasto kod polariziranih (aktivnih, očuvanih) mitohondrija ili u zeleno kod

depolariziranih (slabi potencijal membrane) mitohondrija (slika 14.). Postupak je rađen pomoću kita za mitohondrijsku aktivnost (EASYKIT 2 Mitochondrial activity, IMV, ref. 024864). Prvo je JC-1 reagens razrijeđen sa 230 µL DMSO (Sigma, ref. D2650) u kiveti. Zatim se u eppendorf epruvetu odlilo 4 µL JC-1 i razrijedilo sa 96 µL EasyBuffer-a (IMV). Potom se u otopinu dodalo 4 µL sjemena i još 296 µL EasyBuffer-a. Uzorci su zatim bili inkubirani na 37 °C kroz 30 minuta u mraku. Analizirano je 2000 spermija po uzorku u programu „Mitopotential setup“ (IMV).



Slika 14. Prikaz različititog statusa membrane mitohondrija nakon primjene boje JC-1.

4.6. STATISTIČKA ANALIZA REULTATA

Statistička analiza podataka rađena je s programskim paketom SAS 9.4 (Statistical Analysis Software 2002-2012 by SAS Institute Inc., Cary, SAD). Deskriptivna statistika podataka rađena je pomoću modula PROC MEANS, FREQ i UNIVARIATE. Kada podatci nisu bili normalno distribuirani te kod heterogenosti varijanci, načinjena je transformacija varijabli (logaritam na bazu 10 i eksponencijalne funkcije) pomoću BOX-COX transformacije upotrebom modula PROC TRANSREG.

Za analizu kvantitativnih parametara korišten je mješoviti modul (PROC MIXED). Statistički model uključivao je fiksni efekt grupe, perioda i farme te starost životinja kao kontinuiranu varijablu. U svakom modelu je uz interakciju skupine s vremenskim razdobljem ispitano i da li su farma i dob životinje imali utjecaja na zavisne varijable između i unutar skupine životinja. U model je uključen i slučajni efekt životinje

(identifikacijski broj mužjaka) na ponovljeno mjerenje kroz vrijeme korištenjem CS strukture (CS - compound-symmetry).

Proporcije su analizirane pomoću modula PROC GLIMMIX s binomijalnom distribucijom i link funkcijom logit. Struktura modela je bila slična kao i kod mješovitog modela te je isto tako identifikacijski broj životinje bio uključen kao slučajni efekt za ponovljeno mjerenje tijekom vremena.

Srednje vrijednosti izračunate su metodom najmanjih kvadrata (LSM - least squares means) korištenjem LSMEANS naredbe i opcija PDIFF i CL. Za usporedbu srednjih vrijednosti korištena je Tukey-Kramer-ova metoda višestrukih usporedbi na razini statističke signifikantnosti $P<0.05$. Usporedba razlika između skupina unutar pojedinog perioda istraživanja te unutar skupine kroz cijeli period istraživanja rađena je pomoću opcije SLICE. Nakon analize, podaci su transformirani natrag u izvorne vrijednosti (ako je korištena transformacija) i prikazani na slikama, tablicama ili opisani u tekstu kao srednje vrijednosti i 95%-tni interval pouzdanosti srednje vrijednosti ili kao srednje vrijednosti i standardne greške srednjih vrijednosti.

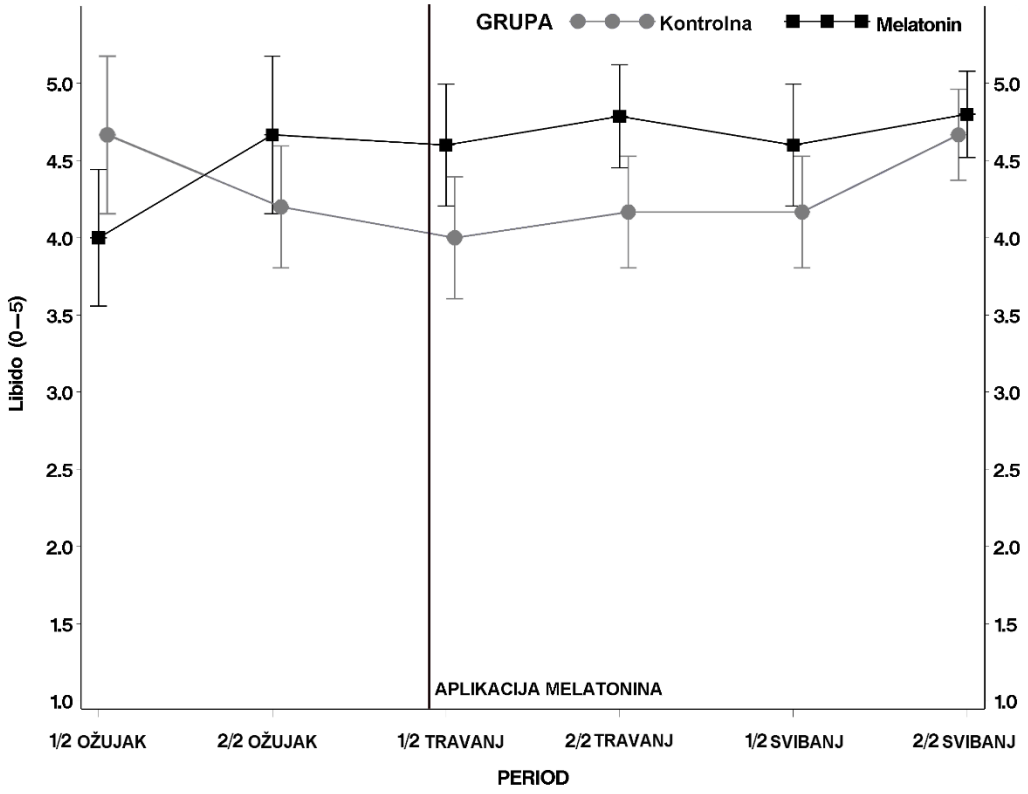
Pearson-ov ili Spearman-ov koeficijent korelacije izračunat je između različitih parametara sjemene plazme i spermija korištenjem CORR modula SAS-a (PROC CORR).

Grafikoni su izrađeni u SAS-u korištenjem modula SAS/GRAPH, postupcima PROC GPLOT i SGPLOT, a u izradi grafikona je ponekad korištena anotacijska grafika.

5. REZULTATI

5.1. LIBIDO JARČEVA I POKAZATELJI KVALITETE SVJEŽEG EJAKULATA

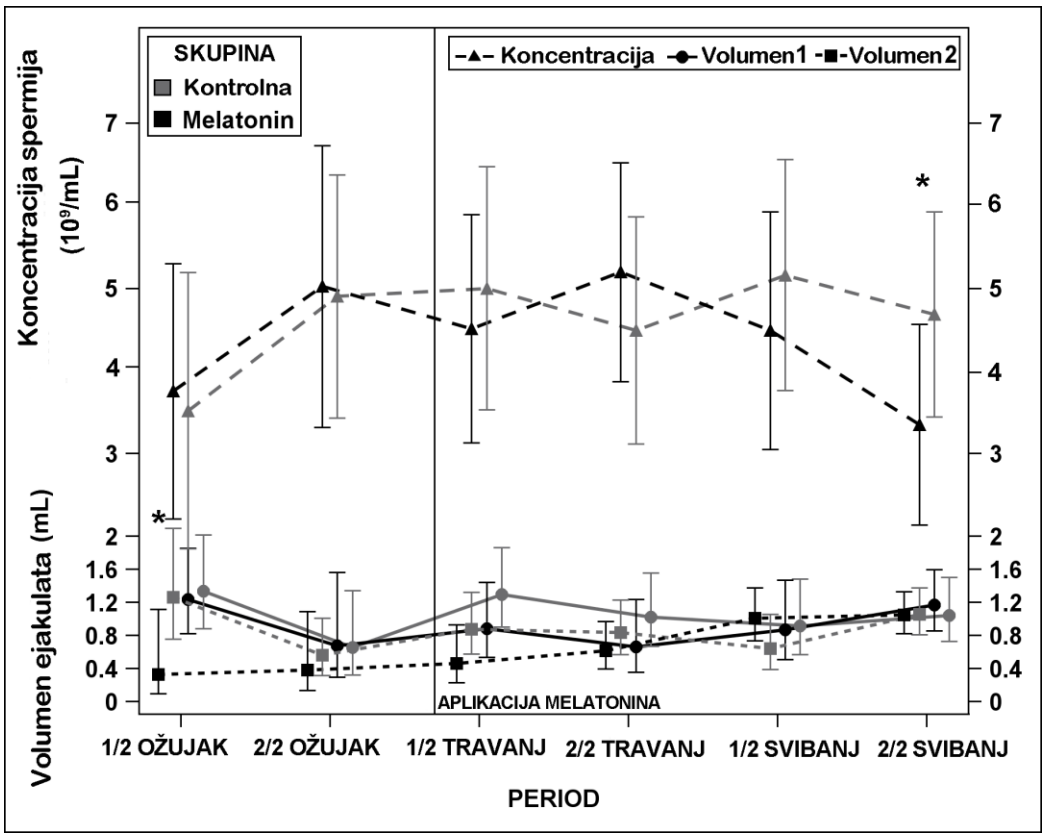
Srednja vrijednost libida jarčeva u kontrolnoj skupini bila je 4,34 (3,88-4,66, 95% CI), dok je u pokusnoj skupini životinja bila nešto viša 4,60 (4,17-4,91, 95% CI), ali bez statističke značajnosti kao niti tijekom cijelog pokusnog perioda (slika 15.)



Slika 15. Grafikon srednjih vrijednosti i 95% intervala pouzdanosti libida kontrolne i pokusne (aplicirani implantati melatonina nakon drugog perioda pokusa) skupine jarčeva alpske pasmine kroz period izvan rasplodne sezone.

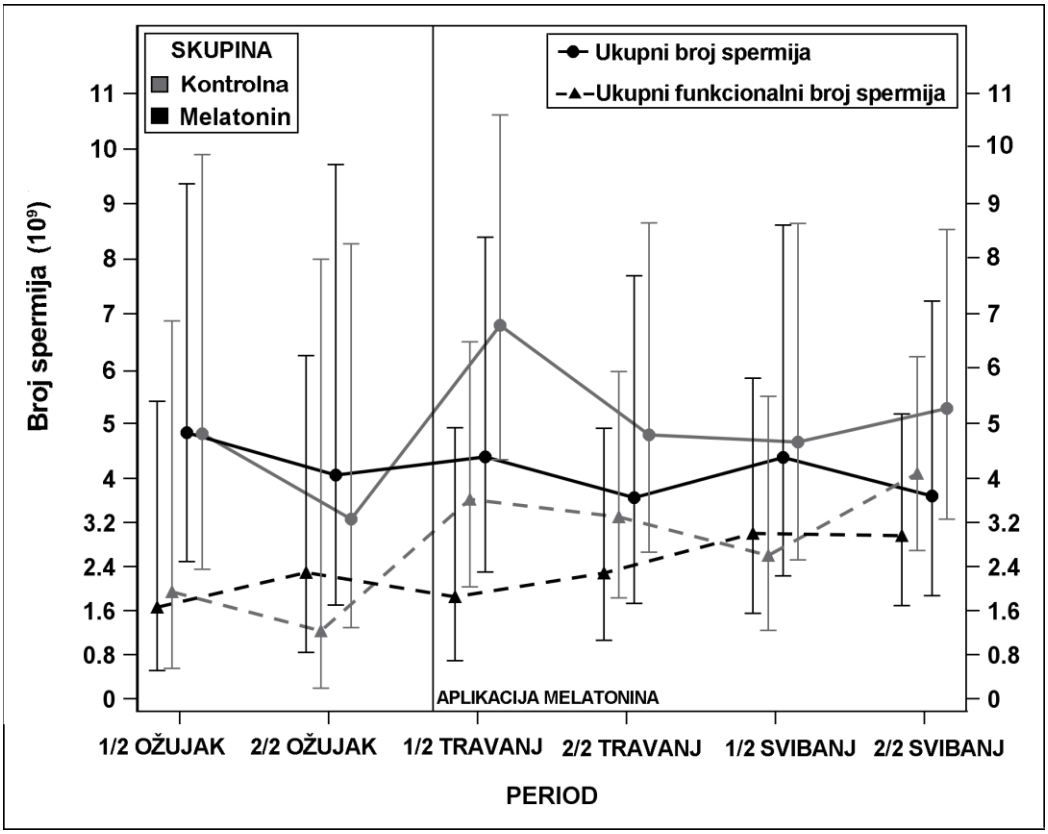
Koncentracija spermija u ejakulatu (slika 16.) je bila slična u obje skupine osim u zadnjem periodu pokusa (druga polovica svibnja) kada je koncentracija spermija u pokusnoj skupini jarčeva (3,34; 2,09-4,60, 95% CI) bila statistički značajno niža ($p<0,05$) za razliku od kontrolne skupine (4,68; 3,40-5,96, 95% CI). Volumen prvog ejakulata se nije statistički značajno razlikovao između skupina, dok je volumen drugog zaredom

uzetog ejakulata (slika 16.) u razmaku ne duljim od 15 minuta bio značajno veći ($p<0,05$) u prvom periodu pokusa kod kontrolne skupine životinja (1,25; 0,74-2,13, 95% CI) nego kod pokusne skupine (0,32; 0,09-1,16, 95% CI).



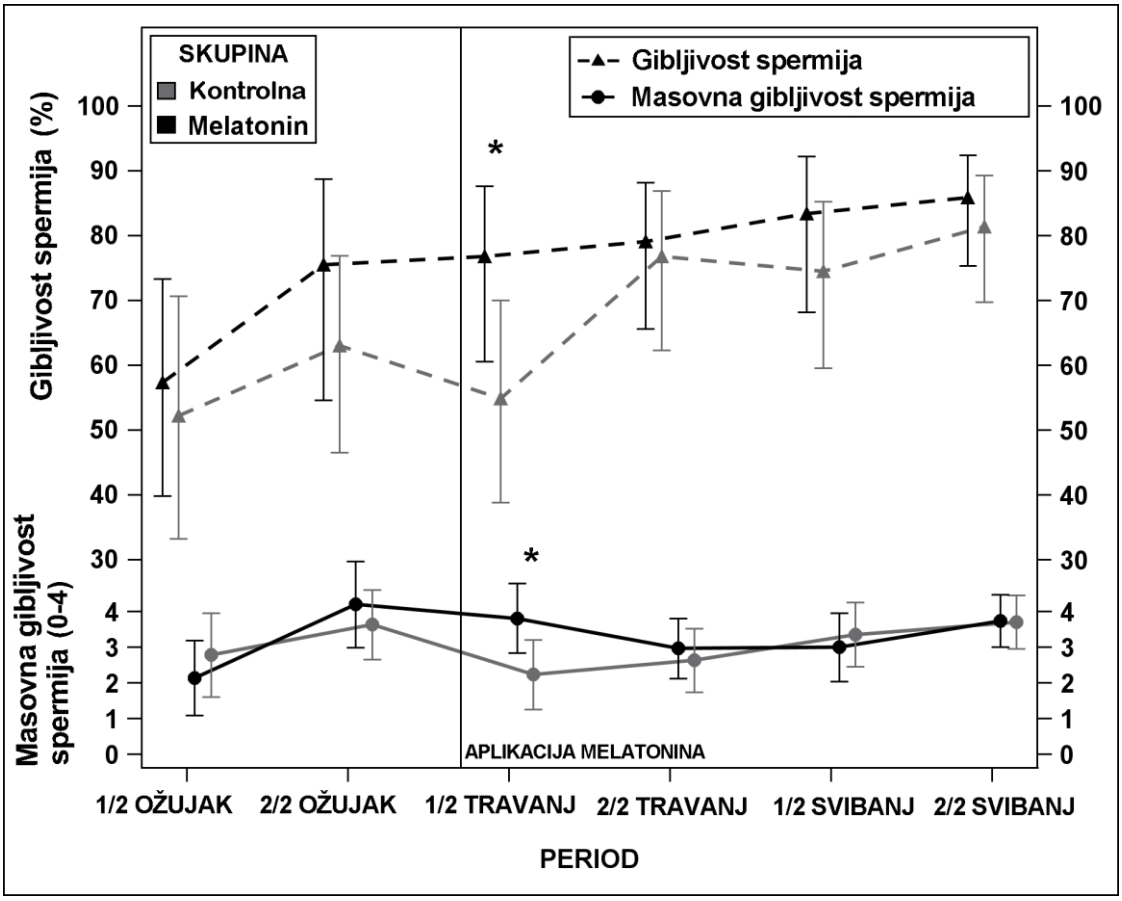
Slika 16. Grafikon srednjih vrijednosti i 95% intervala pouzdanosti koncentracije spermija u ejakulatu te volumena prvog i drugog zaredom uzetog ejakulata u kontrolne i pokusne skupine (aplicirani implantati melatonina nakon drugog perioda pokusa) jarčeva alpske pasmine kroz period izvan rasplodne sezone (* označava statistički značajne razlike između skupina u promatranom periodu pokusa).

Ukupni broj spermija kao i ukupni funkcionalni broj spermija u ejakulatu se nije statistički razlikovao između skupina kroz promatrani pokusni period (slika 17.)



Slika 17. Grafikon srednjih vrijednosti i 95% intervala pouzdanosti ukupnog broja spermija te ukupnog funkcionalnog broja spermija u ejakulatu kontrolne i pokusne skupine (aplicirani implantati melatonina nakon drugog perioda pokusa) jarčeva alpske pasmine kroz period izvan rasplodne sezone.

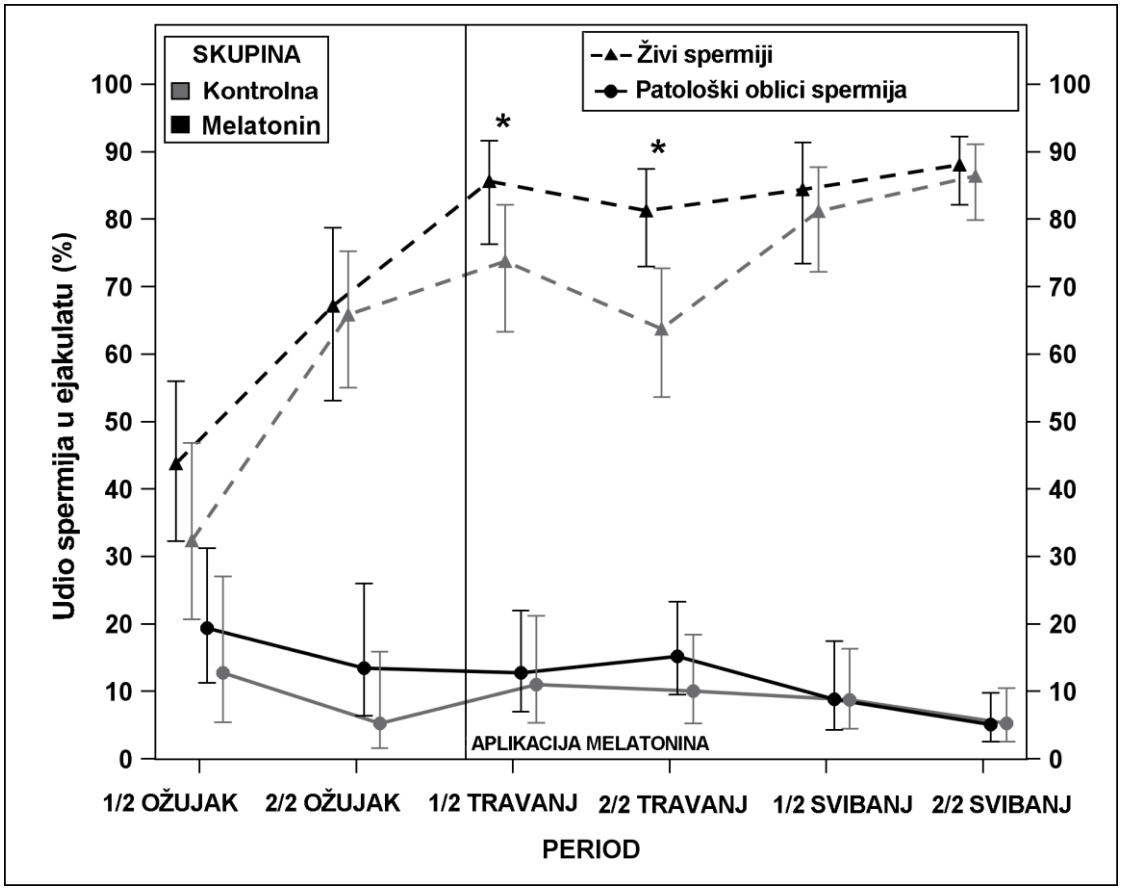
Procjena gibljivosti kao i masovne gibljivosti spermija u ejakulatu (slika 18.) je bila statistički značajno veća ($p<0,05$) u pokusne skupine jarčeva tijekom trećeg perioda pokusa odnosno odmah nakon aplikacije melatonina pokusnoj skupini jarčeva. Postotak gibljivosti spermija u trećem periodu kod pokusne skupine jarčeva je iznosio 76,7% (60,0-87,8, 95% CI) dok je kod kontrolne skupine iznosio 54,9% (38,3-70,3, 95% CI). Procjena masovne gibljivosti spermija u trećem periodu je kod pokusne skupine iznosila 3,63 (2,47-4,80, 95% CI) dok je u kontrolne skupine jarčeva iznosila 2,36 (1,19-3,52, 95% CI).



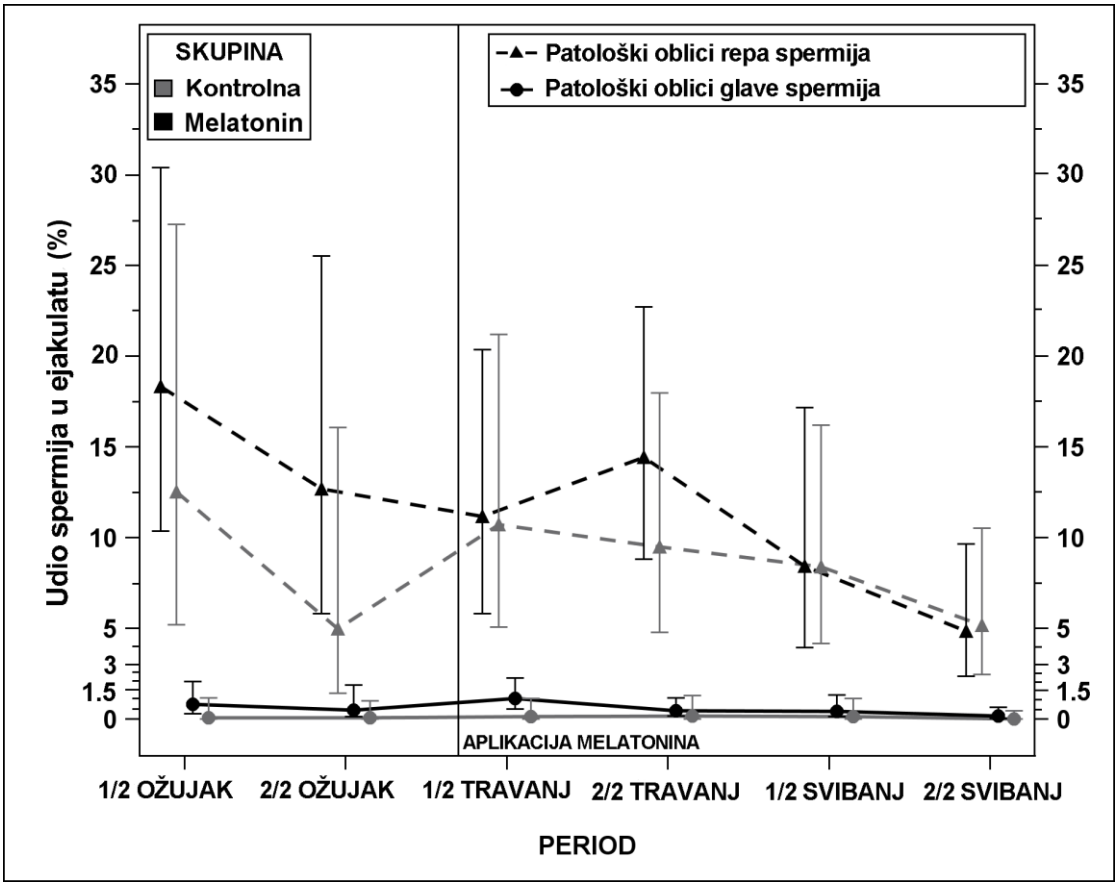
Slika 18. Grafikon srednjih vrijednosti i 95% intervala pouzdanosti procjene gibljivosti (%) i masovne gibljivosti (0-4) spermija u ejakulatu kontrolne i pokusne skupine (aplicirani implantati melatonina nakon drugog perioda pokusa) jarčeva alpske pasmine kroz period izvan rasplodne sezone (* označava statistički značajne razlike između skupina u promatranom periodu pokusa).

Udio živih spermija u ejakulatu (slika 19.) je bio značajno veći ($p<0,05$) u pokusne skupine životinja tijekom trećeg (85,6%; 75,9-91,8, 95% CI) i četvrtog (81,2%; 72,7-87,5, 95% CI) periodu pokusa za razliku od kontrolne skupine jarčeva tijekom trećeg (73,7%; 62,9-82,3, 95% CI) i četvrtog (63,7; 53,3-72,9, 95% CI) perioda pokusa.

Udio ukupno patoloških oblika spermija kao i patoloških oblika repa i glave spermija se nije statistički značajno razlikova između skupina tijekom promatranog perioda pokusa (slika 19. i 20.).



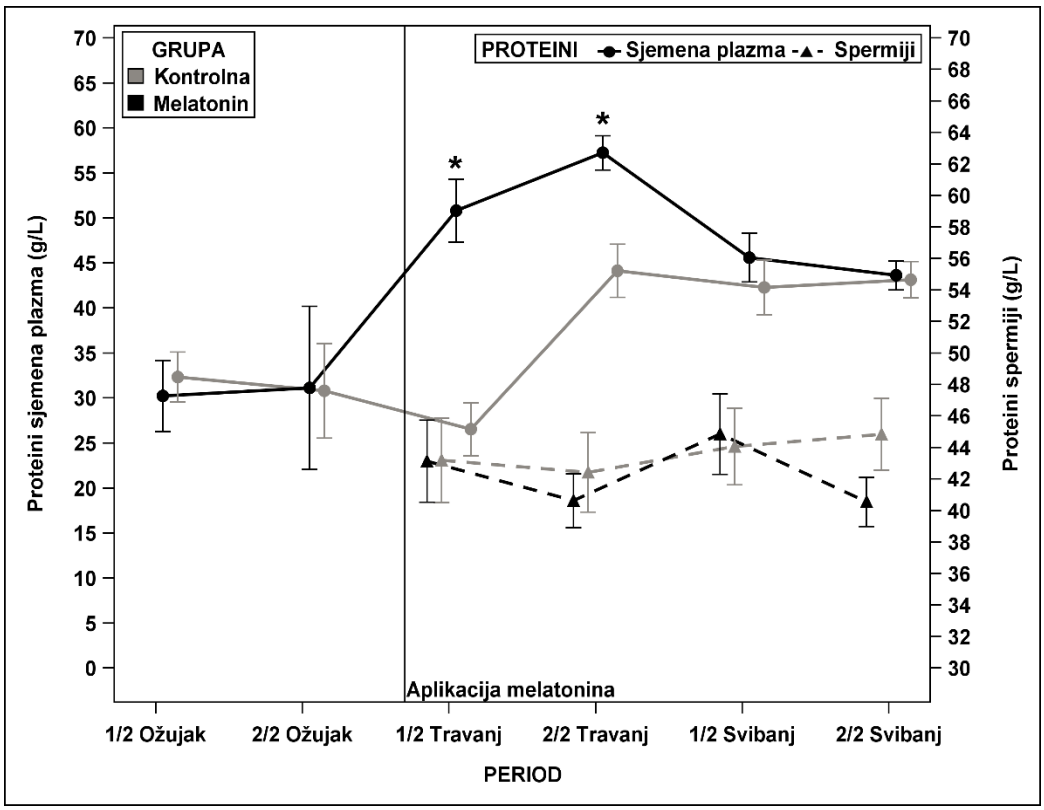
Slika 19. Grafikon srednjih vrijednosti i 95% intervala pouzdanosti udjela živih spermija i ukupno patoloških oblika spermija (%) u ejakulatu kontrolne i pokusne skupine (aplicirani implantati melatonina nakon drugog perioda pokusa) jarčeva alpske pasmine kroz period izvan rasplodne sezone (* označava statistički značajne razlike između skupina u promatranom periodu pokusa).



Slika 20. Grafikon srednjih vrijednosti i 95% intervala pouzdanosti udjela patoloških oblika repa i glave spermija (%) u ejakulatu kontrolne i pokusne skupine (aplicirani implantati melatonina nakon drugog perioda pokusa) jarčeva alpske pasmine kroz period izvan rasplodne sezone.

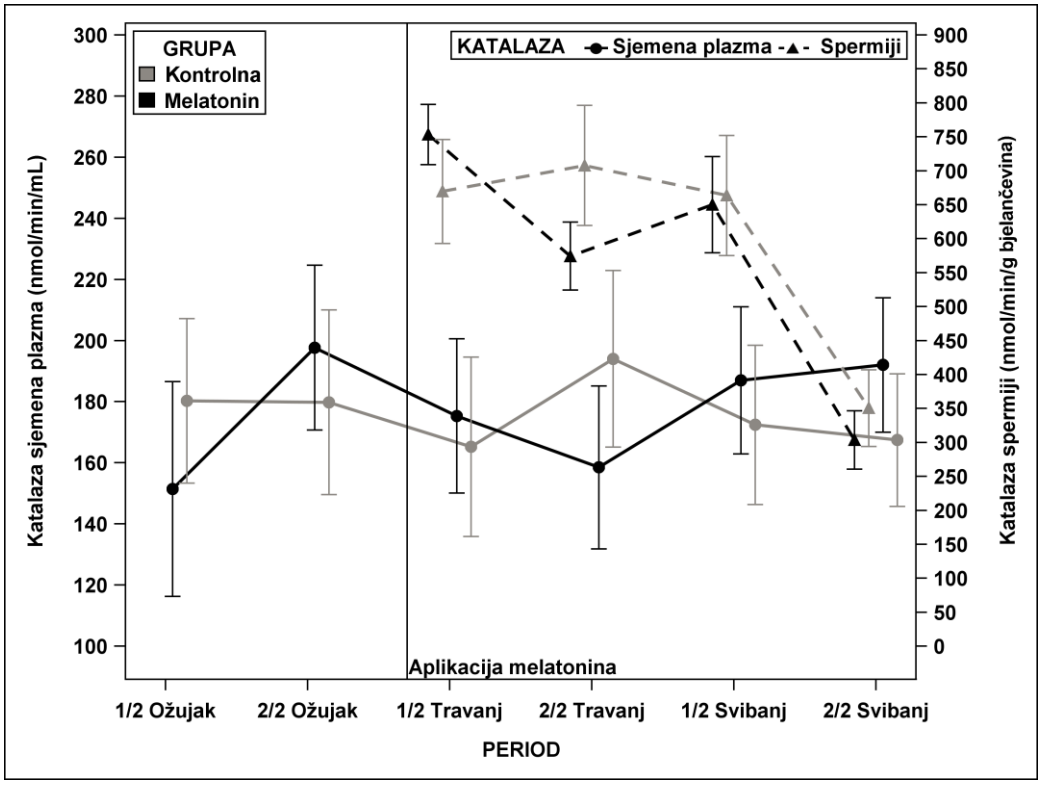
5.2. POKAZATELJI ANTIOKSIDACIJSKOG STATUSA SJEMENE PLAZME I SPERMIJA

U periodu prije aplikacije melatonina obje skupine jarčeva su imale podjednaku koncetraciju proteina u sjemenoj plazmi. Odmah nakon aplikacije melatonina pokusna skupina jarčeva je imala značajno veću koncentraciju proteina u odnosu na kontrolnu skupinu životinja u trećem (50,80±3,49 nasuprot 26,51±2,94; $p<0,001$) i četvrtom periodu (57,22±1,9 nasuprot 44,11±2,95; $p<0,01$) pokusa. Koncentracija proteina u spermijima se nije statistički značajno mijenjala (slika 21.).



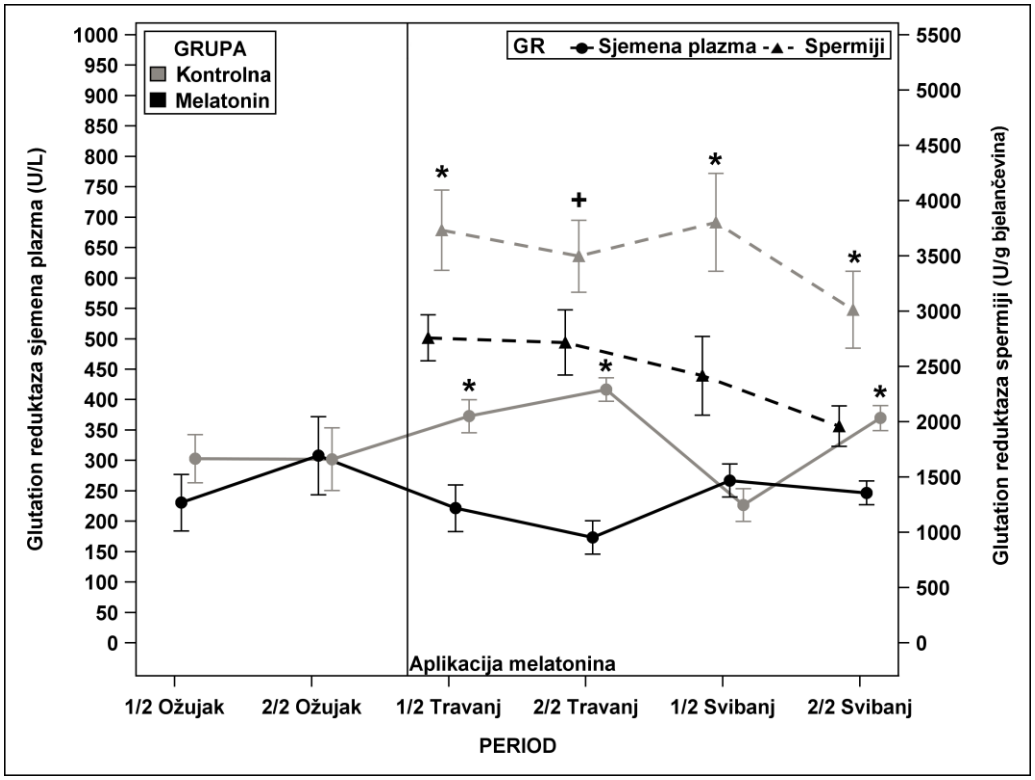
Slika 21. Grafikon srednjih vrijednosti i standardne pogreške koncentracije proteina u sjemenoj plazmi i spermijima kontrolne i pokusne skupine (aplicirani implantati melatonina nakon drugog perioda pokusa) jarčeva alpske pasmine kroz period izvan rasplodne sezone. (* označava statistički značajne razlike između skupina u promatranom periodu pokusa).

Koncentracija katalaze se nije statistički značajno mijenjala između skupina kroz pokusni period u sjemenoj plazmi i spermijima jarčeva (slika 22.).



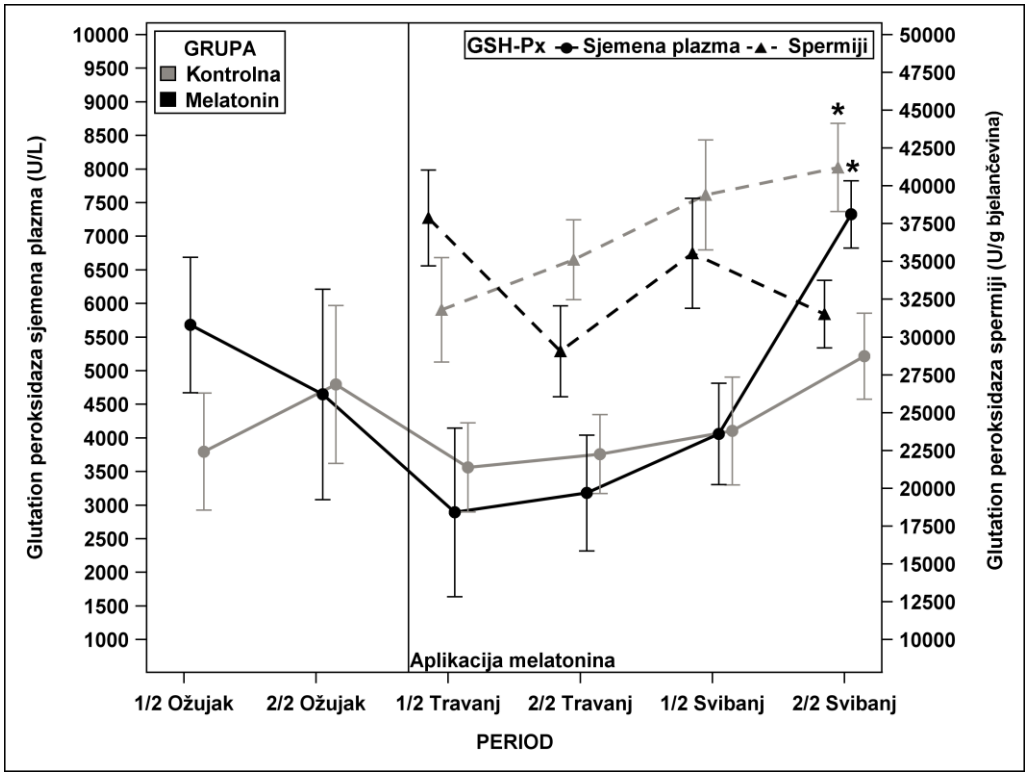
Slika 22. Grafikon srednjih vrijednosti i standardne pogreške koncentracije katalaze u sjemenoj plazmi i spermijima kontrolne i pokusne skupine (aplicirani implantati melatonina nakon drugog perioda pokusa) jarčeva alpske pasmine kroz period izvan rasplodne sezone.

Koncentracija glutation reduktaze u sjemenoj plazmi jarčeva je bila statistički značajno veća u kontrolnoj skupini u odnosu na pokusnu skupinu životinja tijekom trećeg (372,6±26,9 nasuprot 221,3±38,3; $p<0,01$), četvrtog (416,4±19,1 nasuprot 173,4±27,4; $p<0,0001$) i šestog (369,5±20,4 nasuprot 246,5±19,4; $p<0,001$) perioda pokusa. Koncentracija glutation reduktaze u spermijima jarčeva je isto bila značajno veća u kontrolnoj skupini u odnosu na pokusnu skupinu životinja tijekom trećeg (3731,2±362,7 nasuprot 2758,1±207,5; $p<0,05$), petog (3802,3±443,2 nasuprot 2415,4±356,0; $p<0,05$) i šestog (3012,7±347,3 nasuprot 1959,4±182,1; $p<0,05$) perioda pokusa dok je u četvrtom periodu razlika bila blizu statističke značajnosti (3496,4±325,5 nasuprot 2716,5±295,9; $p<0,10$) (slika 23.).



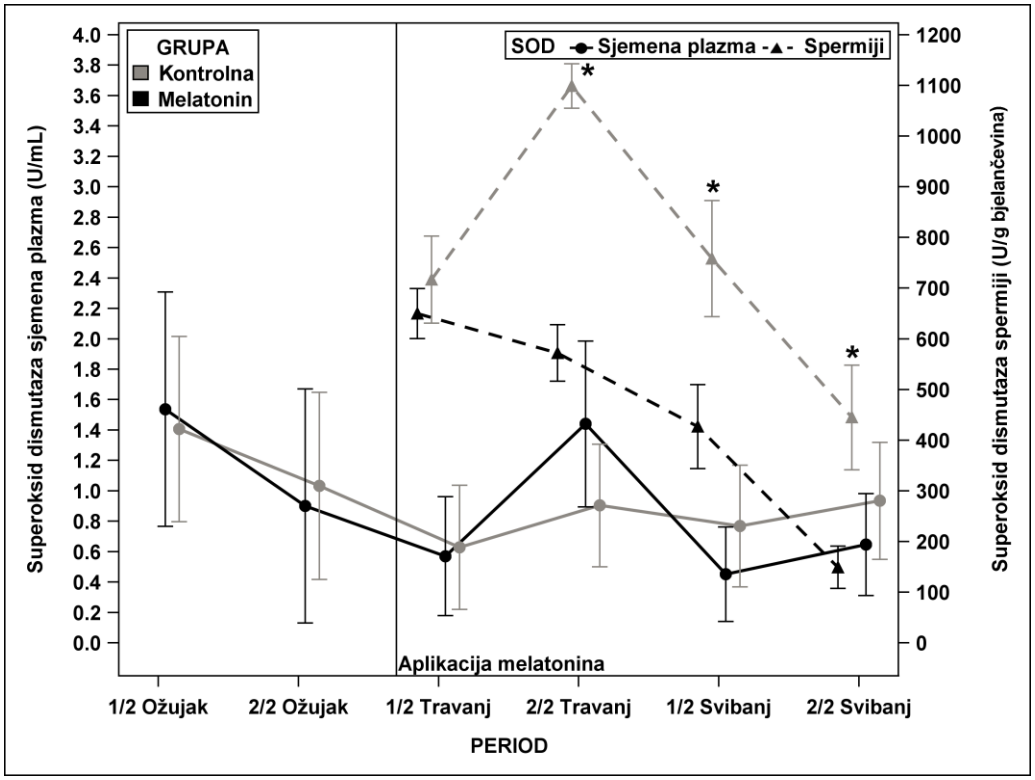
Slika 23. Grafikon srednjih vrijednosti i standardne pogreške koncentracije glutation reduktaze (GR) u sjemenoj plazmi i spermijima kontrolne i pokusne skupine (aplicirani implantati melatonina nakon drugog perioda pokusa) jarčeva alpske pasmine kroz period izvan rasplodne sezone. (*označava statistički značajne razlike između skupina u promatranom periodu pokusa; $^{+}$označava da je razlika između skupina u promatranom periodu pokusa blizu statističke značajnosti $p<0,10$).

Koncentracija glutation peroksidaze u sjemenoj plazmi je bila statistički značajno veća ($p<0,05$) u pokusnoj skupini životinja tijekom zadnjeg perioda pokusa (7324,5±499,9) u odnosu na kontrolnu skupinu (5214,5±640,3), dok je obrnuto nađeno za koncentraciju glutation peroksidaze u spermijima gdje je u kontrolnoj skupini zabilježena značajno veća ($p<0,05$) koncentracija tijekom zadnjeg perioda (41213,0±2914,6) u odnosu na pokusnu skupinu jarčeva (31515,0±2226,0) (slika 24.).



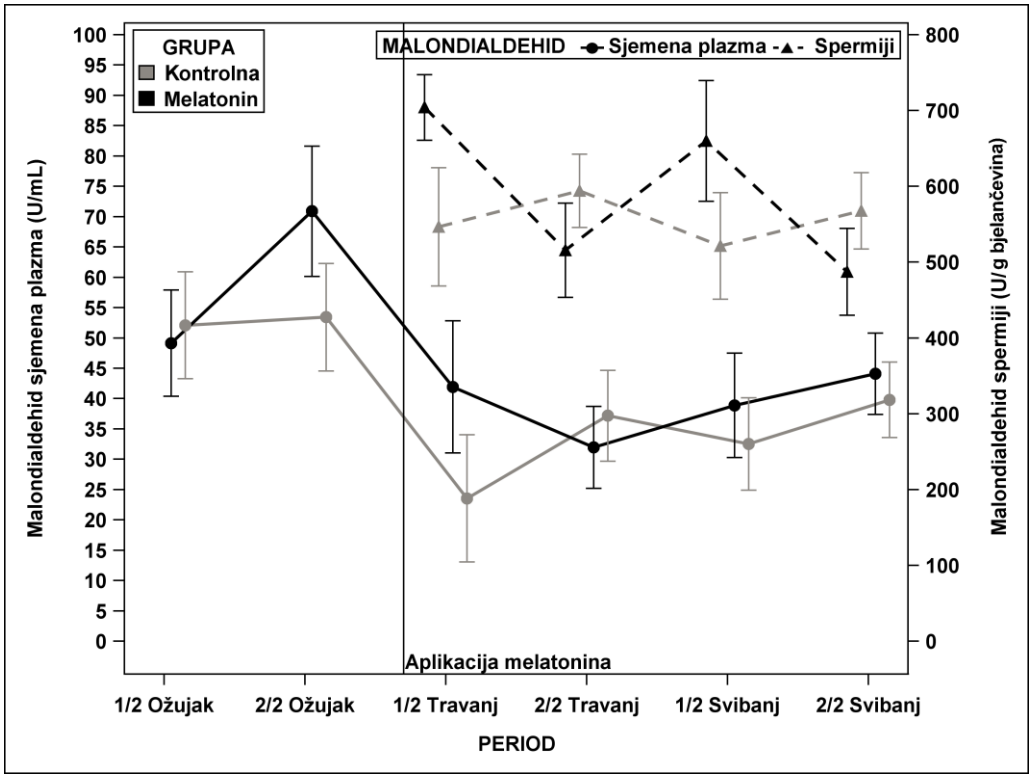
Slika 24. Grafikon srednjih vrijednosti i standardne pogreške koncentracije glutation peroksidaze (GSH-Px) u sjemenoj plazmi i spermijima kontrolne i pokusne skupine (aplicirani implantati melatonina nakon drugog perioda pokusa) jarčeva alpske pasmine kroz period izvan rasplodne sezone. (*označava statistički značajne razlike između skupina u promatranom periodu pokusa).

Koncentracija superoksid dismutaze u sjemenoj plazmi se nije značajno razlikovala između skupina tijekom pokusnog perioda dok je u spermijima bila značajno veća u kontrolnoj skupini jarčeva u odnosu na pokusnu skupinu tijekom četvrtog (1098,9±43,77 nasuprot 571,85±55,73; $p<0,001$), petog (758,0±114,6 nasuprot 426,5±82,77; $p<0,05$) i šestog (444,8±103,2 nasuprot 149,0±41,7; $p<0,01$) perioda pokusa (slika 25.)



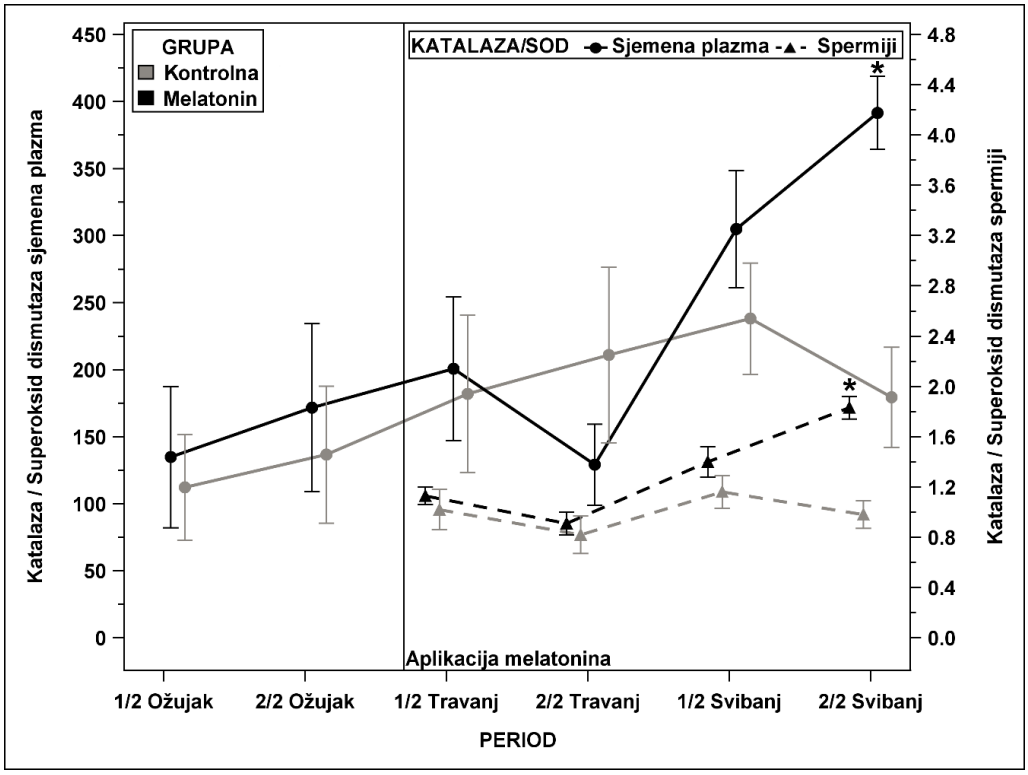
Slika 25. Grafikon srednjih vrijednosti i standardne pogreške koncentracije superoksid dismutaze (SOD) u sjemenoj plazmi i spermijima kontrolne i pokusne skupine (aplicirani implantati melatonina nakon drugog perioda pokusa) jarčeva alpske pasmine kroz period izvan rasplodne sezone. (*označava statistički značajne razlike između skupina u promatranom periodu pokusa).

Koncentracija malondialdehida u sjemenoj plazmi i spermijima se nije značajno razlikovala između skupina tijekom pokusnog perioda (slika 26.).



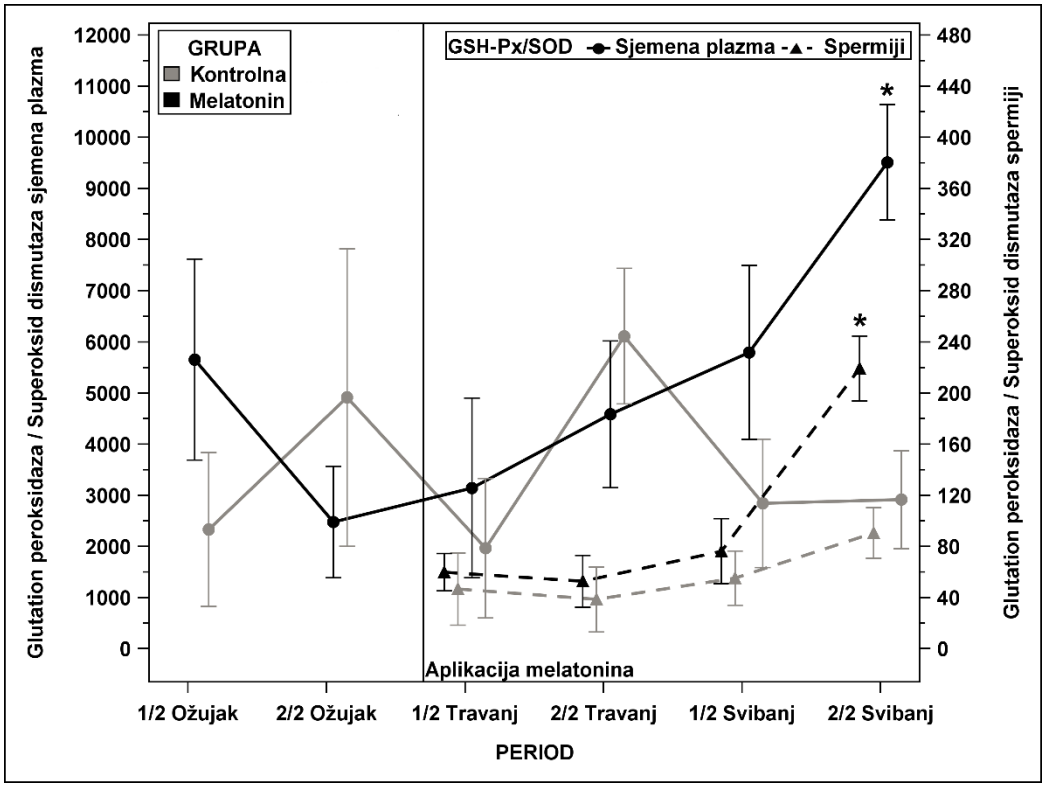
Slika 26. Grafikon srednjih vrijednosti i standardne pogreške koncentracije malondialdehida u sjemenoj plazmi i spermijima kontrolne i pokusne skupine (apliciranih implantati melatonina nakon drugog perioda pokusa) jarčeva alpske pasmine kroz period izvan rasplodne sezone.

Omjer katalaze sa superoksid dismutazom u sjemenoj plazmi je bio značajno veći ($p<0,01$) tijekom šestog perioda u pokusnoj skupini životinja (391,5±27,33) u odnosu na kontrolnu skupinu (179,3±37,38). Omjer katalaze sa superoksid dismutazom u spermijima tijekom šestog perioda je isto bio značajno veći ($p<0,01$) u pokusnoj skupini jarčeva (1,83±0,09) u odnosu na kontrolnu skupinu (0,98±0,11) (slika 27.).



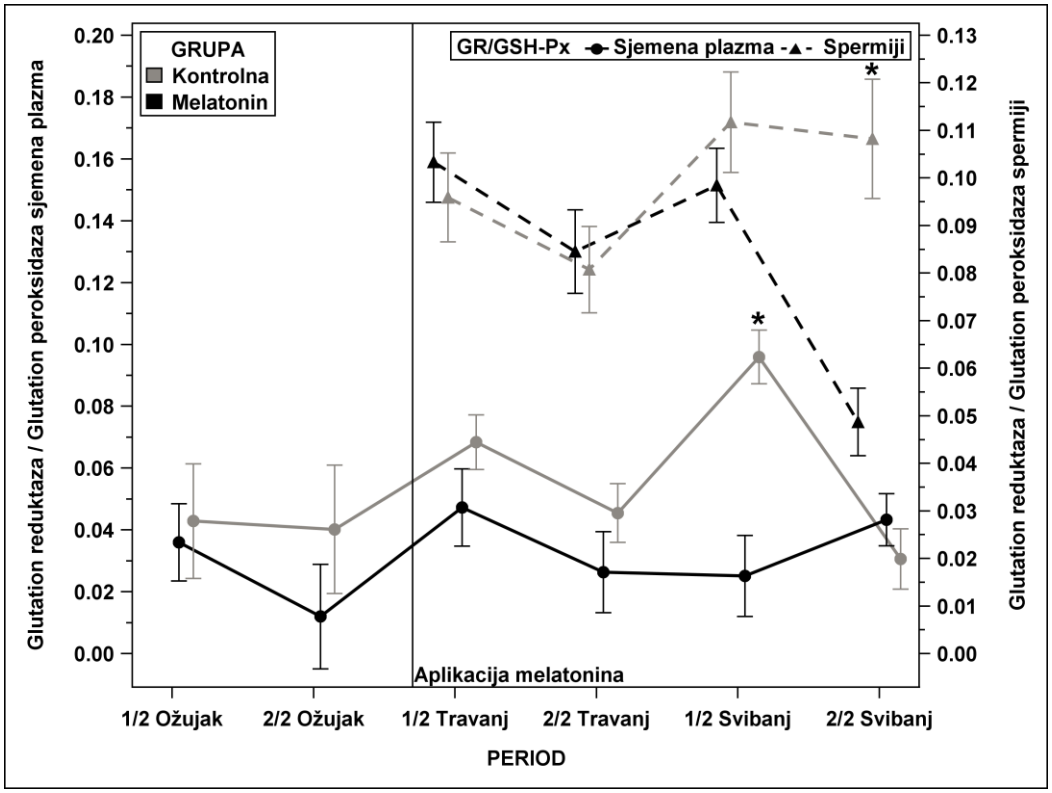
Slika 27. Grafikon srednjih vrijednosti i standardne pogreške omjera katalaze sa superoksid dismutazom (KATALAZA/SOD) u sjemenoj plazmi i spermijima kontrolne i pokusne skupine (aplicirani implantati melatonina nakon drugog perioda pokusa) jarčeva alpske pasmine kroz period izvan rasplodne sezone. (*označava statistički značajne razlike između skupina u promatranom periodu pokusa).

Omjer glutation peroksidaze sa superoksid dismutazom u sjemenoj plazmi je bio značajno veći ($p<0,01$) tijekom šestog perioda u pokusnoj skupini životinja (9509,5±1129,2) u odnosu na kontrolnu skupinu (2915,7±957,64). Omjer glutation peroksidaze sa superoksid dismutazom u spermijima tijekom šestog perioda je isto bio značajno veći ($p<0,005$) u pokusnoj skupini jarčeva (219,0±25,5) u odnosu na kontrolnu skupinu (90,3±19,9) (slika 28.).



Slika 28. Grafikon srednjih vrijednosti i standardne pogreške omjera glutation peroksidaze sa superoksid dismutazom (GSH-Px/SOD) u sjemenoj plazmi i spermijima kontrolne i pokusne skupine (aplicirani implantati melatonina nakon drugog perioda pokusa) jarčeva alpske pasmine kroz period izvan rasplodne sezone. (*označava statistički značajne razlike između skupina u promatranom periodu pokusa)

Omjer glutation reduktaze s glutation peroksidazom u sjemenoj plazmi je bio značajno veći ($p<0,05$) tijekom petog perioda u kontrolnoj skupini životinja (0,095±0,008) u odnosu na pokusnu skupinu (0,025±0,013). Omjer glutation reduktaze s glutation peroksidazom u spermijima tijekom šestog periodu je isto bio značajno veći ($p<0,005$) u kontrolnoj skupini jarčeva (0,108±0,012) u odnosu na pokusnu skupinu (0,048±0,007) (slika 29.).



Slika 29. Grafikon srednjih vrijednosti i standardne pogreške omjera glutation reduktaze s glutation peroksidazom (GR/GSH-Px) u sjemenoj plazmi i spermijima kontrolne i pokusne skupine (aplicirani implantati melatonina nakon drugog perioda pokusa) jarčeva alpske pasmine kroz period izvan rasplodne sezone. (*označava statistički značajne razlike između skupina u promatranom periodu pokusa)

U tablici 2. prikazani su neki statistički značajni odnosi antioksidativnih pokazatelja u sjemenoj plazmi i spermijima s nekim pokazateljima kvalitete svježeg ejakulata. U obzir su uzeti odnosi gdje je koeficijent korelacije (r) iznosio => 0,35. Antioksidativni pokazatelji u sjemenoj plazmi nisu korelirali s antioksidativnim pokazateljima u spermijima. Nađene su određene korelacije antioksidativnih pokazatelja sjemene plazme međusobno kao i u spermijima jarčeva. Isto tako koncentracija i udio živih spermija u ejakulatu su korelirali s određenim antioksidativnim pokazateljima u sjemenoj plazmi i spermijima.

Tablica 2. Odnosi između antioksidativnih pokazatelja u sjemenoj plazmi i spermijima te pokazateljima kvalitete svježeg ejakulata u jarčeva alpske pasmine.

		SJEMENA PLAZMA						SPERMIJI						POKAZATELJI KVALITETE	
		KATALAZA	GR	MDA	SOD	GSH-Px	GSH-Px/SOD	KATALAZA/ SOD	GR/GSH-Px	KONCENTRACIJA	ŽIVI / MRTVI
SJEMENA PLAZMA	KATALAZA		0,81 p<0,0001	0,49 P<0,001	n.s.	n.s.	0,50 p<0,0001	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	GR	0,81 p<0,0001		n.s.	n.s.	n.s.	0,60 p<0,0001	n.s.	0,59 p<0,0001	n.s.	n.s.
	MDA	0,49 P=0,0001	n.s.		0,46 P<0,001	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	-0,45 P<0,001	n.s.
	SOD	n.s.	n.s.	0,46 P<0,001		n.s.	-0,67 P<0,0001	-0,86 p<0,0001	n.s.	-0,47 P<0,001	n.s.
	GSH-Px	n.s.	n.s.	n.s.	-0,67 P<0,0001		0,62 P<0,0001	0,74 P<0,0001	-0,79 p<0,001	n.s.	n.s.
	GSH-Px/SOD	n.s.	n.s.	n.s.	-0,86 p<0,0001	0,62 P<0,0001		0,74 P<0,0001	n.s.	n.s.	n.s.
	KATALAZA/ SOD	0,50 p<0,0001	0,60 p<0,0001	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.		n.s.	0,40 p<0,01	n.s.
SPERMIJI	KATALAZA	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.			
	GR	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	0,65 P<0,0001		
	MDA	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	SOD	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	0,89 P<0,0001	0,71 P<0,0001	n.s.
	GSH-Px	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	GSH-Px/SOD	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	-0,61 P<0,0001	-0,53 P<0,0001	n.s.
	KATALAZA/ SOD	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	GR/GSH-Px	n.s.	0,59 p<0,0001	n.s.	n.s.	-0,79 p<0,001	n.s.	n.s.	n.s.	0,97 p<0,0001	n.s.
POKAZATELJI KVALITETE	KONCENTRACIJA	n.s.	n.s.	-0,47 P<0,001	-0,45 P<0,001	n.s.	n.s.	0,40 p<0,01	n.s.		
	ŽIVI / MRTVI	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	

		SPERMIJI								POKAZATELJI KVALITETE	
		KATALAZA	GR	MDA	SOD	GSH-Px	GSH-Px/SOD	KATALAZA/ SOD	GR/GSH-Px	KONCENTRACIJA	ŽIVI / MRTVI
SJEMENA PLAZMA	KATALAZA	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	GR	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	MDA	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	-0,45 P<0,001	n.s.
	SOD	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	-0,47 P<0,001	n.s.
	GSH-Px	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	-0,79 p<0,001	n.s.	n.s.
	GSH-Px/SOD	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	KATALAZA/ SOD	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	0,40 p<0,01	n.s.
SPERMIJI	KATALAZA									0,47 P<0,001	-0,40 p<0,01
	GR	0,65 P<0,0001								0,47 P<0,001	-0,43 p<0,01
	MDA	n.s.	n.s.							n.s.	n.s.
	SOD	0,89 P<0,0001	0,71 P<0,0001	n.s.						0,56 p<0,0001	n.s.
	GSH-Px	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.					n.s.	n.s.
	GSH-Px/SOD	-0,61 P<0,0001	-0,53 P<0,0001	n.s.	-0,71 p<0,0001	n.s.				-0,57 p<0,0001	n.s.
	KATALAZA/ SOD	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	0,73 P<0,0001			n.s.	n.s.
	GR/GSH-Px	n.s.	0,97 p<0,0001	n.s.	n.s.	-0,51 p<0,0001	-0,68 p<0,0001	n.s.		-0,40 p<0,01	n.s.
POKAZATELJI KVALITETE	KONCENTRACIJA	0,47 P<0,001	0,47 p<0,001	n.s.	0,56 p<0,0001	n.s.	-0,57 p<0,0001	n.s.	n.s.		
	ŽIVI / MRTVI	-0,40 p<0,01	-0,43 p<0,01	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	

GR – Glutation reduktaza; MDA – Malondialdehid; SOD – Superoskid dismutaza; GSH-Px – Glutation peroksidaza.

n.s. – nema statističke značajnosti

5.3. POKAZATELJI KVALITETE EJAKULATA NAKON ODMRZAVANJA

5.3.1. SKUPNI POKAZATELJI KVALITETE EJAKULATA NAKON ODMRZAVANJA

U tablici 3. prikazani su skupni pokazatelji kvalitete ejakulata nakon odmrzavanja između pokusne i kontrolne skupine životinja te životinja čiji je ejakulat prije standardnog postupka zamrzavanja obogaćen s vitaminom E i C ili vitamini nisu dodani. Ukupno bez obzira na period eksperimenta, pokusna skupina životinja je u odnosu na kontrolnu skupinu imala značajno veći ($p<0,05$) postotak pokretljivosti spermija nakon otapanja (47,9±1,9% nasuprot 41,7±1,9%), veći postotak manježnog kretanja spermija (19,7±1,1% nasuprot 16,0±1,0%), veći postotak ukupno živih spermija (42,5±1,8% nasuprot 35,6±1,7% prema analizi ejakulata pomoću protočne citometrije te 57,7±1,8% nasuprot 51,4±1,8% prema citološko-morfološkoj analizi ejakulata), veći postotak živih spermija s intaktnom akrosomom (41,3±1,8 nasuprot 34,3±1,7), veći postotak spermija s protoplazmatskom kapljicom (2,9±0,6% nasuprot 1,4±0,3%) te veći udio sekundarno abnormalnih spermija (4,1±0,6% nasuprot 2,0±0,4%). Ujedno je pokusna skupina imala i značajno manji ($p<0,05$) udio spermija s oštećenom plazminom membranom (57,6±2,3% nasuprot 65,0±2,2%) te manji udio ukupno spermija s oštećenom akrosomom (20,2±1,4% nasuprot 24,9±1,5%).

Ejakulat jarčeva koji je prije standardnog postupka zamrzavanja obogaćen s vitaminom E i C je imao značajno veći udio spermija s oštećenom plazminom membranom (65,3±2,2% nasuprot 57,3±2,3%; $p<0,05$) te značajno manji udio ukupno živih spermija (36,1±1,7% nasuprot 41,9±1,7%; $p<0,05$) i živih spermija s intaktnom akrosomom (35,0±1,7% nasuprot 40,7±1,7%; $p<0,05$).

Tablica 3. Skupni pokazatelji kvalitete ejakulata nakon odmrzavanja dobiveni kompjuterski asistiranom analizom, protočnom citometrijom i citološko-morfološkom analizom između kontrolne i pokusne skupine (aplicirani implantati melatonina) jarčeva alpske pasmine te između životinja čiji je ejakulat prije standardnog postupka zamrzavanja obogaćen s vitaminom E i C ili vitamini nisu dodani bez obzira na period istraživanja.

		SKUPINA		*P*	VITAMINI E+C		*P*
	PARAMETAR	KONTROLNA	MELATONIN		NE	DA	
COMPUTER-ASSISTED SPERM ANANLYSIS (CASA) PARAMETRI	POKRETLJIVOST NAKON OTAPANJA (%)	41,7±1,9	47,9±1,9	**0,04**	46,7±1,9	43,0±1,9	0,19
	PROGRESIVNA POKRETLJIVOST (%)	28,4±1,4	31,7±1,5	0,14	30,9±1,5	29,0±1,5	0,36
	KRIVOLINIJSKA BRZINA - VCL (µm/s)	89,4±2,5	90,4±2,6	0,78	91,9±2,5	87,9±2,6	0,27
	PRAVOLINIJSKA BRZINA - VSL (µm/s)	50,1±2,1	49,3±2,2	0,78	50,9±2,1	48,5±2,1	0,44
	PROSJEČNA BRZINA - VAP (µm/s)	65,3±2,7	65,0±2,8	0,93	67,1±2,7	63,4±2,8	0,32
	INDEKS LINEARNOSTI VSL/VCL (%)	55,4±1,4	53,8±1,4	0,41	54,7±1,4	54,5±1,4	0,89
	PRAVOLINIJSKI INDEKS VSL/VAP (%)	76,5±0,8	75,8±0,9	0,52	75,7±0,8	76,6±0,8	0,47
	INDEKS OSCILACIJE VAP/VCL (%)	72,0±1,4	70,9±1,4	0,57	72,1±1,4	70,8±1,4	0,53
	AMPLITUDA LATERALNOG OTKLONA POMJERANJA GLAVE (µm)	2,98±0,05	3,01±0,05	0,70	3,02±0,05	2,98±0,05	0,63
	FREKVENCIJA PRELASKA PRAVOLINIJSKE PUTANJE U SEKUNDI (Hz)	9,85±0,26	10,08±0,26	0,52	9,86±0,26	10,07±0,26	0,56
	MANJEŽNO KRETANJE (%)	16,0±1,0	19,7±1,1	**0,03**	18,6±1,1	17,0±1,0	0,30
PARAMETRI PROTOČNE CITOMETRIJE	OŠTEĆENJE PLAZMINE MEMBRANE (%)	65,0±2,2	57,6±2,3	**0,04**	57,3±2,3	65,3±2,2	**0,02**
	OŠTEĆENJE KROMATINA (%)	9,9±1,0	10,1±1,0	0,89	8,7±0,9	11,4±1,1	0,08
	OŠTEĆENJE I DEPOLARIZACIJA MITOHONDRIJA (%)	71,9±1,9	69,2±2,0	0,34	69,7±1,9	71,4±1,9	0,55
	UKUPNO ŽIVIH SPERMIJA (%)	35,6±1,7	42,5±1,8	**0,01**	41,9±1,7	36,1±1,7	**0,03**
	ŽIVI SPERMIJI S INTAKTNOM AKROSOMOM (%)	34,3±1,7	41,3±1,8	**0,01**	40,7±1,7	35,0±1,7	**0,03**
	MRTVI SPERMIJI S INTAKTNOM AKROSOMOM (%)	21,6±1,8	19,6±1,7	0,42	19,9±1,7	21,2±1,8	0,57
	ŽIVI SPERMIJI S OŠTEĆENOM AKROSOMOM (%)	1,2±0,1	1,0±0,1	0,46	1,1±0,1	1,0±0,1	0,60
	MRTVI SPERMIJI S OŠTEĆENOM AKROSOMOM (%)	21,6±1,7	19,6±1,7	0,42	19,9±1,7	21,2±1,7	0,57
	UKUPNO SPERMIJI S OŠTEĆENOM AKROSOMOM (%)	22,8±1,8	20,7±1,8	0,40	21,1±1,8	22,4±1,8	0,61
PARAMETRI CITOMORFOLOGIJE SPERMIJA	UKUPNO ŽIVIH SPERMIJA (%)	51,4±1,8	57,7±1,8	**0,03**	54,9±1,8	54,2±1,9	0,79
	ŽIVI SPERMIJI S INTAKTNOM AKROSOMOM (%)	43,6±1,9	47,5±2,0	0,18	45,7±1,9	45,3±2,0	0,88
	ŽIVI SPERMIJI S OŠTEĆENOM AKROSOMOM (%)	2,8±0,3	2,2±0,3	0,24	2,6±0,3	2,5±0,3	0,85
	UKUPNO SPERMIJI S OŠTEĆENOM AKROSOMOM (%)	24,9±1,5	20,2±1,4	**0,04**	21,5±1,4	23,4±1,5	0,34
	UKUPNO SPERMIJI S PROTOPLAZMATSKOM KAPLJICOM (%)	1,4±0,3	2,9±0,6	**0,04**	2,2±0,5	1,8±0,4	0,50
	PRIMARNO ABNORMALNI SPERMIJI (%)	6,8±0,7	7,7±0,7	0,37	7,8±0,7	6,7±0,6	0,31
	SEKUNDARNO ABNORMALNI SPERMIJI (%)	2,0±0,4	4,1±0,6	**0,02**	2,8±0,5	3,0±0,5	0,70
	UKUPNO ABNORMALNI SPERMIJI (%)	9,1±1,0	12,2±1,1	0,07	11,0±1,1	10,1±1,0	0,59

5.3.2. POKAZATELJI GIBLJIVOSTI SPERMIJA

U tablici 4. su prikazani različiti pokazatelji gibljivosti spermija dobiveni kompjuterski potpomognutom analizom ejakulata između kontrolne i pokusne skupine sa i bez dodanih vitamina C i E u razrijeđivač kroz 6 pokusnih perioda izvan rasplodne sezone. Skupina jarčeva koja je primila implantate melatonina imala je statistički značajno veću ($p<0,05$) ukupnu pokretljivost spermija nakon otapanja (60,4±6,2%) nasuprot kontrolne skupine jarčeva (37,8±6,1%) u trećem periodu pokusa u ejakulatu bez dodanih vitamina i skupnu ukupnu pokretljivost u ejakulatu bez obzira na dodane vitamine (54,7±5,0% nasuprot 34,0±4,5%). Isto tako, bez obzira na dodane vitamine u razrijeđivač pokusna skupina jarčeva je imala značajno veću ($p<0,05$) skupnu progresivnu pokretljivost spermija nakon otapanja (36,9±4,2%) nasuprot kontrolne skupine (24,5±3,6%) u trećem periodu pokusa.

Pokusna skupina jarčeva je imala značajno veću ($p<0,05$) skupnu frekvenciju prelaska pravolinijske putanje u sekundi bez obzira na dodane vitamine u razrijeđivač (11,56±0,96 Hz) nasuprot kontrolne skupine jarčeva (9,41±0,96 Hz) u četvrtom periodu pokusa.

Tablica 4. Pokazatelji gibljivosti spermija dobiveni nakon kompjuterski potpomognute analize ejakulata između kontrolne i pokusne skupine (aplicirani implantati melatonina) jarčeva alpske pasmine sa i bez dodanog vitamina C i E u razrijeđivač kroz 6 pokusnih perioda izvan rasplodne sezone.

			PERIOD						SKUPNA STANDARDNA POGREŠKA ZA CIJELI PERIOD
					NAKON APLIKACIJE MELATONINA				
PARAMETAR	SKUPINA	VITAMINI	1/2 OŽUJAK	2/2 OŽUJAK	1/2 TRAVANJ	2/2 TRAVANJ	1/2 SVIBANJ	2/2 SVIBANJ	
POKRETLJIVOST NAKON OTAPANJA (%)	KONTROLNA	0	27,7	35,8	**37,8^{A}**	41,9	48,6	44,0	15,5
		1			**30,1**	40,7	48,9	42,9	12,3
	MELATONIN	0	36,3	46,8	**60,4^{B}**	60,4	41,2	52,3	16,2
		1			**48,0**	40,9	47,6	44,2	12,9
PROGRESIVNA POKRETLJIVOST (%)	KONTROLNA	0	16,6	23,5	**26,4**	27,4	34,1	28,7	11,9
		1			**22,6**	24,4	32,5	29,7	9,6
	MELATONIN	0	22,8	30,5	**40,9**	30,1	29,9	30,8	13,2
		1			**32,1**	26,2	32,8	29,4	10,3
KRIVOLINIJSKA BRZINA - VCL (µm/s)	KONTROLNA	0	76,9	92,0	84,8	95,7	96,7	89,4	19,4
		1			73,3	93,2	94,9	90,0	15,2
	MELATONIN	0	82,9	99,5	99,2	77,3	95,7	91,3	19,7
		1			86,3	82,0	87,8	89,8	15,6
PRAVOLINIJSKA BRZINA - VSL (µm/s)	KONTROLNA	0	37,1	51,7	47,8	54,3	56,7	48,8	16,6
		1			42,6	50,1	56,0	50,0	13,0
	MELATONIN	0	41,4	58,8	60,4	40,6	49,4	48,9	17,0
		1			44,6	37,5	51,6	49,7	13,4
PROSJEČNA BRZINA - VAP (µm/s)	KONTROLNA	0	50,8	69,1	61,0	71,5	74,3	63,8	20,9
		1			52,5	68,0	73,8	64,4	16,4
	MELATONIN	0	55,8	74,4	78,1	50,5	68,7	65,7	21,3
		1			58,6	51,2	66,1	64,7	16,9
INDEKS LINEARNOSTI VSL/VCL (%)	KONTROLNA	0	48,2	54,3	54,0	57,6	57,6	54,5	10,7
		1			56,3	54,7	58,2	54,4	8,3
	MELATONIN	0	48,7	58,8	60,7	51,0	51,2	53,2	10,8
		1			51,5	44,6	57,3	54,7	8,6
PRAVOLINIJSKI INDEKS VSL/VAP (%)	KONTROLNA	0	72,4	74,0	76,8	75,5	76,4	76,1	6,7
		1			79,3	73,7	77,2	76,4	5,2
	MELATONIN	0	73,3	78,8	77,0	78,4	71,5	75,0	6,7
		1			76,3	72,7	77,5	76,5	5,4
INDEKS OSCILACIJE VAP/VCL (%)	KONTROLNA	0	66,2	73,0	69,9	75,5	75,3	71,0	10,7
		1			70,7	73,4	75,7	70,3	8,2
	MELATONIN	0	65,9	74,3	78,6	64,8	71,5	71,1	11,0
		1			67,5	60,9	73,9	71,2	9,0
AMPLITUDA LATERALNOG OTKLONA POMJERANJA GLAVE (µm)	KONTROLNA	0	2,81	3,06	2,90	3,10	2,94	3,02	0,41
		1			2,65	3,20	2,93	3,05	0,32
	MELATONIN	0	3,06	3,39	3,02	2,85	3,19	2,99	0,42
		1			2,96	3,07	2,91	3,01	0,33
FREKVENCIJA PRELASKA PRAVOLINIJSKE PUTANJE U SEKUNDI (Hz)	KONTROLNA	0	9,66	8,17	9,94	**9,29**	9,74	9,93	1,96
		1			9,76	**9,53**	9,25	9,94	1,54
	MELATONIN	0	9,37	9,40	9,23	**11,78**	8,50	9,99	2,01
		1			11,18	**11,34**	9,45	10,01	1,59
MANJEŽNO KRETANJE (%)	KONTROLNA	0	13,7	12,6	13,8	17,8	16,8	19,3	7,6
		1			18,9	19,7	16,7	17,0	6,0
	MELATONIN	0	15,4	17,9	19,1	15,4	20,3	20,2	8,4
		1			20,9	21,1	16,8	18,6	6,8

^{AB} različite slovne oznake – statistički značajna razlika ($p<0,05$) između kontrolne i pokusne skupine jarčeva unutar iste podskupine (dodani vitamini ili bez dodanih vitamina C i E) u određenom periodu pokusa.

Podebljane vrijednosti ukazuju na ukupno statistički značajnu razliku ($p<0,05$) između kontrolne i pokusne skupine jarčeva (bez obzira na vitamine) u određenom periodu pokusa.

5.3.3. POKAZATELJI VITALNOSTI SPERMIJA

U tablici 5. su prikazani različiti pokazatelji vitalnosti spermija dobiveni analizom protočne citometrije ejakulata između kontrolne i pokusne skupine sa i bez dodanih vitamina C i E u razrijeđivač kroz 6 pokusnih perioda izvan rasplodne sezone. Skupina jarčeva koja je primila implantate melatonina imala je statistički značajno više ($p<0,05$) ukupno živih spermija nakon otapanja u trećem periodu pokusa nasuprot kontrolne skupine jarčeva u podskupini bez dodanih vitamina (50,1±4,9% nasuprot 29,3±4,9%), s dodanim vitaminima C i E u razrijeđivač (42,8±5,5% nasuprot 25,5±4,9%) kao i ukupno bez obzira na dodane vitamine (47,3±5,9% nasuprot 27,6±6,5%). Isto tako, skupina jarčeva koja je primila implantate melatonina imala je statistički značajno više ($p<0,05$) živih spermija s intaktnom akrosomom nakon otapanja u trećem periodu pokusa nasuprot kontrolne skupine jarčeva u podskupini bez dodanih vitamina (49,4±4,9% nasuprot 28,5±5,0%), s dodanim vitaminima C i E u razrijeđivač (42,1±5,6% nasuprot 24,5±5,0%) kao i ukupno bez obzira na dodane vitamine (44,4±4,4% nasuprot 26,6±4,4%). Skupina jarčeva koja je primila implantate melatonina imala je statistički značajno manje ($p<0,05$) mrtvih spermija s oštećenom akrosomom nakon otapanja nasuprot kontrolne skupine jarčeva bez obzira na dodane vitamine (8,7±3,8% nasuprot 20,6±5,1%) kao i ukupno spermija s oštećenom akrosomom bez obzira na dodane vitamine (9,8±3,4% nasuprot 20,4±4,4%) u trećem periodu pokusa. Skupina jarčeva koja je primila implantate melatonina imala je statistički značajno manje ($p<0,05$) spermija s oštećenom plazminom membranom nakon otapanja u trećem periodu pokusa nasuprot kontrolne skupine jarčeva u podskupini bez dodanih vitamina (47,1±5,1% nasuprot 69,5±5,8%), s dodanim vitaminima C i E u razrijeđivač (57,8±6,0% nasuprot 76,2±5,8%) kao i ukupno bez obzira na dodane vitamine (53,0±7,9% nasuprot 72,6±6,8%).

Tablica 5. Pokazatelji vitalnosti spermija dobiveni nakon analize protočne citometrije ejakulata između kontrolne i pokusne skupine (aplicirani implantati melatonina) jarčeva alpske pasmine sa i bez dodanog vitamina C i E u razrijeđivač kroz 6 pokusnih perioda izvan rasplodne sezone.

				PERIOD						
						NAKON APLIKACIJE MELATONINA				SKUPNA STANDARDNA POGREŠKA ZA CIJELI PERIOD
	PARAMETAR	SKUPINA	VITAMINI	1/2 OŽUJAK	2/2 OŽUJAK	1/2 TRAVANJ	2/2 TRAVANJ	1/2 SVIBANJ	2/2 SVIBANJ	
TEST INTEGRITETA MEMBRANE I AKROSOMA SPERMIJA	UKUPNO ŽIVIH SPERMIJA (%)	KONTROLNA	0	29,3	33,3	**29,3^{A}**	35,6	48,7	40,0	12,6
			1			**25,5^{A}**	25,5	42,0	38,8	9,8
		MELATONIN	0	36,2	42,8	**50,1^{B}**	41,0	49,6	44,7	12,9
			1			**42,8^{B}**	30,6	42,0	39,1	10,2
	ŽIVI SPERMIJI S INTAKTNOM AKROSOMOM (%)	KONTROLNA	0	28,3	31,6	**28,5^{A}**	34,6	47,3	38,0	11,7
			1			**24,5^{A}**	24,9	40,7	37,0	9,5
		MELATONIN	0	35,5	40,9	**49,4^{B}**	39,5	48,1	43,3	12,0
			1			**42,1^{B}**	29,0	40,6	38,0	9,7
	MRTVI SPERMIJI S INTAKTNOM AKROSOMOM (%)	KONTROLNA	0	40,6	34,7	53,4	39,6	34,3	33,4	15,8
			1			53,6	48,1	37,7	32,8	12,4
		MELATONIN	0	37,4	32,3	37,7	47,7	29,9	23,7	15,7
			1			46,2	53,0	32,9	32,0	12,7
	ŽIVI SPERMIJI S OŠTEĆENOM AKROSOMOM (%)	KONTROLNA	0	0,8	1,7	0,8	0,8	1,2	1,9	0,6
			1			0,9	0,5	1,2	1,7	0,3
		MELATONIN	0	0,7	1,8	0,6	1,3	1,4	1,4	0,5
			1			0,6	1,6	1,3	1,2	0,2
	MRTVI SPERMIJI S OŠTEĆENOM AKROSOMOM (%)	KONTROLNA	0	30,7	32,2	**17,5**	24,8	17,5	28,0	13,0
			1			**21,2**	26,3	20,4	28,5	10,3
		MELATONIN	0	26,8	24,7	**9,4**	13,2	18,8	31,6	10,7
			1			**7,8**	18,2	23,4	29,9	9,4
	UKUPNO SPERMIJI S OŠTEĆENOM AKROSOMOM (%)	KONTROLNA	0	31,5	33,9	**18,3**	25,7	18,7	29,9	13,6
			1			**22,1**	26,8	21,6	30,2	10,7
		MELATONIN	0	27,5	26,0	**10,0**	14,6	20,3	33,0	11,9
			1			**8,4**	19,8	24,7	31,1	9,9
OŠTEĆENJE PLAZMINE MEMBRANE (%)		KONTROLNA	0	66,4	50,6	**69,5^{A}**	63,9	45,8	53,1	20,8
			1			**76,2^{A}**	80,0	53,0	58,2	17,4
		MELATONIN	0	57,8	47,3	**47,1^{B}**	60,4	44,0	58,2	20,7
			1			**57,8^{B}**	75,3	54,2	61,7	17,5
OŠTEĆENJE KROMATINA (%)		KONTROLNA	0	12,9	12,5	15,8	12,6	6,3	4,9	7,1
			1			18,1	20,8	4,8	6,0	5,5
		MELATONIN	0	15,3	13,1	11,9	17,3	5,1	6,2	7,3
			1			20,6	20,4	5,2	8,0	5,7
OŠTEĆENJE I DEPOLARIZACIJA MITOHONDRIJA (%)		KONTROLNA	0	80,2	62,1	63,0	68,7	71,0	77,5	12,9
			1			78,5	74,0	65,3	69,9	11,0
		MELATONIN	0	61,5	40,0	56,7	68,9	76,7	69,8	15,3
			1			60,7	76,1	79,1	71,5	11,4

^{AB} različite slovne oznake – statistički značajna razlika ($p<0,05$) između kontrolne i pokusne skupine jarčeva unutar iste podskupine (dodani vitamini ili bez dodanih vitamina C i E) u određenom periodu pokusa.

Podebljane vrijednosti ukazuju na ukupno statistički značajnu razliku ($p<0,05$) između kontrolne i pokusne skupine jarčeva (bez obzira na vitamine) u određenom periodu pokusa.

5.3.4. POKAZATELJI CITOLOŠKO-MORFOLOŠKE ANALIZE SPERMIJA

U tablici 6. su prikazani različiti pokazatelji citološko-morfološke analize ejakulata između kontrolne i pokusne skupine sa i bez dodanih vitamina C i E u razrijeđivač kroz 6 pokusnih perioda izvan rasplodne sezone. Slično kao i kod analize protočne citometrije skupina jarčeva koja je primila implantate melatonina imala je statistički značajno više ($p<0,05$) ukupno živih spermija nakon otapanja nasuprot kontrolne skupine jarčeva u podskupini bez dodanih vitamina (67,4±5,1% nasuprot 42,6±5,4%), s dodanim vitaminima C i E u razrijeđivač (66,0±5,7% nasuprot 42,8±5,4%) kao i ukupno bez obzira na dodane vitamine (66,8±4,5% nasuprot 42,7±4,6%) u trećem periodu pokusa. Isto tako, skupina jarčeva koja je primila implantate melatonina imala je statistički značajno više ($p<0,05$) živih spermija s intaktnom akrosomom nakon otapanja nasuprot kontrolne skupine jarčeva u podskupini bez dodanih vitamina (54,0±5,7% nasuprot 34,8±5,5%), s dodanim vitaminima C i E u razrijeđivač (54,7±6,4% nasuprot 34,4±5,5%) kao i ukupno bez obzira na dodane vitamine (54,4±5,2% nasuprot 34,6±4,9%) u trećem periodu pokusa. Pokusna skupina jarčeva imala je u trećem periodu pokusa statistički značajno manje ($p<0,05$) živih spermija s oštećenom akrosomom nakon otapanja bez obzira na dodane vitamine (1,4±0,6% nasuprot 3,9±0,9%) kao i ukupno spermija s oštećenom akrosomom tijekom trećeg perioda u podskupini bez dodanih vitamina (13,0±3,0% nasuprot 25,0±3,9%), s dodanim vitaminima C i E u razrijeđivač (9,5±3,0% nasuprot 37,0±4,4%) te ukupno bez obzira na dodane vitamine (12,0±2,5% nasuprot 32,7±3,4%) i četvrtog perioda u podskupini bez dodanih vitamina (16,3±4,3% nasuprot 32,3±5,5%) i ukupno bez obzira na dodane vitamine (18,6±3,3% nasuprot 29,9±3,9%). Pokusna skupina jarčeva imala je u trećem periodu statistički značajno više spermija s protoplazmatskom kapljicom u podskupini bez dodanih vitamina (9,6±2,2% nasuprot 0,4±0,4%), s dodanim vitaminima C i E u razrijeđivač (5,7±1,9% nasuprot 0,8±0,6%) te ukupno bez obzira na dodane vitamine (7,7±1,4% nasuprot 0,6±0,4%). Kod abnormalnih formi spermija, pokusna skupina jarčeva je u četvrtom periodu pokusa imala statistički značajno više primarno abnormalnih spermija u podskupini s dodanim vitaminima C i E u razrijeđivač (15,6±3,4% nasuprot 4,6±2,0%) i ukupno bez obzira na vitamine (16,0±2,6% nasuprot 7,2±1,8%) te značajno više sekundarno abnormalnih spermija u petom periodu (7,0±1,7% nasuprot 2,6±0,9%) i ukupno abnormalnih spermija u četvrtom periodu (21,4±5,4% nasuprot 9,6±4,2%) ukupno bez obzira na dodane vitamine.

Tablica 6. Pokazatelji citološko-morfološke analize spermija između kontrolne i pokusne skupine (aplicirani implantati melatonina) jarčeva alpske pasmine sa i bez dodanog vitamina C i E u razrijeđivač kroz 6 pokusnih perioda izvan rasplodne sezone.

				PERIOD						SKUPNA STANDARDNA POGREŠKA ZA CIJELI PERIOD
						NAKON APLIKACIJE MELATONINA				
	PARAMETAR	SKUPINA	VITAMINI	1/2 OŽUJAK	2/2 OŽUJAK	1/2 TRAVANJ	2/2 TRAVANJ	1/2 SVIBANJ	2/2 SVIBANJ	
NORMALNE FORME	UKUPNO ŽIVIH SPERMIJA (%)	KONTROLNA	0	36,7	39,4	**42,6^{A}**	45,0	58,8	57,7	13,9
			1			**42,8^{A}**	47,0	58,5	54,5	10,9
		MELATONIN	0	40,5	45,0	**67,4^{B}**	50,7	61,6	55,1	14,1
			1			**66,0^{B}**	50,7	61,2	56,0	11,1
	ŽIVI SPERMIJI S INTAKTNOM AKROSOMOM (%)	KONTROLNA	0	30,0	34,2	**34,8^{A}**	37,6	52,0	49,6	14,5
			1			**34,4^{A}**	41,0	49,3	47,6	11,4
		MELATONIN	0	36,5	42,5	**54,0^{B}**	42,3	46,4	48,6	15,1
			1			**54,7^{B}**	39,7	50,2	48,6	12,0
	ŽIVI SPERMIJI S OŠTEĆENOM AKROSOMOM (%)	KONTROLNA	0	3,3	4,4	**3,6**	4,0	2,5	2,6	3,1
			1			**4,2**	2,0	2,8	1,6	1,9
		MELATONIN	0	2,7	2,0	**2,0**	2,6	3,4	1,2	2,5
			1			**0,7**	3,3	3,0	2,0	2,0
	UKUPNO SPERMIJI S OŠTEĆENOM AKROSOMOM (%)	KONTROLNA	0	35,0	27,4	**25,0^{A}**	**32,3^{A}**	20,1	22,0	10,7
			1			**37,0^{A}**	**28,3**	19,3	23,7	8,2
		MELATONIN	0	24,7	19,0	**13,0^{B}**	**16,3^{B}**	21,6	23,2	9,2
			1			**9,5^{B}**	**21,0**	21,0	26,1	7,3
	UKUPNO SPERMIJI S PROTOPLAZMATSKOM KAPLJICOM (%)	KONTROLNA	0	2,3	1,2	**0,4^{A}**	1,0	1,6	2,8	2,2
			1			**0,8^{A}**	0,6	0,5	3,2	1,4
		MELATONIN	0	6,0	3,6	**9,6^{B}**	1,3	3,0	2,5	3,9
			1			**5,7^{B}**	2,0	2,2	2,2	2,6
ABNORMALNE FORME	PRIMARNO ABNORMALNI SPERMIJI (%)	KONTROLNA	0	11,6	5,4	13,6^{A}	**9,3**	5,6	4,8	5,3
			1			6,8	**4,6^{A}**	5,5	4,7	3,3
		MELATONIN	0	12,5	7,3	6,8^{B}	**17,0**	7,4	3,8	5,7
			1			9,5	**15,6^{B}**	5,0	11,3	4,5
	SEKUNDARNO ABNORMALNI SPERMIJI (%)	KONTROLNA	0	2,0	1,2	3,0	1,3	**1,8**	1,6	2,8
			1			3,0	3,3	**3,1**	0,6	2,8
		MELATONIN	0	9,5	7,0	1,4	4,6	**6,8**	3,4	5,2
			1			1,7	6,3	**7,2**	3,0	3,8
	UKUPNO ABNORMALNI SPERMIJI (%)	KONTROLNA	0	12,8	6,4	16,3	**11,0**	8,1	6,1	7,9
			1			9,6	**8,3**	9,4	5,0	5,6
		MELATONIN	0	20,5	14,9	8,7	**21,3**	15,4	6,9	9,6
			1			11,4	**21,6**	13,4	7,7	7,1

^{AB} različite slovne oznake – statistički značajna razlika ($p<0,05$) između kontrolne i pokusne skupine jarčeva unutar iste podskupine (dodani vitamini ili bez dodanih vitamina C i E) u određenom periodu pokusa.

Podebljane vrijednosti ukazuju na ukupno statistički značajnu razliku ($p<0,05$) između kontrolne i pokusne skupine jarčeva (bez obzira na vitamine) u određenom periodu pokusa.

5.3.5. ODNOSI IZMEĐU ANTIKSIDACIJSKIH POKAZATELJA I POKAZATELJA KVALITETE EJAKULATA NAKON OTAPANJA

U tablici 7. prikazani su različiti međusobni odnosi antioksidativnih pokazatelja u sjemenoj plazmi i spermijima s pokazateljima kvalitete smrznutog ejakulata analiziranog nakon otapanja. U obzir su uzeti odnosi gdje je koeficijent korelacije (r) iznosio => 0,35. Nađene su određene korelacije antioksidativnih pokazatelja sjemene plazme i spermija jarčeva s pokazateljima kvalitete sjemena nakon otapanja.

Tablica 7. Odnosi između antioksidativnih pokazatelja u sjemenoj plazmi i spermijima te pokazateljima kvalitete smrznutog/odmrznutog ejakulata u jarčeva alpske pasmine.

		SJEMENA PLAZMA	SPERMIJI							KOMPJUTERSKI POTPOMOGNUTA ANALIZA										PROTOČNA CITOMETRIJA				CITOLOŠKA MORFOLOGIJA
		SJEMENA PLAZMA	KATALAZA	GR	SOD	GSH-Px	GSH-Px/ SOD	KATALAZA/ SOD	GR/ GSH-Px	POKRETLJIVOST	PROGRESIVNA POKRETLJIVOST	VCL	VSL	VAP	ALH	LIN	STR	WOB	BCF	OŠTEĆENE PLAZMINE MEMBRANE	OŠTEĆENE KROMATINA	OŠTEĆENI DEPOLARIZACIJA MITOHONDRIJA	OŠTEĆENE AKROSOME	UKUPNO ABNORMALNI SPERMIJI
SJEMENA PLAZMA	MDA		KATALAZA							POKRETLJIVOST										OŠTEĆENE PLAZMINE MEMBRANE	OŠTEĆENE KROMATINA	OŠTEĆENI DEPOLARIZACIJA MITOHONDRIJA	OŠTEĆENE AKROSOME	UKUPNO ABNORMALNI SPERMIJI
	MDA	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	0,35 P<0,05	n.s	0,46 P<0,001	0,35 P<0,05	0,43 P<0,01	0,36 P<0,01	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	-0,37 P<0,01	n.s.	-0,49 P<0,001	0,41 P<0,01
SPERMIJI	KATALAZA	n.s.		0,65 P<0,0001	0,89 P<0,0001	n.s.	-0,61 P<0,0001	n.s.	0,97 P<0,0001	-0,38 P<0,05	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	0,48 P<0,001	0,47 P<0,01	-0,60 P<0,0001	0,37 P<0,05
	GR	n.s.	0,65 P<0,0001		0,71 P<0,0001	n.s.	-0,53 P<0,0001	n.s.	-0,51 P<0,0001	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	0,37 P<0,05	-0,37 P<0,05	n.s.	n.s.
	SOD	n.s.	0,89 P<0,0001	0,71 P<0,0001		n.s.	-0,71 P<0,0001	n.s.	0,97 P<0,0001	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	GSH-Px	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.		-0,53 P<0,0001	n.s.	-0,51 P<0,0001	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	GSH-Px/SOD	n.s.	-0,61 P<0,0001	-0,53 P<0,0001	-0,71 P<0,0001	-0,53 P<0,0001		0,73 P<0,0001	-0,68 P<0,0001	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	KATALAZA/SOD	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	0,73 P<0,0001		-0,68 P<0,0001	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	GR/GSH-Px	n.s.	n.s.	0,97 P<0,0001	n.s.	-0,51 P<0,0001	-0,68 P<0,0001	-0,68 P<0,0001		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
KOMPJUTERSKI POTPOMOGNUTA ANALIZA	POKRETLJIVOST	0,35 P<0,05	-0,38 P<0,05	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.		0,89 P<0,0001	0,62 P<0,0001	0,53 P<0,0001	0,54 P<0,0001	0,50 P<0,0001	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	-0,63 P<0,0001	-0,55 P<0,0001	-0,47 P<0,0001	-0,37 P<0,0001	-0,39 P<0,001
	PROGRESIVNA POKRETLJIVOST	n.s	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	0,89 P<0,0001		0,50 P<0,0001	0,58 P<0,0001	0,49 P<0,0001	0,35 P<0,001	0,50 P<0,0001	0,51 P<0,0001	0,38 P<0,001	0,35 P<0,001	-0,55 P<0,0001	-0,45 P<0,0001	-0,45 P<0,0001	-0,37 P<0,0001	-0,43 P<0,0001
	VCL	0,46 P<0,001	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	0,62 P<0,0001	0,50 P<0,0001		0,87 P<0,0001	0,93 P<0,0001	0,65 P<0,0001	0,49 P<0,0001	0,41 P<0,0001	0,89 P<0,0001	0,64 P<0,0001	-0,47 P<0,0001	-0,47 P<0,0001	-0,38 P<0,0001	-0,37 P<0,0001	-0,41 P<0,0001
	VSL	0,35 P<0,05	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	0,53 P<0,0001	0,58 P<0,0001	0,87 P<0,0001		0,96 P<0,0001	0,85 P<0,0001	0,84 P<0,0001	0,71 P<0,0001	0,41 P<0,0001	0,89 P<0,0001	-0,37 P<0,0001	-0,37 P<0,0001	-0,37 P<0,0001	-0,37 P<0,0001	-0,43 P<0,0001
	VAP	0,43 P<0,01	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	0,54 P<0,0001	0,49 P<0,0001	0,93 P<0,0001	0,96 P<0,0001		0,65 P<0,0001	0,49 P<0,0001	0,42 P<0,0001	n.s.	0,86 P<0,0001	-0,38 P<0,0001	-0,38 P<0,0001	-0,38 P<0,0001	-0,37 P<0,0001	-0,41 P<0,0001
	ALH	0,36 P<0,01	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	0,50 P<0,0001	0,35 P<0,001	0,65 P<0,0001	0,85 P<0,0001	0,65 P<0,0001		0,71 P<0,0001	0,42 P<0,0001	n.s.	0,86 P<0,0001	-0,37 P<0,0001	-0,37 P<0,0001	-0,37 P<0,0001	-0,37 P<0,0001	-0,38 P<0,0001
	LIN	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	0,50 P<0,0001	0,49 P<0,0001	0,84 P<0,0001	0,49 P<0,0001	0,71 P<0,0001		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	STR	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	0,51 P<0,0001	n.s.	0,41 P<0,0001	n.s.	0,42 P<0,0001	n.s.		0,91 P<0,0001	0,72 P<0,0001	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	WOB	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	0,38 P<0,0001	0,64 P<0,0001	0,89 P<0,0001	0,86 P<0,0001	n.s.	n.s.	0,91 P<0,0001		0,39 P<0,0001	-0,36 P<0,0001	-0,36 P<0,0001	-0,36 P<0,0001	-0,37 P<0,0001	-0,37 P<0,0001
	BCF	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	0,35 P<0,001	-0,47 P<0,0001	-0,37 P<0,0001	-0,38 P<0,0001	-0,37 P<0,0001	n.s.	0,72 P<0,0001	0,39 P<0,0001		0,37 P<0,0001	0,41 P<0,0001	0,35 P<0,001	n.s.	0,35 P<0,001
PROTOČNA CITOMETRIJA	OŠTEĆENE PLAZMINE MEMBRANE	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	-0,63 P<0,0001	-0,55 P<0,0001	-0,47 P<0,0001	-0,37 P<0,0001	-0,38 P<0,0001	-0,37 P<0,0001	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.		0,41 P<0,0001	0,36 P<0,001	n.s.	0,41 P<0,0001
	OŠTEĆENE KROMATINA	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	-0,55 P<0,0001	-0,45 P<0,0001	-0,47 P<0,0001	-0,37 P<0,0001	-0,38 P<0,0001	-0,37 P<0,0001	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	0,41 P<0,0001		0,36 P<0,001	n.s.	0,35 P<0,001
	OŠTEĆENI DEPOLARIZACIJA MITOHONDRIJA	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	-0,49 P<0,0001	-0,45 P<0,0001	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	0,36 P<0,001	0,36 P<0,001		0,38 P<0,0001	n.s.
	OŠTEĆENE AKROSOME	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	0,38 P<0,0001	n.s.
CITOLOŠKA MORFOLOGIJA	UKUPNO ABNORMALNI SPERMIJI	n.s.	0,41 P<0,01	0,37 P<0,05	0,37 P<0,05	n.s.	n.s.	-0,40 P<0,01	n.s.	0,35 P<0,05	n.s	0,46 P<0,001	0,35 P<0,05	0,43 P<0,01	0,36 P<0,01	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	-0,63 P<0,0001	-0,55 P<0,0001	-0,49 P<0,0001	-0,52 P<0,001	0,41 P<0,01

GR – Glutation reduktaza; MDA – Malondialdehid; SOD – Superoskid dismutaza; GSH-Px – Glutation peroksidaza; VCL- krivolinijska brzina; VSL- pravolinijska brzina; VAP- prosječma brzina; ALH-amplituda lateralnog otklona glave u odnosu na prosječnu putanju; LIN-indeks linearnosti; WOB- indeks oscilacije; STR- pravolinijski indeks; BCF-frekvencija prelaska pravolinijske putanje u sekundi

n.s. – nema statističke značajnosti

6. RASPRAVA

Slobodni radikali su atomi ili molekule koje posjeduju u vanjskoj ljusci elektronskog omotača jedan ili više nesparenih elektrona što ih u biološkom smislu čini izuzetno nestabilnim i reaktivnim. Jedan od najznačajnijih biološki aktivnih radikala su reaktivni kisikovi spojevi (ROS). Jedan od glavnih uzroka pada pokretljivosti i čimbenika plodnosti spermija tijekom procesa smrzavanja i odmrzavanja su oksidativna oštećenja spermija koja nastaju kao posljedica negativnih djelovanja prekomjerne količine ROS-a, koje generiraju same stanične komponente sjemena, abnormalni spermatozoi i neutrofili. Tijekom procesa krioprezervacije sjemena, spermatozoidi se podvrgavaju kemijskom/toksičnom, osmotskom, toplinskim, mehaničkim i oksidacijskom stresu koji prevladavaju prilikom dodavanja razrjeđivača, hlađenja, ekvilibracije, zamrzavanja i odmrzavanja ejakulata (GRIVEAU i LE LANNOU, 1997.). Antioksidativna zaštita spermija započinje spermiogenezom te se nastavlja u epididimisu tijekom sazrijevanja. U procesu spermiogeneze dolazi do redukcije citoplazme u spermijima pa je i količina antioksidativnih enzima reducirana u spermijima, ali to je kompenzirano onima prisutnim u sjemenoj plazmi (MAYORGA i sur., 2015.).

Protutežu ROS-u u organizmu čine antioksidansi koji su prisutni u sjemenoj plazmi. Nesrazmjer produkcije slobodnih radikala i antioksidativne obrane organizma naziva se oksidativni stres što može dovesti do oštećenja stanica i posljedično neplodnosti. Antioksidativni mehanizmi su podijeljeni u tri razine obrane organizma. Prvi razinu čine antioksidativni mehanizmi kao što su glutation-peroksidaza (GSH-Px), katalaza (CAT), superoksid dismutaza (SOD) i dr. Druga razina uključuje neenzimatske mehanizme poput vitamina topljivih u mastima i vodi ili tripeptida poput glutation-a (GSH), a treću razinu uključuje lipaze, peptidaze, proteaze i treansferaze koje sudjeluju u popravku prouzročenih oštećenja staničnih organela (SURAI, 2002.).

Melatonin (5-methoxy N-acetyltryptamine) je hormon kojega za vrijeme noćnih sati luči endokrina žlijezda u mozgu-epifiza. Osim što u ovaca i koza kao sezonski poliestričnih životinja, sudjeluje u regulaciji spolnog ciklusa otkriveno je da melatonin izravno sudjeluje u provođenju biološki aktivnih oblika slobodnih radikala u neaktivne oblike, a neizravno u stimuliranju funkcija antioksidativnih enzima (REITER i sur., 2000.). Receptori za melatonin nađeni su u blizini hipotalamasa, adenohipofize ali i u Leydig-ovim stanicama testisa što znači da bi melatonin mogao imati direktan utjecaj na testise

(RAMADAN i sur., 2009.). Isto tako, učinci melatonina na kakvoću sperme mogu biti izravni, budući da postoje mjesta vezanja melatonina u spermijima (GONZALEZ-ARTO i sur., 2014.).

Lipidna peroksidacija jedan je od glavnih uzroka oštećenja spermija malih preživača prilikom procesa dubokog smrzavanja, a melatonin utječe na redukciju lipidne peroksidacije i očuvanje integriteta staničnih membrani spermija (SILVA i sur., 2011.). Dodatak s antioksidansima može smanjiti utjecaj oksidacijskog stresa izazvanog ROS-om općenito tijekom pohrane spermija (MICHAEL i sur., 2009.).

Glavni cilj ovog istraživanja bio je ustanoviti utjecaj egzogenog melatonina na antioksidativnu zaštitu ejakulata jarčeva izvan rasplodne sezone praćenjem antioksidativne enzimske aktivnosti te putem različitih pokazatelja kvalitete ejakulata prije i poslije dubokog smrzavanja.

6.1. UTJECAJ MELATONINA NA POKAZATELJE KVALITETE EJAKULATA PRIJE PROCESA ZAMRZAVANJA

Imlpantati melatonina se naveliko koriste u kontroli reprodukcije malih preživača više od 30 godina. Prethodne studije o aplikaciji melatonina u malih preživača izvan sezone parenja pokazale su različitost u dobivenim rezultatima. Uglavnom bi melatonin imao pozitivan utjecaj na kvalitetu ejakulata ili samo malo poboljšanje nekih karakteristika ejakulata (BUFFONI i sur., 2015.; FAZLI-NEZAD i sur., 2016.; KAYA i sur., 2000.; RAMADAN i sur., 2009.). FATOBA i ADELOYE (2013.) su u svom istraživanju imali pozitivan učinak egzogenog melatonina za vrijeme rasplodne sezone na sve karakteristike jarčevog ejakulata poput pokretljivosti spermija, masovne pokretljivosti spermija, koncentracije spermija u ejakulatu, udjela živih i morfološki normalnih spermija u ejakulatu uz pad udjela nezrelih, abnormalnih i mrtvih spermija. RAMADAN i sur. (2009.) su u svom istraživanju za vrijeme rasplodne sezone imali slične pozitivne rezultate, ali su u pokusu prije aplikacije melatonina koristili svjetlosni režim. Ipak, u istom istraživanju efekt svjetlosnog režima i melatonina izvan rasplodne sezone pozitivno je utjecao samo na neke reproduktivne karakteristike jarca poput boljeg libida i poboljšao neke pokazatelje kvalitete sjemena poput ukupnog funkcionalnog broja spermija i ukupnog broja živih spermija. Rezultati ovog doktorata pokazuju sličnosti s prethodno navedenim radom

budući da je egzogeni melatonin poboljšao samo određene parametre kvalitete ejakulata izvan rasplodne sezone poput gibljivosti, masovne gibljivosti i broja živih spermija i to odmah nakon aplikacije melatonina u trećem i četvrtom periodu dok kasnije nije bilo razlike između kontrolne i pokusne skupine jarčeva. CASAO i sur. (2010.) su u svom istraživanju proučavali pokretljivost i različite brzinske parametre spermija nakon implantata melatonina u ovnova te su objavili veću progresivnu gibljivost spermija u pokusnoj skupini, ali tek od 46 do 75 dana nakon aplikacije melatonina što se ne podudara s rezultatima u ovom istraživanju. Dokazano je da djelovanje melatonina počinje već 2-3 tjedna od aplikacije u vidu veće mase testisa (CHEMINAU i sur., 1992.). CASAO i sur. (2013.) su izmjerili veću koncentraciju melatonina u sjemenoj plazmi tjedan dana i testosterona 4 tjedna od aplikacije melatonina ovnovima. To bi moglo objasniti zašto je pokretljivost u ovom istraživanju bila bolja u pokusnoj skupini već 1-2 tjedna nakon aplikacije melatonina budući da melatonin osim indirektnog djelovanja može djelovati i direktno u očuvanju membrane spermija, a s time i na veći udio pokretljivih spermija. U ovom istraživanju ejakulat se počeo polučivati već mjesec dana (2 perioda) prije aplikacije melatonina što znači da su jarčevi već bili pobuđeni (vjerojatno je i porast testosterona bio ranije) prije aplikacije melatonina te je možda zato melatonin imao tako brzi učinak ne neke parametre kvalitete ejakulata. Iako je u prethodnim istraživanjima utvrđen pozitivan utjecaj melatonina na libido jarčeva, u ovom istraživanju nije bilo statistički značajne razlike iako je libido bio veći u pokusnoj skupini jarčeva cijeli period nakon aplikacije melatonina. Libido bi vjerojatno bio statistčki značajno veći u pokusnoj skupini jarčeva da je melatonin apliciran odmah na početku (prije prvog perioda) dok se jarčevima još nije uzimao ejakulat i dok nisu bili pobuđeni ženkama u estrusu. Naime, poznato je da se libido jarčeva može poboljšati dovođenjem ženki u estrusu koje su korištene kao fantom za uzimanje ejakulata, a zbog pokusnog dizajna ženke su korištene i prije pokusa (radi probe i navikavanja na uzimanje ejakulta) te dva perioda prije aplikacije melatonina što je vjerojatno svim jarčevima poboljšalo libido. Isto tako svrha ovog istraživanja nije bilo istražiti utjecaj svjetlosnog režima koje je korišteno u istraživanju RAMADAN-A i sur. (2009.) te bi se zbog toga utjecaj melatonina na libido jarčeva trebao dodatno istražiti. Melatonin u ovom istraživanju nije imao utjecaja na ostale testirane pokazatelje poput volumena ejakulata, koncentracije spermija (ukupni broj spermija i ukupni funkcionalni broj spermija) što nije u skladu s rezultatima dobivenim od ZARAZAG i sur. (2010.) koji su objavili poboljšanje ovih pokazatelja u Mediteranskih jarčeva nakon aplikacije

melatonina. Kao i kod prethodno navedenih istraživanja ove razlike u dobivenim poboljšanjima određenih pokazatelja kod Mediteranskih jarčeva mogu biti pripisane prvenstveno različitim pokusnim dizajnom koji je uključivao i svjetlosni režim (tretman dugim danima) prije aplikacije melatonina te razlikama u klimatskoj zoni i pasmini jarčeva. KAYA i sur. (2000.) u svom istraživanju u ovnova nisu dobili razlike u volumenu, koncentraciji i udjelu abnormalnih spermija između kontrolne i melatoninske skupine što je u skladu s ovim istraživanjem. Iako se udio patoloških oblika spermija nije značajno razlikovao između skupina, primijećeno je kako se kroz pokusni period udio takvih spermija (ponajviše patoloških oblika repa spermija) smanjivao u obje skupine, a pogotovo u pokusnoj skupini jarčeva gdje je utvrđena statistički značajna razlika između prvog i šestog perioda pokusa. Istovremeno s padom udjela patoloških oblika spermija povećavao se udio živih spermija kroz period pokusa u obje skupine slično kao u istraživanju RAMADAN i sur. (2009.). Takvi rezultati mogu se objasniti opće poznatom činjenicom da je kvaliteta ejakulata nakon duljeg perioda neejakuliranja znatno lošija te da se postupno korištenjem jarčeva u reprodukciji ta kvaliteta poboljšava. Možda to objašnjava zašto su gibljivost i udio živih spermija u pokusnoj skupini jarčeva bili značajno bolji samo u trećem i četvrtom periodu dok su se kasnije u petom i šestom periodu ti pokazatelji poboljšali i u kontrolne skupine jarčeva pa nije bilo razlike između skupina.

Spermiji sadržavaju veći udio nezasićenih masnih kiselina koje su osjetljive na lipidnu peroksidaciju što može prouzročiti oštećenja membrane posebno u dijelu akrosome spermija te posljedično dovesti do smanjenog udijela živih spermija i smanjene gibljivosti (AGARWAL i sur., 2014.). Dokazano je antioksidativno djelovanje melatonina na stanice spermija koje utječe i na smanjenje lipidne peroksidacije spermija (GAVELLA i LIPOVAC, 2000.). Isto tako, poznato je da melatonin štiti mitohondrije stanica spermija od oštećenja uzrokovanih reaktivnim kisikovim spojevima putem antioksidativnih mehanizama zaštite (CASAO i sur., 2013.). Takvo zaštitno antioksidativno djelovanje melatonina je najvjerojatnije razlog zašto je pokusna skupina jarčeva u ovom istraživanju imala bolje rezultate pokretljivosti i udjela živih spermija odmah nakon aplikacije melatonina. Razlike u učinkovitosti melatonina na kvalitetu sjemena u jarčeva za vrijeme i izvan rasplodne sezone objašnjeno je sezonskom i mjesečnom varijacijom u koncentraciji melatonina. SHEIKHELDIN i sur. (1992.) su objavili da je koncentracija melatonina krajem ljeta i u jesen (rasplodna sezona) signifikantno veća nego u zimi i proljeću (period izvan rasplodne sezone). Aplikacija egzogenog melatonina jarčevima za vrijeme rasplodne

sezone, kada endogeni melatonin doseže svoju maksimalnu koncentraciju, očito je dodatni efekt koji rezultira dodatnim poboljšanjem kvalitete sjemena za razliku od perioda izvan rasplodne sezone kada endogeni melatonin doseže najniže koncentracije. Rezultati ovog istraživanja potvrđuju da se aplikacijom egzogenog melatonina izvan rasplodne sezone značajno poboljša kvaliteta ejakulata gledano kroz gibljivost, masovnu gibljivost i udio živih spermija odmah nakon aplikacije u trajanju od 2-4 tjedna. Rezultati dobiveni u ovom istraživanju imaju i praktičnu primjenu. Prvo, sjeme dobiveno od jarčeva tretiranih melatoninom može se koristiti za umjetno osjemenjivanje te se tako produžuje dostupnost seksualno aktivnih jarčeva tijekom cijele godine i drugo, tretirani jarčevi se mogu koristiti za stimuliranje ženki efektom mužjaka nakon odvajanja i ponovnog uvođenja u stado izvan rasplodne sezone.

6.2. UTJECAJ MELATONINA NA ANTIOKSIDACIJSKI SUSTAV U SJEMENOJ PLAZMI I SPERMIJIMA

Prema našem saznanju u dostupnoj literaturi nema podataka/istraživanja u kojima je istraživan učinak melatonina na antioksidacijsku zaštitu sjemena jarčeva u rasplodnoj sezoni kao ni izvan nje. Nadalje, po prvi puta su određivani antioksidacijski enzimi (SOD; CAT; GSH-PX i GR) i MDA u spermijima malih preživača, a koncentracija MDA je po prvi puta određena u sjemenoj plazmi malih preživača. Prema tome, do sada ni učinak egzogenog melatonina na aktivnosti navedenih antioksidacijskih enzima i koncentraciju MDA u sjemenoj plazmi i spermijima jarčeva izvan rasplodne sezone nije poznata. Shodno tome, rasprava ovog istraživanja temeljit će se na usporedbi rezultata dobivenih od skupine autora koji su istraživali učinak melatonina na koncentraciju testosterona, aktivnost antioksidacijskih enzima u sjemenoj plazmi ovnova izvan rasplodne sezone te povezanost koncentracije melatonina s aktivnosti antioksidacijskih enzima u sjemenoj plazmi ovnova u rasplodnoj sezoni kao i izvan nje (CASAO i sur., 2010., CASAO i sur., 2013.). Prije svega, značajno je naglasiti da nije utvrđena značajna razlika između istraživanih skupina jarčeva u aktivnosti antioksidacijskih enzima u sjemenoj plazmi prije umetanja implantata melatonina, što je bilo slučaj i sa istraživanjem koje su sproveli CASAO i sur. (2013.). Navedeni autori također nisu ustvrdili značajnu razliku između istraživanih skupina ovnova u aktivnosti antioksidacijskih enzima u sjemenoj plazmi prije umetanja implantata

melatonina. Što se tiče aktivnosti antioksidacijskog enzima u sjemenoj plazma istraživanih jarčeva, u ovom istraživanju značajne razlike u aktivnostima između pokusne i melatoninske skupine, ustvrđene su samo u dva enzima i to GR i GSH-Px, što je sukladno rezultatima istraživanja u ovnova kojeg su proveli CASAO i sur. (2013.). No, u ovom istraživanju aktivnost GR bila je značajno veća u svim periodima istraživanja u kontrolnoj skupini, a u navedenih autora aktivnost GR bila je značajno veća u melatoninskoj skupini jarčeva, ali tek nakon 9. do 14. tjedna nakon aplikacije melatonina. U ovom istraživanju je istraživan učinak melatonina samo 8 tjedana nakon umetanja implantata te bi se možda aktivnost GR u sjemenoj plazmi jarčeva melatoninske skupine povećala 9. tjedna i u našem istraživanju. Možda su razlike u rezultatima posljedica korištenja 4 implantata melatonina u ovom istraživanju (72 mg melatonina), dok su CASAO i sur. (2013.) koristili 3 implantata melatonina (54 mg). Aktivnost GSH-Px bila je značajno veća u melatoninskoj skupini u sjemenoj plazmi jarčeva ovog istraživanja te je slično utvrđeno i kod ovnova, ali u različitim periodima istraživanja. Tijekom ovog istraživanja nije ustvrđena značajna razlika u aktivnosti SOD i CAT u sjemenoj plazmi između istraživanih skupina jarčeva tijekom cijelog pokusnog perioda. CASAO i sur. (2013.) također nisu ustvrdili značajne razlike u aktivnostima navedenih enzima u sjemenoj plazmi ovnova tijekom istraživanog perioda (21. tjedan nakon aplikacije melatonina), unatoč njihovim prethodnim rezultatima u kojima su ustvrdili razlike u vrijednostima aktivnosti CAT i SOD u sjemenoj plazmi ovnova u rasplodnoj sezoni i izvan nje (MARTI i sur., 2007.) te korelaciji između koncentracije melatonina u sjemenoj plazmi i aktivnosti CAT i SOD (CASAO i sur., 2010.). Navedeni autori prethodno utvrđene razlike pripisuju dugoročnim učinkom melatonina na aktivnosti SOD i CAT u sjemenoj plazmi ovnova, a koji se ne može inducirati/postići kratkotrajnim porastom koncentracije melatonina, koji je rezultat aplikacije melatoninskih implantata.

U ovom istraživanju utvrđene su značajne razlike u aktivnosti većine istraživanih antioksidacijskog enzima (SOD, GSH-Px i GR) u spermijima između istraživanih skupina jarčeva. Naime, aktivnost navedenih enzima bila je značajno veća u spermijima kontrolne skupine jarčeva i to aktivnost GR (u 3., 4., 5. i 6. periodu istraživanja) i SOD (u 4., 5. i 6. periodu istraživanja), a aktivnost GSH-Px samo u 6. periodu. Aktivnost CAT i koncentracija MDA u spermijima jarčeva nije se značajno razlikovala između skupina. Tako dobivene rezultate ovog istraživanja teško je protumačiti, jer mehanizam djelovanja melatonima u potpunosti nije razjašnjen. Naime, CASAO i sur. (2012.) su dokazali

prisutnost i distribuciju melatoninskih MT1 i MT2 receptora u spermijima ovna, ali biokemijski putevi koje pokreću ti receptori i njihova funkcija u plodnosti nije u potpunosti razjašnjena. Međutim, učinak melatonina na aktivnost antioksidacijskog enzima može uključivati druge putove koji nisu povezani s aktivacijom melatoninskih receptora. Zbog svoje lipofilne prirode, melatonin jednostavno prolazi kroz stanične membrane te može modulirati kalcij-kalmodulin signalni put, izravnim vezanjem za kalmodulin (BENITEZ-KING i sur., 1993.) i regulirati ekspresiju gena antioksidacijskih enzima preko nuklearnih receptora (PABLOS i sur., 1997.). Prema nekim dobivenim korelacijama u ovom istraživanju, a pogotovo pozitivnom korelacijom aktivnosti antioksidacijskih enzima SOD i GR u spermijima s oštećenjem kromatina mogla bi se djelomično protumačiti veća razina antiosidativnih enzima u spermijima kontrolne skupine. Naime, pretpostavljamo da je kontrolna skupina jarčeva imala veću količinu stvorenih ROS-a u spermijima pa su aktivnosti SOD, GR i GSH-Px (samo u 6. periodu istraživanja) bile značajno povećane kao odgovor na veće količine generiranih ROS-a. Budući da je jezgra spermija okružena citoplazmom u kojoj su antioksidativni enzimi može se pretpostaviti da je pokusna skupina imala manje antioksidativnih enzima u spermijima zbog slabije izloženosti kromatina djelovanju ROS-a, a što se može dovesti u vezu s poželjnim djelovanjem melatonina na spermije.

Tijekom oksidacijskih metaboličkih procesa u stanici nastaju potencijalno štetni ROS. Reaktivne kisikove spojeve neutraliziraju antioksidacijski enzimi. Naime, prvu liniju obrane čini SOD, enzim koji superoksidne radikale ($\cdot O^{2-}$) pretvara u H_2O_2. Nakon toga CAT i GSH-Px neovisno jedna o drugoj pretvaraju vodikov peroksid u vodu. Dok je CAT odgovorna za njegovu izravnu razgradnju na H_2O i O_2, uklanjanje H_2O_2 putem GSH-PX-a ovisi o oksidaciji reduciranog oblika glutation (GSH) u oksidirani oblika glutationa (GSSG), kojeg GR reducira natrag u GSH, koji djeluje antioksidativno i također je uključen u aktivnost GSH-Px-a. Štoviše, GSH-Px je također odgovoran za uklanjanje organskih peroksida, za razliku od CAT (TORRES i sur., 2011.). Stoga su antioksidativni enzimi ključni za održavanje oksidansa unutar fizioloških razina, a njihove funkcije međusobno su ovisne/povezane. Neravnoteža antioksidativnih enzima može uzrokovati nakupljanje ROS-a i RNS-a koji dovode do oštećenja stanica. Primjerice, neravnoteža u omjeru SOD prema GSH-Px i CAT rezultira nakupljanjem H_2O_2 koji može sudjelovati u Fentonovoj reakciji, što rezultira stvaranjem štetnih hidroksilnih radikala. Hidroksilni

radikali su vrlo reaktivni ROS i uzrokuju oštećenje makromolekula kao što su DNK, bjelančevine i lipidi (DE HAAN i sur., 1995., TORRES i sur., 2011.).

Različiti su autori predložili da se omjeri aktivnosti antioksidativnih enzima mogu smatrati pokazateljima oksidativnog stresa i mogu dati uvid u adaptaciju i status sustava antioksidacijskih enzima (SOMANI i sur., 1997., OJEDA i sur., 2009.). Nadalje, pojedini autori smatraju da bismo trebali uzeti u obzir vrijednosti omjera između samih antioksidativnih enzima, češće nego li njihove pojedinačne specifične aktivnosti, kako bismo bolje procijenili koliko se, odnosno da li se organizam može zaštititi od oštećenja prouzročenih oksidativnim stresom (AMICARELLI i sur., 1999., AVANZO i sur., 2001.). Tako je u ovom istraživanju osim pojedinačnih vrijednosti antioksidativnih enzima određen i njihov međusobni omjer. Odnos CAT/SOD je od velike važnosti jer može ukazati na sposobnost tkiva da se nosi s oksidativnim stresom. S druge strane, omjer GR/GSH-Px predstavlja učinkovitost pretvorbe GSSG u GSH (SOMANI i HUSAIN, 1997.; OJEDA i sur., 2009.) te se koristi u boljoj procijeni ciklusa glutationa (TORRES i sur., 2011.). Navedeni autori navode da promjene u omjerima antioksidacijskih enzima odnosno povećanje omjera CAT/SOD i GR/GSH-Px u jetri mladunčadi štakora ukazuju na činjenicu da enzimi ne uklanjaju učinkovito ROS, potvrđujući oksidacijsko oštećenje (OJEDA i sur., 2009.). Prema tumačenju navedenih autora dobiveni rezultati ovog istraživanja ukazuju da je egzogeni melatonin imao povoljan učinak na omjer GR/GSH-Px antioksidacijskih enzima u pojedinim pokusnim periodima. Naime, značajno povoljniji/niži omjer GR/GSH-Px imala je melatoninska skupina jarčeva u sjemenoj plazmi (u 5. pokusnom periodu), odnosno u spermijima (u 6. pokusnom periodu) u odnosu na kontrolnu skupinu jarčeva. Međutim, u ovom istraživanju utvrđen je značajno veći omjer antioksidacijskih enzima CAT/SOD i to u spermijima i u sjemenoj plazmi pokusne/melatoninske skupine jarčeva u odnosu na kontrolnu (u 6. pokusnom periodu). Identični rezultati utvrđeni su i u omjeru GSH-Px/SOD, odnosno zabilježen je značajno veći omjer navedenih enzima u melatoninskoj skupini jarčeva i spermijima i u sjemenoj plazmi (također u 6. pokusnom periodu). Prema OJEDA i sur. (2009.), veći omjer CAT/SOD nije povoljan te egzogeni melatonin nema povoljan učinak na navedeni omjer. Dok, AMICARELLI i sur. (1999.) te AVANZO i sur. (2001.) navode da povećanje omjera CAT/SOD i GSH-Px/SOD, može ukazivati na aktivaciju obrane antioksidacijskih enzima protiv štetnih učinka ROS-a, dok bi smanjenje jednog ili oba omjera ukazivalo na smanjenu učinkovitost vezanja ROS-a što može prouzročiti oksidativna oštećenja. Prema

navodima prethodno spomenutih autora egzogeni melatonin u ovom istraživanju imao je povoljni učinak na CAT/SOD i GSH-Px/SOD omjere u spermijima i sjemenoj plazmi jarčeva što ukazuje da utječe na podizanje antioksidativne enzimske zaštite protiv štetnih učinaka ROS-a. Nadalje AMICARELLI i sur. (1999.) te AVANZO i sur. (2001.) navode da povećanje GR/GSH-Px omjera ukazuje na to da će sustav moći zadržati visoke razine GSH i osigurati zaštitu stanica; kada se taj omjer smanji, stanica možda neće proizvesti dovoljno GSH da bi se oslobodila organskih i anorganskih peroksida ili ROS-a. Slično navode PESCE i sur. (2014.), te smatraju da niži omjer SOD/CAT (odnosno viši omjer CAT/SOD) i GR/GSH-Px ukazuju na veću učinkovitost u antioksidacijskom odgovoru. Navedene se reakcije također javljaju tijekom staničnog metabolizma. Kada se razina aktivnosti SOD poveća u stanici bez proporcionalnog povećanja aktivnosti peroksidaza, stanica se suočava s izazovom preopterećenja peroksida. Peroksid može reagirati s prijelaznim metalima i generirati hidroksilni radikal koji je najštetnija vrsta reaktivnog kisika (SPERANZA i sur., 2008.; PESCE i sur., 2014.). Naime, prema tumačenju ovih autora rezultati ovog istraživanja ukazuju na to da je melatonin pozitivno utjecao na razinu omjera CAT/SOD, a negativno na razinu omjera GR/GSH-Px u spermijima i sjemenoj plazmi jarčeva. Prema našem saznanju u dostupnoj literaturi nema podataka/istraživanja u kojima su određivani omjeri antioksidacijskih enzima u sjemenu muškaraca i/ili mužjaka bilo koje vrste stoga je tumačenje dobivenih omjera otežano. Dostupni podatci o spomenutim omjerima određeni su u tkivima različitih organa i različitih vrsta životinja te ljudi sa drugačijim dizajnom pokusa, što zapravo i nije usporedivo sa rezultatima dobivenim u ovom istraživanju. Prema dobivenim rezultatima ovog istraživanja egzogeni melatonin imao je utjecaj na omjere antioksidacijskih enzima, napose u 5. i 6. pokusnom periodu i u spermijima i u sjemenoj plazmi jarčeva, no nužna su daljina istraživanja kako bi mogli pravilno tumačiti njegov učinak na sjeme tretiranih jarčeva.

6.3. ANTIOKSIDANSI I POKAZATELJI KVALITETE EJAKULATA NAKON PROCESA SMRZAVANJA/ODMRZAVANJA

Procesi smrzavanja i odmrzavanja ejakulata štete membrani spermija, ali i ostalim strukturama spermija poput akrosome i mitohondrija što dovodi do pada preživljavanja, pokretljivosti spermija i njihove sposobnosti oplodnje (MEYERS, 2005.; PENA i sur.,

2009.). Glavni razlog za smanjeno preživljavanje spermija nakon procesa smrzavanja/odmrzavanja je oštećenje membrane spermija uzrokovano lipidnom peroksidacijom zbog povećanih razina reaktivnih kisikovih spojeva (LOPES i sur., 1998.). Plazmina membrana spermija u malih preživača sadrži dosta nezasićenih masnih kiselina koje su podložne lipidnoj peroksidaciji i to je najvažniji razlog oštećenja membrane posebno u dijelu akrosome (LEWIS i sur., 1997.; AGARWAL i sur., 2014.). Gubitku antioksidativne sposobnosti ejakulata mogu doprinijeti i promjene u razini antioksidativnih enzima (MEYERS, 2012.).

Više puta spomenuto antioksidativno djelovanje melatonina trebalo bi biti najefikasnije upravo prilikom procesa smrzavanja i odmrzavanja kada su spermiji podvrgnuti kemijskom/toksičnom, osmotskom, toplinskom, mehaničkom i oksidacijskom stresu (GRIVEAU i LE LANNOU, 1997.). Uloga melatonina u očuvanju spermija osim na antioksidativnim svojstvima temelji se i na antiapoptotičkim svojstvima što može poboljšati ili zadržati kvalitetu ejakulata (BEJARANO i sur., 2014.; REITER i sur., 2007.). U nekim istraživanjima koja su koristila implantate melatonina u ovnova, kvaliteta ejakulata nakon procesa smrzavanja je bila bolja upravo zbog antioksidativnih svojstava i zaštitnog učinka protiv oksidativnog oštećenja (KAYA i sur., 2001.; ASHRAFI i sur., 2011.). U istraživanju KAYA-e i sur. (2001.) ejakulat ovnova kojima je apliciran melatonin izvan rasplodne sezone imao je veći postotak živih spermija i živih spermija s intaktnom akrosomom nakon odmrzavanja. Isti autori su ustanovili da je ejakulat ovnova s primljenim melatoninom imao smanjeni udio enzima aspartat amino-transferaze (AAT) nakon otapanja što dovode u vezu sa smanjenim propuštanjem spomenutog enzima kroz membranu spermija tj. da je membrana spermija bila bolje očuvana tijekom procesa krioprezervacije. Slično kao i kod KAYA i sur. (2001.), u ovom istraživanju je isto zabilježen veći ukupni udio živih spermija te živih spermija s intaktnom akrosomom nakon otapanja u pokusnoj skupini jarčeva. Gledajući rezultate kroz periode statistički značajna razlika u udjelu živih spermija bila je u 3. periodu tj. odmah nakon aplikacije implantata melatonina slično kao i kod svježeg ejakulata gdje je značajniji porast živih spermija bio u 3. ali i u 4. periodu. Osim u udjelu živih spermija u ovom istraživanju zabilježen je i veći postotak pokretljivih i progresivno pokretljivih spermija nakon otapanja u ejakulatu polučenom u 3. periodu tj .odmah nakon aplikacije melatonina. Ti rezultati nisu u skladu s istraživanjima GALLEGO-CALVO i sur. (2015). koji nisu dobili nikakvo poboljšanje pokretljivosti spermija nakon otapanja sjemena u jarčeva tretiranih melatoninom. Rezultati

ovog istraživanja su donekle u skladu s rezultatima CASAO i sur. (2010.) koji su imali veći udio progresivno pokretljivih spermija u svježem ejakulatu ovnova tretiranih melatoninom izvan sezone parenja. Donekle zato što su potonji autori imali taj porast tek od 46 do 75 dana nakon aplikacije melatonina, a ne odmah kao u ovom istraživanju kod svježeg i odmrznutog ejakulata. Razlog zašto se rezultati ovog istraživanje razlikuju od rezultata GALLEGO-CALVO i sur. (2015.) je vjerojatno zbog drugačijeg eksperimentalnog dizajna jer su navedeni autori koristili iste jarčeve kojima su dali melatonin ili su im skratili svjetlosne dane na 2 mjeseca, zatim su ti isti jarčevi bili na dugim svjetlosnim danima 2 mjeseca te im je nakon toga opet apliciran melatonin ili su stavljeni na kratke dane kroz 2 mjeseca. To znači da nisu imali istovremeno pokusnu skupinu s melatoninom ili kratkim danima i kontrolnu skupinu životinja. Isto tako iz njihovog istraživanja nije jasno da li je riječ o istom sjemenu koje je pregledano svježe i poslije smrznuto pa opet pregledano ili su koristili drugo sjeme prilikom krioprezervacije. Možda je to djelomično razlog zašto su navedeni autori imali poboljšanje kvalitete svježeg ejakulata u jarčeva tretiranih melatoninom ili kratkim danima, ali isto to nisu dobili kod odmrznutog ejakulata. Dio odgovora zašto su u ovom istraživanju dobiveni slični rezultati svježeg i odmrznutog ejakulata na određene pokazatelje kvalitete (pokretljivost i udio živih spermija) je to što je riječ upravo o istom sjemenu koje je pregledano svježe te nakon procesa krioprezervacije i odmrzavanja opet detaljnije pregledano pomoću CASA-e i protočne citometrije. Ipak, iz tog razloga ne može se utvrditi da li je ejakulat jarčeva u ovom istraživanju zbilja bio zaštićeniji tijekom procesa smrzavanja/odmrzavanja ili je veća gibljivost i veći udio živih spermija u odmrznutom ejakulatu pokusnih jarčeva bio samo preslika rezultata svježeg ejakulata. Još važniji razlog ove tvrdnje je taj što je u ovom istraživanju izdvojena sjemena plazma prije smrzavanja spermija za potrebe analize antioksidativnih enzima, a s plazmom je izdvojen i melatonin koji bi mogao direktno utjecati na zaštitu sjemena tijekom procesa krioprezervacije. Isto tako, neki od antioksidativnih enzima (indirektni utjecaj melatonina) mjerenih u izdvojenoj sjemenoj plazmi razlikovali su se između skupina tek u zadnjem periodu istraživanja te se ne mogu povezati s boljom kvalitetom sjemena prije i nakon odmrzavanja nađenom u 3. periodu GALLEGO-CALVO i sur. (2015.) spominju da je vjerojatni razlog podjednake kvalitete odmrznutog sjemena jarčeva između skupina taj što su prije smrzavanja isprali spermije od sjemene plazme te da bi možda rezultati bili sličniji kao kod nekih istraživanja u ovnova. CASAO i sur. (2010.) tvrde da je pozitivni učinak melatonina upravo to što štiti

spermatozoide od različitih vrsta nepovoljnih manipulacija sjemenom. I druga istraživanja spominju da oksidacijski stres spermija promoviraju neki procesi krioprezervacije kao centrifugiranje i razrjeđivanje upravo zato jer se uklanjaju ili razrjeđuju antioksidativni spojevi prisutni u sjemenoj plazmi (LI i sur., 2010.; CHEN i sur., 2014.). Važnost antioksidanata u sjemenoj plazmi je i zbog toga što tijekom spermatogeneze dolazi do reduciranja citoplazme u spermijima pa je i količina antioksidativnih enzima ograničena u spermijima, ali se to kompenzira upravo s onima prisutnima u sjemenoj plazmi (MAYORGA i sur., 2015.). Zbog tog razloga u ovom istraživanju se ne može govoriti o protektivnoj ulozi melatonina tijekom procesa smrzavanja budući da je sjemena plazma izdvojena prije procesa smrzavanja, a antioksidansi prisutni u spermijima vjerojatno nisu bili dostatni za bolju zaštitu spermija. Ipak, zanimljivo je da su pozitivni i negativni korelacijski odnosi u ovom istraživanju nađeni upravo između antioksidativnih enzima u spermijima, a ne sjemenoj plazmi, s oštećenjem DNK i oštećenjem akrosome spermija. Tako su katalaza, glutation reduktaza i superoksid dismutaza u spermijima imali negativan korelacijski odnos s oštećenjem akrosome. Dva od tri enzima (GR i SOD) su nađena u značajno manjoj koncentraciji u spermijima pokusne skupine jarčeva što bi s obzirom na korelacijski odnos značilo da su ejakulati u pokusnoj skupini imali veći udio spermija s oštećenom akrosomom. Ipak tome u prilog ne govore rezultati protočne citometrije gdje je nađeno da je upravo kontrolna skupina imala veći udio ukupnog oštećenja akrosome u 3. periodu dok u ostalim periodima nije bilo razlike. Budući da normalni spermiji sadrže jako malo citoplazme i s njom antikosidativnih enzima, teško je povezati koncentraciju navedenih enzima u citoplazmi s oštećenjem akrosome gdje tih enzima nema. Zbog toga ovaj nalaz negativne korelacije enzima glutation reduktaze i superoksid dismutaze s oštećenjem akrosome ne bi trebalo povezivati s nižom razinom navedenih enzima u spermijima pokusne skupine. Vjerojatnije je da je ta niža razina enzima u pokusnoj skupini posljedica zato što su spermiji u toj skupini proizvodili manje reaktivnih kisikovih spojeva. Neki autori manju koncentraciju enzima u spermijima ljudi (poput superoksid dismutaze) povezuju s normalnim razvojem i sazrijevanjem spermija koji za razliku od ostalih abnormalnih i nezrelih spermija sadrže dosta manje citoplazme, a s njom i SOD enzima (AITKEN i sur., 1996.).

Dosta autora je istraživalo utjecaj melatonina na kvalitetu sjemena prilikom smrzavanja/odmrzavanja tako što su ga dodavali direktno u razjeđivač. Tako su dobiveni različiti rezultati i uglavnom je ustanovljeno da zaštitni učinak melatonina postoji i da ovisi

o dozi dodanog melatonina u razrjeđivač između životinjskih vrsta i unutar njih. Tako su SUCCU i sur. (2011.) ustanovili da je najbolja doza melatonina dodana u razrjeđivač bila 1000 nM te je takav ejakulat ovnova nakon odmrzavanja imao bolju pokretljivost, očuvanost integriteta DNK i veći postotak oplodnje od ejakulata s manjom ili većom dozom dodanog melatonina. Drugi autori u svom istraživanju su ustanovili da je doza dodanog melatonina od 100 pM u razrjeđivač uzrokovala bolju pokretljivost, bolju očuvanost plazmine membrane i integritet akrosome spermija te veću aktivnost mitohondrija nakon otapanja u ejakulatu ovnova za razliku od kontrolne grupe kojoj nije dodan melatonin u razrjeđivač (SOUZA i sur., 2016.). Osim utjecaja melatonina na kvalitetu smrznutog/odmrznutog sjemena analizirao se i njegov utjecaj tijekom hlađenja i pohrane na 5 ℃ kroz 48 sati. Tako je dodani melatonin u razrjeđivač imao pozitivan utjecaj na kvalitetu ejakulata u ovnova (CANO-SUAREZ i sur., 2013.), dok se u jarčeva nije polučio pozitivan efekt na kvalitetu sjemena vjerojatno zbog negativnog utjecaja DMSO-a (dimetil sulfoksid) u razrjeđivaču na melatonin (MOAZZAMI i sur., 2014.). Bolju pokretljivost spermija u istraživanjima s melatoninom može se protumačiti boljom zaštitom funkcije mitohondrija (LÓPEZ i sur., 2009.). Smatra se da je mitohondrij u stanici glavni izvor ROS-a te da se na njega često vežu slobodni radikali koji ga mogu oštetiti. Reaktivni kisikovi spojevi proizvedeni u mitohondriju vežu se na proteine masti i mitohondrijsku DNK. U ovom istraživanju iako je u 3. periodu izmjerena značajno bolja pokretljivost spermija u pokusnoj skupini te rezultate u istom periodu nisu pratili i rezultati vezani za oštećenje i depolarizaciju mitohondrija nakon otapanja. Ipak, iako nije bilo statističke značajnosti, pokusna skupina je imala nešto manji postotak oštećenja i depolarizacije mitohondrija nakon otapanja u 3. periodu koji je mogao biti dostatan za razliku u pokretljivosti spermija između skupina. Slično je i sa različitim brzinskim parametrima. Naime, iako rezultati krivolinijske, pravolinijske i prosječne brzine nisu bili statistički značajno različiti u 3. periodu, pokusna skupina je ipak imala nešto veće vrijednosti za razliku od kontrolne skupine jarčeva. Kako je već spomenuto vjerojatno bi se na rezultate drugačije utjecalo da se nije ejakulat centrifugirao radi izdvajanja sjemene plazme te se u ovom slučaju teško mogu komentirati rezultati pokazatelja nakon otapanja sjemena. U prilog ovoj tvrdnji ide i novije istraživanje kod bikova (PANG i sur., 2016.) gdje je proučavan dodani melatonin na ejakulat nakon otapanja te je ustanovljeno da takav ejakulat osim boljeg integriteta plazmine membrane i akrosome ima i bolju aktivnost mitohondrija uz smanjenje intracelularnog ROS-a. Različita koncentracija nekih

antioksidativnih enzima između skupina u sjemenoj plazmi i spermijima nađena u ovom istraživanju mogla je utjecati na ROS i bolju aktivnost mitohondrija, ali to nije bilo vidljivo u rezultatima analizom oštećenja i depolarizacije mitohondrija te analizom brzinskih parametara nakon otapanja. Jedina razlika bila je u 4. periodu pokusa gdje je pokusna skupina imala veću frekvenciju prelazaka pravolinijske putanje spermija u sekundi. Budući da je već spomenuto kako je izdvajanjem sjemene plazme prije smrzavanja izdvojen melatonin i antioksidativna zaštita, ostala je samo zaštita u samim spermijima koja očito nije bila dostatna, a tome u prilog ide i činjenica da niti jedan od mjerenih antioksidativnih enzima u spermijima nije korelirao s oštećenjima i depolarizacijom mitohondrija te s različitim brzinskim parametrima. Samo je katalaza izdvojena u spermijima negativno korelirala s ukupnom pokretljivošću. GALLEGO-CALVO i sur. (2015.) u svom istraživanju kod sjemena jarčeva isto tako ne nalaze razlike u brzinskim parametrima mjerenim nakon procesa smrzavanja/odmrzavanja ejakulata. Budući da su isti autori prije smrzavanja ispirali spermije ni kod njih se ne može promatrati utjecaj melatonina i antioksidativne zaštite iz sjemene plazme.

Dosta je studija koje govore o pozitivnoj osobini melatonina u očuvanju strukturnog integriteta DNK u spermijima odnosno očuvanju DNK od fragmentacije. Tako su SARABIA i sur. (2009.) ustanovili da melatonin sprječava oštečenje DNK u spermijima miša kada su tretirani diazinonom. SUCCU i sur. (2011.) su ustanovili da melatonin dodan u određenoj koncentraciji u razrjeđivač štiti DNK od procesa krioprezervacije u spermijima ovnova. Spomenuto je već da melatonin u sjemenoj plazmi osim antioksidativnog djelovanja ima i zaštitno djelovanje od programirane smrti stanice, a za to je ključan receptor na membrani spermija (MT1) i aktivacija kinaze regulirane izvanstaničnim signalom (ERK) (ESPINO i sur., 2011.). U istraživanjima SHARBATOGHLI i sur. (2015.) nađena je pozitivna korelacija melatonina u sjemenoj plazmi ejakulata ljudi s fragmentacijom DNK te isti autori tvrde kako je to dobar indikator štetnog djelovanja ROS-a na receptore melatonina na membrani spermija i kontrole povratne veze. U ovom istraživanju nije nađena razlika između pokusne i kontrolne skupine u udjelu oštećenja DNK spermija, ali je primjećeno da je taj udio opadao u obje skupine tijekom perioda tako da je najmanje oštećenja DNK u spermijima zabilježeno u zadnja dva perioda. Utvrđena je pozitivna korelacija s antioksidativnim enzimima u spermijima (katalaza, GR , SOD) s oštećenjem DNK. Iako nije bilo razlike u udjelu spermija s oštećenom DNK između skupina, pokusna skupina jarčeva je u spermijima

imala manju koncentraciju glutation reduktaze i superoksid dismutaze u više perioda te glutation peroksidaze u zadnjem periodu. Budući da je jezgra spermija okružena citoplazmom u kojoj su antioksidativni enzimi može se pretpostaviti da je pokusna skupina imala manje antioksidativnih enzima u spermijima zbog slabije izloženosti kromatina djelovanju ROS-a, a što se može dovesti u vezu s poželjnim djelovanjem melatonina na spermije. To je djelovanje melatonina na antioksidativne enzime moglo nastati prije izdvajanja sjemene plazme odnosno prije smrzavanja, ali očito nije dovoljno utjecala da bi se pokazale razlike u udjelu fragmentacije DNK između skupina. Možda bi razlike bile uočljive da se nije izdvajala sjemena plazma prije smrzavanja, no zanimljivo je da koncentracija katalaze, glutation reduktaze te naročito superoksid dismutaze u spermijima obje skupine opada prema zadnjem periodu upravo kako se i smanjuje udio spermija s oštećenom DNK. Katalaza i superoksid dismutaza u spermijima osim s udjelom spermija koji imaju oštećenu DNK, pozitivno koreliraju i s ukupnim udjelom abnormalnih spermija te i udio spermija s oštećenom DNK pozitivno korelira s ukupnim udjelom abnormalnih spermija. To bi značilo da udio tih enzima opada s padom udjela spermija koji imaju oštećenu DNK. U spomenutom istraživanju SHARBATOGHLI i sur. (2015.), melatonin u sjemenoj plazmi ljudi je pozitivno korelirao s udjelom spermija koji su imali oštećenu DNK. Navedeni autori tvrde da je povišena razina melatonina kod ljudi s većim udjelom spermija koji imaju oštećenu DNK dobar pokazatelj štetnog učinka ROS-a na melatoninske receptore na membrani spermija te da razina melatonina može porasti upravo zbog kontrolno-povratne veze s receptorima. Isti autori tvrde da bi i povišenje melatonina u sjemenoj plazmi moglo povremeno izazvati supresiju hormonske funkcionalnosti što bi moglo dovesti do smanjenja integriteta DNK, a svoju tvrdnju temelje na starijim istraživanjima gdje je ustanovljen supresivni efekt melatonina na pulzatornu sekreciju GnRH i na aktivnost Leydig-ovih stanica (CAVALLO, 1993.; PERSENGIEV i KEHAJOVA, 1991.). Ipak, korelacija melatonina s udjelom spermija koji su imali oštećenu DNK u navedenom istraživanju je bila dosta niska (r=0.27) te i sami autori tvrde da je potrebno daljnje istraživanje na ovu temu.

6.4. UTJECAJ VITAMINA C I E NA POKAZATELJE KVALITETE EJAKULATA NAKON PROCESA SMRZAVANJA/ODMRZAVANJA

Zanimljiv je, i teško objašnjiv nalaz da je kvaliteta ejakulata jarčeva, kojima su prije zamrzavanja dodani vitamini E i C, bila ukupno gledajući bez obzira na period slabija jer je nakon odmrzavanja utvrđen veći udio spermija s oštećenjem plazmatske membrane te manji udio ukupno živih spermija i živih spermija s neoštećenom akrosomom. Naime, mnogi su egzogeni i endogeni činitelji mogli utjecati na ovakav ishod, inače u literaturi često spominjanih pozitivnih učinaka vitamina E i C na pokazatelje kvalitete ejakulata jarčeva, ovnova, bikova i muškaraca nakon odmrzavanja. U ovom istraživanju od egzogenih činitelja koji su mogli utjecati na negativni učinak dodanih vitamina E i C treba spomenuti: (1) moguće razlike u kvaliteti vitaminskih pripravaka, kao i melatoninskih implantata testiranih u ovom pokusu u odnosu na pripravke rabljene u pokusima drugih autora, (2) razlike u dozama vitamina E i C u odnosu na volumen i sastav razrjeđivača, (3) razlike u trajanju djelovanja dodanih vitamina E i C prije prestanka aktivnosti njihovih molekula zbog smrzavanja, odnosno ponovnog aktiviranja po odmrzavanju, (4) mogući izostanak sinergističkog djelovanja dodanih vitamina E, a naročito C s melatoninom i (5) ljudska pogreška zbog činjenice da je E vitamin topiv u mastima, a vitamin C u vodi, pa je postupak s ejakulatima, odnosno razrjeđivačima obogaćenim tim vitaminima bio tehnički različit od onih bez dodatka tih vitamina. Premda su jarčevi u našem pokusu bili iste pasmine, slične dobi, držani su u jednakim makroklimatskim uvjetima, hranjeni na isti način, a bili su smješteni u jednakim mikroklimatskim uvjetima, ipak treba uzeti u obzir i endogene činitelje: (1) pasminske razlike u odnosu na jarčeve testirane u sličnim pokusima drugih autora, (2) s posljedično različitom općom fiziologijom, a posebice fiziologijom reprodukcije te (3) njezinu rasplodnu cirkadijalnu, pa i sezonsku kinetiku. Međutim, također treba spomenuti da se uvidom u relevantnu literaturu mogu naći brojni podaci koji govore u prilog općeprihvaćenom stavu da je dodavanje vitamina E i C u ejakulate jarčeva (AGOSSOU i KOLUMAN, 2018.), prije dubokog smrzavanja (-196 C°) ili samo ohlađivanja na 5 C° kroz par dana, kao i u ejakulate blisko srodnih vrsta papkara, kao što su ovnovi (AMINIPOUR i sur., 2013.; AZAWI i HUSSEIN, 2013.) ili filogenetski udaljeniji bikovi (MITTAL i sur., 2014.) te u čovjeka, i to naročito dodavanje E vitamina (GURUPRASAD i sur., 2011.), uglavnom imalo pozitivan učinak na pokazatelje kvalitete ejakulata nakon odmrzavanja. No, ima i oprečnih nalaza glede pozitivnih učinaka vitamina

E i C koji su donekle slični ovom istraživanju. Naime, ANGHEL i sur. (2010.) nisu utvrdili nikakav učinak na pokretljivost i udio živih spermija te na integritet njihovih staničnih membrana, nakon dodavanja 0,1 mM vitamina E prije procesa smrzavanja spermija, ali su utvrdili statistički značajan porast pokretljivosti i integriteta staničnih membrana u uzorcima sva 3 testirana jarca nakon dodavanja 1,0 mM vitamina E, a za udio živih spermija u 2 od 3 jarca. Zanimljivo je da su zabilježili i statistički neznačajni porast abnormalnih oblika spermija. Naime, ovaj se nalaz može povezati s prooksidativnim djelovanjem veće koncentracije vitamina E (WAHJUNINGSIH i RACHMAWATI, 2012.). Poznato je, da je kalibriranje optimalno djelotvorne doze nekog pripravka, u ovom slučaju α-tokoferola ili E vitamina, od ključne važnosti za postizanje njegovog željenog učinka, pa su i drugi autori utvrdili da vitamin E u dozi od 10 mM nema nikakvog učinka na pokretljivost, vigor i hipoosmotsko bubrenje spermija jarčeva nakon brzog odmrzavanja ejakulata kojima je bio dodavan (PENITENTE-FILHO i sur., 2014.). Isto tako, *peroralno* davanje vitamina E (u dozama od 15, 30 ili 45 mg/kg tjelesne težine) jarčevima kroz 30 dana prije polučivanja ejakulata, premda se ovdje radi o *in vivo* učincima E vitamina, pa su stoga rezultati teško usporedivi s rezultatima dobivenim u *in vitro* uvjetima, ipak nije nepotrebno napomenuti da su rezultati slični ovom istraživanju gdje nije nađena razlika između skupina s dodanim vitaminom i bez njega kod različitih pokazatelja kvalitete ejakulata gledano kroz period (DARAMOLA i sur., 2016.). Premda su navedeni autori u svom pokusu nastojali da vitamin E bude unesen u organizam gotovo prirodnim putem te da na taj način bude i njegova razina optimizirana (redovitim dodavanjem *per os* u 3 različite doze), izostao je povoljni učinak i na spermije, i na pokazatelje oksidativnog stresa. Neki su pak autori izvijestili da dodavanje 9 mM vitamina C (askorbinske kiseline) statistički značajno povećava brojnost živih spermija nakon odmrzavanja, dok dodavanje 4,5 mM vitamina E (α-tokoferola) nije izazvalo nikakve značajne učinke na progresivnu pokretljivost spermija, integritete akrosome i plazmatske membrane te DNK molekule (SARASWAT i sur., 2012.). Nadalje, isti su autori pomoću testa nasumične amplifikacije polimorfne DNK (engl. random amplified polymorphic DNA; RAPD), utvrdili da testirani antioksidansi, vitamini C i E, učinkovito štite od oštećenja genomsku DNK izdvojenu iz odmrznutih spermija jarčeva te predlažu da bi se ta metoda mogla rabiti za provjeru molekularnih osobitosti, a time i integriteta genetskog materijala, sjemena jarčeva (SARASWAT i sur., 2014.).

Unatoč ovim, pretežito pozitivnim izviješćima o zaštitnoj ulozi vitamina E i C od oksidativnog stresa izazvanog naglim i dubokim smrzavanjem spermija jarčeva te potom pri odmrzavanju istih, trebali bi se i podatci dobiveni u ovom istraživanju razmatrati s određenom dozom znanstvene kritičnosti, jer u području prirodnih znanosti ishod često može iznenaditi. Slijedom toga, nalaz u ovom istraživanju da vitamin E nije pokazao očekivani učinak, već je odavno utvrđen u čovjeka (PASQUALOTTO i sur., 2000.), ali i u jarčeva (LOU i sur., 2004.). Potonji su autori pretpostavili da bi se zaštitni učinak vitamina E protiv oksidativnih oštećenja spermija jarčeva mogao uspostaviti kada su u uzgoju loši higijenski uvjeti, pa su pojave upala reproduktivnog/urogenitalnog sustava bitno učestalije. Naime, takva upalna stanja slabe antioksidativne zaštitne mehanizme i pogoduju generiranju oksidativnog stresa, što dovodi do poremećaja u tkivima testisa i izazivanja oštećenja stanica spermija. Međutim, kada su uvjeti držanja životinja dobri, one su zdrave i nisu izložene oksidativnom stresu, što bi mogao biti jedan od razloga da u ovom istraživanju nije zabilježen zaštitni učinak vitamina E, jer za to nije bilo potrebe. Osim toga, poznato je da fenolni antioksidansi, kao što je α-tokoferol, u razmjerno visokoj koncentraciji (kao što je bila doza od 60 mM dodana u razrjeđivač za spermu u ovom istraživanju), može potaknuti i njegovu potpunu nedjelotvornost kao antioksidansa, pa čak i izazvati njegovo prooksidativno djelovanje (WAHJUNINGSIH i RACHMAWATI, 2012.). Kako je ovom istraživanju dodana razmjerno visoka koncentracija naročito vitamina E (60 mM), ali i C (8,5 mg/ml) vjerojatno je ta veća količina α-tokoferola mogla izazvati prooksidativni učinak na spermije jarčeva pa je gledajući ukupno bez obzira na period, bilo značajno više spermija s oštećenom plazmatskom membranom, a značajno manje ukupno živih spermija i živih spermija s intaktnom akrosomom.

Shodno navedenom, a uzimajući u obzir tuđa i vlastita iskustva, u ovom istraživanju vjerojatno je krivo procijenjena doza vitamina E (kao i C) koja očito nije bila ni dostatna da izazove antioksidativni učinak u uzorcima sjemena pokusnih jarčeva, niti je bila u suvišku da bi izazvala prije spomenuti, nepoželjni prooksidativni učinak samog vitamina E gledajući kroz svaki zasebno period. Stoga, u budućim istraživanjima, svakako treba poraditi na kalibriranju doze dodavanog vitamina, jer se naime i oni-vitamini, kada imaju tako značajnu ulogu antioksidansa, mogu uklopiti u sintagmu o tome što je lijek s obzirom na dozu i pri tome se samo orijentacijski oslanjati na brojne podatke iz literature, a najviše na vlastita istraživačka iskustva.

7. ZAKLJUČCI

Rezultati istraživanja utjecaja egzogenog melatonina na pokazatelje kvalitete ejakulata te na antioksidacijski status sjemena jarčeva francuske alpine izvan rasplodne sezone omogućuju sljedeće zaključke:

- Dobiveni rezultati ukazuju da je primjena egzogenog melatonina značajno doprinijela poboljšanju kvalitete ejakulata unutar 2-4 tjedna od aplikacije melatonina povećanjem pokretljivosti i udjela živih spermija u svježem ejakulatu jarčeva alpske pasmine izvan rasplodne sezone. Nadalje, utvrđen je i pozitivan utjecaj melatonina na libido jarčeva, no nije bilo statistički značajne razlike između istraživanih skupina.

- Egzogeni melatonin u ovom istraživanju utjecao je na promjenu aktivnosti pojedinih antioksidacijskih enzima u određenim periodima istraživanja, a ponajviše na glutation reduktazu u sjemenoj plazmi i spermijima; superoksid dismutazu u spermijima te glutation peroksidazu u sjemenoj plazmi i spermijima.

- Prema dobivenim rezultatima ovog istraživanja egzogeni melatonin imao je utjecaj na omjere antioksidacijskih enzima u spermijima i sjemenoj plazmi jarčeva, u 5., a najviše u 6. pokusnom periodu, no daljina istraživanja su neophodna kako bi pravilno mogli tumačiti njegov učinak na sjeme tretiranih jarčeva. Određivanje omjera aktivnosti antioksidativnih enzima može se smatrati pokazateljima oksidativnog stresa te dati i bolji uvid u adaptaciju i stanje antioksidativnog sustava u odnosu na pojedinačno utvrđene aktivnosti antioksidativnih enzima.

- Egzogeni melatonin u pokusnoj skupini jarčeva zadržao je pozitivni učinak na pokazatelje kvalitete ejakulata (pokretljivost spermija i udio živih spermija) u odmrznutom ejakulatu u istom pokusnom periodu kao što je utvrđeno kod svježeg sjemena.

- Pozitivna korelacija utvrđena je između aktivnosti antioksidacijskih enzima (CAT, GR, SOD) u spermijima s oštećenjem DNK u obje skupine jarčeva gdje je smanjenje aktivnosti antioksidacijskih enzima u spermijima pratilo i smanjenje oštećenja DNK pri kraju pokusnog perioda.

- Negativna korelacija utvrđena je između pokretljivosti i različitih brzinskih pokazatelja spermija s oštećenjem plazmatske membrane, oštećenjem i depolarizacijom mitohondrija spermija te s udjelom abnormalnih spermija u ejakulatu nakon odmrzavanja.

- Dodatak odabrane koncentracije vitamina E i C u razrjeđivač prije procesa smrzavanja ejakulata nije utjecao na poboljšanje istraživanih pokazatelja kvalitete ejakulata nakon odmrzavanja.

8. POPIS LITERATURE

AGARWAL, A., G. VIRK, C. Ong, S. S. du Plessis (2014): Effect of oxidative stress on male reproduction, World J. Mens Health, 32, 1–17.

AGOSSOU, D. J., N. KOLUMAN (2018): An objective analysis of factors affecting buck semen quality attributes during cryopreservation. Annu. Res. Rev. Biol., 27, 1-7.

AHMAD, N., D. E. NOAKES (1996): Sexual Maturity in British Breeds of Goat Kids. Br. Vet. J., 152, 93–103.

AHMAD, N., D. E. NOAKES, D. J. MIDDLETON (1993): Seminal Vesiculitis and Epididymitis in an Anglo–Nubian Buck. Veterinary Record, 133, 322-323.

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 Radic. Biol. Med., 21, 495–504.

AMICARELLI, F., RAGNELLI, A. M., AIMOLA, P., BON¢GLI, A., COLAFARINA, S., DI ILIO, C., MIRANDA, M. (1999): Age-dependent ultrastructural alterations and biochemical response of rat skeletal muscle after hypoxic or hyperoxic treatments. Biochim. Biophy. Acta 1453, 105-114.

AMINIPOUR H., A. M. TAHMASBI, A. A. NASERIAN (2013): The influenceof vitamin E on semen characteristics of ghezel rams in during cooling and frozen process. Eur. J. Zool. Res., 2, 94–99.

ANGHEL A., S. ZAMFIRESCU, D. COPREAN, D. NADOLU, E. SOGORESC, F. BUSURICU (2010): The effects of antioxidants on the cytological parameters of cryopreserved buck semen. Rom. Biotechnol. Lett., 15, 26 -32.

ANZAR, M., L. HE, M. M. BUHR (2009): Comparison of Different Methods for Assessmentof Sperm Concentration and Membrane Integrity with Bull Semen. J. Androl., 30, 661–668.

ASHRAFI, I., H. KOHRAM, F. F. ARDABILI (2013): Antioxidative Effects of Melatonin on Kinetics, Microscopic and Oxidative Parameters of Cryopreserved Bull Spermatozoa. Anim. Reprod. Sci., 139, 25–30.

ASHRAFI, I., H. KOHRAM, H. NAIJIAN, M. BAHREINI, M. POORHAMDOLLAH (2011): "Protective effect of melatonin on sperm motility parameters on liquid storage of ram semen at 5∘C." Afr. J. Biotechnol., 10, 6670–6674.

AUGER, J., J. M. KUNSTMANN, F. CZYGLIK, P. JOUANNET (1995): Decline in Semen Quality Among Fertile Men in Paris During the Past 20 Years. N. Engl. J. Med., 332, 281–285.

AVANZO, J. L., A. DE MENDONC, C. X., PICCOLI PUGINE, S. M., DE CERQUEIRA CESAR, M. (2001): Effect of vitamin E and selenium on resistance to oxidative stress in chicken superficial pectoralis muscle. Comp. Biochem. Physiol. C. 129, 163-173.

AZAWI, O. I., E. K. HUSSEIN (2013): Effect of Vitamins C or E Supplementation to Tris Diluent on the Semen Quality of Awassi Rams Preserved at 5 ˚C. Vetreinary Research Forum, 4, 157–160.

BARTH, A. D., R. J. OKO (1989): Abnormal Morphology of Bovine Spermatozoa. Ames, Iowa State University Press.

BAUMBER, J., B. A. BALL, C. G. GRAVANCE, V. MEDINA, M. C. G. DAVIES–MOREL (2000): The Effect of Reactive Oxygen Species on Equine Sperm Motility,Viability, Acrosomal Integrity, Mitochondrioal Membrane Potential and Membrene Lipid Peroxidation. J. Androl., 21, 895–902.

BAUMBER, J., A. VO, K. SAUBER, B. A. BALL (2002): Genaration of Reactive Oxygen Species by Equine Neutrophils and Their Effect on Motility of Equine Spermatozoa. Theriogenology, 57, 1025–1033.

BEJARANO, I., F. MONLLOR, A. M. MARCHENA, A. ORTIZ, G. LOZANO, M.I. JIMÉNEZ, P. GASPAR, J. F. GARCÍA, J. A. PARIENTE, A. B. RODRÍGUEZ, J. ESPINO (2014): Exogenous melatonin supplementation prevents oxidative stressevoked DNA damage in human spermatozoa. J. Pineal. Res., 57, 333-339.

BENITEZ-KING, G., L. HUERTO-DELGADILLO, F. ANTON-TAY (1993): Binding of 3 Hmelatonin to calmodulin. Life Sciences, 53, 201–207.

BERNDTSON, W. E. (2014): Sperm Production and its Harvest. In: Animal Andrology: Theories and Applications, CAB International, eds P. J. Chenoweth and S. P. Lorton, 11–33.

BOERSMA, A., R. RAβHOFER, R. STOLLA (2001): Influence of Sample Preparation, Staining Procedure and Analysis Conditions on Bull Sperm Head Morphometry using the Morphology Analyser Integrated Visual Optical System. Reprod. Domest. Anim., 36, 222–229.

BREDDERMAN, P. J., R. H. FOOTE (1969): Volume of Stressed Bull Spermatozoa and Protoplasmic Droplets, and the Relationship of Cell Size to Motality and Fertility. J. Anim. Sci., 28, 496–501.

BRIESALSKI, H. K. (2000): Nutrition. Volume 16, 7/8.

BRIGELIUS–FLOHÉ, R., M. MAIORINO (2013): Glutathione Peroxidases. Biochim. Biophys. Acta, 1830, 3289–3303.

BRINSKO, S. P., J. A. SPOONER, T. L. BLANCHARD, C. C. LOVE, D. D. VARNER (2011): Relationship Among Morphologic Characteristics and Membrane Integrity of Stallion Sperm. Clinical Theriogenology, 3, 55–59.

BRITO, L. F. C., A. D. BARTH, S. BILODEAU–GOESEELS, P. L. PANICH, J. P. KASTELIC (2003): Comparison of Methods to Evaluate the Plasmalemma of Bovine Sperm and their Relationship with in vitro Fertilization Rate. Theriogenology, 60, 1539–1551.

BUCAK, M. N., A. ATEŞŞAHIN, A. YÜCE (2007): Effect of Anti-oxidants and Oxidative Stress Parameters on Ram Semen after the Freeze–Thawing Process. Small Rumin. Res., 75, 128–134.

BUCAK, M. N., S. SARIÖZKAN, P. B. TUNCER, F. SAKIN, A. ATEŞŞAHIN, R. KULAKSIZ, M ÇEVIK (2010): The Effect of Antioxidants on Post–Thawed Angora Goat (Capra Hicus Ancryrensis) Sperm Parameters, Lipid Peroxidation and Antioxidant Activities. Small Rumin. Res., 89, 24–30.

BUEGE, J. A., S. D. AUST (1978): Microsomal Lipid Peroxidation. Methods Enzymol., 52, 302–310.

BUFFONI, A., A. VOZZI, D. M. GONZALEZ, H. VIEGAS, A. LATORRACA, F. HOZBOR, J. A. ABECIA (2015): Melatonin modifies scrotal circumference but not plasma testosterone concentrations and semen quality of rams during the seasonal anestrus at 43°S. Biological Rhythm Research, 46, 785-795.

CÂMARA, D. R., M. M. C. MELLO–PINTO, L. C. PINTO, O. O. BRASIL, J. F. NUNES, M. M. P. GUERRA (2011): Effects of Reduced Glutathion and Catalase on the Kinematics and Membrane Functionality of Sperm During Liquid Storage of Ram Semen. Small Rumin. Res., 100, 44–49.

CAMERON, R. D. A., L. H. LAUERMAN (1976): Characteristics of Semen Changes during Brucella Ovis Infection in Rams. Veterinary Record, 99, 23–233.

CANO-SUAREZ P., F. GONZALEZ, R. SOTO, A. MEDRANO (2013): The effect of melatonin on ram sperm quality during refrigeration at 5 ℃ for 48 h. Reprod. Domest. Anim., 48, 75.

CASAO, A., I. CEBRIÁN, M. E. ASUMPÇÃO, R. PÉREZ–PÉ, R. ABECIA, J. A. FORCADA, F., J. A. CEBRIÁN–PÉREZ, T. MUIÑO – BLANCO (2010): Seasonal variations of melatonin in ram seminal plasma are correlated to those of testosterone and antioxidant enzymes. Reprod. Biol. Endocrinol., 8, 59.

CASAO, A., M. GALLEGO, J. A. ABECIA, F. FORCADA, R. PÉREZ-PÉ, T. MUIˇNO-BLANCO, J. Á. CEBRIÁN-PÉREZ (2012): Identification and immunolocalisation of melatonin MT1 and MT2 receptors in Rasa Aragonesa ram spermatozoa. Reprod. Fertil. Dev., 24, 953–961.

CASAO, A., R. PÉREZ – PÉ, J. A. ABECIA, F. FORCADA, T. MUIÑO – BLANCO, J. A. CEBRIÁN – PÉREZ (2013): The Effect of Exogenous Melatonin During the Non–Reproductive Season on the Seminal Plasma Hormonal Profile and the Antioxidant Defense System on Rasa Arangonesa Rams. Anim. Reprod. Sci., 138, 168–174.

CASAO, A., S. VEGA, I. PALACÍN, , R. PÉREZ–PÉ, A. LAVIÑA, F. J. QUINTÍN, E. SEVILLA, J. A. ABECIA, J. A. CEBRIÁN–PÉREZ, F. FORCADA, T. MUIÑO – BLANCO (2010): Effects of melatonin implants during non-breeding seasonon on sperm motility and reproductive parameters in rasa aragonesa rams. Reprod. Domest. Anim., 45, 425–432.

CAVALLO, A. (1993): Melatonin and human puberty: current perspectives. J. Pineal Res., 15, 115–121.

CEBRIÁN–PÉREZ, J. A., A. CASAO, M. GONZÁLES–ARTO, T. R. Dos SANTOS HAMILTON, R. PÉREZ–PÉ, T. MUIÑO–BLANCO (2014): Melatonin in Sperm Biology: Breaking Paradigms. Reprod. Domest. Anim., 49, 11–21.

CERGOLJ, M., M. SAMARDŽIJA (2006): Veterinarska Andrologija. Veterinarski fakultet. Zagreb.

CURRY, M. R., P. F. WATSON (1994): Osmotic Effects on Ram and Human Sperm Membranes in Relation to Thawing Injury. Cryobiology, 31, 39–46.

CHEMINEAU, P., B. MALPAUX, J. A. DELGADILLO, Y. GUERIN, J. P. RAVAULT, J. THIMONIER, J. PELLETIER (1992): Control of sheep and goat reproduction: use of light and melatonin. Anim. Reprod. Sci., 30, 157–184.

CHEN, X., H. ZHU, C. HU, H. HAO, J. ZHANG, K. LI, X. ZHAO, T QIN, K. ZHAO, H. ZHU, D. WANG (2014): Identification of differentially expressed proteins in fresh and frozen-thawed boar spermatozoa by iTRAQ-coupled 2D LC–MS/MS. Reproduction, 147, 321-330.

DARAMOLA, J. O., E. O. ADEKUNLE, O. E. OKE, O. OGUNDELE, E.-O. A. SAANU, A. J. ODEYEMI (2016): Effect of vitamin E on sperm and oxidative stress parameters of West African Dwarf goat bucks. Tropical and Subtropical Agroecosystems, 19, 151–158.

DE HAAN, J. B., F. CRISTIANO, R. C. IANNELLO, I. KOLA (1995): Cu/Zn-superoxide dismutase and glutathione peroxidase during aging. Biochem. Mol. Biol. Int. 35, 1281-97.

DE LA CUEVA, F. I. C., M. R. PUJOL, T. RIGAU, S. BONET, J. MIRÓ, M. BRIZ, J. E. RODRIGUEZ – GILL (1997): Resistance to Osmotic Stress of Horse Spermatozoa: the Role of Ionic Pumps and their Relationship to Cryopreservation Success. Theriogenology, 48, 947–968.

DEPONTE, M. (2013): Glutathione Catalysis and the Reaction Mechanisms of Glutathione – Dependent Enzymes. Biochim. Biophys. Acta, 1830, 3217–3266.

DJORDJEVIĆ, V. B. (2004): Free Radicals in Cell Biology. International Review in Cytology, 237, 57–89.

DONOGHUE, A. M., D. L. GARNER, D. J. DONOGHUE, L. A. JOHNSON (1996): Assessement of the Membrane Integrity of Fresh and Stored Turkey Spermatozoa

Using Combination of Hypo – osmotic Stress, Fluorescent Staining and Flow Cytometry. Theriogenology, 46, 153–163.

ĐUKIĆ, M., M. NINKOVIĆ, M. JOVANOVIĆ (2008): Oxidative Stress–Clinical Diagnostic Significance. J. Med. Biochem., 27, 409–425.

EDDY, E. M. (2006): The Spermatozoon. In Physiology of Reproduction. Elsevier Academic Press, San Diego, ed J. D. Neill, 1–54.

ESPINO, J., A. ORTIZ, I. BEJARANO, G. M. LOZANO, F. MONLLOR, J. F. GARCIA, A. B. RODRÍGUEZ, J. A. PARIENTE (2011): Melatonin protects human spermatozoa from apoptosis via melatonin receptor- and extracellular signal-regulated kinase-mediated pathways. Fertil. Steril., 95, 2290-2296.

EVENSON, D. P., Z. DARZYNKIEWICZ, M. R. MELAMED (1980): Relation of Mammalian Sperm Chromatin Heterogeneity to Fertility. Sience, 210, 1131–1133.

EVENSON, D. P., J. E. PARKS, M. T. KAPROTH, L. K. JOST (1993): Rapid Determination on Sperm Cell Concentration in Bovien Semen by Flow Cytometry. J. Dairy Sci., 76, 86–94.

EVENSON, D. P., L. THOMPSON, L. K. JOST (1994): Flow Cytometric Avaluation of Boar Semen by the Sperm Chromatin Structure Assay as Related to Cryopreservation and Fertility. Thgeriogenology, 41, 637–651.

FATOBA, T. A., A. A. Adeloye (2013): The effects of exogenous melatonin on sperm characteristics of West African Dwarf goat bucks. J. agric. soc. sci., 11, 283.

FAZLI-NEZAD, J., M. MAMOEII, A. KHERADMAND, A. SOOKHTEZARY (2016): The effect of melatonin on testicular circumference and semen characteristics in non-breeding season in Lori-Bakhtiari ram. J. Vet. Sci., 71, 27–32.

FOOTE, R. H., J. Arriola, R. J. WALL (1978): Principles and Procedures for Photometric Measurement of Sperm Cell Concentration. In Proceedings, 7th Technical Conference on Artificial Insemination and Reproduction, Columbia, Missouri, 55–61.

FOSTER, M. L. (2009): Comparison of Methods for Assessing Viability of Equine Spermatozoa and Effects of Seminal Plasma on Viability of Equine Spermatozoa. Master of Science Thesis, Texas A&M University, College Station.

FOSTER, M. L, D. D. VARNER, K. HINRICHS, S. TEAGUE, K. LaCAZE, T. L. BLANCHARD, C. C. LOVE (2011a): Agreement Between Measures of Total Motility and Membrane Integrity in Stallion Sperm. Theriogenology, 75, 1499–1505.

FOSTER, M. L, C. C. LOVE, D. D. VARNER, S. P. BRINSKO, K. HINRICHS, S. TEAGUE, K. LaCAZE, T. L. BLANCHARD (2011b): Comparison of Methods for Assessing Interity of Equine Sperm Membranes. Theriogenology, 76, 334–341.

FRASER, L., K. GORSZCZARUK, J. STRZEZEK (2001): Relationship Between Motility and Membrane Integrity of Boar Spermatozoa in Media Varying in Osmolality. Reprod. Domest. Anim., 363, 325–329.

GALLEGO-CALVO, L., M. C. GATICA, J. SANTIAGO-MORENO, J. L. GUZMÁN, L. A. ZARAZAGA (2015): Exogenous melatonin does not improve the freezability of Blanca Andaluza goat semen over exposure to two months of short days. Anim. Reprod. Sci., 157, 24-32.

GANJAM, V. K., R. P. AMANN (1976): Steroids in Fluids and Sperm Entering and Leaving the Bovine Epididymis, Epididymal tissue and Accessory Sex Gland Secretions. Endocrinology, 99, 1618–1630.

GARNER, D. L., L. A. JOHNSON, S. T . YUE, B. L. ROTH, R. P. HAUGLAND (1994): Dual DNA Staining Assessment of Bovine Sperm Viability Usin SYBR–14 and Propidium Iodide. J. Androl., 15, 620–629.

GAVELLA, M., V. Lipovac (2000): Antioxidative effect of melatonin on human spermatozoa. Archives of Andrology, 44, 23–27.

GONZALEZ-ARTO, M., C. LUNA, R. PÉREZ-PÉ, T. MUIÑO-BLANCO, J. A. CEBRIÁN-PÉREZ, A. CASAO (2014): New evidence of melatonin receptor contribution to ram sperm functionality. Reprod. Fertil. Dev., 28, 924-935.

GRIVEAU, J. F., D. LE LANNOU (1997): Reactive oxygen species and human spermatozoa: Physiology and pathology. Int. J. Androl., 20, 61–69.

GROTTO, D., L. D. SANTA MARIA, S. BOEIRA , J. VALENTINI, M. F. CHARÁO, A. M. MORO, P. C. NASCIMENTO, V. J. POMBLUM, S. C. GARCIA (2007): Rapid quantification of malondialdehyde in plasma by high performance liquid chromatography - visible detection. J. Pharm. Biomed. Anal., 43, 619-624.

GURUPRASAD K., R. SUJITH, A. THIYAGARAJAN, S. KUMAR, P. KUMAR, A. SATISH KUMAR (2011): Vitamin E supplementation in semen-freezing medium improves the motility and protects sperm from freeze-thaw–induced DNA damage. Fertil. Steril., 95, 1149-1151.

GUTIERREZ – PEREZ, O., Mde. L. JUAREZ – MOSQUEDA, S. U. CARVAJAL, M .E. ORTEGA (2009): Boar Spermatozoa Cryopreservation in Low Glicerol / Trehalose Enriched Media Improves Cellular Integrity. Cryobiology, 58, 287 – 292.

HAMMERSTEDT, R. H., J. K. GRAHAM (1992): Cryopreservation of Poultry Sperm: the Enigma of Glicerol. Cryobiology, 29, 26–38.

HAZZOURI, M., S. ROUSSEAUX, F. MONGELARD, Y. USSON, R. PELLETIER, A. K. FAURE, C. VOURC'H, B. SÉLE (2000): Genome Organization in the Human Sperm Nucleus Studied by Fish and Confocal Microscopy. Mol. Reprod. Dev., 55, 307–315.

HISHINUMA, M., J. SEKINE (2003): Evaluation of Membrane Integrity of Canine

Epididymal Spermatozoa by Short Hypo – osmotic Swelling Test With Ultrapure Water. J. Vet. Med. Sci., 65, 817–820.

HOLT, W. V., L. M. PENFOLD (2014): Fundamental and Practical Aspects of Semen Cryopreservation. In Animal Andrology: Theories and Applications, CAB International, eds P. J. Chenoweth and S. P. Lorton, 76–90.

ISACHENKO, V., E. ISACHENKO, M. MONTAG, V. ZAEVA, I. KRIVOKHARCHENKO, F. NAWROTH, S. DESSOLE, I. I. KATKOW, H. Van der VEN (2005): Clean Technique for Cryoprotectant – Free Vitrification of Human Spermatozoa. Reprod. Biomed. Online, 10, 350–354.

ISLAM, N., S. PERVIN (2011): Antixidants. J. Dhaka National Med. Coll. Hos., 17 (02), 61– 64.

JOHANSSON, C. S., F. C. MATSSON, H. LEHN–JENSEN, J. M. NIELSEN, M. M. PETERSEN (2008): Equine Spermatozoa Viability Comparing the NucleoCounter SP–100 and Eosin–Nigrosin Stain. Anim. Reprod. Sci., 107, 325–326.

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.

KATALINIĆ, I., Z. DOMINIKOVIĆ, D. DRAGOJLOV, V. JOVANOVIĆ-BUNTA, Ž. LJUBIĆ (1994): Kozarska proizvodnja pod uzgojno-selekcijskom kontrolom na obiteljskim farmama u hrvatskoj. Mljekarstvo, 44, 59–68.

KAYA, A., N. BASPINAR, C. YILDIZ, F. KURTOGLU, M. B. ATAMAN, S. HALILOGLU (2000): Influence of melatonin implantation on sperm quality, biochemical composition of the seminal plasma and plasma testosterone levels in rams. Rev. Med. Vet., 151, 1143–1146.

KAYA, A., S. BIRLER, L. ENWALL, E. MEMILI (2014): Determinants of Sperm Morphology. In Animal Andrology: Theories and Applications, CAB International, eds P. J. Chenoweth and S. P. Lorton, 34–56.

KIRKMAN, H. N., G. F. GAETANI (1984): Catalase: A Tetrameric Enzyme with Four Tightly Bound Moleculs of NADPH. Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America, 81, 4343–4347.

KNIGHT, J. A. (1998): Free radicals: Their history and current status in aging and disease. Annals of the Clinical and Laboratory Sciences, 28, 331–346.

KNIGHT, T. W. (1974): The Effect of Oxytocin and Adrenalin on Semen Output of Rams. J. Reprod. Fertil., 39, 329–336.

KANEKO, T., Y. IUCHI , T. KOBAYASHI, T. FUJII, H. SAITO, H. KURACHI, J. FUJII (2002): The Expression of Glutathione Reductase in the Male Reproductive System of Rats Supports the Enzymatic Basis of Glutathione Function in Spermatogenesis. Eur. J. Biochem., 269, 1570–1578.

KATZ, D. F., R. O. DAVIS, B. A. DELANDMETER, J. W. OVERSREET (1985): Real – time Analysis of Sperm Motion Using Automatic Video Image Digitization. Comput. Methods Programs Biomed., 21, 173–182.

KAYA, A., M. AKSOY, N. BASPINAR, C. YILDRZ, M. B. ATAMAN (2001): Effect of melatonin implantation to sperm donor rams on post-thaw viability and acrosomal integrity of sperm cells in the breeding and non-breeding season. Reprod. Domest. Anim., 36, 11–15.

LAEL M. C., S. C. BECKER-SILVA, H. CHIARINI-GARCIA, L. R. FRANCA (2004): Sertoli Cell Efficiency and Sper Production in Goats. Anim. Reprod. Sci., 1, 122–128.

LEWIS, S. E., E. S. STERLING, I. S. YOUNG, W. THOMPSON (1997): Comparison of individual antioxidants of sperm and seminal plasma in fertile and infertile men. Fertil. Steril., 67, 142-147.

LI, Z., Q. LIN, R. LIU, W. XIAO, W. LIU (2010): Protective effects of ascorbate and catalase on human spermatozoa during cryopreservation. J. Androl., 31, 437-444.

LINCOLN, G. A., C. E. LINCOLN, A. S. McNEILLY (1990): Seasonal Cycles in the Blood Plasma Concentration of FSH, Inhibin and Testosterone, and Testicular Size in Rams of Wild, Feral and Domesticated Breeds of Sheep. J. Reprod. Fertil., 88, 623–633.

LÓPEZ, A., J. A. GARCÍA, G. ESCAMES, C. VENEGAS, F. ORTIZ, L. C. LÓPEZ, D. ACUÑA-CASTROVIEJO (2009): Melatonin protects the mitochondria from oxidative damage reducing oxygen consumption, membrane potential, and superoxide anion production. J. Pineal. Res., 46, 188-198.

LOPES, S., A. JURISICOVA, J. G. SUN, R. F. CASPER (1998): Reactive oxygen species: potential cause for DNA fragmentation in human spermatozoa. Hum. Reprod., 13, 896–900.

LUO, H. L., Z. H. JIA, S. E. ZHU, J. Z. DING (2004): Effect of vitamin E on the qualities of fresh and frozen thawed ram semen. China Herbivores, 24, 14-16.

MAIA, M. da S., S. D. BICUDO, C. C. SICHERLE, L. RODELLO, I. C. S. GALLEGO (2010): Lipid Peroxidation and Generation of Hydrogene Peroxide in Frozen – Thawed Ram Semen Cryopreserved in Extenders with Antioxidant. Anim. Reprod. Sci., 122, 118–123.

MAJIĆ BALIĆ, I., S. MILINKOVIĆ–TUR, M. SAMARDŽIJA, S. VINCE (2012): Effect of Age and Environmental Factors on Semen Quality, Glutathion Peroxidase Activity and Oxidative Parameters in Simmental Bulls. Theriogenology, 78, 423-431.

MARKLUND, S. L. (1984b): Extracellular superoxide dismutase and other superoxide dismutase isoenzymes in tissues from nine mammalian species. Biochem. J., 222, 649-655.

MARTÍ, J. I., J. A. CEBRIÁN–PÉREZ, T. MUIÑO–BLANCO (2000): Assessement of theAcrosomal Status of Ram Spermatozoa by RCA Lectin–Binding and Partition in an Aqueous Two–Phase System. J. Androl., 21, 541–548.

MARTÍ, E., L. MARA, J. I. MARTÍ, T. MUIÑO-BLANCO, J. A. CEBRIÁN-PÉREZ (2007): Seasonal variations in antioxidant enzyme activity in ram seminal plasma. Theriogenology, 67, 1446–1454.

MAYORGA T. B., M. CAMARGO, A. P. CADAVID, C. MAYA, W. D. C. MAYA (2015): Oxidative stress: An imperfect cellular condition for sperm physiology? Rev. Chil. Obstet. Ginecol., 80, 486-492.

MEYERS, S. A. (2005): Spermatozoal response to osmotic stress. Anim. Reprod. Sci., 89, 57–64.

MEYERS, S. A. (2012): Cryostorage and oxidative stress in mammalian spermatozoa. In: Studies on Men's Health and Fertility. Humana Press – Springer, eds A. Agarwal, R. J. Aitken, J. G. Alvarez, 41-56.

MICHAEL, A. J., C. ALEXOPOULOS, E. A. PONTIKI, D. J. HADJIPAVLOU-LITINA, P. SARATSIS, H. N. VERVERIDIS, C. M. BOSCOS (2009): Effect of antioxidant supplementation in semen extenders on semen quality and reactive oxygen species of chilled canine spermatozoa. Anim. Reprod. Sci., 112, 119–135.

MISHRA, B., M. G. S. ALAM, M. A. M. Y. KHANDOKAR, S. MAZUMDER, M. N. MUNSI (2010): Qualities of Goat Semen in Tris-Citrate-Glucose Extender Containing Glutathione. The Bangladesh Veterinarian, 27, 46–55.

MISZTAL T., K. ROMANOWICZ, B. BARCIKOWSKI (2002): Effect of Melatonin on Daily LH Secretion in Intact and Ovariectomized Ewes During the Breeding Season. Anim. Reprod. Sci., 69, 187–198.

MITTAL P. K., M. ANAND, A. K. MADAN, S. YADAV, J. KUMAR (2014): Antioxidative capacity of vitamin E, vitamin C and their combination in cryopreserved Bhadavari bull semen. Veterinary World, 7, 1127-1131.

MOBINI, S., A. M. HEATH, D. G. PUGH (2002): Theriogenology of Sheep and Goats. In: Sheep and Goat Medicine, W.B. Saunders Company, ed D. G. Pugh, 129–186.

MORAN, J. M., L. MADEJÓN, C. ORTEGA FERRUSOLA, F. J. PEÑA (2008): Nitric oxide induces caspase activity in boar spermatozoa. Theriogenology, 70, 91-96.

MORRELL, J. M., A. JOHANNISSON, L. JUNTILLA, K. RYTTY, L. BACKGREN, A. –M. DALIN, H. RODRIGUEZ–MARTINEZ (2010): Stallion Sperm Viability, as Measured by the NucleoCounter SP – 100, is Affested by Exterder and Enhanced by Single Layer Cenrifugation. Vet. Med. Int., 2010, 659862.

MOAZZAMI, M., A. MEDRANO, F. GONZALEZ, F. CABRERA, M. BATISTA, A. GRACIA (2014): Effect of melatonin on buck semen quality during refrigeration at 5 ℃ for 48 h. Int. J. Zool. Res., 49, 123.

MUT-SALUD, N., P. J. ÁLVAREZ, J. M. GARRIDO, E. CARRASCO, A. ARÁNEGA, F. RODRÍGUEZ-SERRANO (2016): Antioxidant Intake and Antitumor Therapy: Toward Nutritional Recommendations for Optimal Results. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, Volume 2016, ID 6719534.

NEAGU, V. R., B. MARCÍAS GARCÍA, A. MORILLO RODRÍGUEZ, C. ORTEGA FERRUSOLA, J. M. GALLARDO BOLAÑOS, L. GONZÁLES FERNÁNDEZ, J. A. TAPIA, F. J. PEÑA (2011): Determination of Glutation Peroxidase and Superoxid Dismutase Activities in Canine Seminal Plasma ant its Relation with Sperm Quality and Lipid Peroxidation Post Thaw. Theriogenology, 75, 10–16.

NEILD, D., G. CHAVES, M. FLORES, N. MORA, M. BECONI, A. AGÜERO (1999): Hypoosmotic Test in Equine Spermatozoa. Theriogenology, 51, 721–727.

NOSRATI, R., M. M. GONG, M. C. SAN GABRIEL, A. ZINI, D. SINTON (2016): Paper - based sperm DNA integrity analysis. Anal. Methods, 8, 6260-6264.

NUTI, L.C., D. R. McWHINNEY (1987): Photoperiod Effects on Reproductive Parameters in Two Breeds of Dairy Goat Bucks. In Proceedings of 4th International Conference on Goat, Brazil, 2, 1508–1509.

ODHIAMBO, J. F., M. SUTOVSKY, J. M. DeJARNETTE, C. MARSHALL, P. SUTOVSKY (2011): Adoption of Ubiquitin – PNA Based Sperm Quality Assay for Semen Evaluation by a Conventional Flow Cytometer and a Dedicated Platform for Flow Cytometric Semen Analysis. Theriogenology, 76, 1168–1176.

OJEDA, M. L., F. NOGALES, B. VÁZQUEZ, M. J. DELGADO, M. L. MURILLO, O.CARRERAS (2009): Alcohol, gestation and breastfeeding: selenium as an antioxidant therapy. Alcohol Alcohol, 44, 272-277.

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.

PABLOS, M. I., J. M. GUERRERO, G. G. ORTIZ, M. T. AGAPITO, R. J. REITER (1997): Both melatonin and a putative nuclear melatonin receptor agonist CGP 52608 stimulate glutathione peroxidase and glutathione reductase activities in mouse brain in vivo. Neuro. Endocrinol. Lett., 18, 49–58.

PALACIN, I., J–A. ABECIA, F. FORCADA, A. Casao, J–A. CEBRIÁN, T. MUIÑO, C. PALACIOS, J. M. PONTES (2008): Effects of Exogenous Melatonin Treatment on Out–of-Season Ram Fertility. Ital. J. Anim. Sci., 7, 199–206.

PANG, Y. W., Y. Q. SUN, X. L. JIANG, Z. Q. HUANG, S. J. ZHAO, W. H. DU, H. S. HAO, X. M. ZHAO, H. B. ZHU (2016): Protective effects of melatonin on bovine sperm characteristics and subsequent in vitro embryo development. Mol. Reprod. Dev., 83, 993-1002.

PASQUALOTTO, F. F., R. K. SHARMA, D. R. NELSON, A. J. THOMAS, A. AGARWAL (2000): Relationship between oxidative stress, semen characteristics, and clinical diagnosis in men undergoing infertility investigation. Fertil. Steril., 73, 459-64.

PEÑA C., J. RINCON, A. PEDREANEZ, N. VIERA, J. MOSQUERA (2007): Chemotactic Effect of Melatonin on Leukocytes. J. Pineal. Res., 43, 263–269.

PEÑA, F. J., H. RODRÍGUEZ MATÍNEZ, J. A. TAPIA, C. ORTEGA FERRUSOLA, L. GONZÁLES FERNÁNDEZ, B. MACÍAS GARCÍA (2009): Mitochondria in mammalian sperm physiology and pathology: a review. Reprod. Domest. Anim. 44, 345–349.

PENITENTE-FILHO J. M., F. A. OLIVEIRA, C. R. JIMENEZ, E. CARRASCAL, J. C. DIAS, G. D. OLIVEIRA, R. G. SILVEIRA, C. O. SILVEIRA, C. A. TORRES (2014): Association of Vitamin E With Rapid Thawing on Goat Semen. Scientific World Journal, Volume 2014, 1-5.

PERSAENGIEV, S., J. KEHAJOVA (1991): Inhibitory action of melatonin and structurally related compounds on testosterone production by mouse Leydig cells in vitro. Cell Biochem. Funct., 9, 281–286.

PERUMAL, P., K. VUPRU, K. KHATE (2013): Effect of Addition of Melatonin on the Liquid Storage (5°C) of Mithum (Bos frontalis) Semen. Int. J. Zool., Volume 2013, 1-10.

PESCE, M., M. R. SERGI, A. RIZZUTO, R. TATANGELO, M. TOMMASI, L. PICCONI, M. BALSAMO, V. GATTA, L. STUPPIA, A. B. SIEGLING, E. GÖKÇEN, A. GRILLI, A. SAGGINO (2014): Associations between the antioxidant network and emotional intelligence: a preliminary study. PLOS One, 1, 9.

PETRUNKINA, A. M., R. PETZOLDT, A. STAHLBERG, J. PFEILSTICKER, M. BEYERBACH, H. BADER, E. TÖPFER–PETERSEN (2001): Sperm–cell Volumetrics Mesaurements as Parameters in Bull Semen Function Evaluation: Correlation with Non–return Rate. Andrologia, 33, 360–367.

PIZZORNO, J. (2014): Glutathione! J. Integr. Med., 13, 8–12.

POLGE, C., A. V. SMITH, A. S. PARKES (1949): Revival of Spermatozoa after Vitrification and Dehydration at Low Temperatures. Nature, 164, 166.

POMPELLA, A., A. CORTI (2015): Editorial: the Changing Faces of Glutathione, a Cellular Protagonist. Front. Pharmacol., 6.

QUINTERO–MORENO, A., T. RIGAU, J. E. RODRÍGUEZ–GILL (2004): Regression Analyses and Motile Sperm Subpopulation Structure Study as Improving Tools in Boar Semen Quality Analysis. Theriogenology, 61, 673–690.

QUINTERO–MORENO, A., J. RUBIO, D. GONZALEZ (2008): Estimating Cryodamage on Plasma Membrane Integrity in Bull Spermatozoa Using HOS–ENY test. Reprod. Domest. Anim., 43, 62.

RAMADAN, T. A., T. A. TAHA, M. A. SAMAK, A. HASSAN (2009): Effectiveness of exposure to longday followed by melatonin treatment on semen characteristics of Damascus male goats during breeding and non-breeding seasons. Theriogenology 71, 458-468.

RATHORE (1968): Effects on High Temperature on Sperm Morphology and Subsequent Fertility in Merino Sheep. Proceedings of the Australian Society of Animal Production, 7, 270–274.

REFSAL, K. R., D. A. SIMPSON, J. D. GUNTHER (1983): Testicular Degeneration in a Male Goat: a Case Report. Theriogenology, 19, 685–691.

REITER, R. J., D. X. TAN, C. OSUNA, E. GITTO (2000): Action of Melatonin in Reduction of Oxidative Stress. J. Biomed. Sci., 7, 444–58.

REITER, R. J., D. X. TAN, M. P. TERRON, LJ. FLORES, Z. CZARNOCKI (2007): Melatonin and its metabolites: new findings regarding their production and their radical scavenging actions. Acta. Biochim. Pol., 54, 1-9.

REITER, R. J., D. X. TAN, S. ROSALES - CORRAL, L. C. MANCHESTER (2013): The Universal Nature, Unequal Distribution and Antioxidant Functions of Melatonin and its Derivatives. Mini Reviews in Medical Chemistry, 13, 373–384.

RIBAS, V., C. GARZÍA–RUIZ, J. C. FERNÁNDEZ–CHECA (2014): Glutathione and Mitochondria. Front. Pharmacol., 5, 1–19.

ROB, E. L., C. A. CHRISTOFF, L. A. MADDALENA, J. A. STUART (2014): Mitohondrial Reactive Oxygen Species (ROS) in Animals Cell: Relevance to Aging and Normal Physiology. Can. J. Zool., 92, 603–613.

ROSA, H. J. D., M. J. BRYANT (2003): Seasonality of Reproduction in Sheep. Small Rumin. Res., 48, 155–171.

ROTA, A., N. PENZO, L. VINCENTI, R. MANTOVANI (2000): Hypoosmotic Swelling (HOS) as a Screening Assay for Testing in vitro Fertility of Bovine Spermatozoa. Theriogenology, 53, 1415–1420.

ROTA, A., V. BASTIANACCI, C. MAGELLI, D. PANZANI, F. CAMILLO (2010): Evaluation of Plasma Membrane Integrity of Donkey Spermatozoa. Reprod. Domest. Anim., 45, 228–233.

SAMARDŽIJA, M., D. ĐURIČIĆ, T. DOBRANIĆ, M. HERAK, S.VINCE (2010): Rasplođivanje ovaca i koza, Veterinarski fakultet Zagreb, ur. M. Samardžija i M. Poletto, 113.

SARABIA, L., I. MAURER, E. BUSTOS-OBERGON (2009): Melatonin prevents damage elicited by the organophosphorous pesticide diazinon on mouse sperm DNA. Ecotoxicol. Environ. Saf., 72, 663–668.

SARASWAT, S., S. K. JINDAL, R. PRIYADHARSINI, N. RAMACHANDRAN, S. YADAV, P. K. ROUT, S. D. KHARCHE, A. K. GOEL (2012): The effect of antioxidants supplementation to cryopreservation protocol on seminal attributes and sperm membrane characteristics in Sirohi goat. J. Physiol. Pharmacol., 2, 49-58.

SARASWAT, S., S. K. JINDAL, S. D. KHARCHE, P. K. ROUT, R. RANJAN, R. PRIYADHARSINI (2014): Role of antioxidant additives in the protection of DNA integrity of buck spermatozoa with RAPD assay. Indian J. Anim. Sci., 84, 295–297.

SATHE, S., C. F. SHIPLEY (2014): Applied Andrology in Sheep, Goats and Selected Cervids. In: Animal Andrology: Theories and Applications, CAB International, eds P. J. Chenoweth and S. P. Lorton, 226–253.

SETCHELL, B. P. (2014): Semen aon its Constituents. In: Animal Andrology: Theories and Applications, CAB International, eds P. J. Chenoweth and S. P. Lorton, 3–10.

SHARBATOGHLI, M., M. REZAZADEH VALOJERDI, M. H. BAHADORI, R. SALMAN YAZDI, L. R. GHALONO (2015): The Relationship between Seminal Melatonin with Sperm Parameters, DNA Fragmentation and Nuclear Maturity in Intra-Cytoplasmic Sperm Injection Candidates. Cell Journal, 17, 547-553.

SHARKEY, J.T., R. PUTTARAMU, R. A. WORD, J. OLCESE (2009): Melatonin Synergizes with Oxytocin to Enhance Contractility of Human Myometrial Smooth Muscle Cells. J. Clin. Endocrinol. Metab., 94, 421–427.

SHARMA, A. K., G. TANEJA, D. KHANNA, S. K. RAJPUT (2015): Reactive Oxygen Species: Friend or Foe? The Royal Society of Chemistry, 5, 57267.

SHEIKHELDIN, M. A., B. E. HOWLAND, W. M. PALMER (1992): Seasonal profiles of melatonin in adult rams. J. Pineal Res., 12, 58–63.

SICILIANO, L., V. MARCIANÓ, A. CARPINO (2008): Prostasome-like vesicles stimulate acrosome reaction of pig spermatozoa. Reprod. Biol. Endocrinol., 6, 5.

SILVA, S.V., A. T. SOARES, A. M. BATISTA, F. C. ALMEIDA, J. F. NUNES, C. A. PEIXOTO, M. M .P. GUERRA (2013): Vitamin E (Trolox) Addition to Tris–Egg Yolk Extender Preserves Ram Spermatozoon Structure and Kinematics after Kryopreservation. Anim. Reprod. Sci., 137, 37–44.

SIMONNEAUX, V., C. RIBELAYGA (2003): Generation of the Melatonin Endocrine Message in Mammals: A Review of the Complex Regulation of Melatonin Synthesis by Norepinephrine, Peptides, and Other Pineal Transmitters. Pharmacological Reviews, 55, 325–395.

SKALET, L. H., H. D. RODRIGUES, H. O. GOYAL, M. A. MALONEY, M. M. VIG, R. C. NOBLE (1988): Effects of Age And Season on the Type and Occurrence of

Sperm Abnormalities in Nubian Bucks. Am. J. Vet. Res., 49, 1284–1289.

SOMANI, S. M., K. HUSAIN (1997): Interaction of exercise training and chronic ethanol ingestion on antioxidant system of rat brain regions. J. Appl. Toxicol., 17, 329–36.

SOMANI, S. M., K. HUSAIN, E. C. SCHLORFF (1997): Response of antioxidant system to physical and chemical stress. In: Oxidants, Antioxidants and Free Radicals, eds S. Y. Baskin and H. Salem. Washington: CRC Taylor & Francis, 125–129.

SOUZA, W. L., E. A. MORAES, J. M. S. COSTA, P. H. F. SOUSA, E. S. LOPES JUNIOR, R. P. OLIVEIRA, R. TONIOLLI (2016): Effect of different concentrations of melatonin to ram spermatozoa on oxidative stress after cryopreservation. Pesqui. Vet. Bras., 36, 657-664.

SPERANZA, L., S. FRANCESCHELLI, M. PESCE, I. VINCIGUERRA, M. A. DE LUTIIS, A. GRILLI, M. FELACO, A. PATRUNO (2008): Phosphodiesterase type-5 inhibitor and oxidative stress. Int. J. Immunopathol. Pharmacol., 21, 879-889.

SPRECHER, D. J., P. H. COE, R. D. WALKER (1999): Relationships Among Seminal Culture, Seminal White Blood Cells and the Percentage of Primary Sperm Abnormalities in bulls evaluated Prior to the Breeding Season. Theriogenology, 51, 1197–1206.

SUCCU, S., F. BERLINGUER, V. PASCIU, V. SATTA, G. G. LEONI, S. NAITANA (2011): Melatonin Protects Ram Spermatozoa from Cryopreservation Injuries in a Dose -Dependent Manner. J. Pineal Res., 50, 310–318.

SULLIVAN, J. J. (1978): Morphology and Motility of Spermatozoa. In: Physiology of Reproduction and Artificial Insemination of Cattle, second edition, eds D. P. Salisbury, N. L. Van Demark, J. R. Lodge, W. H. Freeman Company, San Francisco, 286–328.

SURAI, P. F. (2002): Natural Antioxidants in Avian Nutrition and Reproduction. Notthingham University Press, Notthingham.

TAN, D. X., L. C. MANCHESTER, X. Y. LIU, S. A. ROSALES - CORRAL, D. ACUNA – CASTROVIEJO, R. J. REITER (2013): Mitochondria and Chloroplasts as the Original Sites of Melatonin Synthesis: a Hypothesis Related to Melatonin's Primary Function and Evolution in Eukaryotes. J. Pineal Res., 54, 127–138.

TARIQ, M., M. S. KHAN, M. G. SHAH, M. UMER, S. M. HASAN, A. RAHMAN, I. RABBANI (2015): Exogenous antioxidant inclusion during semen cryopreservation of farm animal. J. Chem. Pharm. Res., 7, 2273–2280.

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.

TORRES, L. L., N. B. QUAGLIO, G. T. DE SOUZA, R. T. GARCIA, L. M. DATI, W. L. MOREIRA, A. P. LOUREIRO, J. N. DE SOUZA-TALARICO, J. SMID, C. S.

PORTO, C. M. BOTTINO, R. NITRINI, S. B. BARROS, R. CAMARINI, T. MARCOURAKIS (2011): Peripheral oxidative stress biomarkers in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. J. Alzheimers. Dis., 26, 59-68.

VALKO, M., C. J. RHODES, J. MONCOL, M. IZAKOVIC, M. MAZUR (2006): Free Radicals, Metals and Antioxidants in Oxidative Stress-induced Cancer. Chemico–Biological Interactions, 160, 1-40.

WAHJUNINGSIH, S., A. RACHMAWATI (2012): The effect of α-tocopherol on plasma membrane Integrity of goat spermatozoa. Journal of Basic and Applied Scientific Research, 2, 8857-8860.

WAI–SUM, O., H. CHEN, P. H. CHOW (2006): Male Genital Tract Antioxidant Enzymes–Their Ability to Preserve Sperm DNA Integrity. Molecular and Cellular Endocrinology, 250, 80–83.

WARD, W. S., D. S. COFFEY (1991): DNA Packaging and Organization in Mammalian Spermatozoa: Comparison with Somatic Cells. Biol. Reprod., 44, 596– 574.

WATSON, P. F. (2000): The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. Anim. Reprod. Sci., 60–61, 481–492.

WHO laboratory manual for the Examination and processing of human semen, 5. izdanje, 138-9, World Health Organization, 2010.

ZARAZAGA, L. A., M. C. GATICA, I. CELI, J. L. GUZMÁN, B. MALPAUX (2010): Effect of Artificial Long Days and/or Melatonin Treatment on the Sexual Activity of Mediterranean Bucks. Small Rumin. Res., 93, 110–118.

9. POPIS KORIŠTENIH SKRAĆENICA

AAT - aspartat amino-transferaza

ALH - amplituda lateralnog otklona glave u odnosu na prosječnu putanju (engl. amplitude of lateral head displacement)

ATP – adenozin trifosfat

BCF –frekvencija prelaska pravolinijske putanje u sekundi (engl. beat cross frequency)

BSA - goveđi serumski albumin (engl. bovine serum albumin)

CASA – kompjuterski analizator sperme (engl. computer – assisted semen analysis)

CAT – katalaza (engl. catalase)

CuZnSOD - bakar-cink superoksid dismutaza

DHA - dokozaheksaenska kiselina (engl. docosahexaenoic acid)

DIF – engl. Diff - Quick

DMSO – dimetil sulfoksid

DNK – deoksiribonuklainska kiselina

ECG – konjski korionski gonadotropin (engl. equine chorionic gonadotropin)

EC-SOD - izvanstanična superoksid dismutaza

FAR - Farelly

FGA - Fluorogestone acetate

FITC - fluorescin – izotiocijanat

GnRH - gonadotropin-oslobađajući hormon (engl. gonadotropin-releasing hormone)

GSSG - oksidirani disulfidni glutation

GSH - glutation

GSH – Px – glutation peroksidaza

GSH - Px - glutation peroksidaza (engl. glutathione peroxidase)

GSH - Px1 - citosolna ili mitohondrijska glutation peroksidaza

GSH - Px2 - gastrointestinalna glutation peroksidaza

GSH - Px3 - plazmatska ili izvanstanična glutation peroksidaza

GSH - Px4 - fosfolipidna hidroperoksidna glutation peroksidaza

GSH - Px5 – epididimska glutation peroksidaza

GSH - Px6 – olfaktorna glutation peroksidaza

GSH - Px7 - neselenocisteinska fosfolipidna hidroperoksidna glutation peroksidaza

GSH - Px8 - glutation peroksidaza 8

GR – glutation reduktaza (engl. glutathione reductase)

H^+ - vodikov ion

HClO – hipoklorna kiselina

HEM - hemotoksilin

HNE - hidroksinonenal

H_2O_2 - vodikov peroksid

HOS – hipoosmotsko bubrenje (engl. hypoosmotic swelling)

LIN - indeks linearnosti (engl. linearity)

LH – luteinitirajući hormon

MDA - malondialdehid

MGZIN - modificirani GZIN

MnSOD - manganska superoksid dismutaza

$NADP^+$ - oksidirani oblik nikotinamidnog dinukleotida

NADPH - nikotinamid adenin dinukleotid fosfat

O_2^- - superoksid

OH – hidroksil radikal

PAF – trombocit – aktivirajući faktor (engl. platelet-activating factor)

PAP - brzi Papanicolaou

PAP+ - brzi Papanicolaou sa produženim vremenom bojanja

PGF2*α* – prostaglandin F2 alfa

PI - propidium jodid

PNA – lektini kikirikija (engl. peanut)

PNA - FITC - aglutinin iz kikirikija sa fluorescein izocijanat-om

PSA – lektini graška (engl. pease)

RAPD - test nasumične amplifikacije polimorfne DNK (engl. random amplified polymorphic DNA)

RCA – lektini ricinusa

RNS – reaktivni oblici dušika (engl. reactive nitrogen species)

ROS – reaktivni oblici kisika (engl. reactive oxygen species)

SCSA – engl. sperm cromatin structure assay

SOD – superoksid dismutaza

SPER - Spermac

STR – pravolinijski indeks (engl. straightness)

TFSF - ukupan broj spermija u ejakulatu (engl. total functional sperm fraction)

TSOD - ukupna superkosid dismutaza (engl. total superoxide dismutase)

VAP - prosječna brzina (engl. average path velocity)

VCL - krivolinijska brzina (engl. curvilinear velocity)

VSL - pravolinijska brzina (engl. straight-line velocity)

WHO – Svjetska zdravstvena organizacija (engl. World Health Organization)

WOB - indeks oscilacije (engl. wobble)

10. ŽIVOTOPIS

Velimir Berta je rođen 09. listopada 1979. godine u Varaždinu u Hrvatskoj. Osnovno i srednjoškolsko obrazovanje je završio u Varaždinu. Nakon završene Gimnazije – općeg smjera 1998. godine u Varaždinu upisuje Studij veterinarske medicine na Veterinarskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu koji završava 2006. godine. Iste godine je započeo s radom kao veterinar – pripravnik u Vetrerinarskoj stanici d.d. Varaždin. Od 2007. godine posjeduje Licenciju za samostalni rad veterinara, a 2008. godine polaže Državni stručni ispit za veterinarskog inspektora. Godine 2013. upisuje poslijediplomski doktorski studij Veterinarske znanosti. Od siječnja 2008. godine radi na radnom mjestu Upravitelja područne veterinarske ambulante, a od 2017. godine radi i na radnom mjestu Zamjenika voditelja sektora Veterinarska medicina u sklopu Veterinarske stanice d.d. Varaždin. Sudjelovao je na više domaćih i međunarodnih kongresa i simpozija te se nekoliko puta usavršavao u inozemstvu. Oženjen je i otac jednog djeteta.

Popis radova

Znanstveni i pregledni radovi u časopisima:

ŽURA ŽAJA, I., S. VINCE, S. MILINKOVIĆ-TUR, N. POLJIČAK MILAS, M. SAMARDŽIJA, H. VALPOTIĆ, V. BERTA, M. VILIĆ, K. RAKIĆ (2018): Exogenous melatonin influences distribution of French Alpine buck spermatozoa in morphometrically distinct subpopulations during the non-breeding season. Animal reproduction science, 192, 154-163.

VINCE, S., H. VALPOTIĆ, V. BERTA, S. MILINKOVIĆ-TUR, M. SAMARDŽIJA, J. GRIZELJ, B. ŠPOLJARIĆ, D. ĐURIČIĆ, I. NAZANSKY, I. ŽURA-ŽAJA (2017): Monitoring of libido and semen quality parameters in melatonin-treated French alpine bucks during the non-breeding season. , 52, 6, 953-961.

ĐURIČIĆ, D., S. VINCE, H. VALPOTIĆ, I. ŽURA-ŽAJA, R. TURK, M. LOJKIĆ, I. GETZ, V. BERTA, M. SAMARDŽIJA (2017): The onset of puberty in Cameroon Dwarf goats kept as pets in northwester Croatia. , 52, 2, 278-282.

VINCE, S., M PLATIŠA, J. GRIZELJ, B. ŠPOLJARIĆ. D. ĐURIČIĆ, F. SAMARTZI, H.

VALPOTIĆ, V. BERTA, N. ROŠIĆ, B. STOJANOV, M. SAMARDŽIJA (2017): Određivanje fizioloških posebnosti spolnog ciklusa i rasplodne sezone u ovaca pasmine lička pramenka. Veterinarska stanica, 48, 1, 13-24.

VINCE, S., J. GRIZELJ, M. SAMARDŽIJA, B. ŠPOLJARIĆ, V. BERTA, N. ROŠIĆ, D. JURKOVIĆ (2016): Dijagnostika i liječenje pseudogravidnosti u koza. Veterinarska stanica, 47, 2, 151-160.

Znanstveni radovi u zbornicima skupova:

ŽURA-ŽAJA, I., A. OGNJENOVIĆ, V. BERTA, S. MILINKOVIĆ-TUR, M. SAMARDŽIJA, V. NAZANSKY, I. NAZANSKY, H. VALPOTIĆ, B. ŠPOLJARIĆ, S. VINCE (2016): Utjecaj egzogenog melatonina na standardne pokazatelje kakvoće sjemena jarčeva izvan resplodne sezone. Zbornik radova 6. hrvatskog veterinarskog kongresa, Opatija, Hrvatska, 281-291.

Stručni radovi u zbornicima skupova:

SLUGANOVIĆ, A., S. STRELEC, I. ŽURA-ŽAJA, M. SAMARDŽIJA, S. VINCE, D. ĐURIČIĆ, J. PEJAKOVIĆ HLEDE, V. BERTA, S. MILINKOVIĆ-TUR (2016): Standardne procjene ejakulata nerasta. Zbornik radova 6. hrvatskog veterinarskog kongresa, Opatija, Hrvatska, 535-541.

Sažeci u zbornicima i časopisima:

VINCE, S., I. ŽURA-ŽAJA, K. RAKIĆ, V. BERTA, B. ŠPOLJARIĆ, I. BUTKOVIĆ, A. SLUGANOVIĆ, I. NAZANSKY, H. VALPOTIĆ, N. POLJIČAK MILAS, S. MILINKOVIĆ-TUR (2017): Spermatoztoa subpopulations in buck based on head and tail morphometric parameters. Zbornik sažetaka radova 7. međunarodnog kongresa, Veterinarska znanost i struka, Zagreb, Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 69-69.

ŽURA-ŽAJA, I., S. VINCE, K. RAKIĆ, V. BERTA, M. SAMARDŽIJA, N. POLJIČAK MILAS, M. KARDUM, S. STRELEC, M. VILIĆ, V. NAZANSKY, S. MILINKOVIĆ-TUR (2017): Association of spermatozoa morphometric characteristics with age of bucks and proportion of motile spermatozoa in ejaculate. Zbornik sažetaka radova 7. međunarodnog kongresa Veterinarska znanost i struka, Zagreb, Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 70-70.