UČINAK RADIOFREKVENCIJSKOG ELEKTROMAGNETSKOG ZRAČENJA NA POKAZATELJE KAKVOĆE, ANTIOKSIDACIJSKI STATUS I OŠTEĆENJE DNK-A IN VITRO OZRAČENOG SJEMENA RASPLODNIH NERASTA

Butković, Ivan

Doctoral thesis / Disertacija

2021

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:178:516003

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

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

Repository / Repozitorij:

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

DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Sveučilište u Zagrebu

VETERINARSKI FAKULTET

IVAN BUTKOVIĆ

UČINAK RADIOFREKVENCIJSKOG ELEKTROMAGNETSKOG ZRAČENJA NA POKAZATELJE KAKVOĆE, ANTIOKSIDACIJSKI STATUS I OŠTEĆENJE DNK-A *IN VITRO* OZRAČENOG SJEMENA RASPLODNIH NERASTA

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2021.

University of Zagreb

FACULTY OF VETERINARY MEDICINE

IVAN BUTKOVIĆ

EFFECT OF RADIOFREQUENCY ELECTROMAGNETIC RADIATION ON INDICATORS OF QUALITY, ANTIOXIDANT STATUS AND DNA DAMAGE OF *IN VITRO* IRRADIATED SEMEN OF BREEDING BOARS

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2021

Sveučilište u Zagrebu

VETERINARSKI FAKULTET

IVAN BUTKOVIĆ

UČINAK RADIOFREKVENCIJSKOG ELEKTROMAGNETSKOG ZRAČENJA NA POKAZATELJE KAKVOĆE, ANTIOKSIDACIJSKI STATUS I OŠTEĆENJE DNK-A *IN VITRO* OZRAČENOG SJEMENA RASPLODNIH NERASTA

DOKTORSKI RAD

Mentori:

izv. prof. dr. sc. Ivan Folnožić

doc. dr. sc. Ivona Žura Žaja

Zagreb, 2021.

University of Zagreb

FACULTY OF VETERINARY MEDICINE

IVAN BUTKOVIĆ

EFFECT OF RADIOFREQUENCY ELECTROMAGNETIC RADIATION ON INDICATORS OF QUALITY, ANTIOXIDANT STATUS AND DNA DAMAGE OF *IN VITRO* IRRADIATED SEMEN OF BREEDING BOARS

DOCTORAL THESIS

Supervisors:

associate professor Ivan Folnožić

assistant professor Ivona Žura Žaja

Zagreb, 2021

Sveučilište u Zagrebu

VETERINARSKI FAKULTET

I Z J A V A

Ja, Ivan Butković, 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, 2021.

Zahvaljujem svojim mentorima izv. prof. dr. sc. Ivanu Folnožiću te doc. dr. sc. Ivoni Žuri Žaji na pomoći, trudu i vremenu koje su mi pružili prilikom izrade ove doktorske disertacije.

Zahvaljujem se kolegi Velimiru Berti i prof. Marinku Viliću bez čije pomoći ovaj rad ne bi bilo moguće izraditi.

Zahvaljujem se svim kolegama Klinike za porodništvo i reprodukciju na potpori koju su mi pružali tijekom cijelog perioda izrade ovog rada.

Zahvaljujem se Veterinarskoj stanici d.o.o. Ozalj.

Posebno se zahvaljujem svojoj obitelj na podršci i bezkompromisnoj pomoći.

Najiskrenije hvala mojoj zaručnici Eriki na strpljenju, razumijevanju i savjetovanju tijekom izrade ovog rada.

SAŽETAK

Dosadašnja istraživanja o učinku radiofrekvencijskog elektromagnetskog zračenja (RF-EMZ) na muški reproduktivni sustav osobito u ljudi temelje se na modernoj tehnologiji koja je u svakodnevnoj upotrebi. Biološki učinci zračenja na organizam/stanice su različiti, a ovise o frekvenciji zračenja te dugotrajnosti izlaganja. Potencijalno negativni utjecaji EMZ-a većih frekvencija od 2500 MHz do sada nisu istraživana na uzorcima sperme ljudi i životinja. Nadalje, u dostupnoj literaturi nema podataka o učinku RF-EMZ-a na pokazatelje antioksidacijske zaštite i vitalnosti spermija te strukturnu stabilnosti kromatina spermija *in vitro* ozračenoga sjemena rasplodnih nerasta. Jedino je istraživan učinak RF-EMZ-a vrlo male frekvencije 50 MHz na pokazatelje gibljivosti i brzine spermija nerasta.

Cilj ovog istraživanja bio je istražiti učinak elektromagnetskog zračenja na pokazatelje vitalnosti, gibljivosti i brzine spermija, pokazatelje antioksidacijske zaštite te strukturnu stabilnosti kromatina spermija *in vitro* ozračenoga sjemena rasplodnih nerasta. Također, cilj je bio utvrditi ovisi li učinak kontinuiranog neionizirajućeg elektromagnetskog zračenja o frekvenciji zračenja na prethodno spomenute pokazatelje.

Uzimanje uzoraka, ozračivanje te analize sjemena provele su se u tri razdoblja radi lakše provedbe istraživanja. U svakom od tri razdoblja, uzorkovani su uzorci sperme 12 rasplodnih nerasta pasmine pietrain i landras, starosti od 1,5 do 3,5 godina. Svježe razrijeđeno sjeme svakog nerasta razdijelilo se u kontrolni uzorak (n = 12) te pokusni uzorak (n = 12) koji je bio ozračen. Pokusni su uzorci bili ozračeni s tri različita tretmana izlaganja kontinuiranom neionizirajućem elektromagnetskom zračenju različite frekvencije. U prvom razdoblju uzorci svježeg razrijeđenog sjemena su bili ozračeni s frekvencijom od 700 MHz, u drugom s 2500 MHz, a u trećem s 3500 MHz pri jakosti elektromagnetskog polja od 10 V/m u trajanju od 2 sata pomoću gigahercne transverzalne elektromagnetske komore. Sveukupno je uzorkovano 36 uzoraka sperme za sva tri pokusna razdoblja što u konačnici predstavlja broj od 72 uzorka gdje 36 čine kontrolne a 36 pokusne uzorke. U uzorcima ozračenog i neozračenog sjemena određivani su pokazatelji gibljivost i brzine spermija pomoću kompjuterske analize spermija, udio oštećenja stanične i akrosomske membrane, oštećenje DNK-a te oštećenje i depolarizacija mitohondrija pomoću specifičnih metoda bojenja. U staničnim lizatima spermija na automatskom biokemijskom analizatoru određene su aktivnosti glutation reduktaze, glutation

peroksidaze, ukupne superoksid dismutaze, koncentracija ukupnog antioksidacijskog statusa te malondialdehida.

U ukupno svim ozračenim uzorcima sperme utvrđeno je statistički značajno manji udio gibljivih, progresivno gibljivih i brzih spermija te spermija pravolinijskog indeksa, indeksa linearnosti i indeksa oscilacije u odnosu na kontrolnu skupinu uzoraka. Najveći pad u udjelu progresivno gibljivih spermija, u odnosu na kontrolnu skupinu, zabilježen je u uzorcima ozračenima sa 700 MHz te s 2500 MHz dok je nešto manji pad zabilježen u uzorcima ozračenima s 3500 MHz. U uzorcima sperme ozračenima s 2500 MHz zabilježen je značajan pad u udjelu progresivno gibljivih spermija, u udjelu spermija pravolinijskog indeksa, u udjelu indeksa linearnosti, u vrijednostima pravolinijske brzine spermija i frekvenciji prelaska pravolinijske putanje u odnosu na neozračene uzorke. Značajan pad u udjelu progresivno gibljivih i brzih spermija, u udjelu indeksa oscilacije, u vrijednostima pravolinijske brzine spermija zabilježen je u uzorcima ozračenima sa 700 MHz u odnosu na neozračene uzorke. Statistički značajno veći udio spermija s oštećenjem DNK-a utvrđen je u ukupno svim ozračenim uzorcima, u odnosu na kontrolne skupine uzoraka. Najveći porast u udjelu spermija s oštećenjem DNK-a zabilježen je u uzorcima ozračenima s 2500 MHz, a nešto je manji porast zabilježen u uzorcima ozračenima s 3500 MHz u odnosu na neozračene uzorke. Vrijednosti pokazatelja antioksidacijskog statusa spermija nisu se statistički značajno razlikovale u ozračenim i neozračenim uzorcima sperme nerasta.

Prema dobivenim rezultatima može se zaključiti da RF-EMZ ima negativan učinak na pokazatelje gibljivosti i brzine spermija te na strukturnu stabilnosti kromatina spermija *in vitro* ozračenoga sjemena rasplodnih nerasta. Učinak RF-EMZ-a na prethodno spomenute pokazatelje značajno ovisi o frekvenciji zračenja. Najštetniji učinak na pokazatelje gibljivosti i brzine spermija te na strukturnu stabilnosti kromatina spermija utvrđen je u uzorcima ozračenima s 2500 MHz. Elektromagnetsko zračenje nema značajnog učinak na pokazatelje pokazatelje antioksidacijske zaštite spermija *in vitro* ozračenoga sjemena rasplodnih nerasta.

Ključne riječi: neionizrajuće elektromagnetsko zračenje, sjeme nerasta, pokazatelji vitalnosti, pokazatelji gibljivosti i brzine spermija, antioksidacijski status, oštećenje DNK-a

SUMMARY

With the development of modern technology, there is an increasing exposure of organisms to artificially created electromagnetic fields. The presence of different frequencies from non-ionizing radiation field of anthropogenic origin (radio communication systems, mobile phones, microwave ovens, sources from the field of wireless communication system in the environment) is known as electromagnetic smog or electrosmog. Also, with the development of modern technology, public interest in the potential negative effects of electromagnetic radiation (EMR) has increased as the number of users increases daily, especially those of younger age who are most exposed.

Public concern about the impact of EMR on health is controversial. One of perhaps the greatest threats to humanity today is electromagnetic pollution in the environment due to its cumulative effect over a long period of time. In addition, the negative effects of electromagnetic pollution are often not recognized but are associated with other factors such as stress, hereditary traits or diet.

Biological effects can be direct that occur when radiation acts on mitochondrial DNA, indirect that occur due to the effect of radiation on water within the cell itself and somatic that occur on an irradiated individual while genetic effects can occur and be transmitted genetically to offspring.

The majority of research has focused on the negative impact of radiofrequency electromagnetic radiation (RF-EMR) on the male reproductive system, especially humans, while data on the effect of RF-EMR on the reproductive system of male domestic animals are scarce. Currently known data indicate that due to exposure to EMR, there may be a decrease in sperm motility, DNA damage and the creation of excessive amounts of reactive oxygen species or oxidative stress. However, the potentially negative effects of EMRs of higher frequencies (higher than 2500 MHz) have not been investigated on human and animal ejaculates so far. Also, so far there is no data on the effect of RF-EMR on antioxidant protection indicators and vitality of sperm and the structural stability of sperm chromatin *in vitro* irradiated semen of breeding boars. Only the effect of RF-EMR of very low frequency, 50 MHz, on sperm motility and velocity parameters of boars was investigated.

The aim of this study was to investigate the effect of electromagnetic radiation on sperm vitality, motility and velocity indicators, antioxidant protection indicators and structural stability of sperm chromatin *in vitro* irradiated semen of breeding boars. Also, the aim was to determine whether the effect of continuous non-ionizing electromagnetic radiation depends on the frequency of radiation on the previously mentioned indicators.

The hypothesis of the research is that there is a negative effect of electromagnetic radiation on the quality of boar semen and on the indicators of antioxidant protection and on the structural stability of sperm chromatin. Also, it is assumed that lower frequencies of radio frequency electromagnetic radiation can also have a negative effect on the aforementioned indicators.

The research was performed on ejaculate samples of 8 breeding boars of the pietren breed and 4 breeding boars of the German Landrace breed, aged from 1,5 to 3,5 years, which were obtained by manual fixation of the penis. To make the research easier to conduct, sampling and irradiation of sperm semen were carried out in three periods, each period lasting one week. In each of the three periods, ejaculates of 12 breeding boars were sampled. After sampling of the ejaculates, their volume, 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, and for determining morphologically normal and pathologic forms of spermatozoa a commercial staining set Spermac was used. Freshly diluted semen of each boar were divided into a control sample (n = 12) and a test sample (n = 12) that was irradiated.

The test samples were irradiated with three different treatments of exposure to continuous non-ionizing electromagnetic radiation of different frequencies. In the first period, test samples of fresh diluted semen were irradiated with a frequency of 700 MHz, in the second with 2500 MHz and in the third with 3500 MHz at an electromagnetic field strength of 10 V / m for 2 hours using gigahertz transverse electromagnetic (HCTEM) chamber made at the Department of Communication and Space Technologies, Faculty of Electrical Engineering and Computing, University of Zagreb. In addition to the HCTEM irradiation chamber, an HP 8657A signal generator and an RFGA0101-05 linear amplifier were used to obtain higher electromagnetic field strengths. In the samples of irradiated and non-irradiated semen, the indicators of motility (sperm motility, progressive motility) and sperm velocity indicators were determined (curvilinear velocity - VCL, straight-line velocity - VSL, average path velocity -

VAP, amplitude of lateral head displacement - ALH, linearity - LIN, wobble - WOB, straightness - STR, beat cross frequency - BCF) using computer assisted sperm analyzer.

Furthermore, in the samples of irradiated and non-irradiated semen, the proportion of sperm with cell and acrosomal membrane damage, the proportion of sperm with damage and depolarization of mitochondria using PI/SYBR-14 LIVE/DEAD with JC-1 and the proportion of sperm with DNA damage were determined using Halomax DNA Fragmetation Test. Part of the experimental and control samples after irradiation were centrifuged at 21 ° C for 15 minutes at 2400 g. The supernatants from both groups were taken by pipette, and the remaining spermatozoa were washed three times with saline and after each washing they were centrifuged for 5 minutes at 500 g and soon after that preserved to - 80 ° C in the freezer until analyzed. After thawing the sperm samples, cell lysates were prepared. The activities of glutathione reductase, glutathione peroxidase, total superoxide dismutase and the concentration of total antioxidant status, as well as the concentration of malondialdehyde by the Grotto method were determined in the cell supernatants lysates by commercial kits of the company "Randox Laboratories" on an automatic biochemical analyzer.

In all irradiated samples, a statistically significantly lower share of motile, progressively motile, rapid sperm count, straightness, linearity and wobble index, was found in relation to the control group of ejaculate. Furthermore, in all irradiated ejaculates, a statistically significantly higher proportion of medium-fast and immobile sperm was recorded compared to the control group of ejaculates. Likewise, all irradiated ejaculates had, compared to the control group of ejaculates, statistically significantly lower values of straight-line and average path velocity.

The largest decrease in the proportion of progressive sperm motility, compared to the control group, was recorded in ejaculates irradiated with 700 MHz ($p<0,001$) and 2500 MHz ($p<0,001$) while a slightly smaller decrease was recorded in ejaculates irradiated with 3500 MHz ($p<0,05$). In ejaculates irradiated with 2500 MHz, a significant decrease was recorded in the share of progressive sperm motility, in the share of the straightness, in the share of the linearity index, in the values of the straight-line velocity and the beat cross frequency.

A significant decrease in the share of progressively motile and rapid sperm, in the share of wobble index, in the values of straight-line velocity was recorded in ejaculates irradiated with 700 MHz in relation to non-irradiated ejaculates. Furthermore, in ejaculates irradiated

with 700 MHz, a simultaneous increase in the proportion of medium-fast sperm and slow sperm was recorded ($p<0,05$).

The largest increase in the proportion of sperm with DNA damage was recorded in ejaculates irradiated with 2500 MHz ($p <0,01$) and a slightly smaller increase was recorded in ejaculates irradiated with 3500 MHz ($p<0,05$) compared to non-irradiated ejaculates. A negative correlation was found between DNA damage with almost all investigated indicators of sperm velocity (VAP, VCL, ALH, BCF, STR and LIN). A significantly higher proportion of sperm with damaged membrane and good mitochondrial potential was recorded in ejaculates irradiated with 3500 MHz.

Although there was an increase in the sum of the proportion of sperm with damaged membrane and / or low mitochondrial potential in all irradiated ejaculates, depending on and independent of the radiation frequency, the difference was not statistically significant. The values of sperm antioxidant status indicators did not differ statistically significantly in irradiated and non-irradiated boar ejaculates.

According to the results of this study, it can be concluded that RF-EMR has a negative effect on sperm motility, velocity indicators and on the structural stability of sperm chromatin *in vitro* irradiated semen of breeding boars. The negative effect of RF-EMR on indicators of sperm motility and velocity sperm of breeding boar ejaculates was manifested in a significant decline: the share of motile, progressively motile and rapid sperm, average path velocity and straight-line velocity values and linearity and wobble values. The effect of RF-EMR on the aforementioned indicators significantly depends on the radiation frequency. The most harmful effect on sperm motility, velocity indicators and on the structural stability of sperm chromatin was found in ejaculates irradiated with 2500 MHz.

The established negative correlation between DNA damage of irradiated boar sperm with almost all investigated indicators of sperm velocity indicates that irradiated sperm with DNA damage had a lower velocity.

The negative effect of RF-EMR with a frequency of 2500 MHz on the indicators of motility and sperm velocity of irradiated ejaculates was recorded in a significant decline: the proportion of progressively motile sperm, the proportion of straightness index, linearity index, values of straight-line velocity and beat cross frequency index.

The effect of RF-EMR on irradiated ejaculates, depending on and independent of the radiation frequency, is manifested by an increase in the proportion of sperm with damaged membrane and / or low mitochondrial potential compared to non-irradiated ejaculates.

RF-EMR has no significant effect on the indicators of antioxidant protection of sperm *in vitro* irradiated semen of breeding boars.

Key words: non-ionizing electromagnetic radiation, boar semen, vitality indicators, sperm motility and velocity indicators, antioxidant status, DNA damage

SADRŽAJ

1. UVOD ... 1
2. PREGLED DOSADAŠNJIH SPOZNAJA ... 3
2.1. REPRODUKTIVNI SUSTAV NERASTA ... 3
2.1.1. SPERMATOGENEZA ... 6
2.2. UZIMANJE UZORKA SPERME NERASTA ... 9
2.3. OCJENA UZORKA SPERME ... 10
2.3.1. MAKROSKOPSKA OCJENA SPERME ... 11
2.3.2. MIKROSKOPSKA OCJENA SPERME ... 12
2.3.2.1. OCJENA GIBLJIVOSTI SPERMIJA ... 12
2.3.2.2. OCJENA KONCENTRACIJE ... 13
2.3.2.3. OCJENA INTEGRITETA STANIČNE MEMBRANE SPERMIJA ... 15
2.3.2.4. OCJENA MITOHONDRIJSKOG STATUSA ... 16
2.3.2.5. PROCJENA OŠTEĆENJA DNK-A / STRUKTURNE STABILNOSTI KROMATINA ... 17
2.4. RAZRJEĐIVANJE I KONZERVIRANJE SPERME ... 17
2.5. NOVE METODE PROCJENE KVALITETE SJEMENA NERASTA ... 19
2.5.1. PROTOČNA CITOMETRIJA ... 20
2.6. REAKTIVNI KISIKOVI SPOJEVI I OKSIDACIJSKI STRES ... 21
2.6.1. LIPIDNA PEROKSIDACIJA ... 25
2.7. ANTIOKSIDACIJSKI ZAŠTITNI MEHANIZMI ... 27
2.7.1. ENZIMATSKI ANTIOKSIDACIJSKI ZAŠTITNI MEHANIZMI ... 28
2.7.1.1. SUPEROKSID DISMUTAZA ... 28
2.7.1.2. GLUTATION PEROKSIDAZA ... 29
2.7.1.3. GLUTATION REDUKTAZA ... 30
2.7.1.4. UKUPNI ANTIOKSIDACIJSKI STATUS ... 31
2.8. ELEKTROMAGNETSKO ZRAČENJE ... 31
3. OBRAZLOŽENJE TEME ... 37
4. MATERIJAL I METODE ISTRAŽIVANJA ... 39
4.1. ŽIVOTINJE, SMJEŠTAJ I HRANIDBA ... 40
4.2. DIZAJN POKUSA I POSTUPCI SA ŽIVOTINJAMA ... 42
4.3. POLUČIVANJE I POSTUPAK SA SPERMOM ... 43
4.3.1. POLUČIVANJE SPERME ... 43

4.3.2. POSTUPAK SA SPERMOM I STANDARDNA OCJENA SPERME 44
4.3.3. RAZRJEĐENJE UZORKA SPERME 44
4.4. IZLAGANJE UZORAKA RADIOFREKVENCIJSKOM ELEKTROMAGNETSKOM ZRAČENJU U LABORATORIJSKIM UVJETIMA 44
4.5. OCJENA UZORKA NAKON OZRAČIVANJA 48
4.5.1. RAČUNALNO POTPOMOGNUTA ANALIZA SPERMIJA – CASA..... 48
4.5.2. PROCJENE INTEGRITETA STANIČNE MEMBRANE SPERMIJA 50
4.5.3. PROCJENA OŠTEĆENJA DNK-A / STRUKTURNE STABILNOSTI KROMATINA 51
4.6. BIOKEMIJSKA ANALIZA UZORAKA 52
4.6.1. ODREĐIVANJE POKAZATELJA ANTIOKSIDACIJSKOG STATUSA 53
4.6.1.1. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE UKUPNOG ANTIOKSIDACIJSKOG STATUSA 53
4.6.1.2. AKTIVNOST GLUTATION PEROKSIDAZE 53
4.6.1.3. AKTIVNOST UKUPNE SUPEROKSID DISMUTAZE 54
4.6.1.4. AKTIVNOST GLUTATION REDUKTAZE 54
4.6.2. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE MALONDIALDEHIDA 54
4.6.3. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE BJELANČEVINA 55
4.7. STATISTIČKA OBRADA REZULTATA 56
5. REZULTATI 57
5.1. PRIKAZ DESKRIPTIVNIH PODATAKA RAZLIČITIH POKAZATELJA 57
5.2. POKAZATELJI GIBLJIVOSTI SPERMIJA 59
5.3. POKAZATELJI VITALNOSTI SPERMIJA 68
5.4. POKAZATELJI ANTIOKSIDACIJSKOG STATUSA SPERMIJA 73
5.5. ODNOSI IZMEĐU POKAZATELJA GIBLJIVOSTI, BRZINE, KVALITETE I ANTIOKSIDACIJSKIH POKAZATELJA SPERMIJA NERASTA 78
6. RASPRAVA 85
6.1. POKAZATELJI GIBLJIVOSTI SPERMIJA 86
6.2. POKAZATELJI VITALNOSTI SPERMIJA 90
6.3. POKAZATELJI ANTIOKSIDACIJSKOG STATUSA 92
7. ZAKLJUČCI 94
8. POPIS LITERATURE 95
9. POPIS KORIŠTENIH SKRAĆENICA 130

10. ŽIVOTOPIS 132
POPIS OBJAVLJENIH ZNANSTVENIH RADOVA 133

1. UVOD

Teško je zamisliti svakodnevni život bez suvremene tehnologije. Razvojem moderne tehnologije dolazi do sve veće izloženosti umjetno stvorenim elektromagnetskim poljima. Elektromagnetsko zračenje (EMZ) se može definirati kao prijenos energije u obliku elektromagnetskih valova koji se šire zrakopraznim prostorom brzinom svjetlosti. Ionizirajuće zračenje nosi veliku energiju (iznad 30 PHz) te može ionizirati atome i molekule pri prolasku kroz tvari. EMZ nižih frekvencija od 30 PHz nema dovoljnu energiju za ionizaciju atoma te se još naziva neionizirajuće elektromagnetsko zračenje, a sastoji se od radiofrekvencijskog i optičkog dijela. Radiofrekvencijski spektar zauzima područje frekvencije od 0 - 300 GHz, te je prema Međunarodnoj Telekomunikacijskoj Uniji (engl. *International Telecommunication Union* - ITU) podijeljen na područja ekstremno dugog vala i područja ekstremno kratkog vala. Prisutnost različitih frekvencija iz područja neionizirajućeg zračenja antropogenog podrijetla (radiokomunikacijski sustavi, mobilni telefoni, mikrovalne pećnice, izvori iz područja bežičnog komunikacijskog sustava u okolišu) poznat je pod pojmom elektromagnetski smog ili elektrosmog (SAEFL, 2005.; POLJAK, 2006.).

Zabrinutost javnosti o utjecaju EMZ-a na zdravlje ljudi izaziva sve veću medijsku pažnju. Usporedno sa zabrinutošću raste ovisnost o modernoj tehnologiji bez koje je nemoguće zamisliti svakodnevni život. Paradoks je uvjetovanost o tehnologiji koja je glavni izvor EMZ-a. Jedna od možda najvećih prijetnji čovječanstvu danas je elektromagnetsko zagađenje u okolišu zbog kumulativnog učinka kroz duže vremensko razdoblje. Osim toga, negativni učinci elektromagnetskog zagađenja se često ne prepoznaju nego se najčešće dovode u vezu s drugim čimbenicima kao što su stres, nasljedne osobine ili prehrana (TROŠČIĆ i sur, 2014.). Agencija za istraživanje karcinoma Svjetske zdravstvene organizacije je na temelju korelacije utjecaja zračenja i pojavnosti glioma klasificirala elektromagnetska zračenja u kategoriju 2B odnosno potencijalno kancerogena za ljude (CARDIS i sur., 2010.). Razvojem tehnologije poraslo je zanimanje javnosti za potencijalni negativni učinak EMZ-a s obzirom da se broj korisnika svakodnevno povećava, pogotovo onih mlađe životne dobi koja su najizloženija (LANGER i sur., 2017.). Biološki učinci radiofrekvencijskog elektromagnetskog zračenja (RF-EMZ) mogu biti toplinski i netoplinski. Toplinski učinci se manifestiraju porastom temperature zbog prijenosa energije (KIVRAK i sur., 2017.), a netoplinski učinci izazivaju kontroverze zbog nemogućnosti isključivanja drugih čimbenika koji mogu djelovati na zdravlje organizma. Najčešći simptomi netoplinskih učinaka su promjena moždane aktivnosti, poremećaj

pamćenja, gubitak koncentracije, depresija, nepravilnosti rada srca te elektroosjetljivost (SAEFL, 2005.; MILEUSNIĆ, 2006.; RÖÖSLI, 2008.). Netoplinski učinci RF-EMZ-a zabilježeni su na brojnim vrstama životinja u prirodi, uključujući ptice (BALMORI, 2005.), vodozemce (BALMORI, 2010.), kukce (EVANS i sur., 2017.), ribe (IBRAHEIM i sur, 2013.) i sisavce (MAILANKOT i sur., 2009.). Biološki učinci također mogu biti: direktni koji nastaju kada zračenje djeluje na mitohondrijsku DNK-a koja sadrži genetske upute za specifični biološki razvoj (XU i sur., 2010.), indirektni koji nastaju zbog djelovanja zračenja na vodu unutar same stanice (RAVANAT i sur., 2001.) te somatski koji se javljaju na ozračenom pojedincu dok se genetski učinci mogu pojaviti i prenijeti genskom uputom na potomstvo (CRNEK-KUNSTELJ, 2003.).

Velika većina dosadašnjih istraživanja usmjerena je na negativni utjecaj EMZ-a na reproduktivni sustav ljudi (FALZONE i sur., 2011.; ALTUN i sur., 2018.). Istraživanje provedeno na klinici za neplodnost na 361 ispitaniku pokazalo je da muškarci koji koriste mobilne uređaje više od dva sata dnevno, imaju pojavnost značajnog smanjenja ukupnog broja spermija, gibljivosti, udjela živih spermija te udjela morfološki normalnih spermija u uzorku sperme (AGARWAL i sur., 2008.). Reproduktivna toksičnost radiofrekvencijskih polja očituje se klinički (testikularna oštećenja), patofiziološki (patološka spermatogeneza/oogeneza) i biokemijski (promjene u serumskim razinama spolnih hormona) (POPLAŠEN i sur., 2015.).

U dostupnoj literaturi postoje oskudni podatci o učincima EMZ-a na muški reproduktivni sustav u životinja. Primjerice, poznato je da štakori izloženih RF-EMZ-u frekvencije od 10 GHz dva sata dnevno tijekom 35 dana imaju smanjenu proizvodnju spermija (KESARI i sur., 2011.). Neplodnost štakora se dovodi u vezu sa stvaranjem prevelike količine reaktivnih kisikovi radikala, smanjenom aktivnosti antioksidacijskih enzima, razaranjem DNK-a lanca, patološkom morfologijom spermija i smanjenom koncentracijom testosterona (KESARI i sur., 2011.). Nadalje, sperma bika *in vitro* ozračena frekvencijom od 1800 GHz očituje značajan porast gibljivosti spermija kratkotrajnim izlaganjem, dok duža izloženost sperme navedenom EMZ-u uzrokuje pad gibljivosti spermija (LUKAC i sur., 2011.). Prema našem saznanju u dostupnoj literaturi, jedino je istraživan učinak RF-EMZ-a vrlo male frekvencije od 50 MHz na pokazatelje gibljivosti i brzine spermija nerasta (BERNABO i sur., 2007.).

2. PREGLED DOSADAŠNJIH SPOZNAJA

2.1. REPRODUKTIVNI SUSTAV NERASTA

Muški reproduktivni sustav ima tri osnovne funkcije: proizvodnju spermija u testisima, sazrijevanje, skladištenje i transport spermija kroz sustav kanalića te polaganje sjemena u ženski spolni sustav pomoću penisa. Funkcija muških spolnih hormona je također trostruka: regulacija spermatogeneze i ponašanja mužjaka (prvenstveno libido i agresija) te razvoj sekundarnih spolnih obilježja mužjaka (NOAKES i sur., 2019.). Muški spolni sustav sisavaca se sastoji od: parnih muških spolnih žlijezda, sjemenika (*testis, orchis)* smještenih u mošnji (*scrotum*), nuzsjemenika (*epididymis*), sjemenovoda (*ductus deferens*), mokraćnice *(urethra masculina*), mjehurićastih žlijezda (*glandulae vesiculosae),* uretralnih žlijezda (*glandulae urethrales),* penisa (*penis),* prepucija ili puzdre (*praeputium)* te akscesornih spolnih žlijezda - prostate (*glandula prostatica)* i bulbouretralnih žlijezda (*glandulae bulbourethrales)* (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.).

Sjemenici (*testes)* odnosno muške gonade su parni organi smješteni u mošnji (*scrotum*). Embrionalno porijeklo imaju iz primordijskih gonada medijalnog mezonefrosa u slabinskom području. Spuštanje testisa (*descensus testis*) je postupak koji se odvija u kasnijem stadiju embrionalnog razvoja gdje muške gonade migriraju iz trbušne šupljine kroz vaginalni izdanak potrbušnice (*processus vaginalis*) u mošnju (KONIG i LIEBICH, 2009.). Spuštanje testisa u mošnju kod nerasta se odvija nakon 85-og dana gravidnosti (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.). Na površini testisa se nalazi vezivnotkivna čahura (*tunica albuginea*) koja je građena od kolagenih vlakana te sadrži krvne žile (*a.* i *v. testicularis*). Sljedeći anatomski sloj je vezivnotkivna pregrada (*septula testis*) koja dijeli testis u piramidalno oblikovane režnjeve (*lobuli testis*). Vezivnotkivne pregrade konvergiraju prema središnjoj osi testisa te stvaraju vezivnotkivno tijelo (*mediastinum testis*). Svaki režnjić testisa sastoji se od dva do pet sjemenih kanalića (*tubuli seminiferi contorti*) u kojima se odvija spermatogeneza. Unutar epitelne stjenke kanalića nalaze se i Sertolijeve potporne stanice te stanice zametnog podrijetla koje se za vrijeme spermatogeneze diferenciraju preko spermatida u spermije (KONIG i LIEBICH, 2009.). Ravni dijelovi (*tubuli seminiferi recti*) savijenih sjemenih kanalića (*tubuli seminiferi contorti*) prelaze u mrežu (*rete testis*) koja se nalazi u medijastinumum testisa. U prostoru između kanalića nalaze se Leydigove intersticijske stanice (*endocrinocyctus interstitialis*) koje su glavni izvori muških steroidnih spolnih hormona. Veza između *rete testitis* i glave nuzsjemenika su savijeni odvodni kanalići (*ductuli efferentes testis*) koji

probijaju vezivnotkivnu čahuru (*tunica albuginea*). Testisi nerasta dugački su od 12 do 20 cm, širine 7 – 12 cm te mase od 150 do 350 grama (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.).

Nuzsjemenik (*epididymis*) je jednostruka zavijena cijev, čvrsto pripojena duž testisa i sastoji se od izduženih sjemenih kanalića, koje zajedno drži vezivno tkivo (NOAKES i sur., 2019.). Nuzsjemenik je cilindrični organ koji se sastoji od glave (*caput epididymis*) koja je čvrsto spojena s čahurom sjemenika i prima odvodne kanaliće sjemenika (*ductuli efferentes testis*), tijela (*corpus epididymis*) te repa (*cauda epididymis*). Nakon ulaska u nuzsjemenik odvodni kanalići se zajedno spajaju u kanal nuzsjemenika (*ductus epididymis*). Mišićni zid kanala nuzsjemenika peristaltički pomiče spermije kroz lumen, koji iz testisa izlaze nezreli te tako prolaze zadnji stadij sazrijevanja (NOAKES i sur., 2019.). Rep je pričvršćen za kaudalni okrajak sjemenika pomoću vlastitog ligamenta sjemenika (*ligamentum testis proprium*), a za *processus vaginalis* pomoću ligamenta repa nuzsjemenika (*ligamentum caudae epididymis*). Ovaj ligament pruža vlakna u duboki sloj skrotuma koja su izrazito dobro razvijena u nerasta te čine ligament skrotuma (*ligamentum scorti*). *Ductus epididymis* nastavlja se medijalno na repu nuzsjemenika u sjemenovod (*ductus deferens*) (KONIG i LIEBICH, 2009.). U kanalu nuzsjemenika dolazi do sazrijevanja spermija, resorpcije tekućine sjemenika, fagocitoze staničnih fragmenata te izlučivanja nutritivnih tvari potrebnih za spermije. Kanal nuzsjemenika u nerasta je dugačak od 17 do 18 metara (KONIG i LIEBICH, 2009.). Nuzjemenik ima četverostruku ulogu: transport spermija, koncentracija i zrenje spermija, skladištenje zrelih i za oplodnju sposobnih spermija te regulacija ejakulacije (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.).

Sjemenovod (*ductus deferens*) je nastavak *ductus epididymisa* koji započinje kao valoviti dio repa nuzjemenika, uspinje se medijalno sa živcima, krvnim žilama i mišićima (*musculus cremaster*) u sjemensko uže (*funiculus spermaticus*) do *anulus vaginalisa* te na tom mjestu ulazi u trbušnu šupljinu (KONIG i LIEBICH, 2009.). U nerasta sjemenovod je dužine 25 do 30 cm te debljine 3 mm. Sjemensko uže (*funiculus spermaticus)* tvore *arteria* i *vena spermatica,* limfne žile, simpatički živci, sjemenovod, *musculus cremaster internus* te visceralni list *tunice vaginalis.* Mišići sjemenskog užeta su od glatke muskulature te svojim refleksnim kontrakcijama podižu testise prema ingvinalnom kanalu, a relaksacijom izdužuju skrotum te spuštaju i udaljuju od tijela životinje. Ovim mehanizmima zajedno s venoznim pletežom (*plexus* pampiniformis) omogućena je termoregulacijska uloga testisa za normalnu spermatogenezu (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.).

Mošnja (*scrotum)* je dvodijelna kožna vreća koja sadrži testise, nuzjaja i dijelom sjemenovode. U nerasta se nalazi kaudalno ispod anusa. Slojevi mošnje su: vanjska koža, mišićno-elastično pokožje (*tunica dartos*), dvoslojna *fascia spermatica externa* kao odvojak vanjske fascije trupa, *musculus cremaster* koji je nastavak unutarnjeg kosog, odnosno poprečenog trbušnog mišića s fascijom (KONIG i LIEBICH, 2009.). Koža mošnje je razdijeljena longitudinalnom prugom (*raphe scroti),* dok *tunica dartos* duž cijele longitudinalne pruge tvori medijalni razdjel odnosno *septum scroti* koji dijeli mošnju u dvije jednake cjeline.

Prostata (*glandula prostatica*) je žlijezda tubuloalveolarnog tipa te izlučuje bistar, vodenasto-serozni sekret. U nerasta se sastoji od dva dijela: jedan difuzno rašireni dio u stijenci zdjelične mokraćnice (*pars disseminata*) i drugog kompaktnog dijela odnosno tijela prostate (*corpus prostatae*) (KONIG i LIEBICH, 2009.). Tijelo prostate u nerasta je veličine 3 do 4 cm (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.).

Bulbouretralne žlijezde (*glandula bulbourethralis*) su parne žlijezde koje su u nerasta dobro razvijene, veličine 13 x 3 x 3 cm. Valjkastog su oblika, izdužene te se pružaju duž čitavog dijela mokraćnice.

Penis (*penis*) sastoji se od korijena, trupa i glavića penisa. Korijen penisa (*radix penis*) je sastavljen od dva kraka (*crura penis*) koji se približavaju i spajaju te oblikuju zajedno s dijelom spužvastog tijela uretre (*bulbus penis*) u korijen penisa. Korijen prelazi u tijelo penisa koji čini glavninu organa te završava glavićem penisa. Penis je sastavljen od tri cjeline erektilnog tkiva: parnih *corpora cavernosa penis* i neparnog *corpus spongiosum penis.* Penis nerasta je prosječne duljine 50 do 60 cm te debljine 1 do 1,5 cm. Ovaj tip penisa svrstavamo u fibroelastični tip penisa za koje je karakteristična *flexura sigmoidea penis* koja se pri erekciji ispravlja produžujući penis. Kod ovakvog tipa penisa potrebna je mala količina krvi da bi došlo do erekcije. Slobodni kraj penisa u nerasta spiralno je zavijen oko podužne osi te je sličan vadičepu koji je prekriven kapicom.

Puzdra (*praeputium*) je kožni nabor koji prekriva slobodni kraj neerigiranog penisa. Sastoji se od vanjskog sloja (*lamina externa*) i unutarnjeg sloja (*lamina interna*) koji prelaze jedan u drugi na otvoru prepucija (*ostium preputiale*). U nerasta, s dorzalne strane prepucij se proširuje u obliku slijepe vreće (*diverticulum praeputiale*), veličine kokošjeg jajeta.

Vaskularizaciju sjemenika čine dvije glavne krvne žile: *arteria* i *vena testicularis*. *Arteria testicularis* je grana *aorte abdominalis.* Arterija daje ogranke za nuzsjemenike (*rami epididymales*) i za sjemenovod (*rami ductus deferentis*). *Vena testicularis* stvara mrežoliki pleter (*plexus pampiniformis*) oko zavoja arterije. Iz ovog pletera izlazi jedna *vena testicularis* koja se ulijeva u *venu cavu caudalis*. Brojni pojedini kontakti između krvnih žila u funikulusu hlade krv u arteriji na njenom putu do testisa.

2.1.1. SPERMATOGENEZA

Spermatogeneza je početni proces stvaranja spermija koji započinje u pubertetu koji nerasti dostižu u dobi od 6,5 mjeseci (MCGLONE i sur., 2020.). Odvija se u zavijenim kanalićima testisa i sastoji se od mitoze, mejoze, spermatogeneze i spermiogeneze (PARRISH i sur., 2017.). Spermatogeneza i spermiogeneza su dva procesa koji su uključeni u proizvodnju zrelih spermija. Spermatogeneza je proizvodnja i diferencijacija pokretnih stanica spermija iz stanica zametnog epitela mužjaka. Spermiogeneza je diferencijacija i sazrijevanje spermatida u pokretne spermatozoide. Spermiogeneza je završni dio spermatogeneze, dok je spermatogeneza cjelokupni proces proizvodnje funkcionalnih, muških gameta. Glavna razlika između spermatogeneze i spermiogeneze je mehanizam svakog procesa u proizvodnji spermija. Spolne stanice u mužjaka prvo prolaze niz mitotičkih dioba, nakon čega slijede mejoza i spermiogeneza što rezultira morfološki prepoznatljivima spermatozoidima. U nerasta, nediferencirane spermatogonijalne matične stanice tipa A ulaze u proces proliferacije te nastaju spermatogonije A1 i A2. Spermatogonija A1 ostaje nepromijenjena i miruje odnosno služi kao pričuva za sljedeći ciklus spermatogeneze dok se A2 nastavlja diferencirati što dovodi do dva tipa A2 spermatogonija. Stanice tipa A2 dijele se dajući četiri A3, osam A4, 16 intermedijarnih spermatogonija, 32 spermatogonije tipa B i konačno 64 primarne spermatocite. Primarne spermatocite prelaze krvno-testikularnu barijeru te započinje proces mejoze (PARRISH i sur., 2017.). Završetak mejoze I rezultira sa 128 sekundarnih spermatocita, a mejozom II dolazi do ukupno 256 okruglih spermatida od izvorne A1 spermatogonije. Haploidne okrugle spermatide prolaze kroz proces spermiogeneze mijenjajući se u spermatozoide koji se ispuštaju u lumen zavijenih kanalića, skladište se u nuzsjemeniku da bi u konačnici došlo do procesa maturacije. U teoriji će svaka spermatogonija tipa A1 dati 256 spermatida, ali u stvarnosti u nerasta se 70 do 90 % tih stanica izgubi (COSTA i sur., 2013.). Dužina spermatogenog ciklusa je 8,6 dana dok u konačnici spermatogeneza traje 34,4 dana kroz četiri ciklusa. Za prolaz spermija kroz nuzsjemenik potrebno je 10,2 dana tako da je u konačnici potrebno 45 dana od dijeljenja

spermatogonije A1 do ejakulacije spermija (COSTA i sur., 2013.). Dvije osnovne anatomske cjeline testisa koje sudjeluju u stvaranju spermija su Leydigove i Sertolijeve stanice. Fetalne Leydigove stanice su formirane prije rođenja te bivaju zamijenjene „odraslim“ Leydigovim stanicama u perinatalnom razdoblju (WEN i sur., 2016.). S približavanjem puberteta, ove stanice postaju osjetljivije na luteinizirajući hormon (LH) te posljedično dolazi do stvaranja testosterona i drugih promotora rasta koji reguliraju funkciju Sertolijevih stanica. Sertolijeve stanice sadrže receptore za testosteron i folikulo-stimulirajući hormon (FSH) (FRANCA i sur., 2016.). FSH regulira proliferaciju Sertolijevih stanica u razdoblju prije spolne zrelosti, koja se odvija u nerasta u dvije faze: od rođenja do starosti od mjesec dana te ponovno od trećeg do četvrtog mjeseca starosti. Konačni broj Sertolijevih stanica u pubertetu određuje ukupan broj spermija koje testis može proizvesti (FRANCA i sur., 2000.). Sve stanice koje nastaju od početne A1 spermatogonije su u izravnoj vezi sa svakom pojedinom Sertolijevom stanicom (FRANCA i sur., 2016.).

Sperma (*semen*) ili ejakulat je kompleksna tekućina mliječnobijele boje čiji sastojci potiču iz različitih dijelova muškog spolnog sustava. Izbacuje se prilikom ejakulacije kroz vanjski otvor mokraćne cijevi. Ejakulat se sastoji od korpuskularnih elemenata (spermija i epitelnih stanica) i tekućeg dijela u kojem spermiji plivaju, a nazivamo ga sjemenom plazmom (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.). Sjemena plazma je složena tekućina u kojoj se spermiji uzastopno suspendiraju prilikom ejakulacije te se sastoji od mješavine sekreta testisa, nuzsjemenika te akcesornih spolnih žlijezda.

Spermiji su muške spolne stanice koje imaju sposobnost samostalnog gibanja i održivosti izvan organizma u aerobnim i anaerobnim uvjetima. Sastoje se od glave, središnjeg dijela (vrat i tijelo) i repa. Glava spermija sastavljena je od dva različita anatomska dijela, jezgre i akrosome. Jezgra sadrži genetski materijal: DNK, ribonukleinsku kiselinu, kromatin, bjelančevine te alkalne fosfataze. Akrosoma je vezikula koja proizlazi iz Golgijevog aparata a sadržava hidrolitičke enzime koji su izuzetno bitni da postizanje penetracije kroz matriks folikularnih stanica. Vezikula je okružena unutarnjom i vanjskom akrosomskom membranom. Vrat se sastoji od centriola koji je građen od devet segmenata te središnje i spiralne aksoneme koje sežu sve do repa. U blizini središnje aksoneme nalaze se mithonodriji koji su važni za gibanje spermija. Tijelo je poveznica između glave i repa, te se smatra „motorom“ koji pokreće rep. Strukturnu građu tijela čine bjelančevine, ugljikohidrati i masti koje sudjeluju u staničnom metabolizmu. Rep je najznačajniji dio spermija u pogledu gibljivosti te sadrži aksonemu u središnjem dijelu vrata koja je omotana mitohondrijskim omotačem (YASTE OLIVER, 2008.).

U nerasta ejakulacija se odvija frakcionirano s diskontinuitetom različitog trajanja između pojedinih frakcija. Sjemena plazma nerasta predstavlja 95 % volumena sperme te se po sastavu razlikuje od ostalih frakcija (RODRIGUEZ-MARTINEZ i sur., 2009.). Glavna uloga sjemene plazme je aktivacija, hranidba i zaštita spermija. U sjemenoj plazmi makroelementi kao što su natrij, kalij, magnezij i klor imaju izrazito važnu ulogu na funkciju spermija. Natrij i klor su najzastupljeniji ioni, koji utječu na metabolizam i gibljivost spermija i stabilnost membrane što u konačnici može dovesti do modificiranja morfologije spermatozoida (LOPEZ-RODRIGUEZ i sur., 2013.). Kalij, metabolički inhibitor, usporava metabolizam spermija i time smanjuje gibljivost spermija (JUYENA i STELLETTA, 2012.; JOHNSON i sur., 2000.). Kalcij je izuzetno bitan za gibljivost spermija, a presudan je u pokretanju akrosomske reakcije (JUYENA i STELLETTA, 2012.). Magnezij je uključen u gotovo sve enzimske reakcije, a time je povezan s gibljivošću i očuvanjem membrane spermija (JUYENA i STELLETTA, 2012.; LÓPEZ-RODRIGUEZ i sur., 2013.). Ostali ioni prisutni u sjemenoj plazmi nerasta, poput bakra, selena i cinka, također utječu na kvalitetu sperme (PIPAN i sur., 2017.). Selen je komponenta glutation peroksidaze, enzima s antioksidacijskim svojstvima čija je prisutnost povezana s preživljavanjem spermija i plodnošću *in vivo* (BARRANCO i sur., 2016.). Nedavna studija pokazala je da je selen u sjemenoj plazmi povezan sa gibljivošću i morfologijom spermija te održivošću i integritetom DNK-a (PIPAN i sur., 2017.).

U sjemenoj plazmi postoji veliki broj enzima s različitim djelovanjem. U sjemenoj plazmi nerasta više od 3 % proteoma su enzimi (ROCA i sur., 2020.). Također, postoji i nekoliko enzima s antioksidacijskim svojstvima čija je glavna funkcija smanjiti lipidnu peroksidaciju kako bi se zaštitili spermiji od djelovanja slobodnih radikala, što je izuzetno važno u svinja zbog njihove visoke osjetljivosti na oksidativni stres (RADOMIL i sur., 2011.; LI i sur., 2017.). Enzimi s antioksidacijskim svojstvima u sjemenoj plazmi nerasta su: superoksid dismutaza, katalaza, glutation peroksidaza, glutation reduktaza, glutation S-transferaza, fosfolipid hidroperoksid glutation peroksidaza, gama-glutamil transferaza i paraoksanaza tip 1. Većina prethodno nabrojanih enzima ima pozitivni učinak na smrznuto sjeme, koncentraciju spermija u spermi i na progresivnu gibljivost (ROCA i sur., 2005.; LOPEZ-RODRIGUEZ i sur., 2013.; BARRANCO i sur., 2016.). Monosaharidi, kao što su fruktoza i glukoza, predstavljaju glavne izvore energije u sjemenu nerasta, a podliježu biokemijskim procesima iskorištavanja glukoze stvarajući piruvat/laktat (MARIN i sur., 2003.). Zanimljivo je da u nedostatku monosaharida, sjeme nerasta može koristiti i druge izvore energije kao što su glicerol, piruvat, laktat i citrat (RODRÍGUEZ-GIL, 2013.).

U nerasta, ejakulacija se odvija u vremenskim intervalima u trajanju od 5 do 10 minuta tijekom kojih je otprilike 250 do 300 mL sjemena položeno u cerviks ženke ili je sjeme uzeto manualno za umjetno osjemenjivanje (U.O.) (SENGER, 2005.). Prva frakcija sjemena nerasta je sekret bulbouretralnih žlijezda, bistre konzistencije s prisutnošću gela odnosno želatinoznih zrnaca. Za ovu frakciju je karakterističan visok stupanj kontaminacije zbog velikog broja stanica, urina i smegme iz puzdre. Druga frakcija je bogata spermijima, mliječno bijele boje te konzistencije mlijeka. Zadnja, odnosno treća frakcija je volumenom veća od druge frakcije, ali siromašnija spermijima. U nerasta, većina bjelančevina iz sjemene plazme su spermadhezini i to u postotku od 75 – 90 % od ukupne koncentracije bjelančevina (RODRIGUEZ-MARTINEZ i sur., 2009.). Prva frakcija i prvi dio druge frakcije sjemena nerasta su siromašna bjelančevinama dok njihova koncentracija raste u ostalim frakcijama.

2.2. UZIMANJE UZORKA SPERME NERASTA

U Europi, gotovo 98 % krmača, koje se koriste za uzgoj u svinjogojskoj industriji su podvrgnute umjetnom osjemenjivanju (UO) (KHALIFA i sur., 2013.). Prednosti umjetnog osjemenjivanja su višestruke: smanjen rizik prijenosa bolesti, mogućnost korištenja visoko kvalitetnog sjemena iz udaljenih područja, smanjeni troškovi, veća dostupnost sjemena vrhunskog genetskog materijala. Sjeme nerasta može se uzorkovati na nekoliko načina: naskakivanjem na nazimicu ili krmaču u estrusu, naskakivanjem na fantom „lažne krmače“ ili pomoću automatiziranih sustava. „Collectis“ automatizirani sustav za uzorkovanje sperme nerasta, drži penis nerasta tijekom sakupljanja sperme te regulira tlak zraka i vakum kako bi se postigli uvjeti slični vagini (ANEAS i sur., 2008.). Prednosti ovog sustava, pogotovo u velikima sustavima proizvodnje, su ušteda vremena i to 6,5 minuta po uzorkovanju sperme te smanjena potreba za fizičkom radnom snagom. Kvaliteta sjemena nerasta je jednaka kao i kod klasičnog uzorkovanja sjemena uz pomoć fantoma (ANEAS i sur., 2008.).

Uzorkovanje sperme u većini svinjogojskih reproduktivnih centara izvodi se metodom ručne fiksacije penisa (HANCOCK i HOVELL, 1959.). Korišteni fantomi moraju biti čvrste konstrukcije, podesive visine, bez oštrih rubova te smješteni u posebnu prostoriju s podom koji nije sklizak. Zbog potencijalne opasnosti od nerasta, prostorija mora imati nekoliko izlaza kako bi osoba koja uzorkuje spermu mogla izaći u slučaju nužde. Nakon ulaska nerasta u prostoriju i naskakivanja na fantom, kraj penisa se uhvati čvrsto s rukom na kojoj je rukavica. Stisak ruke imitira pritisak koji je prisutan na penisu prilikom kopulacije unutar vagine nazimice/krmače.

Postupak uzimanja uzorka sperme uvijek treba raditi ista osoba na koju su se životinje naviknule. Prilikom uzorkovanja, posebnu pozornost treba posvetiti higijenskim uvjetima kako bi se maksimalno smanjila evenutalna kontaminacija uzorka. Također, izuzetno je bitno izbjeći evenutalne ozljede ili traume prilikom samog uzorkovanja. Sperma prilikom manualne fiksacije penisa se skuplja u graduirane staklene posude (spermohvatač) omotane staničevinom te zagrijane na 37 °C kako bi se izbjegao temperaturni šok. U spermohvatač se uzimaju posljednje dvije frakcije sjemena, koje se procjeđuju kroz 3 sloja sterilne gaze u svrhu odvajanja sekreta bulbouretralnih žlijezda, koji bi mogao začepiti kateter pri umjetnom osjemenjivanju. Potrebno je koristiti polivinil rukavice jer lateks rukavice toksično djeluju na spermije (KO i sur., 1989.). Lateks rukavice, nitrilne, ali i pojedine rukavice napravljene od vinila, ako je sjeme izloženo djelovanju rukavica dulje od dvije minute, također imaju negativni učinak na gibljivost spermija (STEWART i sur., 2017.).

Porođajna masa muških praščića predstavlja eliminacijski čimbenik za odabir potencijalno kvalitetnih rasplodnih nerasta (DYSART, 2014.). Prije uvođenje u program uzorkovanja sjemena, s mladim nerastima je potrebno provesti treninge priprema i upoznavanja s tehnikom, u trajanju od 1 do 3 tjedna. U probno razdoblje nerasti ulaze u starosti od 8 do 9 mjeseci. Prilikom treninga, miris sjemena drugog nerasta, slina ili urin krmače/nazimice dodatno stimuliraju mladog nerasta. U većini reproduktivnih centara, uzorkovanje sperme svakog nerasta provodi se dva puta tjedno (VYT i sur., 2007.) jer preučestalo uzimanje sperme dovodi do smanjene kvalitete i količine sjemena te do smanjenog seksualnog nagona nerasta. Daljnji postupci sa sjemenom trebaju se obaviti u sljedećih 15-ak minuta.

2.3. OCJENA UZORKA SPERME

Ocjena sjemena nerasta iznimno je značajna kao jedan od čimbenika koji bitno utječe na plodnost prilikom umjetnog osjemenjivanja krmača. Predstavlja prvi korak u daljnjem postupanju sa sjemenom nerasta. Od iznimne je važnosti isključiti sjeme lošije kvalitete na temelju pokazatelja kojima se procjenjuje kvalitete sjemena. Uzorci sperme se analiziraju makroskopski (volumen, boja, konzistencija, miris, pH) i mikroskopski (gustoća, gibljivost, morfologija). Koncentracija i gibljivost su pokazatelji koji se najčešće koriste, zbog kratkog vremenskog razdoblja potrebnog za izvođenje istih te se na temelju vrijednosti ova dva pokazatelja određuje koliko će se razrijediti uzorak sperme i koliko će se doza sjemena od jednog uzorka sperme nerasta dobiti.

2.3.1. MAKROSKOPSKA OCJENA SPERME

Volumen sperme se određuje kako bi se odredila prikladnost za razrjeđivanje i konzerviranje sjemena za umjetno osjemenjivanje. Količina sperme se određuje odmah nakon uzorkovanja u graduiranom spermohvataču. Volumen ovisi o nekoliko pokazatelja: životnoj dobi, načinu i vremenu prikupljanja uzorka sperme, veličini testisa, čimbenicima stresa (WOLF i SMITAL, 2009.). Mlađi nerasti imaju manji volumen sperme, a svoj maksimum dosežu ulaskom u spolnu zrelost. WOLF i SMITAL (2009.) navode raspon volumena sperme od 50 do 600 mL, dok KNOX (2003.) navodi raspon od 150 do 500 mL. Učestalo uzorkovanje sperme smanjuje volumen koji ne mora imati patološko značenje, ali redovito sadržava manju gustoću spermija (FRUNZĂ i sur., 2008.).

Boja fiziološkog sperme nerasta je bijela s plavkastim odsjajem, a **konzistencija** vodenasta (konzistencije mlijeka). Učestalo uzorkovanje sjemena mijenja boju, te ona postaje prozirnija zbog smanjene koncentracije spermija u spermi. Prema FRUNZĂ i sur. (2008.) boja sperme može odstupati zbog nekoliko razloga: žuta boja se javlja zbog hranjenja krmnom smjesom bogatu karotenom; zagasito ružičasta može biti indikator prisustva lezija u spolnom sustavu koje ne moraju biti opasne, ali isto tako ova boja se zna pojaviti i nakon dugotrajne terapije fenotijazinima; smeđa boja je potencijalno indikacija infekcije prostate; zelenkasto-plava boja se javlja kod oligospermije (stanja u kojem je broj spermija u spermi ispod fizioloških vrijednosti).

Miris sperme je karakterističan te podsjeća na miris kuhanih kostiju (FRUNZĂ i sur., 2008.). Ukoliko sperma ima miris na mokraću, trulež ili neki drugi miris, potrebno je isključiti takav uzorak (CERGOLJ i SAMARŽIJA, 2006.).

pH sperme je potrebno odrediti neposredno nakon uzorkovanja uz pomoć indikator papira ili pomoću tekućine univerzalnog indikatora koji pomiješan sa spermom mijenja boju, ovisno o stupnju pH (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.). Određivanje pH je izuzetno bitno jer je pH značajan pokazatelj kvalitete sjemena. Fiziološke vrijednosti se kreću od 6,4 – 7,4. Snižavanje pH uzrokuje smanjenje energetskog metabolizma i gibljivost spermija (YESTE i sur., 2017.). Promjene u pH može uzrokovati i prisustvo bakterija, ali i kontakt sa zrakom prilikom skladištenja razrijeđenog sjemena (VYT i sur., 2007.). Prilikom razrjeđivanja uzorka sperme, potrebno je koristiti pufere u razrjeđivačima kako ne bi došlo do promjena u vrijednosti pH-a.

2.3.2. MIKROSKOPSKA OCJENA SPERME

Mikroskopska ocjena sperme uključuje ocjenu gibljivosti spermija, ocjenu integriteta akrosome te morfološka ocjena uzorka sperme.

2.3.2.1. OCJENA GIBLJIVOSTI SPERMIJA

Gibljivost spermija je od ključne važnosti za uspješnu oplodnju te je sveopće prihvaćeno da je dobra gibljivost spermija odlika muške plodnosti (TURNER, 2006.). Subjektivna procjena gibljivostI spermija jedan je od najboljih pokazatelja kvalitete sjemena. Normalni spermiji se gibaju pravocrtno, rotiraju se oko podužne osi prema naprijed s brzim pokretima repa lijevo-desno. Pod malim, a zatim pod velikim povećanjem mikroskopa, uz pravocrtno gibanje može se vidjeti još i manježno ili kružno gibanje, retrogradno gibanje (rep prebačen preko glave pa se kreću u smjeru suprotnom od glave) te nepomične spermije. Gibljivost se spermija u nativnom uzorku sperme određuje mikroskopski, ali također postoje i računalne metode koje omogućuju preciznu procjenu gibanja spermija, njihove putanje, brzinu gibanja, ali i oblik promatranih gibanja (WANG i sur., 2011.). Ocjenu gibljivosti izražavamo u postotcima progresivno gibljivih spermija. Sperma nerasta, da bi se mogla koristiti za razrijeđenje i dalje za umjetno osjemenjivanje, mora imati barem 70 % progresivno gibljivih spermija (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006). U većine sisavaca, fiziološka gibljivost spermija se manifestira na dva načina: aktivna gibljivost u kojoj rep stvara simetrični val niže amplitude u više ili manje ravnoj liniji što vjerojatno pomaže propulziji spermija kroz ženski spolni sustav te hiperaktivna gibljivost pri kojoj je amplituda gibanja veća kako bi se spermij progresivno gibao kroz sluz jajovoda te stigao do jajne stanice (SCHMIDT i KAMP, 2004.).

KUNAVONGKRIT i sur. (1988.) navode da disfunkcija nuzsjemenika dovodi do velike učestalosti spermija sa savijenim repom te posljedično tome i njihove slabije gibljivosti. Postoje i fentotipske korelacije unutar pojedinih pasmina koje su zapravo rezultat neizravne selekcije i interakcije između nekoliko gena (RODRIGUEZ-LOPEZ i sur., 2017.). Primjerice, utvrđeno je da je debljina masnog tkiva leđa u visoko kvalitetnih nerasta pasmine pietren pozitivno povezana s progresivnom gibljivošću spermija (ARSENAKIS i sur., 2015.). Toplinski stres također utječe na kvalitetu sjemena nerasta. Nerasti izloženi dnevno 8 sati temperaturi od 34,5 °C te 16 sati na 31,0 °C tijekom 90 dana imali su manju gibljivost spermija te veći udio spermija patološke morfologije u spermi, kao i smanjenu plodnost u odnosu na kontrolnu skupinu nerasta držanih na 23,0 °C (WETTEMANN i sur., 1976.).

2.3.2.2. OCJENA KONCENTRACIJE

Određivanje koncentracije odnosno ukupnog broja spermija nije komponenta procjene kvalitete sjemena, već služi više kao pokazatelj za praćenje produktivne sposobnosti nerasta te kao primarna značajka u obradi uzorka sperme. Jedna od najučestalijih metoda određivanja koncentracije sjemene je brojanje u komorici po Thoma-i (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.). Komorica ima 16 kvadrata od kojih je svaki dodatno podijeljen na 16 kvadrata. Uzorak sperme se priprema u leukocitnom melanžeru pošto je sjeme nerasta rjeđe u odnosu na druge vrste životinja. Nakon uzorkovanja sjemena nerasta i razrjeđivanja 20 puta, uzorak se postavlja na komoricu te nakon nekoliko minuta se može započeti s brojenjem spermija. Prilikom brojenja, spermiji se broje u četiri dijagonalna kvadrata u smjeru odozgo prema dolje te u petom kvadratu koji se nalazi u suprotnom lijevom ili desnom kutu. Bitno pravilo je da se broje samo spermiji kojima se glave drže desnog i gornjeg ili lijevog i donjeg ruba mrežice te svi spermiji kojima su glave u velikom kvadratu, te glave bez repova. Nakon prebrojavanja spermija, zbroj označavamo sa **n** te da bi izračunali koncentraciju koristimo formulu: $\boldsymbol{K = n \times D \times 50}$, gdje nam je K oznaka za koncentraciju, D stupanj razrjeđenja. Dobivena vrijednost se množi s brojem tisuću da bi se dobio broj spermija u 1 mL. Za nerasta prosječna koncentracija spermija iznosi od 250 do 300 milijuna spermija u 1 mL. Drugi načini određivanja koncentracije spermija su različiti elektronski brojači (fotometri) te kompjuterski potpomognuta analiza spermija. CAMUS i sur. (2011.) u svom radu navode su rutinska fotometrijska mjerenja koncentracija spermija pouzdane, točne i precizne.

2.3.2.2.1. KOMPJUTERSKI POTPOMOGNUTA ANALIZA SPERMIJA

U posljednje vrijeme, za preciznu procjenu koncentracije, gibljivosti i morfologije spermija sve je učestalija upotreba elektronskog uređaja Computer Assisted Sperm Analysis (CASA). Kompjuterski potpomognuta analiza spermija odnosno CASA je automatska, reproducibilna metoda koja se koristi diljem svijeta zbog svoje preciznosti i jednostavnosti (WANG i sur., 2011.). Osnovni princip rada CASA-e je snimanje različitih slika spermija pod mikroskopom i pretvaranje u digitalne slike. Mikroskopsko polje je vizualizirano tamnim poljem ili negativnom visokofaznom kontrasnom slikom, kako bi se glava spermija prikazala jasno bijelom bojom na crnoj podlozi. Jezgra glave spermija ostaje konstantno jasnom čak i kada se spermij pomiče, jer pomak glave spermija ne utječe na intezitet njegove bijele slike (AYAD, 2018.).

CASA tehnologija obično uključuje sljedeće korake:

1) akvizicija slike predstavlja postupak pristupa digitalnim slikama s vezom između digitalnog fotoaparata i okulara mikroskopa

2) poboljšanje slike čija je glavna svrha postići što bolji kontrast između spermija i pozadine

3) otkrivanje rubova slike

4) segmentacija, budući da su spermiji segmentirati s obzirom na područje interesa

5) određivanje svojstva spermija koje se želi promatrati6) klasifikacija.

CASA je prezentirana na komercijalnom tržištu početkom 90-ih godina prošlog stoljeća. U današnje vrijeme, postoje tri CASA sustava dostupna na tržištu:

a) *Sperm Quality Analyzer* – digitalna metoda kojom se određuje gibljivost spermija (SQA, United Medical Systems Inc., Santa Ana, CA,USA);

b) *Sperm Class Analyzer* – za procjenu morfometrijskih pokazatelja spermija, koristi glavu i vrat spermija, usporedbom različitih bojenja (SCA, Microptic S. l, Barcelona, Španjolska);

c) *Integrated Visual Optical Systems* – sustav koji može klasificirati spermije u tri kategorije: normalan, djelomično normalan i patološki oblik, a funkcionira na broju patoloških oblika (IVOS, Hamilton Thorne Research, Beverly, MA, Sjedinjene Američke Države).

Pomoću CASA-e se može odrediti ukupna gibljivost spermija (%), progresivna gibljivost (%), manježno kretanje (%) te različiti pokazatelji brzine spermija:

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

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

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

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

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

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

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

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

Prednosti CASA-e su detaljna analiza parametara gibljivosti, kinetičke analize, hiperaktivacije i morfometrije spermija. Klinički značaj CASA pokazatelja je procjena rasplodnog potencijala. CASA mjerenja su se pokazala izuzetno bitnim u praćenju suptilnih promjena u distribuciji gibljivosti i brzine spermija kao odgovor na različite fiziološke i okolišne uvjete (AYAD, 2008.).

Od svih nabrojanih pokazatelja, VCL, ALH i BCF su najznačajniji pokazatelji koji se koriste u procijeni kvalitete spermija nerasta (GIL i sur., 2009.). ALH je značajan pokazatelj gibljivosti jer je potrebna određena gibljivost da bi se penetrirala barijera cervikalnog kanala krmače. Prema BROEKHUIJSE i sur. (2011.) VAP je također bitan pokazatelj kvalitete sjemena korištenog za umjetno osjemenjivanje krmača.

2.3.2.3. OCJENA INTEGRITETA STANIČNE MEMBRANE SPERMIJA

Integritet stanične membrane spermija se smatra bitnim pokazateljem u procjeni reproduktivnog potencijala. Ocjenu rezistencije spermija i otpornost integriteta procjenjujemo sa 1 % natrijevim kloridom te naglim temperaturnim promjenama kako bi izazvali temperaturni šok (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.). Široku primjenu za ocjenu strukturnog integriteta stanične membrane spermija imaju supravitalno bojenje po Bloom-u, fluorescentni testovi kao što su SYBR-14 sa propidij jodidom te za ocjenu funkcionalnosti stanične membrane spermija, test hipoosmotskog bubrenja. Supravitalno bojenje po Bloom-u je jeftina, brza i jednostavna metoda ocjene postotka živih i mrtvih spermija koju radimo sa 5 % -tnom otopinom eozina i

10 % -tnom otopinom negrozina. Metoda se zasniva na principu da kroz ovojnicu mrtvog spermija prolazi eozin dok ista boja ne može prodrijeti kroz ovojnicu živog spermija. Kombinacija SYBR-14 i propidij jodid fluorescentnog bojenja predstavlja jednu od najučestalijih metoda procjene živih spermija odnosno integriteta stanične membrane. Prilikom bojenja, dolazi do obojenja spermija te zelene smatramo intaktnim spermijima, dok zeleno-crvene ili samo crvene smatramo kao spermije s oštećenom membranom. Hipoosmotsko bubrenje je glavni pokazatelj funkcionalnosti membrane spermija. Učestalo je korišten za ocjenu funkcionalnog integriteta stanične membrane ljudskih spermija te je smatran učinkovitijim nego supravitalno bojenje. Važnost ovog testa je u tome što je funkcionalni status spermija značajni pokazatelj rasplodnog statusa. Jedan od najštetnijih učinaka na stanični integritet spermija predstavlja djelovanje oksidacijskog stresa i to prilikom pripreme i hlađenja sjemena za umjetno osjemenjivanje (AWDA i sur., 2009.).

2.3.2.4. OCJENA MITOHONDRIJSKOG STATUSA

Mitohondriji su unutar spermija smješteni ispod glave spermija ili u proksimalnom dijelu flageluma gdje se izduljuju i spiralno ovijaju u području vrata (KOZARIĆ, 1998.). Glavna funkcija im je proizvodnja ATP-a procesom oksidativne fosforilacije, ali i procesom glikolize u anaerobnim uvjetima. Funkcionalni mitohondrijski status je bitan parametar visoko kvalitetnih spermija (AGNIHOTRI i sur., 2016.; BARBAGALLO i sur., 2020.). Glavnim unutarstaničnim izvorom kisikovih slobodnih radikala su smatrani upravo mitohondriji, a njihova povećana proizvodnja je povezana sa smanjenjem potencijala mitohondrija. Trenutno se za procjenu mitohondrijskog potencijala koriste različita fluorescentna bojenja, od kojih je najpoznatiji tetraetilbenizimdazolkarbocijanin jodid (JC-1). Posebnost ovog bojenja je što se JC-1 nakuplja u mitohondrijima što omogućuje precizne analize. Monomeri JC-1 dominiraju u depolariziranim mitohondrijima koje karakterizira niski mitohondrijski potencijal i oni emitiraju zelenu fluorescenciju, dok agregati JC-1 akumulirani u hiperpolariziranim mitohindrijima sa visokim mitohondrijskim potencijalom emitiraju crvenu fluorescenciju (GALLO i sur., 2021).

2.3.2.5. PROCJENA OŠTEĆENJA DNK-A / STRUKTURNE STABILNOSTI KROMATINA

Oštećeni spermiji imaju sposobnost oplodnje jajnih stanica, ali je embrionalni razvoj povezan sa stupnjem oštećenja DNK-a (AHMADI i SOON-CHYE, 1999.). Neke kemikalije i toksične tvari mogu oštetiti protamine koji štite DNK-a u spermijima (EVENSON i sur., 1994.). Anomalije spermija, poput slabo strukturno zapakiranog kromatina i oštećena DNK-a povezani su s uzorcima sjemena loše kvalitete (SAILER i sur., 1995.). Jedan od glavnih uzroka oštećenja DNK spermija je izloženost slobodnim radikalima koji su vrlo reaktivni te oštećuju nukleinske kiseline (OCHSENDORF, 1999.). Procjena strukturne stabilnosti kromatina je u fokusu interesa kako bi se objasnio način protaminacije i djelovanje na epigentsko stanje spermija. Iz tog razloga, upotreba neizravnih metoda koje se temelje na različitim tehnikama bojenja za procjenu količine protamina i mjerenje strukturne stabilnosti kromatina trenutno postaju široko rasprostranjena (BANASZEWSKA i sur., 2015.). Najučestalija procjena oštećenja DNK-a proizlazi da su oštećenja lako uočljiva protočnom citometrijom pomoću akridin narančastog bojenja. Metoda se temelji na činjenici da jednolančani i dvolančani prekidi DNK-a nisu osjetljivi na uvjete denaturizacije koje karakterizira pH = 1,2. Poremetnje u strukturnom integritetu kromatina karakterizira prisutnost jednostrukih i dvostrukih prekida u molekulama DNK-a koji dovode do stvaranja do denaturiranih segmenata (RYBAR i sur., 2004.).

2.4. RAZRJEĐIVANJE I KONZERVIRANJE SPERME

Nakon ejakulacije, gibljivost i vitalnost spermija će biti očuvani svega nekoliko sati. Kako bi produljili preživljavanje spermija, metabolička aktivnost spermija se mora usporiti dodavanjem kemijskih inhibitora. Uspoređujući sjeme nerasta s drugim životinjskim vrstama, ono je izuzetno osjetljivo na temperaturu nižu od 12 °C zbog niskog udjela zasićenih masnih kiselina u staničnoj membrani spermija (ALTHOUSE i sur., 1998.). Prilikom uzorkovanja sjemena temperatura iznosi 37 °C, a pri dolasku u laboratorij 32 - 35 °C (SCHULZE i sur., 2013.). Većina centara za umjetno osjemenjivanje razrjeđuje sjeme u dva koraka: u prvom koraku uzorak je razrijeđen s prethodno zagrijanim razrjeđivačem (33 °C) u omjeru 1:1, a zatim s razrjeđivačem sobne temperature. Dakako, postoji veliki broj različitih protokola koji se koriste u centrima za umjetno osjemenjivanje. Prilagodba uzorka na temperaturu od 30 °C kroz nekoliko sati ima zaštitni učinak pri skladištenju uzorka na temperaturi od 17 °C (PURSEL i

sur., 1972.). Međutim, rezultati kasnijih istraživanja su dokazali da sjeme razrijeđeno s razrjeđivačem na temperaturi od 32 °C ima lošiji učinak na spermije u smislu većeg broja kapacitiranih spermija u odnosu na sjeme razrjeđeno s razrjeđivačem temperature 20 °C (PETRUNKINA i sur., 2005.). Navedeni autori smatraju da pohrana sperme bliže fiziološkoj temperaturi, ne dovodi do usporavanja metabolizma spermija već do pogoršanja kvalitete sjemena. Nadalje, dvodijelno razrjeđivanje sperme nerasta s prethodno zagrijanim razrjeđivačem nije pozitivno djelovao na vitalnost, gibljivost ili integritet akrosome u odnosu na razrjeđivač koji je držan na sobnoj temperaturi (LOPEZ-RODRIGUEZ i sur., 2012.).

Sperma se razrjeđuje kako bi se povećao volumen te u konačnici dobio što veći broj doza sperme za umjetno osjemenjivanje krmača. Razrjeđivači su otopine koje sadrže elektrolite, neelektrolite i aditive te imaju svojstva pufera (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.). U većini komercijalnih razrjeđivača se nalazi natrijev citrat u izotoničnoj otopini zbog pozitivnog djelovanja na spermije. Sastojci u razrjeđivačima moraju osigurati dovoljnu količinu energije, neutralizirati metaboličke rezidue, održati osmotsku ravnotežu i stabilnost membrane spermija te minimalizirati rast bakterija (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.).

Na temelju *in vitro* i *in vivo* studija, većina komercijalnih razrjeđivača pruža optimalnu zaštitu kroz 72 sata.

Najčešće korišteni sastojci razrjeđivača su:

1. šećeri - kao izvor energije je glukoza u malim koncentracijama; mogu se koristiti i galaktoza, fruktoza, riboza ili trehaloza, ali nemaju isti učinak kao glukoza;

2. puferi - pH svježe ejakuliranog sjemena nerasta je 7,4 ± 0,2 te pri snižavanju pH, dolazi i do smanjenja energetskog metabolizma i gibljivosti; upravo zbog toga se moraju dodavati određene supstance kako bi se kontrolirao pH. Strukturno jednostavnije supstance uključuju bikarbonate i citrate s ograničenim djelovanjem, dok složenije supstance mogu djelovati puno dulje te nisu temperaturno uvjetovani;

3. osmotski tlak spermija nerasta iznosi 290 – 300 mOsm. Osmotski tlak ne utječe na gibljivost spermija sve dok se ne snizi ispod 200 mOsm. Anorganske ionske soli poput natrija i kalijevog klorida uglavnom se koriste za regulaciju osmotskog tlaka;

4. antibiotici - zdravo tkivo testisa i akcesornih spolnih žlijezda nemaju bakterija u svojoj mikroflori, što znači da do kontaminacije sperme dolazi prilikom uzorkovanja. Za kontrolu rasta bakterija, potrebno je dodati antibiotik, pogotovo jer dodavanjem glukoze na temperaturi

od 15 – 16 °C potiče se rast gram-negativnih bakterija (*E. coli, Salmonella* ili *Pseudomonas*). Najčešće su dodavani penicilin ili streptomicin (1g/L), ali i aminoglikozidi (200 mg/L) kao što su gentamicin, neomicin ili kanamicin. U zadnje vrijeme se sve više koristi nova generacija antibiotika (ceftiofur, apramicin),premda još nisu poznati njihovi konačni rezultati. Direktiva Europske Unije 90/429/EEC regulira upotrebu kombinacije antibiotika protiv leptospiroze i mikoplazme i u koncentraciji koja mora biti ekvivalentna minimalnim koncentracijama 500 IU streptomicina/mL, 500 IU penicilina/mL, 150 mg linkomicina/mL te spektinomicina/mL. Bakterijska kontaminacija uglavnom uzrokuje promjene smanjenja gibljivosti i aglutinacije spermija, povećanje postotka akrosoma s preuranjenom akrosomskom reakcijom te smanjenje pH (5,7 - 6,4). No, centrifugiranje sjemena nerasta dovodi do smanjenja koncentracije bakterija i posljedično tome upotrebe manje količine antibiotika u ekstenderima. Međutim, centrifugiranjem ne dolazi do smanjenja ukupne gibljivosti, ali su zabilježene promjene u linearnom kretanju spermija (MORRELL i WALLGREN 2011.).

Većina razrjeđivača sadrži destiliranu ili deioniziranu vodu. Izuzetno je bitan elektrolitski sastav, odnosno odsustvo iona kalcija. Magnetizirani razrjeđivač (tekućina koja je prošla kroz magnet i pokazuje povećanu propusnost u stanice i karakteristike doniranja elektrona), nadalje poboljšava integritet membrane smanjujući stupanj peroksidacije (LEE i PARK, 2015.). Magnetiziranjem tekućine dolazi do porasta sposobnosti doniranja elektrona što bi moglo smanjiti razinu slobodnih radikala i reaktivnih kisikovih spojeva.

2.5. NOVE METODE PROCJENE KVALITETE SJEMENA NERASTA

Unaprjeđenje menadžmenta, odnosno reproduktivnog potencijala nerasta posebice u centrima za U.O. smatra se sljedećim korakom u unapređenju svinjogojske industrije, a temelji se na primjeni novih metoda za procjenu kvalitete sjemena nerasta (SUTOVSKY, 2015.). U posljednje vrijeme u visokorazvijenim centrima i laboratorijima u primjeni su protočne citometrije uz kombinaciju bojanja (za procjenu integriteta akrosome i mitohondrijskog potencijala), ocjena fragmentacije DNK-a i biomarkera (ubikvintin, sperm postacrosomal WW binding protein - PAWP). Procjena antioksidacijskog statusa je također značajan pokazatelj kvalitete sjemena iako se ne provodi rutinski u već je više zastupljena u istraživačkoj procijeni sjemena nerasta (SUTOVSKY, 2015.).

2.5.1. PROTOČNA CITOMETRIJA

Upotreba protočne citometrije donosi mnogobrojne prednosti, nudi mogućnost multikompleksne analize te tako daje rezultate gdje standardne metode procjenjivanja nisu dostatne (SUTOVSKY, 2015.). Iako zahtjeva skupocjenu opremu te znanje za izvođenjem analize, protočna citometrija je postala dio standardnog protokola za kontrolu kvalitete sjemena bikova te time i sredstvo u poboljšanju plodnosti bikova odnosno unaprjeđenje u govedarskoj industriji (PETRUNKINA i HARRISON, 2013.). Ovaj instrument nudi brzu analizu broja spermija, vitalnosti i apoptoze te veliki broj dodatnih analiza (SUTOVSKY, 2015.).

Ocjena integriteta akrosome putem protočne citometrije, izvodi se koristeći lektine, molekule biljnog podrijetla, koje se specifično vežu na karbohidratne rezidue glikoproteina (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.). Vezanje se zbiva unutar akrosome ili na pojedinim dijelima vanjske membrane akrosome. Fluorescentno konjugirani lektini, aglutinini kikirikija koji se vežu na vanjsku membranu akrosome te aglutinini graška koji se vežu unutar matriksa akrosome, su u velikoj mjeri korišteni za procjenu različitih protokola za pohranjivanje sjemena, krioprezervaciju i oplodnju (BARRANCO i sur., 2013.). Glavni nedostatak ove pretrage je kompliciranost procjene lektin-akrosoma jer spermiji zahtijevaju određeni stupanj fiksacije. Kako bi se razlikovala prava od lažne akrosomske reakcije koja se može javiti kada spermiji više nisu vitalni, odnosno kad su "mrtvi", potrebno je prije procjene statusa akrosome, odrediti postotak živih spermija.

Integritet mitohondrijskih membrana odražavaju sposobnost mitohondrija spermija da stvaraju adenozin trifosfat (ATP), što je u uskoj korelaciji sa gibljivošću i vitalnošću spermija (GARNER i sur., 1997.). Bojenje fluorescentnim bojama kao što je tetraetilbenizimdazolkarbocijanin jodid (JC-1) je prikladno za protočnu citometriju te se pokazalo da je odlični pokazatelj za vitalnost i integritet akrosome u nerasta (HUO i sur., 2002.). Visoki potencijal mitohondrijske membrane odašilje narančasto obojenje JC-1 dok oni s niskim potencijalom odašilju zelenu boju.

Slično kao potencijal mitohondrija, bojenja s kojima se procjenjuje postotak „živih" u odnosu na „mrtve" spermije, pokazalo se odličnim pokazateljem vitalnosti spermija koja se mogu koristiti odmah nakon polučivanja sperme. Na temelju bojenja zbog različite permeabilnosti intaktne i oštećene membrane spermija, najčešće upotrebljavane boje su crveno – narančasto obojenje fluorescentnim propidium jodidiom te zelena fluorescentna SYBR-14 boja (CHRISTENSEN i sur., 2004.). U nerasta, vitalnost spermija je u pozitivnoj korelaciji s

integritetom akrosome, potencijalom mitohondrija te postotkom fragmentacije DNK-a (BOE-HANSEN i sur., 2008.).

Kapacitacija spermija, ireverzibilni proces koji se odvija neposredno prije oplodnje, događa se u jajovodima krmače. Ako kapacitirani spermiji ne dospiju do jajne stanice krmače unutar nekoliko sati „umiru“ (SUAREZ i PACEY, 2006.). Preuranjena kapacitacija spermija izazvana rukovanjem, hlađenjem i pohranjivanjem sjemena, može dovesti do smrti spermija u uzorkovanom sjemenu. Ove promjene su ključne za određivanje plodnosti odnosno kvalitete sjemena te se mogu mjeriti određivanjem koncentracije iona kalcija u sjemenu koristeći protočnu citometriju. Povećana koncentracija kalcija u sjemenu nerasta, mjerena pomoću 4-(2,7- diklor-6-hidroksi-3-oxo-9-ksantenil)-4′-metil-2,2′-(etilenedioksi) dianilin-N,N,N′,N′-tetraacetične kiseline je pokazatelj preuranjene kapacitacije spermija te je u uskoj pozitivnoj korelaciji sa smanjenom vitalnošću spermija (PETRUNKINA i sur., 2001.).

Prisutnost određene bjelančevine u sjemenu nerasta smatra se biobiljegom kvalitete sjemena odnosno izravnim pokazateljem plodnosti (SUTOVSKY i LOVERCAMP, 2010.; SUTOVSKY i KENNEDY, 2013.). Mnoge bjelančevine, koje su pokazatelji fenotipa i funkcije spermija, stabilni su te zbog toga nisu osjetljivi na vrijeme uzorkovanja sjemena, analize ili oštećenja nastalih prilikom obrade sjemena. U nerasta, visoke koncentracije ubikvintina su u negativnoj korelaciji sa stopom prasenja i veličinom legla (LOVERCAMP i sur., 2007.). Određivanje ubikvintina u spermijima može poslužiti i kao biobiljeg za smrzavanje sperme (PURDY, 2008.). PAWP je bjelančevina za kojeg se smatra da je u uskoj pozitivnoj korelaciji sa smanjenom plodnošću u muškaraca i bikova (AARABI i sur., 2014.; KENNEDY i sur., 2014.). Premda su potrebna daljnja istraživanja u utvrđivanju potpune funkcije ove bjelančevine u sjemenu nerasta, poznato je da PAWP koristan pokazatelj plodnosti nerasta.

2.6. REAKTIVNI KISIKOVI SPOJEVI I OKSIDACIJSKI STRES

Kisik ima takvu elektronsku konfiguraciju da je istodobno neophodan i odgovoran za toksičnost stanica, tkiva odnosno organizma. Zbog toga što kisik ima dva nesparena elektrona koji imaju paralelne spinove, elektroni ostaju u odvojenim orbitama te takva elektronska konfiguracija omogućuje redukciju kisika stupnjevitim nizom prijenosa jednog elektrona.

Oksidacija je kemijski proces pri kojem molekule ili tvari otpuštaju elektrone odnosno električni naboj suprotan redukciji pri kojoj molekule ili tvari primaju elektrone. Postupna redukcija usporava izravno povezivanje kisika s organskim spojevima i omogućuje stanici oksidaciju „goriva“ djelovanjem dehidrogenaza koje povezuju redukciju kisika i nastajanje vode. Prilikom redukcije kisika dolazi do stvaranja slobodnih radikala: hidroperoksilni radikal, superoksidni radikal, vodikov peroksid koji nakon redukcije postaje hidroksilni radikal te nakon daljnje redukcije postaje voda. Slobodni radikali su kemijske vrste s jednim ili više nesparenih elektrona u zadnjoj ljusci. Najčešće su neutralne čestice, međutim mogu biti i negativno nabijeni. Većinom su nestabilni te se javljaju kao kratkoživući međuprodukti. Prvi put 1900. godine Gomberg opisuje slobodni radikal trifenilmetil (LAFONT, 2007.), nakon toga MCCORD i FRIDOVICH (1969.) otkrivaju enzim superoksid-dismutazu. Budući da slobodni radikali imaju nespareni elektron, oni su visoko reaktivni te stupaju u reakcije s anorganskim i organskim spojevima kao što su bjelančevine, lipidi, ugljikohidrati te nukleinske kiseline (ČVORIŠĆEC i ČEPELAK, 2009.). Slobodni radikali nastaju hemolitičkim pucanjem kovalentne veze te prijenosom elektrona (jednoelektronska oksidacija ili redukcija). Reakcija slobodnih radikala sa neradikalima se nastavlja kao lančana reakcija, gdje jedan radikal stvara novi radikal te dolazi do dodatnog oštećenja molekula i staničnih struktura. Radikalske reakcije općenito se odvijaju u lančanim mehanizmima kako slijedi:

1. započinjanje (inicijacijski stupanj) u kojem nastaje reaktivni međuprodukt;

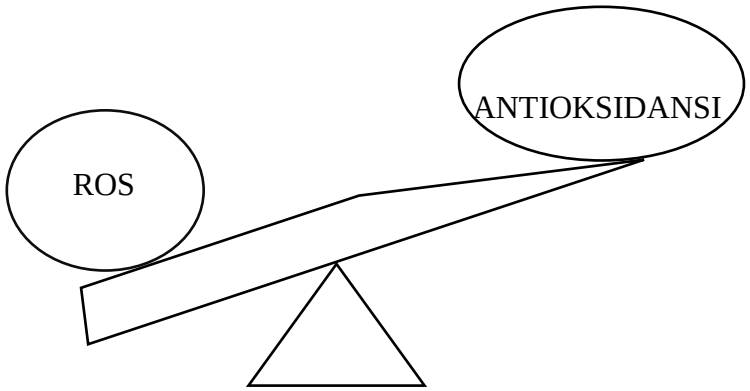
2. napredovanje (propagacijski stupanj) u kojem reaktivni međuprodukt reagira sa stabilnom molekulom te daje produkt i drugi reaktivni međuprodukt što omogućava da se lančana reakcija nastavlja sve dok se ne iscrpi zaliha reaktanata i dok se ne onesposobi reaktivni međuprodukt;

3. završavanje (terminacijski stupanj) u kojem u sporednim reakcijama nestaju reaktivni međuprodukti čime se daljnje reakcije usporavaju ili zaustavljaju (APRIOKU, 2013.).

Reaktivni kisikovi spojevi (ROS – engl. *reactive oxygen species*) su najznačajniji slobodni radikali. ROS označava ne samo slobodne radikale nego i neke neradikalne derivate kisika (npr. vodikov peroksid i hipoklorit). Izvori slobodnih radikala mogu biti vanjski i unutarnji. Vanjski izvori slobodnih radikala: ionizirajuće zračenje pri čemu dolazi do cijepanja molekule vode, fotoliza kemijske veze, visoki sadržaj slobodnih radikala u dimu cigarete dok kod unutarnjih razlikujemo slučajno i namjerno stvaranje slobodnih radikala (ČVORIŠĆEC i ČEPELAK, 2009.). Unutarnji izvori slobodnih radikala su enzimatski sustavi katalize redukcije molekularnog kisika u superoksidni radikal: ksantin-oksidaza, aldehid-oksidaza,

flavin-dehidrogenaza, peroksidaza te neenzimski sustavi prijenosa elektrona, različite reakcije autooksidacije, stvaranje slobodnih radikala u mitohondrijskom elektron-transportnom sustavu (primjer slučajnog nastajanja) te aktivacija neutrofila (primjer namjernog nastajanja) (ČVORIŠĆEC i ČEPELAK, 2009.). ROS se stvaraju za vrijeme normalnog aerobnog metabolizma: esencijalni su za stvaranje energije te za vrijeme jodinacije hormona štitnjače; potrebni su za proces fagocitoze u imunosnom sustavu te za sintezu prostaglandina; sudjeluju u održavanju vaskularnog tonusa; imaju vitalnu funkciju u prijenosu signala; oksidacijom bjelančevina mijenjaju funkciju bjelančevina te održavaju stabilnost membrane stanica. U slučajevima kada je koncentracija ROS-a povećana, imaju negativne toksične učinke (HALLIWELL i GUTTERIDGE, 2015.). Patološka djelovanja ROS-a su: oštećenje biomolekula, inhibicija ili indukcija različitih signalnih puteva (djelovanje na protein-kinaze, fosfataze, proteaze), ekspresija gena, indukcija ili proliferacija stanica, lomovi lanca DNK-a.

Oksidacijski stres je definiran kao stanje u koje dolazi do pomaka ravnoteže u staničnim oksidacijsko-redukcijskim reakcijama prema oksidaciji ili prekomjernim stvaranjem ROS-a. Gubitak ravnoteže dovodi do stvaranja radikala, ali i nemogućnosti stanice da ih se ukloni antioksidacijskim sustavom (Slika 1.).



Slika 1. Slikoviti prikaz oksidacijskog stresa.

Organizam je razvio brojne prirodne obrambene mehanizme od štetnog djelovanja ROS-a. U fiziološkim uvjetima, njihovu toksičnost sprječava veliki broj citoprotektivnih enzima i antioksidansa. Antioksidansi su spojevi, koji su prisutni u malim koncentracijama, a znatno odgađaju ili sprječavaju oksidaciju (KOHEN i NYSKA, 2002.).

Obrambeni mehanizmi djelovanja uključuju:

1. sprječavanje nastanka ROS-a održavanjem niskog tlaka kisika u tkivima, zatvaranjem enzima koji stvaraju ROS u posebne stanične strukture (peroksisomi, lizosomi, mitohondriji) te vezanjem slobodnih iona željeza i bakra, hemoglobina i hema u komplekse (transferin, ceruloplazmin, albumin, haptoglobin, hemopeksin); primarni antioksidansi: ceruloplazmin, feritin, laktoferin, hemopeksin;

2. uklanjanje nastalih spojeva uz pomoć specifičnih enzima te antioksidansa prisutnih u stanicama i tjelesnim tekućinama; sekundarni antioksidansi: superoksid dismutaza, katalaza, glutation-peroksidata, vitamini C i E, urati, bilirubin;

3. popravak nastalih oštećenja i uklanjanje oštećenih molekula prije nego njihova akumulacija dovede do novih oštećenja; tercijarni antioksidansi: fosfolipaze, peptidaze, DNK ligaza, DNK polimeraza I, poli (ADP-riboza) sintetaza, metioninsulfoksid-reduktaza.

Poremećaj ravnoteže odnosno novonastali oksidacijski stres može dovesti do znatnog poremećaja metabolizma stanice, uključujući strukturne prijelome DNK-a, povećanje unutarstaničnog kalcija, oštećenje membransko ionskih transportera i bjelančevina te peroksidaciju lipida (RAHAL i sur., 2014.).

Nakon uzorkovanja sjemena, dolazi do stvaranja ROS-a koji uzrokuju smanjenu gibljivost i vitalnost te mogu dovesti do smrti spermija (THOMPSON i sur., 2009.). Fiziološke koncentracije ROS-a su neophodne za hiperaktivaciju, kapacitaciju te akrosomsku reakciju, ali kada nastane disbalans u stvaranju ROS-a i ukupnog antioksidacijskog kapaciteta sperme, nastaje oksidativni stres. U visokim koncentracijama, ROS s relativno dugim poluživotom, inhibiraju gibljivost ljudskih spermija (ZINI i sur., 1995.). Nadalje, apoptoza uzrokovana ROS-om posreduje u oslobađanju masnih kiselina iz membrana spermija u sklopu programiranog puta apoptoze. Budući da apoptozu i vitalnost stanice karakterizira propusnost membrane, reproduktivni potencijal spermija pod utjecajem oksidativnog stresa može se odrediti na temelju propusnosti membrana (PILANE i LA BELLE, 2004.).

Okretanje doza tijekom skladištenja, kako bi se izbjeglo taloženje spermija, štetno utječe na njihovu gibljivost (SCHULZE i sur., 2015.). Iako se biološki mehanizam nije mogao objasniti, prethodno navedeni autori su pretpostavili da je to posljedica povećanog oksidacijskog stresa.

2.6.1. LIPIDNA PEROKSIDACIJA

Lipidna peroksidacija je lančana reakcija oksidacije lipida posredovana djelovanjem slobodnih radikala koja najčešće nastaje djelovanjem hidroksilnog radikala (CAI, 2005.). Sastoji se od tri koraka: inicijacija, propagacija i terminacija. Bjelančevine i lipidi čine osnovne građevne jedinice stanične membrane spermija gdje su bjelančevine uronjene u dvostruki sloj lipida. Dvosloj lipida je građen od fosfolipida gdje su hidrofilne glave okrenute prema unutar i izvanstaničnom prostoru, a hidrofobni dio, izgrađen od masnih kiselina, je smješten u središnjem dijelu dvosloja. Taj dio je izložen djelovanju slobodnih radikala. Višestruko nezasićene masne kiseline su podložnije djelovanju ROS-a nego zasićene masne kiseline i masne kiseline koje sadrže jednu dvostruku vezu. Udio višestruko nezasićenih masnih kiselina (dokazaheksaenska kiselina= DHA) je veći u nezrelih spermija u odnosu na zrele spermije (OLLERO i sur., 2000.). Peroksidacijski niz u lipidnim sustavima započinje napadom ROS-a sposobnog da izdvoji atom vodika iz metilske skupine te dolazi do nastajanja slobodnih lipidnih radikala. Inicijaciju mogu započeti: hidroksilni radikal, peroksilni radikal, alkoksilni radikal ili pak lipidni radikal (CATALÁ, 2006.; HALLIWELL i GUTTERIDGE, 2007.).

Do propagacije dolazi ukoliko antioksidansi nisu prisutni, a time i do nastanka lančane reakcije lipidne peroksidacije. Lipidni radikali u aerobnim uvjetima reagiraju s kisikom te tako nastaje peroksilni radikal. Oduzimanjem vodika drugoj nezasićenoj masnoj kiselini, peroksilni radikal stvara lipidni hidroperoksid i novi lipidni radikal. Lipidni hidroperoksid stvara nove radikale, što pak ima za posljedicu grananje lančane reakcije. Propagacija se može ponavljati. Mala količina slobodnih radikala iz stadija inicijacije, dovodi do obnavljanja lipidnih hidroperoksida koji pospješuju peroksidaciju lipida uz prisutnost prijelaznih metala (CATALÁ, 2006.; HALLIWELL i GUTTERIDGE, 2007.; KOLENC, 2010.; ŠVERKO, 2011.). Završni korak peroksidacije lipida je terminacija koja nastaje reakcijom slobodnih radikala ili zaštitnim djelovanjem antioksidansa.

Peroksidacija lipida nastaje kao odgovor na oksidacijski stres te je uključena u mnogobrojna patološka stanja: upala, ateroskleroza, karcinomi, neplodnost i neurodegenerativne bolesti. Produkti lipidne peroksidacije su aldehidi, ketoni, ugljikovodici (etan, pentan), epoksid te aktivni radikali. Aldehidi su izrazito reaktivni te ih smatramo toksičnim agensima koji se šire te povećavaju oštećenja započeta slobodnim radikalima. Njihove glavne odlike su stabilnost te mogućnost difundiranja u stanice ili čak izlaska iz stanica kako bi štetno djelovali na stanice daleko od njihova nastanka.

Malondialdehid (MDA) je spoj, koji se stvara u malim količinama tijekom peroksidacije lipida te služi kao pokazatelj peroksidacije. MDA postoji u različitim oblicima. U fiziološkim oblicima se nalazi u obliku enolatnog iona koji reagira s bjelančevinama te pokazuje izraziti afinitet prema lizinskom aminokiselinskom ostatku (ŠTEFAN i sur., 2007.). U organizmu, MDA se metabolizira do malonatne kiseline čija je glavna funkcija inhibicija sukcinat dehidrogenaze mitohondrija.

Nezasićene masne kiseline u staničnoj membrani spermija podliježu autokatalitičkoj reakciji odnosno lipidnoj peroksidaciji. Ova reakcija može dovesti do gubitka integriteta stanične membrane te poremetnje funkcije spermija, a ponekad i potpune inhibicije spermatogeneze. Poremetnja ravnoteže u stvaranju i djelovanju antioksidansa i porastu oksidativnog stresa, dovodi do abnormalnosti koje uzrokuju smanjeni reproduktivni potencijal spermija (CHO i AGARWAL, 2018.; PANNER SELVAM i AGARWAL, 2018.; ALAHMAR, 2019.; HIDALGO i sur., 2019.). S obzirom na to da su membrane spermija podložne djelovanju lipidne peroksidacije, MDA kao pokazatelj pomoću kojeg se mjeri razina oksidativnog stresa, može biti dobar dijagnostički pokazatelj za procjenu neplodnosti u astenozoospermičnih pacijenata (TAVILANI i sur., 2008.). Nadalje, razina je MDA u sjemenoj plazmi u negativnoj korelaciji sa vitalnošću spermija (DAS i sur., 2009.), gibljivošću (TAVILANI i sur., 2005.; HSIEH i sur., 2006.; BEN ABDALLAH i sur., 2009.; ZRIBI i sur., 2011.; ATIG i sur., 2012.; BENEDETTI i sur., 2012.), morfologijom spermija (SHAMSI i sur., 2010.; ATIG i sur., 2012.; BENEDETTI i sur., 2012.) te koncentracijom spermija u spermi (HSIEH i sur., 2006.; ATIG i sur., 2012.). Također, utvrđena je i pozitivna korelacija između koncentracije MDA i anomalija akrosoma te prisutnosti rezidualnih citoplazmatskih kapljica (BEN ABDALLAH i sur., 2009.).

Pozitivna korelacija između razine MDA i fragmentacije DNK-a nije zabilježena (MONTJEAN i sur., 2010.). Premda se MDA smatrao biomarkerom za neplodnost, generalno gledajući, ne može ga se smatrati pokazateljem smanjene gibljivosti spermija (MORETTI i sur., 2009.; RENGAN i sur., 2012.). Međutim, u slučaju urogenitalnih infekcija, membrana spermija je sklonija pucanju, odnosno lipidnoj peroksidaciji, što se manifestira povećanim nekrozama spermija te porastom koncentracije MDA (COSCI i sur., 2008.). Prisutnost leukocita u sjemenu je stanje koji potencira lipidnu peroksidaciju membrane spermija (FRACZEK i sur., 2007.; MARTINEZ i sur., 2007.).

Tijekom konzerviranja sjemena, postoji veća izloženosti spermija djelovanju ROS-a (PLESSIS i sur., 2008.). U takvim slučajevima, u razrjeđivače se dodaju antioksidansi kako bi

se spriječio štetan učinak ROS-a na kvalitetu sjemena (ZHANG i sur., 2015.). U spermi nerasta izmjerena je manja razina MDA ako se u njega doda antioksidacijski enzim superoksid dismutaze (SOD) (ZHANG i sur., 2016.). Nadalje, koncentracije MDA raste pri skladištenju sjemena nerasta na 18 °C nakon 96 sati (KUMARESAN i sur., 2009.). Međutim, dodavanjem vitamina E smanjuje proizvodnju MDA u sjemenu nerasta skladištenog na temperaturi od 15 °C kroz 72 sata bez obzira na dodavanje inzulinu sličan faktor rasta I (IGF-I) dok kombinacija vitamina E i IGF-I osigurava visoku gibljivost spermija nakon inkubacije kroz 120 minuta na temperaturi od 37 °C (MENDEZ i sur., 2012.). Također, utvrđeno je da dodavanje klorogenske kiseline u komercijalni razrjeđivač protektivno djeluje na vitalnost, gibljivost, integritet akrosoma i postotak spermija sa visokim mitohondrijskom aktivnošću u sjemenu nerasta, a smanjuje koncentraciju MDA (PEREIRA i sur., 2019.). Dodavanje velike većine biljaka, kao alternativni izvor, također smanjuju koncentracije MDA u konzerviranoj spermi nerasta (ROS-SANTAELLA i PINTUS, 2021.).

2.7. ANTIOKSIDACIJSKI ZAŠTITNI MEHANIZMI

Antioksidansi su tvari koji umanjuju štete nastale djelovanjem slobodnih radikala (MARKS, 2021.). Mehanizam djelovanja antioksidansa je stabilizacija slobodnih radikala te sprječavanje njihovog djelovanja (SHINDE i sur., 2012.). Antioksidansi se dijele na endogene i egzogene s obzirom na mjesto podrijetla. Egzogeni antioksidansi se ne mogu proizvesti u tijelu te ih je potrebno unijeti u organizam hranom ili dodacima u hrani. Podijelili smo ih na: sintetski (vitamin E, vitamin C, flavonoidi, karotenoidi, likopen), elementi u tragovima (Se, Cu, Zn, Mn) (SHINDE i sur., 2012.). Glavna funkcija endogenih i egzogenih antioksidansa je neutralizacija djelovanja slobodnih radikala. Na taj utječu na stvaranje učinkovitog imunosnog odgovora te smanjuju rizik od degenerativnih oboljenja, karcinoma i pojave neplodnosti jedinki (YADAV i sur., 2006.; PHAM-HUY i sur., 2008.; SHINDE i sur., 2012.). Endogeni se antioksidansi stalno stvaraju u organizmu te se dijele na enzimske i neenzimske molekule. Umreženi su i djeluju interaktivno, a obično su raspoređeni u citoplazmi i različitim staničnim organelama, ali se nalaze i u izvanstaničnoj tekućini.

Antioksidacijski obrambeni sustav sastavljen je od enzimatskih i neenzimatskih antioksidansa. Posebna pozornost je posvećena djelovanju antioksidansa u razrijeđenom uzorku sperme jer se smatra da je glavni uzrok „propadanja“ sperme, lipidna peroksidacija lipidne membrane spermija (LOPEZ-RODRIGUEZ i sur., 2017.). Dodatak Se prehrani koja

sadrži 0,06 ppm Se s 0,5 ppm Se, od odbića do starosti od 9 mjeseci, rezultirao je većom gibljivošću spermija nerasta i manjim postotkom abnormalnih spermija (MARIN-GUZMAN i sur., 1997.). Zamjena anorganskog s organskim Se u prehrani odraslih svinja povećava koncentraciju spermija, ali smanjuje gibljivost i otpornost prema oksidacijskom stresu (LOPEZ i sur., 2010.). Međutim, u naknadnim istraživanjima nije utvrđen utjecaj na kvalitetu sjemena nerasta u hranjenju s organskim i anorganskim selenom (LOVERCAMP i sur., 2013.; MARTINS i sur., 2014.; PETRUJKIC i sur., 2014.).

2.7.1. ENZIMATSKI ANTIOKSIDACIJSKI ZAŠTITNI MEHANIZMI

Antioksidacijski sustav u sjemenu sastavljen je od enzima, antioksidansa niske molekularne mase i bjelančevina sjemene plazme. Slobodni radikali u sjemenu nerasta su proizvodi leukocita te nezrelih ili abnormalnih spermija (ORZOLEK i sur., 2013.). Postoji jako pozitivna korelacija između postotka nezrelih spermija i stvaranja ROS-a što u konačnici negativno utječe na kvalitetu sjemena (SAID i sur., 2004.). Najštetniji slobodni radikali za spermu uključuju superoksidne i hidroksilne radikale te vodikov peroksid te uzrokuju smanjenje genetskog integriteta spermija te plodnosti (SHARMA i AGARWAL, 1996.). Antioksidacijski sustav u sjemenu svih sisavaca sastoji se od enzimskih aktivnosti superoksid dismutaze (SOD), glutation peroksidaze (GPx), glutation reduktaze (GR) i katalaze (CAT).

2.7.1.1. SUPEROKSID DISMUTAZA

Superoksid dismutaza je enzimatski antioksidans koji katalizira dismutaciju superoksidnog aniona u molekularni kisik i vodikov peroksid (DAS i sur., 2012.). Pripada skupini metaloenzima što znači da koristi metalne ione kao kofaktore. Postoji u nekoliko izoformi, koje se međusobno razlikuju prema svojstvu metalnog iona koji sadrže te prema aminokiselinskom sastavu, molekularnoj masi, lokalizaciji, mehanizmima regulacije i funkciji. U ljudskom antioksidacijskom sustavu postoje tri oblika SOD-a: citosolna, izvanstanična i mitohondrijska SOD (LANDIS i TOWER, 2005.). SOD štiti spermije katalizirajući dismutaciju superoksidnih aniona na vodikov peroksid i kisik, štiteći tako zrele spermije od prekomjernog nakupljanja superoksidnih aniona (AITKEN i sur., 1996.). Hlađenjem sjemena na temperaturu od 5 °C smanjuje se unutarstanična razina nastalog kisika i vodikovog peroksida (KIM i sur. 2011.).

Sjemenu plazmu nerasta karakterizira visoka aktivnost SOD-a koja je prisutna u tekućinama nuzsjemenika i prostate. U jednom mL sperme nerasta, u frakciji bogatoj spermijima, ukupno 66 % ukupne aktivnosti SOD-a je povezano s njegovim stvaranjem u spermijima, a ostatak sa stvaranjem u sjemenoj plazmi i citoplazmatskoj kapljici (MANELLA i JONES, 1980.). Niska aktivnost glutationskih enzima i odsutnost katalaze u sjemenu nerasta je kompezirana aktivnošću SOD-a i antioksidacijskim svojstvima bjelančevina iz sjemene plazme (STRZEŻEK, 2002.; STRZEŻEK, 1999.). Aktivnost SOD-a se u sjemenoj plazmi smatra prediktivnim pokazateljem progresivne gibljivosti i vitalnosti nakon 3 dana skladištenja sperme (PIPAN i sur., 2014.). Povećana aktivnost SOD-a u ljudi je u pozitivnoj korelaciji s plodnošću (MURAWSKI i sur., 2010.; WDOWIAK i sur., 2015.; DOROSTGHOAL i sur., 2017.), ali potencijalna veza između SOD-a i plodnosti *in vivo* u domaćih životinja je nedostatno istražena. Tako primjerice razina aktivnosti SOD-a u sjemenu bika nije povezana s njihovom plodnošću (KUMAR i sur., 2017.). Cilj istraživanja BARRANCO i sur. (2019.) je bio dokazati da je aktivnost SOD-a pozitivno povezana s pokazateljima gibljivosti spermija koji su pohranjeni na 17 ° C tijekom 72 sata. Međutim, zaključak je da aktivnost SOD-a nije čimbenik kojim se može predodrediti uspješnost plodnosti osjemenjenih krmača. Dodavanje SOD-a u razrjeđivač sjemena nerasta *in vitro* pozitivno utječe na sposobnost odmrznutih spermija da oplode jajne stanice (ROCA i sur., 2005.). U spermijima nerasta aktivnost SOD-a ovisi o pasmini, odnosno postoje međupasminske razlike u razini SOD-a tako da nerasti pasmine švedski landras imaju najviše razine SOD-a u spermijima, dok križane pasmine nerasta imaju najniže razine SOD-a te samim time i najnižu antioksidacijsku zaštitu (ŽURA ŽAJA i sur., 2016.).

2.7.1.2. GLUTATION PEROKSIDAZA

Glutation peroksidaza je enzim koji razgrađuje vodikov peroksid nastao djelovanjem SOD-a. Ovaj antioksidans predstavlja drugu liniju obrane protiv lipidne peroksidacije katalizirajući redukcije vodikovog peroksida do vode i odgovarajućeg alkohola, uz oksidaciju reduciranog glutationa, koji je donor vodika. Strukturno je sastavljen od selena, a lokaliziran je unutar staničnih membrana. U ljudskom tijelu postoje četiri poznata oblika ovog enzima: gastrointestinalna, stanična, plazmatska i fosfolipid-peroksid-glutation-peroksidaza (ČVORIŠĆEC i ČEPELAK, 2009.). U dostupnoj literaturi podatci o učinku povišene ili snižene razine aktivnosti GPx-a na funkcije spermija nerasta su kontroverzni. NOVAK i sur. (2010.) navode da postoji pozitivna korelacija između povišenih vrijednosti GPx-a i stope

prasenja, dok su VILAGRAN i sur. (2016.) utvrdili da se ipak radi o negativnoj vezi između povišene aktivnosti GPx-a i integriteta membrane spermija i pokazatelja gibljivosti u svježe ejakuliranoj spermi. Razina aktivnosti GPx-a razlikuje se u spermi nerasta koji dobro odnosno loše podnose smrzavanje (VILAGRAN i sur., 2015.). Nadalje, aktivnosti GPx-a značajno variraju među nerastima i između spermi istog nerasta (BARRANCO i sur., 2016.). Također, dokazano je da ekspresija GPx-a u nuzsjemeniku ovisi o nekoliko čimbenika povezanih s nuzsjemenicima i testisima te o čimbeniku rasta fibroblasta i razini androgena (BRIGELIUS-FLOHÉ i MAIORINO, 2013.). Najniža aktivnost GPx-a zabilježena je u prvoj frakciji sperme (prvih 10 mL), čiji spermiji uglavnom potječu iz nuzsjemenika (RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ i sur., 2011.) što je bitno jer je do tada nuzsjemenik bio jedino poznato mjesto podrijetla GPx-a (BRIGELIUS-FLOHÉ i MAIORINO, 2013.). Kasnijim istraživanjima dokazano je da se GPx sintetizira i u tkivu testisa, pogotovo u Leydigovim stanicama te intersticiju (BARRANCO i sur., 2016.). Nadalje, postoji pozitivna korelacija između povećane aktivnosti GPx-a na kvalitetu sjemena u slučaju pohranjivanja sjemena tijekom 72 sata te više aktivnost GPx-a s brojem praščića u leglu. Veća aktivnost GPx-a je u pozitivnoj korelaciji s gibljivošću spermija, odnosno mehanizam pozitivne korelacije je u direktnom učinku GPx-a na gibljivost spermija.

2.7.1.3. GLUTATION REDUKTAZA

Glutation reduktaza je enzim koji je svrstan u porodicu glutationskih enzima. Značajna funkcija ovog enzima je stalna regeneracija reduciranog glutationa. Prilikom kataliziranja redukcije glutation disulfida nastaju dvije molekule glutationa (DEPONTE, 2013.). Koristi NADPH kako bi oksidirani oblik glutationa (GSSG) „obnovio“ u reducirani oblike (GSH) koji dalje služi kao reducirajuća molekula, uz djelovanje glutatione peroksidaze, za vodikov peroksid pretvarajući ga u vodu. U sjemenu plodnih i neplodnih muškarcima ustanovljena je čvrstu korelacija između mitohondrijske glutation peroksidaze (GPx) i GR-a (GARRIDO i sur., 2004.). Najveća razina aktivnosti GR-a zabilježena je u nuzsjemeniku, sjemenovodu, sjemenim vrećicama, prostati odnosno u svim epitelnim stanicama muškog reproduktivnog sustava. Funkcija GR-a je zaštita spermija od oksidacije prilikom maturacije i skladištenja (KANEKO i sur., 2002.).

2.7.1.4. UKUPNI ANTIOKSIDACIJSKI STATUS

Sjemena plazma sadržava mnogobrojne komponente s antioksidacijskim svojstvima, enzimatske i ne-enzimatske, koje zajedničkim djelovanjem čini ukupni antioksidacijski status (TAS). Određivanje koncentracije TAS-a je od velike važnosti jer se smatra da je niska razina TAS-a pokazatelj neplodnosti odnosno spermija patoloških oblika sa smanjenom funkcijom ili bez nje (KHOSRAVI i sur., 2014.). Smatra se da je integritet DNK-a spermija povezan s TAS-om u spermi muškaraca (SONG i sur., 2006.). Koncentracija ROS-a i koncentracija TAS-a smatrani su dobrim pokazateljima oksidativnog stresa (SALEH i sur., 2003.). Nadalje, koncentracija je TAS-a veća u muškaraca sa normalnim spermijima za razliku od muškaraca s abnormalnim spermijima (PAHUNE i sur., 2013.).

Utvrđena je pozitivna korelacija TAS-a u sjemenoj plazmi nerasta s gibljivošću, vitalnošću, normalnom morfologijom i intaktnom staničnom membranom spermija odnosno nađena je veća koncentracija TAS-a u sjemenoj plazmi nerasta s fiziološkim postotkom gibljivih spermija u spermi (AM-IN i sur., 2011.). Također je utvrđena povezanost ukupnih bjelančevina s TAS-om u sjemenoj plazmi nerasta (STRZEZEK i sur., 1999.). Koncentracija TAS-a u sjemenu nerasta značajno varira među pasminama. Hibridne pasmine svinja imaju najveću koncentracije TAS-a u odnosu na pasmine pietren i njemački landras (ŽURA ŽAJA i sur., 2016). Nerasti s višim razinama TAS-a uglavnom imaju bolje rasplodne rezultate, stoga bi TAS trebalo smatrati potencijalnim biobiljegom za plodnost nerasta koji se koriste za umjetno osjemenjivanje krmača (BARRANCO i sur., 2015.).

2.8. ELEKTROMAGNETSKO ZRAČENJE

Zračenje elektromagnetskog spektra je emisija čestica ili elektronskih valova iz nekog izvora. Postoje prirodna elektromagnetska zračenja (EMZ) s kojima oduvijek živimo (Sunce, kozmičko zračenje, Zemljino magnetsko polje, Hartmanovi čvorovi) te umjetna (antropogena) zračenja koja potječu iz izvora koja je čovjeka izumio. Elektromagnetsko zračenje možemo definirati kao prijenos energije u obliku elektromagnetskih valova koji se šire zrakopraznim prostorom brzinom svjetlosti (SOMEDA, 2006.). Polje između dva električna tijela čiji atomi nose električne naboje nazivamo električnim poljem, a prilikom gibanja električnog naboja dolazi do stvaranja magnetskog polja. Električni naboj koji titra ima svojstvo elektromagnetskog vala. Promjenjivo magnetsko polje proizvodi električno, a promjenljivo električno polje proizvodi magnetsko polje. Proces uzajamne proizvodnje električnog i

magnetskog polja širi se po prostoru brzinom svjetlosti. EMZ vrlo visokih frekvencija (iznad 30 PHz) nose veliku energiju te mogu ionizirati atome i molekule pri prolasku kroz tvari. Takvu vrstu EMZ-a nazivamo ionizirajućim zračenjem. S druge pak strane, EMZ nižih frekvencija od 30 PHz nema dovoljnu energiju za ionizaciju atoma te se još naziva neionizirajuće elektromagnetsko zračenje koje se sastoji od radiofrekvencijskog i optičkog dijela (ŽURA ŽAJA i sur., 2021.).

Radiofrekvencijski dio zauzima područje frekvencije od 0 - 300 GHz, te je prema Međunarodnoj telekomunikacijskoj uniji (engl. *International Telecommunication Union - ITU*) podijeljen na područja ekstremno dugog vala i područja ekstremno kratkog vala. Prisutnost različitih frekvencija iz područja neionizirajućeg zračenja antropogenog podrijetla (radiokomunikacijski sustavi, mobilni telefoni, mikrovalne pećnice, izvori iz područja bežičnog komunikacijskog sustava u okolišu) poznat je pod pojmom elektromagnetski smog ili elektrosmog (SAEFL, 2005.; POLJAK, 2006.) koji predstavlja ambijentalna polja na različitim frekvencijama čije se djelovanje zbraja. Elektrosmog se smatra jednim od najopasnijih polutanata, a samu štetnost je definirala Nacionalna aeronautička i svemirska administracija (*National Aeronautics and Space Administration - NASA*) (2010.): „ *Dok sjedite i gledate TV, niste izloženi samo vidljivim svjetlosnim valovima s televizora već i radio valovima emitiranim s obližnje stanice, mikovalne pećnice, mobilnih telefona, bežičnog interneta i navigacijskog satelitskog sustava iz automobila. Kroz vašu sobu trenutno prolazi kaos valova iz cijelog spektra*."

Međunarodna agencija za istraživanje raka (*International Agency for Research on Cancer - IARC*) je 2011. godine prema klasifikaciji čimbenika koji uzrokuju tumore svrstala je elektromagnetska radiofrekvencijska zračenja u potencijalno kancerogene, odnosno kategoriju 2B za koju je karakteristično da postoje ograničeni dokazi o kancerogenosti u ljudi i manje nego dovoljni dokazi o karcinogenosti u pokusnih životinja.

U tablici 1. prikazana je klasifikacija kancerogenih uzročnika prema Međunarodnoj agenciji za istraživanje raka (nadopunjena tablica iz 2021. godine).

Grupa	Opis	Definicija	Broj uzročnika
1	kancerogeni	dovoljni dokazi o kancerogenosti	121
2A	vjerojatno kancerogeni	ograničeni dokazi o kancerogenosti u ljudi i dovoljni dokazi o kancerogenosti u pokusnih životinja	89
2B	potencijalno kancerogeni	ograničeni dokazi o kancerogenosti u ljudi i manje nego dovoljni dokazi o karcinogenosti u pokusnih životinja	318
3	nije klasificirano prema svojoj kancerogeno-sti za ljude	dokazi o kancerogenosti neadekvatni su za ljude, a neadekvatni ili ograničeni u pokusnih životinja	499

Organizam se ponaša kao antena koja apsorbira EMZ i konvertira ih u oblike izmjenične struje. Učinak EMZ-a na organizam se mjeri sa standardnom jedinicom SAR, što predstavlja umnožak količine apsorbirane energije u jedinici vremena po jedinici mase. Formula za izračunavanje SAR-a je:

$$SAR\ (W/kg) = \sigma E^2/\rho,$$

gdje je sigma (σ) vodljivost tekućine, a rho (ρ) gustoća tekućine. Izmjerene vrijednosti E-polja i raspodjela SAR su 1 g i prosječne mase vrijednosti SAR od 10 g.

Biološki učinci radiofrekvencijskog EMZ-a mogu biti toplinski i netoplinski, a dobiveni su na temelju istraživanju *in vivo* na pokusnim životinjama, *in vitro* na staničnim kulturama i na temelju obrade epidemioloških podataka. Negativni učinak je izražen kada je biološki učinak izlaganja polju izvan normalnog raspona koji organizam može podnijeti. Toplinski učinak se manifestira porastom temperature zbog prijenosa energije (KIVRAK i sur., 2017.), a netoplinski učinci izazivaju kontroverze zbog nemogućnosti isključivanja drugih čimbenika koji mogu djelovati na zdravlje organizma. Osnovni biološki učinak EM polja na visokim

frekvencijama je zagrijavanje tkiva. Zagrijavanje tkiva nastaje kad je ukupna EM energija apsorbirana u organizmu dovoljno velika za izazivanje porasta temperature u tijelu koja narušava unutarnje termoregulacijske mehanizme (KIVRAK i sur., 2017.) .

Simptomi netoplinskog učinka koji se najčešće očituju su promjena moždane aktivnosti, poremećaj pamćenja, poremećaj spavanja, razdražljivost, vrtoglavica, glavobolja, gubitak koncentracije, depresija, zujanje u ušima, nepravilnosti rada srca te elektroosjetljivost (SAEFL, 2005.; MILEUSNIĆ, 2006.; RÖÖSLI, 2008.). Biološki učinci mogu biti izravni, koji nastaju kada zračenje djeluje na mitohondrijsku DNK-a koja sadrži genetske upute za specifični biološki razvoj (XU i sur., 2010.), neizravni koji nastaju zbog djelovanja zračenja na vodu unutar same stanice (RAVANAT i sur., 2001.), somatski koji se javljaju na ozračenom pojedincu te genetski učinci koji se mogu pojaviti (prenijeti genskom uputom) i na njegovu potomstvu (CRNEK-KUNSTELJ, 2003.). Netoplinski učinci RF-EMZ-a zabilježeni su na brojnim vrstama životinja u prirodi, uključujući ptice (BALMORI, 2005.), vodozemce (BALMORI, 2010.), kukce (EVANS i sur., 2017.), ribe (IBRAHEIM i sur, 2013.), sisavce (MAILANKOT i sur., 2009.).

Velika većina dosadašnjih istraživanja usmjerena je na negativni utjecaj EMZ-a na reproduktivni sustav ljudi (FALZONE i sur., 2011.; ALTUN i sur., 2018.).

U istraživanju provedenom na 361 ispitaniku, u klinici za neplodnost, utvrđeno je da u muškarca koji koriste mobilne uređaje više od dva sata dnevno, dolazi do značajnog smanjenja u ukupnom broju i gibljivosti spermija, udjelu živih spermija te udjelu morfološki normalnih spermija (AGARWAL i sur., 2008.). *In vitro* studija na spermi muškaraca potvrđuje somatski i genetski učinak EMZ-a dovodeći u vezu da prekomjerna upotreba mobitela potencijalno utječe na plodnost muškaraca i njihovih potomaka (DE IULIIS i sur., 2009.).

EMZ koji odašilju mobilni uređaji, s određenom gustoćom, jakosti i frekvencijskim rasponom, povećavaju stvaranje ROS-a te smanjuju vitalnost stanica stvarajući slobodne radikale koji u konačnici dovode do fragmentacije DNK-a (HOUSTON i sur., 2016.).

Sve veća upotreba uređaja s radiofrekvencijskim zračenjem kao što su mobiteli i bežične mreže, povezuju se sa smanjenom plodnošću parova koja je u SAD-u 2005. godine iznosila 7,4 % (CHANDRA i sur., 2005.), a pretpostavka je da je ta brojka danas još i veća (HOMAN i sur., 2007.). Naime, brojne studije svjedoče o štetnosti upotrebe mobitela na reproduktivni sustav i to na smanjenje broja progresivno gibljivih spermija te vitalnosti spermija (AGARWAL i sur., 2008.; AGARWAL i sur., 2009.) kao i porast koncentracije ROS-

a u spermi štakora (KUMAR i sur., 2011.). Također, EMZ koji emitira bežična mreža laptopa ima negativan utjecaj na kvalitetu sperme muškaraca (AVENDAÑO i sur., 2012.). EMZ je također odgovorno i za smanjenje postotka oplodnje u štakora (I, AL-AKHRAS i sur., 2001.) te ukupnog broja spermija te pokretanje mehanizma apopotoze spermija (LEE i sur., 2004.; KIM i sur., 2009.). Osim nekvalitetnog uzorka sperme (LI i sur., 2010.), brojni autori spominju i hormonalne promjene u testisima (FEJES i sur., 2005.; AGARWAL i sur., 2008.) te fetalnu smrtnost i poremetnje u embrionalnom razvoju ljudi (HEYNICK i MERRITT, 2003.). U istraživanju na Wistar štakorima utvrđeno je da izlaganje EMZ-u 2 sata / dan tijekom 35 dana, dolazi do smanjenja ukupnog broja spermija i porasta broja apopototičnih stanica (KESARI i sur., 2010.). Nadalje, mužjaci Wistar štakora izloženi bežičnoj mreži laptopa (7 sat / dan kroz tjedan dana) imali su smanjen ukupan broj spermija te gibanje spermija u spermi (MORTAZAVI i sur., 2010.). Druga su istraživanja također povezala učinak EMZ-a (FEJES i sur., 2005; YAN i sur., 2007.; AGARWAL i sur., 2009.; GORPINCHENKO i sur., 2014.; JONWAL i sur., 2018.) ili zračenje mobitela (DE IULIIS i sur., 2009.; GHANBARI i sur., 2013.) sa štetnim učincima na testise muškaraca. Takvo izlaganje zračenju može stvoriti stanje oksidativnog stresa i potaknuti stvaranje slobodnih radikala u mitohondrijima spermija (DE IULIIS i sur., 2009.).

Pojedini autori navode da nošenje mobitela u džepu ili na remenu dovodi do smanjenja progresivne gibljivosti spermija (KILGALLON i SIMMONS, 2005.; AL-BAYYARI, 2017.). Nadalje, izlaganje EMZ-u izravno utječe na testise miša uzrokujući značajno smanjenje promjera sjemenih kanalića što u konačnici dovodi do patoloških i fizioloških promjena u tkivu testisa (LUO i sur., 2013.). Naime, u razvijenom dijelu Zemlje postoji sve veća zabrinutost o dokazanom rastućem postotku neplodnosti u ljudi (KUMAR i sur., 2014.).

Uslijed utjecaja EMZ-a na spermu nerasta, može doći do narušavanja vrijednosti pokazatelja brzine spermije, koji se određuju pomoću CASA-e. Nakon zračenja sa svega 50 Hz tijekom 2 sata u sinusoidnom magnetskom polju, vrijednosti za pokazatelje VAP, VCL, ALH, VSL te STR su bile značajno niže, što je izravni dokaz o negativnom utjecaju EMZ-a na pokazatelje brzine spermija nerasta (BERNABO i sur., 2007.).

Učinci EMZ-a na spermije ovisi o nekoliko čimbenika, a najvažniji su frekvencija zračenja, vrijeme izlaganja, jačina polja te količina apsorbirane energije (HOUSTON i sur., 2016.). U spermi muškaraca, zbog izlaganja različitim frekvencijama EMZ-a dolazi do fragmentacije DNK-a (DE IULIIS i sur., 2009.; GORPINCHENKO i sur., 2014.; ZALATA i

sur., 2015.). Pretpostavka je da niže doze zračenja i kraći vremenski period izlaganja nisu dovoljni čimbenici koji uzrokuju oštećenje DNK-a, nego su potrebne više doze zračenja. Posljedica smanjene gibljivosti spermija te oštećenje DNK-a u muškarca izloženih zračenju moderne tehnologije učinak je kumulativnog konstantnog izlaganja EMZ-u (AGARWAL i sur., 2011.). Druga pretpostavka zašto dolazi do oštećenja DNK-a pri manjim frekvencijama zračenja u kraćim vremenskim intervalima je oksidativni stres koji ima ključnu funkciju u fragmentaciji DNK-a (ZALATA i sur., 2015.).

Wistar štakori nakon izlaganja EMZ-u od 2,4 GHz tijekom 2 sata / dan kroz 45 dana imaju značajno oštećenje DNK-a spermija u spermi (MEENA i sur., 2013.). Također, EMZ od 2,4 GHz uzrokuje reorganizaciju dijelova DNK-a te razaranje DNK-a u testisima štakora (NAZIROĞLU i GÜMRAL, 2009.).

Radiofrekvencijsko neionizirajuće EMZ ima genotoksični učinak upravo zbog oštećenja DNK-a, alteracije u ekspresiji gena te promjene u proliferaciji stanica (KESARI i sur., 2018.). Posljedica radiofrekvencijskog neionizirajućeg EMZ-a je iskrivljena glava spermija te oštećenje mitohondrija što u konačnici dovodi do njihove apoptoze. U *in vitro* studiji dokazano je da različite modulacije RF-EMZ-a izazivaju jednolančane i dvolančane prekide u humanim diploidnim fibroblastima te u stanicama granuloza stanica štakora u kulturi (DIEM i sur., 2005.).

U pregledu dosadašnjih istraživanja nisu nađene slične studije o utjecaju EMZ-a na spermi nerasta kako bi se moglo povezati oštećenje DNK-a ili mithondrija uslijed zračenja.

Izlaganjem organizma, odnosno stanica RF-EMZ-u dolazi do prekomjernog stvaranja ROS-a čija koncentracija prelazi antioksidacijski kapacitet stanice te posljedično tome razvoj oksidativnog stresa. Uslijed izlaganja muškaraca i štakora EMZ-u, u spermi istih dolazi do stvaranja ROS-a, odnosno nastupa neravnoteža oksidacijskog statusa (AGARWAL i sur., 2009.; LIU i sur., 2015.). Nadalje, uslijed djelovanja EMZ-a, dolazi do porasta lipidne peroksidacije a time i promjena u aktivnostima antioksidacijskih enzima u krvi muškaraca (AWANATI i sur., 2010.). Prisutnost propalih spermija u sjemenu značajno povećava proizvodnju ROS-a te dovodi do disfunkcije odnosno oštećenja mitohondrija „živih“ spermija u spermi muškaraca (AGARWAL i sur., 2014.). Budući da su mitohondriji neophodni za energiju, odnosno za gibljivost spermija, bilo koji metabolički poremećaj u transportnom lancu elektrona može značajno povećati proizvodnju ROS-a u mitohondrijima, što utječe na

gibljivost spermija, pojavu fragmentacije DNK-a te smanjenje gibljivosti i vitalnosti spermija (ALAHMAR, 2019.).

U pregledu dosadašnjih istraživanja, nisu nađena slična istraživanja odnosno određivanje antioksidacijskog statusa u spermi nerasta nakon izlaganja zračenju EMZ-a.

3. OBRAZLOŽENJE TEME

Razvojem moderne tehnologije poraslo je zanimanje javnosti za potencijalni negativni učinak EMZ-a s obzirom na to da se broj korisnika svakodnevno povećava, pogotovo onih mlađe životne dobi koji su najizloženiji (LANGER i sur., 2017.). Elektrosmogu su izložena sva živa bića koja se nalaze u ljudskoj blizini zbog pojavnosti različitih frekvencija iz područja

neionizirajućeg zračenja (radiokomunikacijski sustavi, mobilni telefoni, mikrovalne pećnice, izvori iz područja bežičnog komunikacijskog sustava u okolišu) koja je čovjek osmislio i stvorio (SAEFL, 2005.; POLJAK, 2006.). Tkiva koja su osobito pogođena utjecaju EMZ-a su mozgovno tkivo i tkivo reproduktivnih organa zbog načina upotrebe i navike nošenja mobitela u džepovima (AGARWAL i sur., 2008.; GYE i PARK, 2012.; KIVRAK i sur., 2017.). Spermiji su u mnogim istraživanjima izabrani kao stanični model zbog ključne funkcije u reprodukciji te zbog specifične građe odnosno biološke osobitosti. Naime, mala količina citoplazmatskih enzima onemogućava spermiju mehanizme zaštite i popravka što ga čini osobito osjetljivim na okolišne uvjete (WARD i COFFEY, 1991.; BERNABO i sur., 2007.). Stoga su velika većina dosadašnjih istraživanja usmjerena na negativni utjecaj RF-EMZ-a na muški reproduktivni sustav, osobito ljudi, dok su podatci o učinku RF-EMZ-a na reproduktivni sustav mužjaka domaćih životinja oskudni. Biološki učinci zračenja na organizam/stanice su različiti, a ovise o frekvenciji zračenja te dugotrajnosti izlaganja. No, čimbenici poput razlike u dizajnu istraživanja, a posebno nemogućnost reproduciranja istih uvjeta izloženosti RF-EMZ-u (frekvencija, amplituda, oblik vala magnetskog polja, vrijeme ekspozicije itd.) onemogućili su do danas konačan zaključak o staničnom oštećenju uzrokovanom izlaganjem elektromagnetskom polju. Zasada poznati podatci ukazuju da uslijed izlaganja EMZ-u, može doći do smanjenja gibljivosti spermija, oštećenja DNK-a te stvaranja prekomjerne količine reaktivnih kisikovih spojeva odnosno oksidacijskog stresa (FALZONE i sur., 2011.; ALTUN i sur., 2018.). Međutim, do sada potencijalno negativni učinci EMZ-a većih frekvencija od 2500 MHz nisu istraživana na muški reproduktivni sustav ljudi i životinja. Nadalje, iako su svinje u posljednjim desetljećima kao animalni modeli vrlo česti izbor u biomedicinskim istraživanjima, do danas je jedino istraživan učinak RF-EMZ-a vrlo male frekvencije 50 MHz na pokazatelje gibljivosti i brzine spermija nerasta (BERNABO i sur., 2007.). Također, u dostupnoj literaturi nema podataka o učinku RF-EMZ-a na pokazatelje antioksidacijske zaštite i vitalnosti spermija te strukturnu stabilnosti kromatina spermija *in vitro* ozračenoga sjemena rasplodnih nerasta.

Ciljevi istraživanja:

1. Istražiti učinak elektromagnetskog zračenja na pokazatelje kakvoće sjemena rasplodnih nerasta, pokazatelje antioksidacijske zaštite spermija i strukturnu stabilnosti kromatina spermija nerasta

2. Utvrditi postoji li različiti učinak kontinuiranog neionizirajućeg elektromagnetskog zračenja različite frekvencije te različite jakosti elektromagnetskog polja na prethodno spomenute pokazatelje.

Pretpostavka istraživanja je da postoji negativan učinak elektromagnetskog zračenja na kakvoću sjemena nerasta te na pokazatelje antioksidacijske zaštite i na strukturnu stabilnosti kromatina spermija. Također, pretpostavka je da niže doze elektromagnetskog zračenja također mogu imati negativan učinak na prethodno navedene pokazatelje.

4. MATERIJAL I METODE ISTRAŽIVANJA

Temeljem članka 31. Statuta Veterinarskoga fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Fakultetsko vijeće Veterinarskoga fakulteta Sveučilišta u Zagrebu na prijedlog Povjerenstva za etiku u veterinarstvu, na 5. redovitoj sjednici održanoj 19. veljače 2020. godine donijelo je odluku da se odobrava provođenje ovog istraživanja (klasa: 640-01/20-17/13, ur. br.: 251-61-44-20-02).

4.1. ŽIVOTINJE, SMJEŠTAJ I HRANIDBA

Istraživanje je provedeno na uzorcima svježeg razrijeđenog sjemena nerasta pasmine pietrain i landras, a prikupljeni su u okviru provođenja neeksperimentalnog kliničkog rada radi izrade doktorskog rada. U ovo istraživanje uključeno je 12 nerasta starosti od jedne i pol do tri i pol godine, kojima se rutinski uzima sjeme u svrhu dobivanja sjemena za umjetno osjemenjivanje krmača, a nalaze u sklopu Veterinarske stanice d.d. Varaždin (Stočar d.o.o., Trg I. Perkovca 24, 42000 Varaždin). Istraživanje je rađeno uz suglasnost Veterinarske stanice d.d. Varaždin o korištenju uzoraka sjemena za provedbu istraživanja u svrhu izrade doktorskog rada.

Nerasti su držani u zasebnim odjeljcima cca 12 m^2 (4 m x 3 m). Svi odjeljci u kojima su držani nerasti su bili osvijetljeni prirodnim svjetlom, a podovi su bili prekriveni slamnatom steljom. Nerasti su bili hranjeni dnevno s cca 2 kg smjese za neraste podijeljene u dva obroka; prvi obrok ujutro prije skoka (oko 6.00 sati) te drugi oko 14.00 sati. Smjesu za neraste izrađuje Veterinarska stanica d.d. Varaždin (tablica 2.) prema propisanoj recepturi. Nerasti su imali pristup vodi po volji (*ad libitum*).

Prema *Naredbi o mjerama zaštite zdravlja životinja od zaraznih i nametničkih bolesti i njihovom financiranju u 2020. godini* (NN 7/2020) nerastima se jednom godišnje vadi krv te im se jednom godišnje parenteralno aplicira Vit AD_3E + Dectomax.

sirove bjelančevine	17,15 %
sirova mast	3,13 %
sirova celuloza	6,29 %
pepeo	5,30 %
metabolička energija	12,49 MJ/kg

Tablica 2. Sastav krmne smjese za neraste.

lizin	1,24 %
metionin	0,47 %
triptofan	0,18 %
metionin + cistin	0,76 %
cink	126 mg/kg
magnezij	56 mg/kg
probavljive bjelančevine	38,28 %
bakar	31,50 mg/kg
selen	0,42 mg/kg
kalcij	0,83 %
fosfor ukupni	0,53 %
fosfor iskoristivi	0,22 %
natrij	0,23 %
vitamin D3	1750,01 IJ/kg
vitamin A	9100 IJ/kg
vitamin E	70 IJ/kg

4.2. DIZAJN POKUSA I POSTUPCI SA ŽIVOTINJAMA

Svim nerastima, koji se nalaze u sklopu Veterinarske stanice d.d. Varaždin se rutinski uzima sjeme jednom tjedno u svrhu dobivanja sjemena za umjetno osjemenjivanje krmača, odnosno svakom nerastu se uzima sjeme isti dan u tjednu. Ovo istraživanje je načinjeno na uzorcima svježeg, razrijeđenog sjemena, koje je dobiveno metodom manualne fiksacije penisa nerasta (8 nerasta pasmine pietren i 4 nerasta pasmine njemački landras) starosti od jedne i pol do tri i pol godine. Sjeme je uzeto nerastima u jutarnjim satima (oko 7.00 sati), razrijeđeno te je potom dostavljeno u transportnoj kutiji s digitalnim termometrom i uloškom za prijenosni hladnjak do Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu na Kliniku za porodništvo i reprodukciju gdje je bilo podvrgnuto postupku ozračivanja. U laboratoriju su uzorci sjemena svakog nerasta bili su razdijeljeni u Petrijeve zdjelice (15 mL uzoraka koji je bio kontrola i 15 mL uzoraka koji je bio ozračen). Nakon toga, pokusni uzorci bili su ozračeni s tri različita tretmana izlaganja kontinuiranom neionizirajućem elektromagnetskom zračenju frekvencije od 700 MHz do 3,5 GHz pri jakosti elektromagnetskog polja od 10 V/m u trajanju od dva sata pomoću gigahercne transverzalne elektromagnetske (HCTEM) komore napravljene u Zavodu za radiokomunikacije i visokofrekvencijsku elektroniku Fakulteta elektrotehnike i računarstva Sveučilišta u Zagrebu. Radi lakše provedbe istraživanja, uzimanje uzoraka i ozračivanje sjemena provelo se u tri razdoblja, a svako razdoblje je trajalo po tjedan dana. U svakom od tri razdoblja, uzorkovana je sperma 12 nerasta odnosno ukupno 24 uzorka od kojih su 12 bili kontrolna skupina a 12 pokusna (ozračena) skupina. Sveukupno je uzorkovano 36 uzoraka sperme za sva tri pokusna razdoblja što u konačnici predstavlja broj od 72 uzorka gdje 36 čine kontrolne a 36 pokusne uzorke. Prvo pokusno razdoblje započeto je 3. prosinca 2020. godine kada je učinjeno ozračivanje neionizirajućim elektromagnetskim zračenjem na frekvenciji od 700 MHz jakosti elektrektričnog polja od 10 V/m. Drugo pokusno razdoblje započeto je 28. siječnja 2021. godine kada su uzorci ozračeni neionizirajućim elektromagnetskim zračenjem frekvencije od 2500 MHz jakosti elektromagnetskog polja od 10 V/m. Posljednje, odnosno treće pokusno razdoblje započeto je 11. veljače 2021. godine kada su uzorci ozračeni neionizirajućim elektromagnetskim zračenjem na frekvenciji od 3500 MHz jakosti elektromagnetskog polja od 10 V/m.

4.3. POLUČIVANJE I POSTUPAK SA SPERMOM

4.3.1. POLUČIVANJE SPERME

Spermu je svakom nerastu polučivala ista osoba na koju su nerasti bili naviknuti, jednom tjedno metodom manualne fiksacije penisa uz prisutnost fantoma (Slika 2.). Nerasti su, jedan po jedan, dovedeni u odjeljak s fantomom čija je glavna funkcija vizualna stimulacija koja je rezultirala prekopulatornim ponašanjem u vidu roktanja, salivacije i bliskog kontakta s fantomom. Nakon što je nerast „naskočio“ na fantom, tako što je stražnjim nogama stajao čvrsto na tlu, a prednjim dijelom tijela je u potpunosti bio naslonjen na fantom, uočene su protruzija penisa i erekcija. Ruka osobe (s rukavicom) koja polučuje spermu je postavljena na ventralni dio abdomena nerasta kranijalno od otvora prepucija, te je čvrstim pritiskom ruke na distalni dio penisa osiguran jak pritisak. Ejakulacija je trajala u prosjeku 7 minuta, a sperma je sakupljena u plastične vrećice koje su se nalazile u termo posudi s toplom vodom na +32 °C radi zaštite od temperaturnog šoka i sunčeve svjetlosti. Na samom vrhu plastičnih vrećica nalazio se filter kako bi se izvršila filtracija na samom mjestu polučivanja sperme.



Slika 2. Manualna fiksacija penisa nerasta uz prisutnost fantoma.

4.3.2. POSTUPAK SA SPERMOM I STANDARDNA OCJENA SPERME

Nakon polučivanja, sperma se ulijeva u menzuru volumena 500 mL pomoću koje je očitan volumen uzroka sperme. Standardna ocjena uzorka sperme učinjena je u centru za U.O. Varaždin kojom je utvrđeno da uzorci odgovaraju kriterijima koji vrijede za neraste (minimalna gibljivost > 60 %). Standardna ocjena obuhvaćala je procjenu morfologije (Spermac; Minitube, Tiefenbach, Njemačka), gibljivosti i masovne gibljivosti („Olympus BX50F“, Olympus, Tokyo, Japan) te koncentracija spermija. Koncentracija spermija određena je pomoću Accucell fotometra tipa 60CI0394“ (IMV technologies, Normandija, Francuska). Uređaj je prije upotrebe kalibriran i podešen na postavke za brojanje spermija nerasta.

4.3.3. RAZRJEĐENJE UZORKA SPERME

Nakon određivanja koncentracije spermija u uzorcima sperme, u svaki uzorak je dodana količina razrjeđivača (Cronos, Medi-Nova, Reggio Emilia, Italija) koja je određena fotometrom. Paralelno je u 3 litre zagrijana voda na 32 °C. Fotometrom preko pisaća izračunato je potrebno razrjeđenje. U menzuru sa spermom dodan je razrjeđivač u omjeru 1:1, te je nakon 5 minuta dodan uzorak u ostatak razrjeđivača (koliko je fotometrom određeno). Formirana su dva različita razrjeđenja kako bi se dobile koncentracije od 30 milijuna spermija/mL i 90 milijuna spermija/mL za potrebe ovog pokusa. Koncentracija od 30 milijuna spermija/mL korištena je za analize pokretljivosti, DNK- statusa te pokazatelje kakvoće dok je koncentracija od 90 milijuna spermija/mL korištena za određivanje antioksidacijskog statusa. Veće razrjeđenje je korišteno kako bi se dobio što veći volumen nadtaloga nakon centrifugiranja kako bi se odredio što veći broj pokazatelja antioksidacijskog statusa. Tako razrijeđeni uzorci preliveni su u plastične bočice od 100 mL te su transportirane u prijenosom hladnjaku uz kontroliranu temperaturu (+17 °C) do Veterinarskog fakulteta u Zagrebu, Klinika za porodništvo i reprodukciju radi izvođenja istraživanja.

4.4. IZLAGANJE UZORAKA RADIOFREKVENCIJSKOM ELEKTROMAGNETSKOM ZRAČENJU U LABORATORIJSKIM UVJETIMA

Uzorci sjemena svakog nerasta (n=12) bili su razdijeljeni u Petrijeve zdjelice (Falcon® 60 mm TC-treated Easy-Grip Style Cell Culture Dish) (kontrolni te pokusni uzorak). Pokusni uzorci bili su ozračeni s tri različita tretmana izlaganja kontinuiranom neionizirajućem elektromagnetskom zračenju na frekvenciji od 700 MHz do 3,2 GHz pri jakosti električnog

polja od 10 V/m u trajanju od dva sata pomoću HCTEM komore (slika 3.). U prvom pokusnom razdoblju, uzorci su ozračeni neionizirajućim elektromagnetskim zračenjem frekvencije od 700 MHz jakosti elektromagnetskog polja od 10 V/m. U drugom pokusnom razdoblju, uzorci su ozračeni neionizirajućim elektromagnetskim zračenjem frekvencije od 2500 MHz jakosti elektromagnetskog polja od 10 V/m, dok su u trećem razdoblju uzorci ozračeni neionizirajućim elektromagnetskim zračenjem frekvencije od 3500 MHz jakosti elektromagnetskog polja od 10 V/m. Osim HCTEM komore koristio se HP 8657A generator signala i RFGA0101-05 linearno pojačalo potrebno za dobivanje većih jakosti EM polja. Generator je spojen na prijenosno računalo te su željene frekvencije zračenja zadane preko programa Windfreak Technologies SynthNV (Windfreak Technologies, LLC., New Port Richey) (slika 4.). Unutar komore, prilikom svakog zračenja, postavljen je digitalni termometar radi mjerenja temperature zbog isključivanja toplinskog učinka (slika 5.). Prosječna temperatura unutar HCTEM komore prilikom zračenja uzoraka iznosila je 19,1 °C, s time da je minimalna temperatura iznosila 18,7 °C, a maksimalna temperatura 19,5 °C. Kontrolni uzorci držani su istoj, tamnoj prostoriji na temperaturi od 19 °C.

HCTEM komora (slika 6.) je izvedenica transverzalne elektromagnetske komore (TEM komore) uz dodatak piramidalnog dijela s apsorberima koji poboljšavaju jednolikost polja između središnjeg vodiča – septuma i gornjih te donjih zidova (TKALEC i sur., 2005.). Značajke HCTEM komore su karakteristična impedancija od 50 Ω, središnji vodič koji se nalazi na 3/4 visine komore, omjer širine i visine komore je 2/3, a kut između unutarnjeg vodiča i donjeg oklopa iznosi 15 °, dok je unutarnjeg vodiča i gornjeg oklopa 5 °. Na drugom kraju 1,15 m duge HCTEM komore su 25 cm dugi piramidalni apsorberi koji služe za prilagođenje EM valova i dva 10 paralelna otpora za zaključenje struje. Veličina istraživanog objekta može iznositi do 1/3 visine komore od septuma do zida (MALARIĆ i sur., 2005.).



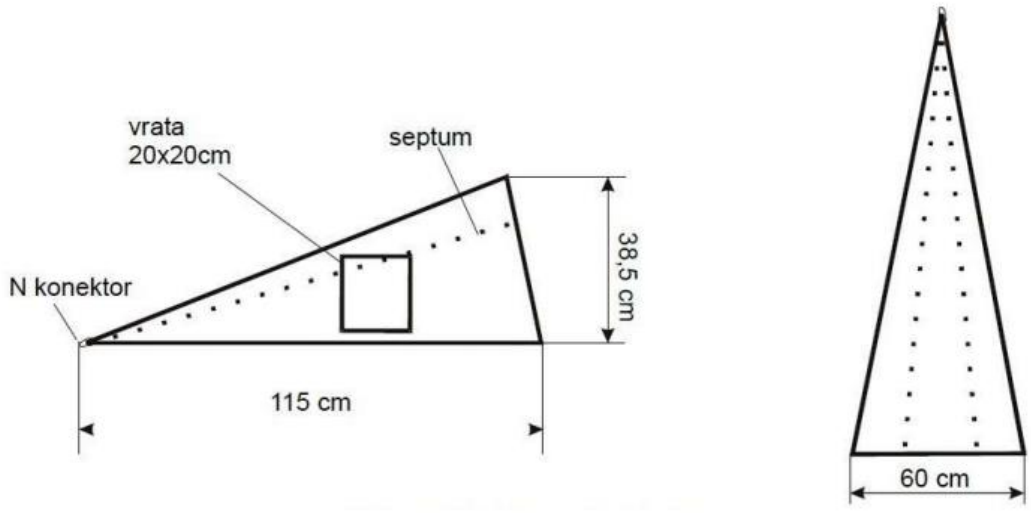
Slika 3. Gigahercna transverzalna elektromagnetska (HCTEM) komora.



Slika 4. Programa Windfreak Technologies SynthNV.



Slika 5. Prikaz Petrijevih zdjelica unutar komore sa digitalnim termometrom.

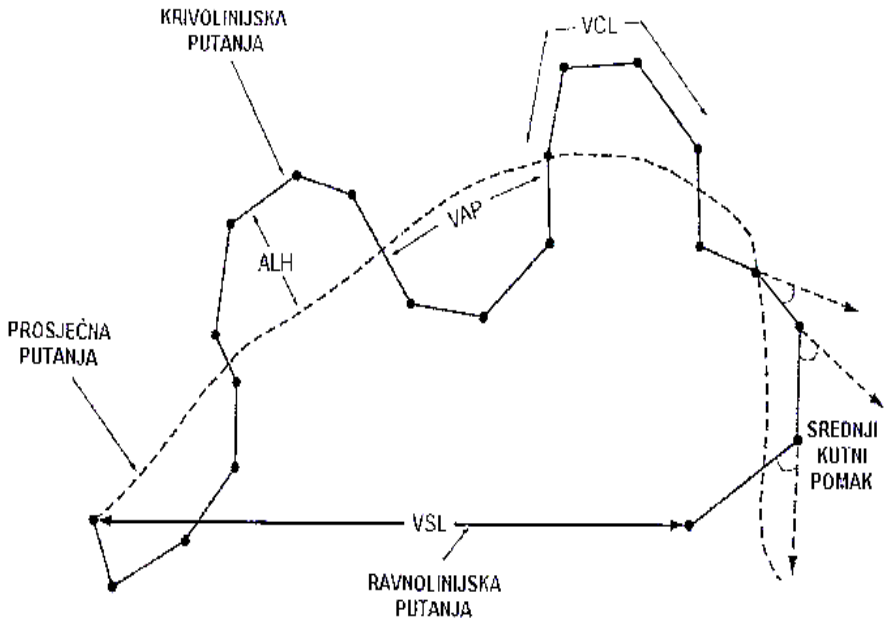


Slika 6. Nacrt gigahercne transverzalne elektromagnetske (HCTEM) komore (prema: MALARIĆ, 2000.).

4.5. OCJENA UZORKA NAKON OZRAČIVANJA

4.5.1. RAČUNALNO POTPOMOGNUTA ANALIZA SPERMIJA – CASA

Osobitosti gibljivosti kontrolnih i pokusnih uzoraka spermija određene su uređajem za računalno potpomognutu analizu spermija (CASA, Integrated Visual Optical System, Version 12.3.) koji se nalazi u Klinici za porodništvo i reprodukciju Veterinarskog fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Prema uputama proizvođača, 3 μL uzorka stavljeno je u leja-komoru dubine 20 μm (Leja Products B.V., Nieuw Vennep, Nizozemska) pomoću Eppendorf mikropipete. Leja-komora stavljena je na grijaču ploču (37 °C) mikroskopa CASA-e kako bi se stabiliziralo pasivno gibanje spermija. Analizirano je minimalno 1000 spermija po uzorku u osam nasumično odobranih polja u središnjem dijelu komore. Analizirani su sljedeći parametri (slika 7.):



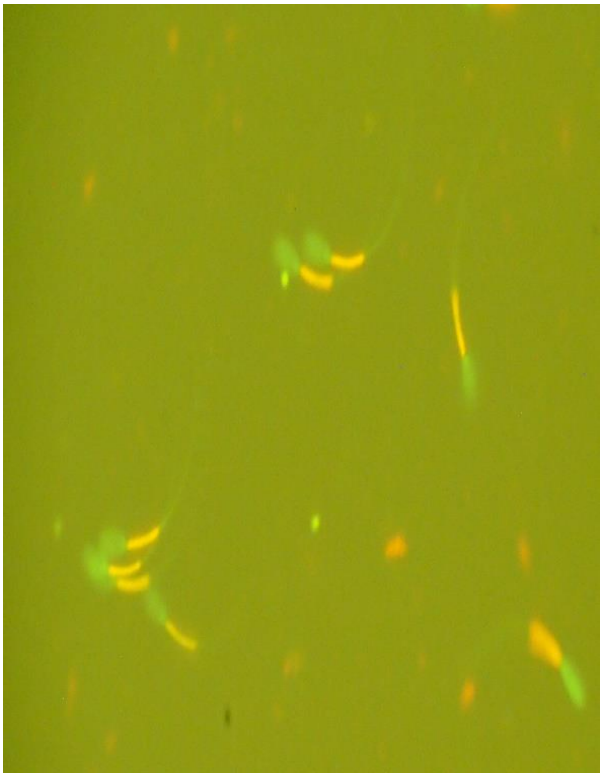
Slika 7. Standardna terminologija različitih pokazatelja mjerenih kompjuterski potpomognutom analizom sperme (Izvor. WHO laboratory manual for the Examination and processing of human semen, 5. izdanje, 138-9, World Health Organization, 2010).

- VCL - prosječna brzina spermija na njegovoj pravolinijskoj putanji; izraženoj u μm/s;
- VSL - prosječna brzina spermija na pravolinijskoj putanji (putanja koja spaja prvu i posljednju slikanu poziciju spermija); izražena u μm/s;
- VAP - prosječna brzina spermija na njegovoj prosječnoj putanji (putanja se izračunava preko algoritma CASA uređaja kojom se ispravlja krivolinijsko gibanje spermija); izražena u μm/s;
- ALH - amplituda lateralnog otklona glave u odnosu na prosječnu putanju; izražena u μm/s;
- LIN - linearnost krivolinijske putanje, a izračunava se međusobnim odnosom pravolinijske i krivolinijske brzine (VSL/VCL); izražen u %;
- WOB - stupanj oscilacije prave putanje u odnosu na prosječnu putanju spermija, a izračunava se međusobnim odnosom prosječne i krivolinijske putanje (VAP/VCL); izražen u %;
- STR - linearnost na prosječnoj putanji, a izračunava se međusobnim odnosom pravolinijske i prosječne brzine (VSL/VAP); izražen u %;
- BCF - prosječan broj prelazaka krivolinijske putanje preko pravolinijske putanje; izražen u Hz.

Postavke softwera su: snimanje 60 sličica po sekundi, ukupno snimljeno 45 slika; detekcija stanica sa minimalnim kontrastom 46 i minimalnom veličinom stanice 7 piksela; zadana vrijednost za stanice veličine 7 piksela i intezitet stanica od 50; granična vrijednost za progresivne stanice od 45 μm/s za vrijednosti VAP-a i 45% za STR; detekcija sporih spermija koje su zabilježene kao statične te granične vrijednosti za VAP od 20 μm/s i VSL 5.0 μm/s.

4.5.2. PROCJENE INTEGRITETA STANIČNE MEMBRANE SPERMIJA

Procjena integriteta stanične membrane spermija i mitohondrijski potencijal određen je trostrukim bojanjem pomoću PI⁄SYBR-14 LIVE⁄DEAD Sperm Viability Kit i 5,5′,6,6′-tetraklor -1,1′,3,3′ - tetraetil – benzimidazolil - karbocijaninjodid (JC-1, Molecular Probes, Leiden, Nizozemska) prema DE PAUW i sur. (2003.) s izmjenama. Kontrolni i pokusni uzorci sjemena u količini od 50 µL dodani su u Eppendorf epruvete zapremnine 1,5 mL u kojima je u 150 µL TALP-a dodano 3 µL PI (2,99 mM), 2 µL SYBR-14 (0,5 mM) i 2 µL JC-1 (1,53 mM) na 37 °C kroz 15 min u mraku. TALP medij je sastavljen od sljedećih komponenti: NaCl (100,00 mM), KCl (3,10 mM), $MgCl_2$ (1,50 mM), $CaCl_2$ (2,10 mM), KH_2PO_4 (0,29 Mm), $NaHCO_3$ (25,00 mM), Na-Hepes (10,00 mM), Na-laktat (21,60 mM) te fenol crvenilo (10,00 µg/mL). SYBR-14 / PI kombinacija je zelene membranski propusne DNK fluorescentne boje SYBR-14 koja se deacilira i zarobljava unutar žive stanice, te crvene, nepropusne fluorescentne boje PI, koja može prožimati samo oštećene membrane. Kombinacija ove dvije fluorescentne boje omogućuje razlikovanje membranski intaktnih i membranski oštećenih spermija u istim pripravcima. JC-1 je kationska boja koja ima sposobnost različitog obilježavanja IMM-a s visokim ili niskim potencijalom. U mitohondrijima s visokim IMM, JC-1 oblici multimera emitiraju fluorescenciju u narančastoj valnoj duljini, dok u mitohondrijima s niskim IMM oblicima JC-1 monomeri emitiraju fluorescenciju u zelenom području (SILVA i GADELLA, 2006.). Integritet membrane spermija i potencijal mitohondrijske membrane određeni su procjenom najmanje 200 stanica za svaki uzorak pomoću mikroskopa Olympus BX51 (Olympus, Tokio, Japan) opremljenog filterom od 450-490 nm živine žarulje snage 100 W te ispitani pri uvećanju 450 x. Analizirani uzorci SYBR-14 / PI i JC-1 pokazali su četiri vrste fluorescentnih stanica spermija: one s crvenom glavom i zelenim mitohondrijima (membranski oštećene stanice spermija), one sa zelenim glavama i narančastim mitohondrijima (membrana netaknuta i visok potencijal mitohondrijske membrane spermija), one sa zelenom glavom i zelenim mitohondrijima (membrana netaknuta s niskim mitohondrijskim potencijalom spermija) i na kraju one s crvenom glavom i narančastim mitohondrijima (oštećene membrane i spermiji s visokim potencijalom mitohondrijske membrane) (slika 6.)

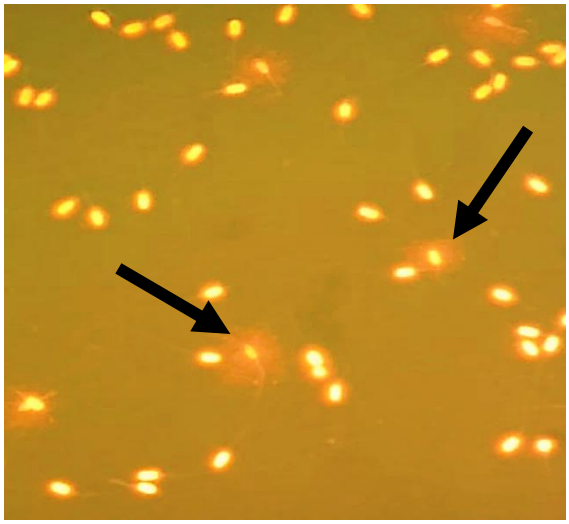


Slika 8. Procjena integriteta stanične membrane spermija određena trostrukim bojanjem pomoću PI⁄SYBR-14 i JC-1 (spermiji sa zelenim glavama i narančastim mitohondrijima, odnosno membrana netaknuta i visok potencijal mitohondrijske membrane spermija.

4.5.3. PROCJENA OŠTEĆENJA DNK-A / STRUKTURNE STABILNOSTI KROMATINA

Procjena oštećenja DNK-a napravljena je Halomax DNA Fragmetation Test (kat.br. HT-SS40) tvrtke Halotech DNA (Madrid, Španjolska). Halomax® test je *in vitro* dijagnostički test koji omogućuje procjenu fragmentacije DNK-a u spermijima. Halomax kit sastoji se od deset prethodno premazanih predmetnica, deset bočica sa agarozom te jednom bočicom s tekućinom za liziranje. Uzorci su pripremljeni na sljedeći način: tekućina za liziranje je zagrijana na sobnu temperaturu; epruveta s agarozom je stavljena u vodenu kupelj zagrijanu na 100 °C / 5 minuta kako bi se agaroza otopila te nakon toga premještena je u termoblok na 37 °C / 5 minuta radi ekvilibracije. Nadalje, je 25 µL uzorka sjemena otpipetirano je u praznu epruvetu, dodano je 50 µL agaroze te je nakon zatvaranja epruvete, učinjena nježna rotacija iste. Iz epruvete je tada uzeto 1,5 – 2 µL mješavine uzorka te nakapano na označeno polje predmetnice, koje je potom prekriveno pokrovnicom. Predmetnica je zatim položena u hladnjak na 4 °C / 5 minuta kako bi se agaroza ukrutila. Nakon 5 minuta, predmetnica je potom izvađena iz hladnjaka te je skinuta pokrovnica. Predmetnica je zatim prebačena u Petrijevu

zdjelicu dimnezije 9,5 x 9,5 cm te prekrivena tekućinom za liziranje na sobnoj temperaturi. Tako je pripremljen uzorak inkubiran 5 minuta te je potom ispran s redestiliranom vodom kroz 5 minuta. Nakon toga je učinjeno ispiranje u dva koraka: 2 minute sa 70 % alkoholom te 2 minute sa 100 % alkoholom. Predmetnica je zatim osušena i čuvana na tamnom mjestu, a nakon mjesec dana bojanje uzoraka FLUORED fluorescentnom bojom (REF HT-FR100, Halotech). Halotech kit se sastoji od reagensa A: crveni fluorokrom (200 µL) te reagens B: medij a fiksaciju (200 µL). Pri bojanju, pomiješani su reagensi A i B u omjeru 1:1, otpipetirano je 3 µL mješavine na pripremljeni uzorak (slika 9.), stavljena pokrovnica te postavljen uzorak na fluorescentni mikroskop. Spermiji s fragmentiranom DNK-om su pokazivali veliku, mrljastu aureolu oko disperzije kromatina (na slici 9. označeni strelicom), dok oni sa nefragmentiranom DNK nisu imali aureolu.



Slika 9. Halomax DNA Fragmetation Test (spermiji sa fragmentiranom DNK-a pokazuju veliku, mrljastu aureolu oko disperzije kromatina).

4.6. BIOKEMIJSKA ANALIZA UZORAKA

Pokusni i kontrolni uzorci, koncentracije 90 milijuna spermija/mL, nakon zračenja centrifugirani su na sobnoj temperaturi 15 minuta na 2400 g. Supernatanti iz oba uzorka uzeti su pipetom, a preostali spermatozoidi isprani su 3 puta fiziološkom otopinom i nakon svakog ispiranja centrifugirani su 5 minuta na 500 g nakon čega su pohranjenu u Eppendorf epruvetama - 80 ° C u zamrzivaču do analize. Uzorci spermija koji su bili pohranjeni na -80°C do analiza bili su odmrznuti i resuspendirani u hladnoj destiliranoj vodi u jednakom omjeru s uzorkom (1:1), potom pohranjeni u hladnjak na 10 minuta na +4 °C te nakon toga centrifugirani

5 minuta na 2400 g. Nadtalozi tako pripremljenih uzoraka korišteni su za analize biokemijskih pokazatelja u uzorcima. Za pojedine pokazatelje, nadtalozi su dodatno razrjeđivani prema uputama proizvođača.

U ozračenim (pokusnim) i neozračenim (kontrolnim) uzrocima određivani su sljedeći antioksidacijski pokazatelji: ukupni antioksidacijski status (engl. *total antoxidant status*, TAS), glutation peroksidaza (engl. *glutathione peroxidase,* GSH-PX), ukupna superoksid dismutaza (engl. *total superoxide dismutase,* TSOD) i glutation reduktaza (engl. *glutathione reductase,* GSH-RD). Uz navedene antioksidacijske pokazatelje u uzrocima su određeni i koncentracija ukupnog malondialdehida (engl. *malondialdehyde,* MDA) i koncentracija bjelančevina.

4.6.1. ODREĐIVANJE POKAZATELJA ANTIOKSIDACIJSKOG STATUSA

4.6.1.1. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE UKUPNOG ANTIOKSIDACIJSKOG STATUSA

Koncentracija ukupnog antioksidacijskoga statusa (TAS) određena je komercijalnim kompletima Total Antioksidant Status (kat. br. NX2332) tvrtke „Randox“ (Randox Laboratories, Crumlin, UK) na automatskom biokemijskom analizatoru Architect Plus c4000 (Abbott, Illinois, U.S.A.). Metoda se temelji na stvaranju radikala kationa 2, 2´-azino-di-[3-ethylbenzthiazoline sulphonate] (ABTS®) koji nastaje inkubacijom ABTS® s peroksidazom (metmioglobin) i vodikovim peroksidom (H_2O_2). Koncentracija se TAS-a mjeri stupnjem inhibicije ABTS®.

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

4.6.1.2. 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“ (Randox Laboratories, Crumlin, UK) na automatskom biokemijskom analizatoru Architect Plus c4000 (Abbott, Illinois, U.S.A.) 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 ispranim spermijima. Aktivnost GSH-Px u spermijima navedenom metodom i kitovima nije bila mjerljiva.

4.6.1.3. AKTIVNOST UKUPNE SUPEROKSID DISMUTAZE

Aktivnost ukupne superoksid dismutaze (SOD; E. C. 1.15.1.1) određena je gotovim kompletima Ransod (kat.br. SD 125) tvrtke „Randox Laboratories“ (Randox Laboratories, Crumlin, UK) na automatskom biokemijskom analizatoru Architect Plus c4000 (Abbott, Illinois, U.S.A.) pri valjnoj dužini od 505 nm. Metoda se temelji na stvaranju superoksidnih radikala iz ksantina spomoću ksantin oksidaze koji reagiraju s 2-(4-jodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-feniltetrazol kloridom i tvore formazan crveno obojenje. Aktivnost TSOD mjeri se kao stupanj inhibicije ove reakcije. Aktivnost TSOD određena je u ispranim spermijima po U/g bjelančevina.

4.6.1.4. AKTIVNOST GLUTATION REDUKTAZE

Aktivnost glutation reduktaze (GSH-RD; E.C. 1.6.4.2.) određena je gotovim kompletima Glutathione reductase (kat.br. GR 2368) tvrtke „Randox Laboratories“ (Randox Laboratories, Crumlin, UK) na automatskom biokemijskom analizatoru Architect Plus c4000 (Abbott, Illinois, U.S.A.) pri valnoj dužini od 340 nm. U ovoj metodi GSH-RD katalizirala je redukciju glutationa (GSSG) u prisutnosti NADPH, koji oksidira u $NADP^+$. Aktivnost GSH-RD određena je u spermijima te je izražena u U/g bjelančevina.

4.6.2. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE MALONDIALDEHIDA

Koncentracija MDA u lizatima spermija biomarker je lipidne peroksidacije te indikator oštećenja uzrokovanih slobodnim radikalima. Opseg lipidne peroksidacije izmjeren je određivanjem koncentracije malondialdehida (MDA) u lizatu spermija. Koncentracija MDA utvrđena je HPLC metodom na tekućinskom kromatografu Shimadzu 2010 (Shimadzu, Tokio, Japan) pomoću InertSustain C-18 kolone (4.6–150 mm -5 µm) (GL Sciences Inc., Tokio, Japan) i UV/Vis detektora (Grotto, 2007.). Metoda se temelji na reakciji MDA s tiobarbiturnom

kiselinom (engl. thiobarburic acid, TBA) koja daje crvenu boju i tvori kompleks reaktivnih supstanci tiobarbiturne kiseline (engl. thiobarbituric acid-reactive substances, TBARS) čija se koncentracija određuje. Koncentracija MDA izražena je u U/g bjelančevina.

Matična standardna otopina 4 M tetraetoksipropana (engl. tetraethoxypropane, TEP) (1,1,3,3-tetraethoxypropane, ≥ 96 %, Sigma Aldrich, Njemačka, TEP) priprema se tako da se 50 µl TEP-a 96 % odpipetira u odmjernu tkivcu volumena 50 ml, ostatak volumena se nadopuni s etanolom (Ethanol, HPLC grade, ≥ 99,8 %, Sigma Aldrich, Njemačka).

Kako bi se pripremio uzorak za analizu na HPLC uređaju koristi se postupak kako slijedi: u epruvetu u kojoj se nalazi 150 µl lizata spermija potrebno je dodati 50 µl destilirane vode (HPLC grade, Sigma Aldrich, Njemačka) i 50 µl NaOH 3N. Slijedi inkubacija sadržaja epruvete u vodenoj kupelji. Potom je u sadržaj epruvete potrebno dadati 250 µl H_3PO_4 6 % i 250 µl TBA 0,8 %. Nakon čega se sadržaj epruvete ponovno inkubira. Nakon hlađenja dodano je 250 µl metanola i 100 µl natrijeva dodecil-sulfata 10 %. Sadržaj je potom premješten u vijale kako bi se moglo provesti mjerenje na tekućinskom kromatografu Shimadzu 2010 (Shimadzu, Tokio, Japan).

4.6.3. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE BJELANČEVINA

Koncentracija bjelančevina određena je u prethodno opisanim nadtalozima uzoraka komercijalnim gotovim kompletima UPro Urine/CSF Protein (kat.br. 7D79-32) tvrtke Abbott GmbH & Co. KG (U.S.A.) na automatskom biokemijskom analizatoru Architect Plus c4000 (Abbott, Illinois, U.S.A.) pri valnoj dužini od 404 nm. Metoda je turbidimetrični proces u kojoj benzetonijev klorid uzrokuje denaturaciju bjelančevina prilikom čega dolazi do stvaranja kompleksa koji je kvantificiran turbodimetrijski pri valnoj dužini od 404 nm. Koncentracija bjelančevina određena je u spermijima te je izražena u g/L.

4.7. STATISTIČKA OBRADA REZULTATA

Procjena optimalnog broja pokusnih životinja odrađena je pomoću programa G-power test 3.1. U procjeni je korišten t-test za usporedbu srednjih vrijednosti dvaju zavisnih uzoraka uz postavljenu vrijednost α (error probability) 0,05. Veličina efekta izračunata je pod pretpostavkom da će uzorak pokusne grupe imati za 5 do 10 % lošije pokazatelje gibljivosti i kvalitete spermija. Ukupna veličina uzorka procijenjena je na minimalno 10 životinja uz najmanju ostvarenu snagu testa P=0,85.

Statistička analiza podataka odrađena je pomoću statističkog programa SAS 9.4 (Statistical Analysis Software 2002–2012 by SAS Institute Inc., Cary, USA). Deskriptivna statistika (srednja vrijednost, standardna devijacija, srednja pogreška srednje vrijednosti, minimum, maksimum, koeficijent varijabilnosti) rađena je pomoću SAS modula PROC MEANS, PROC UNIVARIATE i PROC FREQ. Distribucija podataka testirana je pomoću procedure TRANSREG. U slučajevima kada je normalna distribucija podataka i homogenost varijanci bila poremećena učinjena je Box-Cox transformacija podataka. Transformirani podatci su nakon analize vraćeni na originalne vrijednosti i kao takve prikazane u tablicama i grafikonima. Prilikom transformacije podataka najčešće je korištena transformacija logaritmom na bazi 10, a zatim drugi korijen i kvadrat.

Za analizu kvantitativnih pokazatelja korišten je generalni linearni mješoviti model (PROC GLIMMIX). Statistički model uključivao je fiksni efekt frekvencije zračenja i grupe te starost životinja kao kontinuiranu varijablu. U model je kao slučajni efekt uključen i konstantni član sa subjektom frekvencijom zračenja. Proporcije su analizirane pomoću modula PROC GLIMMIX s binomijalnom distribucijom i link funkcijom logit. Struktura modela je bila slična kao i kod prethodnog modela samo je u slučajni efekt uključeno rezidualno odstupanje. 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 frekvencije zračenja rađena je pomoću opcije SLICE. Pearson-ov ili Spearman-ov koeficijent korelacije izračunat je između različitih pokazatelja korištenjem CORR modula SAS-a (PROC CORR). Podatci su u tablicama prikazani kao srednje vrijednosti i standardna greška srednje vrijednosti, a u grafikonima je uz srednju vrijednost korišten 95 %-tni interval pouzdanosti.

Grafikoni su izrađeni u SAS-u korištenjem procedure TEMPLATE i SGRENDER.

5. REZULTATI

5.1. PRIKAZ DESKRIPTIVNIH PODATAKA RAZLIČITIH POKAZATELJA

Standardnom ocjenom ejakulata u centru za U.O. Varaždin, utvrđeno je da uzorci sperme odgovaraju kriterijima koji vrijede za neraste (minimalna gibljivost > 60 %) te su u tom pogledu zadovoljeni uvjeti jer je prosječna gibljivost spermija iznosila oko 80 %. Prosječni volumen (± SD) uzorka sperme nerasta iznosio je 354,5 mL ± 126,3 mL. Koncentracija spermija u mL sperme (± SD) iznosila je 358,7 milijuna ± 169,4 milijuna. Ukupna koncentracija spermija (± SD) iznosila je 113,5 milijardi ± 34,6 milijardi.

U tablici 3. prikazani su deskriptivni podatci različitih pokazatelja gibljivosti dobivenih pomoću računalno potpomognute analize spermija i vitalnosti spermija u spermi korištenih nerasta.

Tablica 3. Deskriptivni podatci različitih pokazatelja gibljivosti dobiveni pomoću računalno potpomognute analize spermija i vitalnosti spermija u spermi nerasta korištenih u pokusu.

		N	Srednja vrijednost	Standardna devijacija	Standardna pogreška	Minimalna i maksimalna vrijednost	95 %-tni interval pouzdanosti	Koeficijent varijacije
Pokazatelji gibljivosti spermija	**Gibljivost (%)**	36	84,3	11,49	1,91	64,0-96,0	80,4-88,2	13,6
	Progresivna gibljivost (%)	36	50,2	15,87	2,64	11,0-75,0	44,8-55,6	31,6
	VAP (µm/s)	36	68,8	14,05	2,34	27,7-96,4	64,0-73,5	20,4
	VSL (µm/s)	36	47,9	9,09	1,51	27,4-64,0	44,8-50,9	18,9
	VCL (µm/s)	36	144,7	32,00	5,33	59,2-192,0	133,9-155,6	22,1
	ALH (µm)	36	6,04	1,40	0,23	2,10-7,90	5,56-6,51	23,2
	BCF (Hz)	36	37,2	6,23	1,03	12,6-45,4	35,1-39,3	16,7
	STR (%)	36	68,6	11,46	1,91	24,0-88,0	64,7-72,5	16,7
	LIN (%)	36	35,1	8,93	1,48	17,0-63,0	32,1-38,1	25,4
	WOB (%)	36	48,0	5,36	0,89	41,3-68,3	46,2-49,8	11,1
	Brzi spermiji (%)	36	58,7	18,16	3,02	17,0-84,0	52,5-64,8	30,9
	Srednje brzi spermiji (%)	36	13,6	6,57	1,09	4,0-34,0	11,4-15,9	48,1
	Spori spermiji (%)	36	11,9	6,26	1,04	4,0-28,0	9,8-14,0	52,6
	Nepokretni spermiji (%)	36	15,6	11,49	1,91	4,0-46,0	11,7-19,5	73,5
Pokazatelji vitalnosti spermija	**Intaktna membrana spermija + dobar potencijal mitohondrija (%)**	36	78,3	12,74	2,12	47,5-96,4	74,0-82,6	16,2
	Oštećena membrana spermija + loš potencijal mitohondrija (%)	36	15,4	11,84	1,97	1,4-45,1	11,4-19,5	76,4
	Oštećena membrana spermija + dobar potencijal mitohondrija (%)	36	4,27	4,50	0,75	0,00-21,82	2,75-5,80	105,3
	Intaktna membrana spermija + loš potencijal mitohondrija (%)	36	1,92	2,36	0,39	0,00-8,70	1,12-2,72	122,9
	Oštećenje DNK (%)	36	2,21	1,85	0,30	0,00-9,89	1,58-2,84	83,6

VAP-prosječna brzina spermija na njegovoj prosječnoj brzini, VSL-pravocrtna brzina, VCL-linearno zakrivljena brzina, ALH-amplituda lateralnog otklona glave, BCF-ritam frekvencije, STR-linearnost na prosječnoj brzini, LIN-linearnost, WOB-stupanj oscilacije prave putanje u odnosu na prosječnu putanju spermija.

5.2. POKAZATELJI GIBLJIVOSTI SPERMIJA

U tablici 4. prikazani su različiti parametri gibljivosti i brzine spermija nerasta dobiveni pomoću kompjuterski potpomognute analize sperme između kontrolne (neozračeni uzorak) i pokusne skupine (uzorak ozračen korištenjem tri različite frekvencije zračenja; 700 MHz, 2500 MHz i 3500 MHz) te ukupno svih uzoraka pokusne skupine bez obzira na frekvenciju zračenja u odnosu na kontrolni uzorak.

Svi ozračeni uzorci pokusne skupine (bez obzira na frekvenciju zračenja) su imali, u odnosu na kontrolnu skupinu, statistički značajno niži udio gibljivih spermija (76,6 ± 2,7 % vs 84,5 ± 2,3 %; $p<0,05$), progresivno gibljivih spermija (30,7 ± 2,3 % vs 51,6 ± 2,6 %; $p<0,0001$), brzih spermija (42,0 ± 3,2 % vs 58,9 ± 3,3 %; $p<0,01$), pravolinijskog indeksa (57,1 ± 2,1 % vs 68,9 ± 1,9 %; $p<0,001$), indeksa linearnosti (26,5 ± 1,1 % vs 35,0 ± 1,2 %; $p<0,0001$) i indeksa oscilacije (44,2 ± 0,8 % vs 48,0 ± 0,8 %;$p<0,01$) dok je statistički značajno veći udio zabilježen kod srednje brzih spermija (17,9 ± 1,3 % vs 13,2 ± 1,1 %; $p<0,05$) i nepokretnih spermija (24,4 ± 2,8 % vs 15,5 ± 2,3%). Isto tako, svi ozračeni uzorci pokusne skupine (sve frekvencije zračenja zajedno) su imali, u odnosu na kontrolnu skupinu, statistički značajno niže vrijednosti prosječne brzine spermija (59,9 ± 2,7 µm/s vs 69,0 ± 2,7 µm/s; $p<0,05$) i pravolinijske brzine spermija (36,9 ± 1,4 µm/s vs 48,0 ± 1,4 µm/s; $p<0,0001$).

Najveći pad u udjelu progresivno gibljivih spermija (slika 11.) zabilježen je u uzorcima ozračenima sa 700 MHz (30,4 ± 4,1 % vs 55,1 ± 4,4 %; $p<0,001$) te s 2500 MHz (35,0 ± 4,2 % vs 60,1 ± 4,5 %; $p<0,001$) dok je nešto manji pad zabilježen u uzorcima ozračenima s 3500 MHz (26,9 ± 3,9 % vs 39,7 ± 4,3 %; $p<0,05$). Jedini pad u udjelu pravolinijskog indeksa i indeksa linearnosti (slika 17. i slika 18.) zabilježen je u uzorcima ozračenima s 2500 MHz (45,2 ± 3,6 % vs 75,0 ± 3,1 % te 22,9 ± 1,8 % vs 41,6 ± 2,2 %; $p<0,0001$) dok je u uzorcima ozračeni sa 700 MHz zabilježen pad u indeksu oscilacije (slika 19.) (41,3 ± 1,4 % vs 46,3 ± 1,5 %; $p<0,05$). U uzorcima ozračenima sa 700 MHz zabilježen je i pad u udjelu brzih spermija (slika 21.) (41,1 ± 5,6 % vs 66,5 ± 5,4 %; $p<0,01$) dok je istovremeno zabilježen porast u udjelu srednje brzih spermija (18,0 ± 2,3% vs 10,5 ± 1,8%; $p<0,05$) i sporih spermija (16,4 ± 2,2 % vs 9,3 ± 1,7 %; $p<0,05$).

Zbrajanje udjela sporih i nepokretnih spermija (slika 20.) zabilježen je pad u uzorcima ozračenima sa 700 MHz (22,5 ± 4,4 % vs 39,8 ± 5,3 %; $p<0,05$). Najveći pad u vrijednostima pravolinijske brzine (slika 13.) zabilježen je u uzorcima ozračenima s 2500 MHz (37,2 ± 2,5 µm/s vs 51,7 ± 2,5 µm/s; $p<0,001$) te sa 700 MHz (38,1 ± 2,6 µm/s vs 49,0 ± 2,5 µm/s; $p<0,01$) dok je nešto manji pad zabilježen u uzorcima ozračenima s 3500 MHz (35,4 ± 2,5 µm/s vs

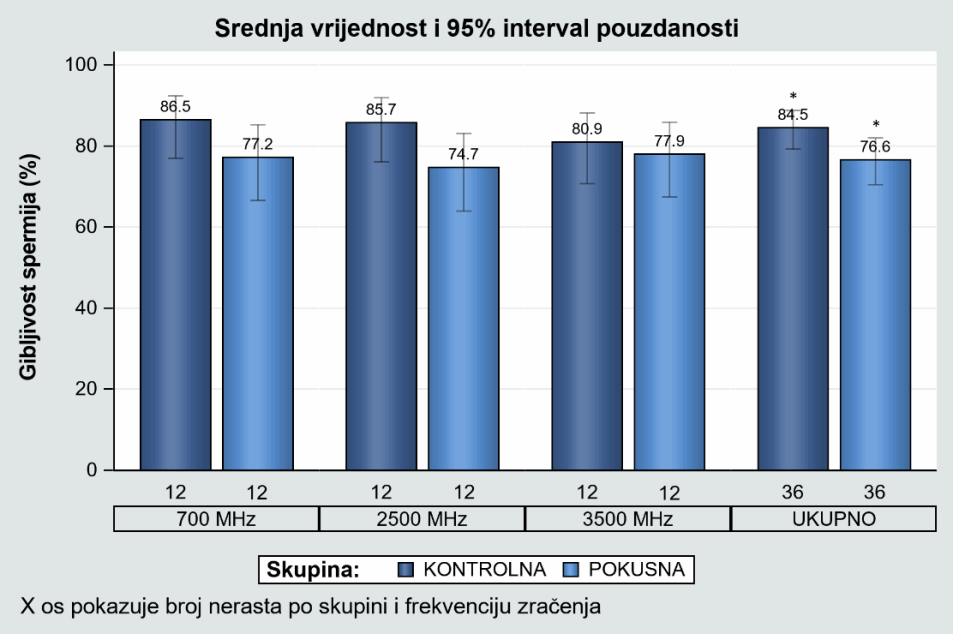
43,2 ± 2,5 µm/s; $p<0,05$). Jedini pad u vrijednostima frekvencije prelaska pravolinijske putanje (slika 16.) zabilježen je u uzorcima ozračenima s 2500 MHz (36,3±1,4 Hz vs 40,5±1,1 Hz; $p<0,05$).

Tablica 4. Pokazatelji gibljivosti i brzine spermija (srednja vrijednost ± standardna greška srednje vrijednosti) nerasta između kontrolnog uzorka (neozračeni) i pokusne skupine uzoraka (uzorci ozračeni korištenjem tri različite frekvencije zračenja; 700 MHz, 2500 MHz i 3500 MHz) te ukupno svih uzoraka pokusne skupine bez obzira na frekvenciju zračenja u odnosu na kontrolni uzorak.

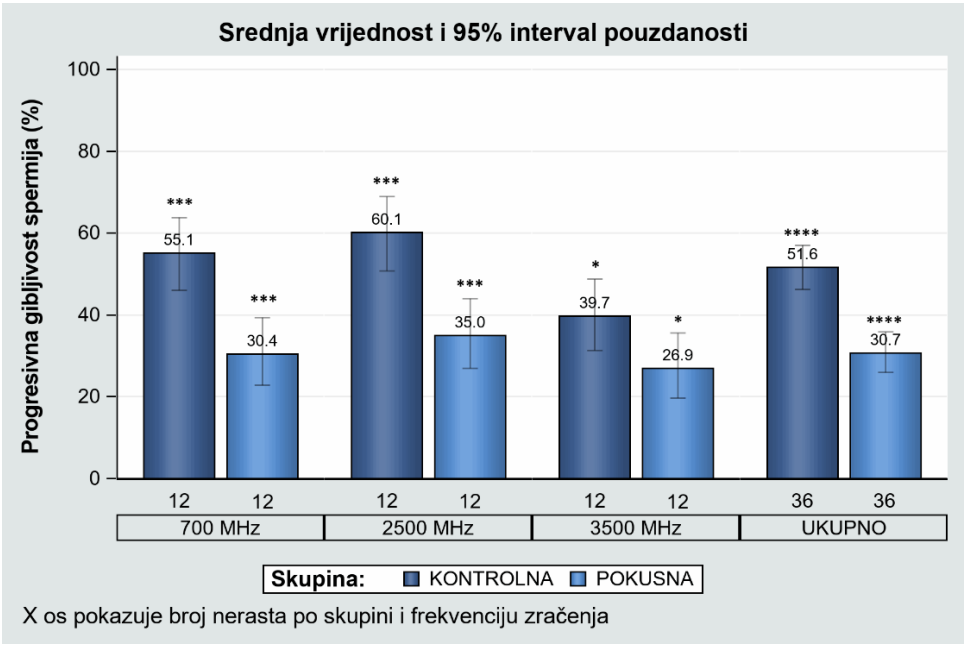
	FREKVENCIJA ZRAČENJA							
	700 MHz		**2500 Mhz**		**3500 MHz**		**UKUPNO**	
BROJ NERASTA	**12**	**12**	**12**	**12**	**12**	**12**	**36**	**36**
SKUPINA	**Kontrolna**	**Pokusna**	**Kontrolna**	**Pokusna**	**Kontrolna**	**Pokusna**	**Kontrolna**	**Pokusna**
Gibljivost (%)	86,5±3,7	77,2±4,6	85,7±3,8	74,7±4,7	80,9±4,2	77,9±4,5	84,5±2,3*	76,6±2,7*
Progresivna gibljivost (%)	55,1±4,4***	30,4±4,1***	60,1±4,5***	35,0±4,2***	39,7±4,3*	26,9±3,9*	51,6±2,6****	30,7±2,3****
VAP (µm/s)	71,6±4,8	63,0±4,9	70,4±4,8	60,3±4,8	65,1±4,8	56,3±4,8	69,0±2,7*	59,9±2,7*
VSL (µm/s)	49,0±2,5**	38,1±2,6**	51,7±2,5***	37,2±2,5***	43,2±2,5*	35,4±2,5*	48,0±1,4****	36,9±1,4****
VCL (µm/s)	154,4±10,9	150,5±11,0	138,8±11,0	131,5±10,9	142,3±10,9	129,3±10,9	145,2±6,3	137,1±6,3
ALH (µm)	6,24±0,42	6,90±0,43	5,32±0,42	5,30±0,42	6,66±0,43	6,49±0,41	6,10±0,25	6,27±0,24
BCF (Hz)	38,4±1,2	37,9±1,1	40,5±1,1*	36,3±1,4*	35,0±1,1	33,7±1,2	37,9±0,6	35,9±0,7
STR (%)	64,0±3,5	60,8±3,6	75,0±3,1****	45,2±3,6****	67,1±3,4	64,7±3,5	68,9±1,9***	57,1±2,1***
LIN (%)	31,2±2,0	26,5±1,9	41,6±2,2****	22,9±1,8****	32,6±2,1	30,5±2,0	35,0±1,2****	26,5±1,1****
WOB (%)	46,3±1,5*	41,3±1,4*	51,7±1,5	47,6±1,5	45,9±1,5	43,8±1,4	48,0±0,8**	44,2±0,8**
Brzi spermiji (%)	66,5±5,4**	41,1±5,6**	63,0±5,5	50,8±5,7	46,5±5,7	34,5±5,4	58,9±3,3**	42,0±3,2**
Srednje brzi spermiji (%)	10,5±1,8*	18,0±2,3*	12,7±2,0	13,1±2,0	16,9±2,2	23,7±2,5	13,2±1,1*	17,9±1,3*
Spori spermiji (%)	9,3±1,7*	16,4±2,2*	9,2±1,7	9,8±1,8	16,8±2,2	18,9±2,3	11,3±1,1	14,6±1,2
Nepokretni spermiji (%)	13,5±3,8	24,4±4,8	14,1±3,9	26,2±4,9	19,1±4,4	22,6±4,7	15,5±2,3*	24,4±2,8*

* p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001; **** p<0,0001.

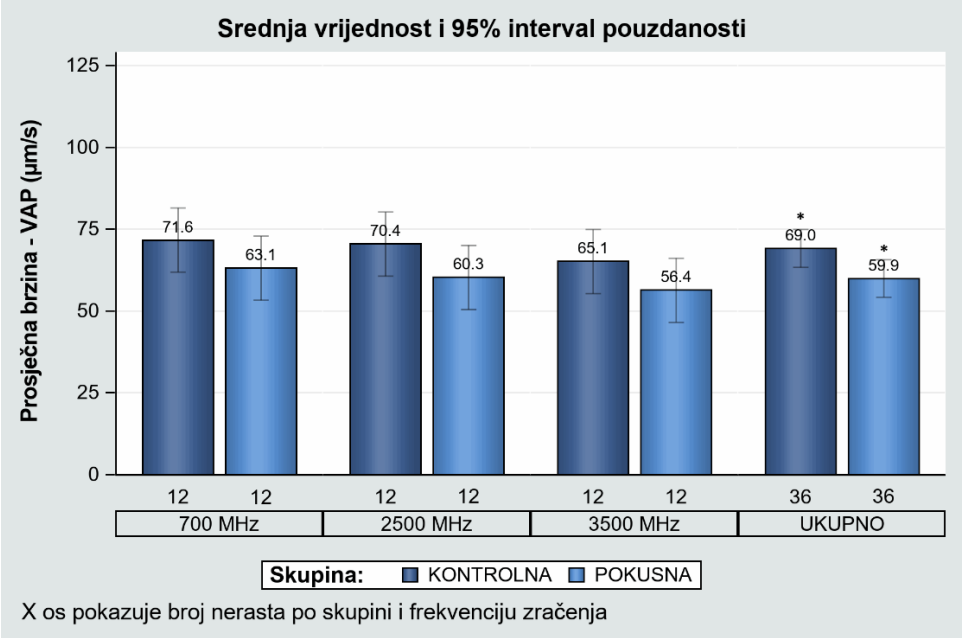
VAP-prosječna brzina spermija na njegovoj prosječnoj brzini, VSL-pravocrtna brzina, VCL-linearno zakrivljena brzina, ALH-amplituda lateralnog otklona glave, BCF-ritam frekvencije, STR-linearnost na prosječnoj brzini, LIN-linearnost, WOB-stupanj oscilacije prave putanje u odnosu na prosječnu putanju spermija.



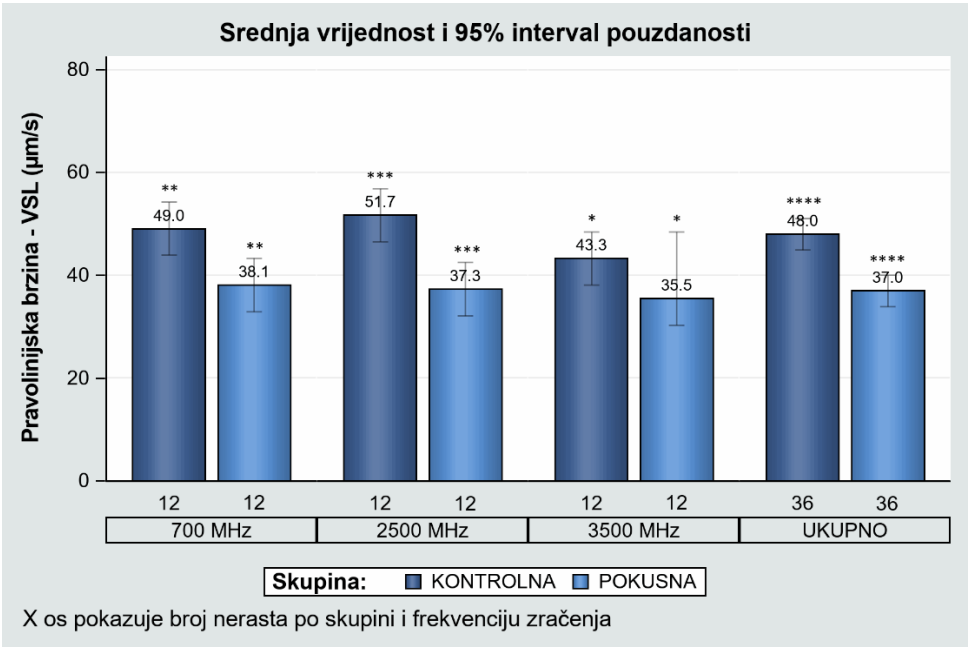
Slika 10. Grafikon srednjih vrijednosti i 95 % intervala pouzdanosti gibljivosti spermija (%) u uzorcima nerasta između kontrolne (neozračeni uzorak) i pokusne skupine (uzorak ozračen korištenjem tri različite frekvencije zračenja; 700 MHz, 2500 MHz i 3500 MHz) te ukupno svih uzoraka pokusne skupine bez obzira na frekvenciju zračenja u odnosu na kontrolni uzorak (* p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001; **** p<0,0001).



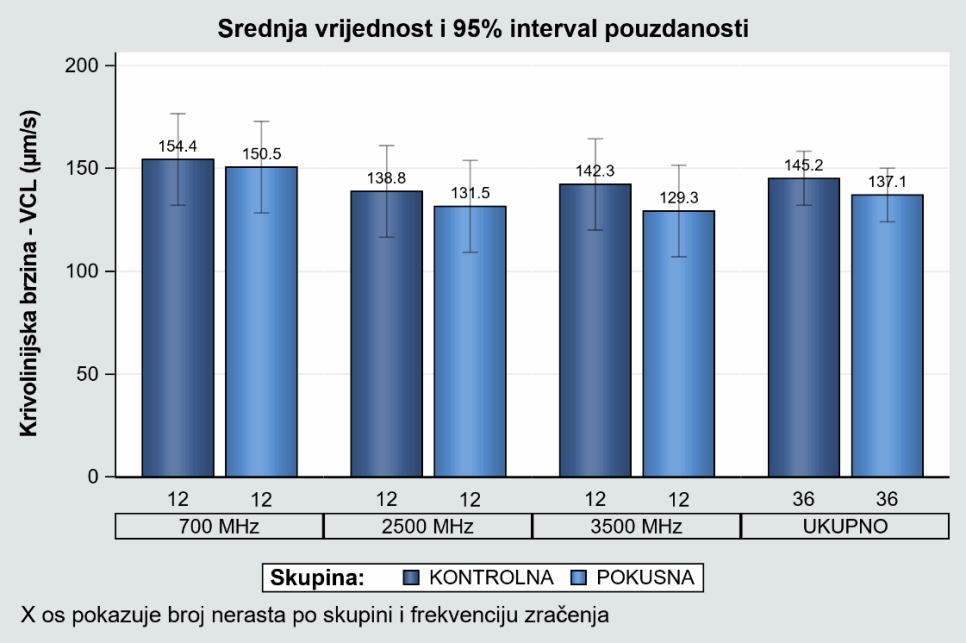
Slika 11. Grafikon srednjih vrijednosti i 95 % intervala pouzdanosti progresivne gibljivosti spermija (%) u uzorcima nerasta između kontrolne (neozračeni uzorak) i pokusne skupine (uzorci ozračeni korištenjem tri različite frekvencije zračenja; 700 MHz, 2500 MHz i 3500 MHz) te ukupno svih uzoraka pokusne skupine bez obzira na frekvenciju zračenja u odnosu na kontrolni uzorak (* p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001; **** p<0,0001).



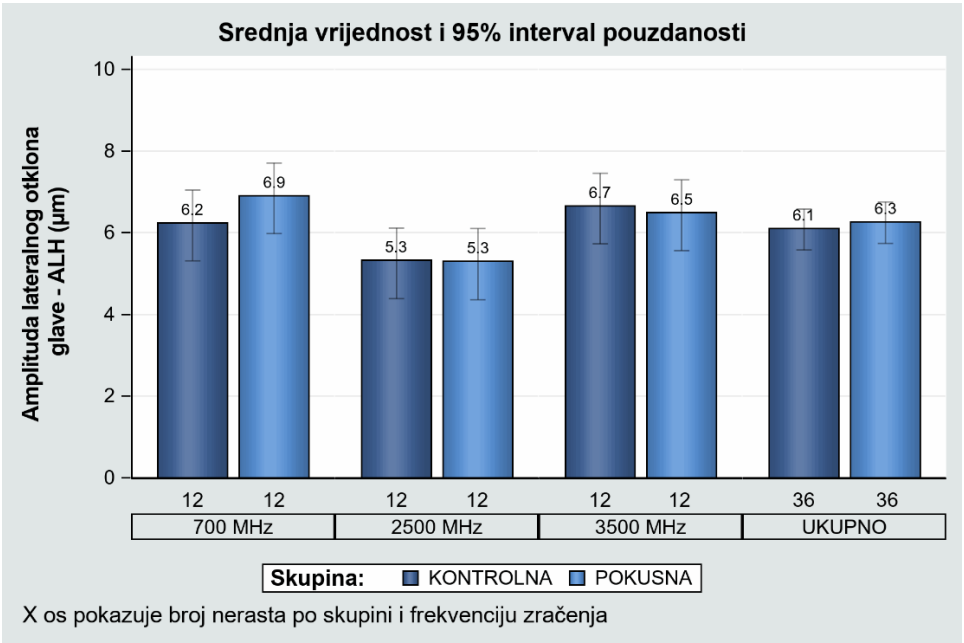
Slika 12. Grafikon srednjih vrijednosti i 95 % intervala pouzdanosti prosječne brzine spermija - VAP (µm/s) u uzorcima između kontrolne (neozračeni uzorak) i pokusne skupine uzoraka (uzorci ozračen korištenjem tri različite frekvencije zračenja; 700 MHz, 2500 MHz i 3500 MHz) te ukupno svih uzoraka pokusne skupine bez obzira na frekvenciju zračenja u odnosu na kontrolni uzorak (* p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001; **** p<0,0001).



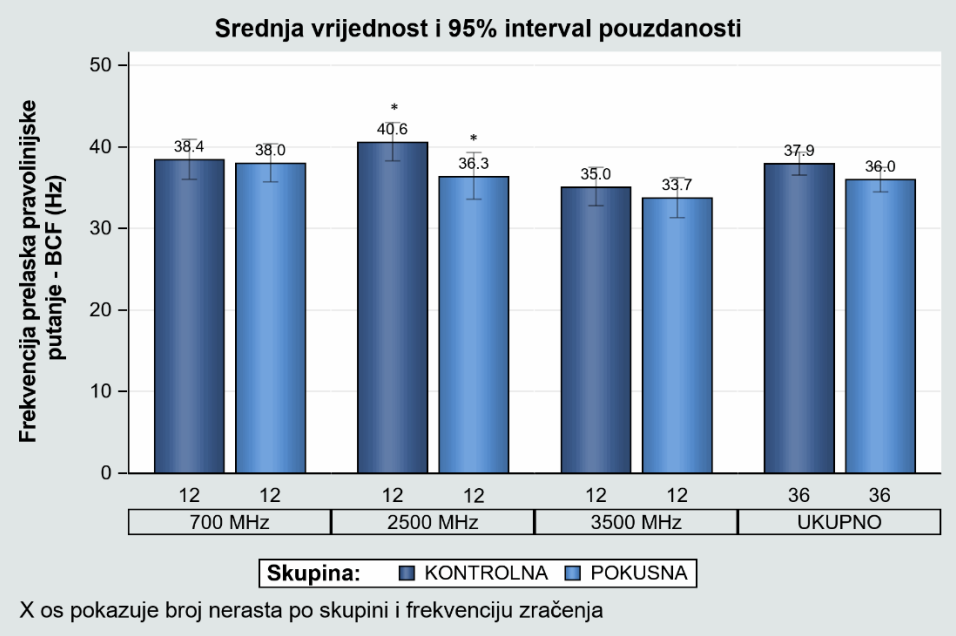
Slika 13. Grafikon srednjih vrijednosti i 95% intervala pouzdanosti pravolinijske brzine spermija - VSL (µm/s) u uzrocima između kontrolne (neozračeni uzorak) i pokusne skupine (uzorci ozračeni korištenjem tri različite frekvencije zračenja; 700 MHz, 2500 MHz i 3500 MHz) te ukupno svih uzoraka pokusne skupine bez obzira na frekvenciju zračenja u odnosu na kontrolni uzorak (* p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001; **** p<0,0001).



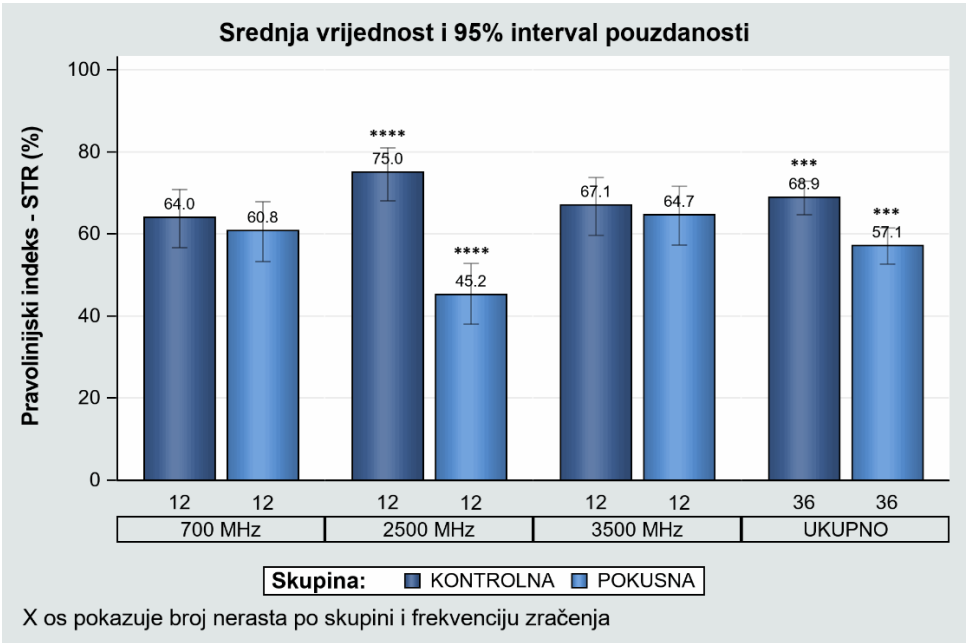
Slika 14. Grafikon srednjih vrijednosti i 95 % intervala pouzdanosti krivolinijske brzine spermija - VCL (µm/s) u uzorcima nerasta između kontrolne (neozračeni uzorak) i pokusne skupine uzoraka (uzorci ozračeni korištenjem tri različite frekvencije zračenja; 700 MHz, 2500 MHz i 3500 MHz) te ukupno svih uzoraka pokusne skupine bez obzira na frekvenciju zračenja u odnosu na kontrolni uzorak (* p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001; **** p<0,0001).



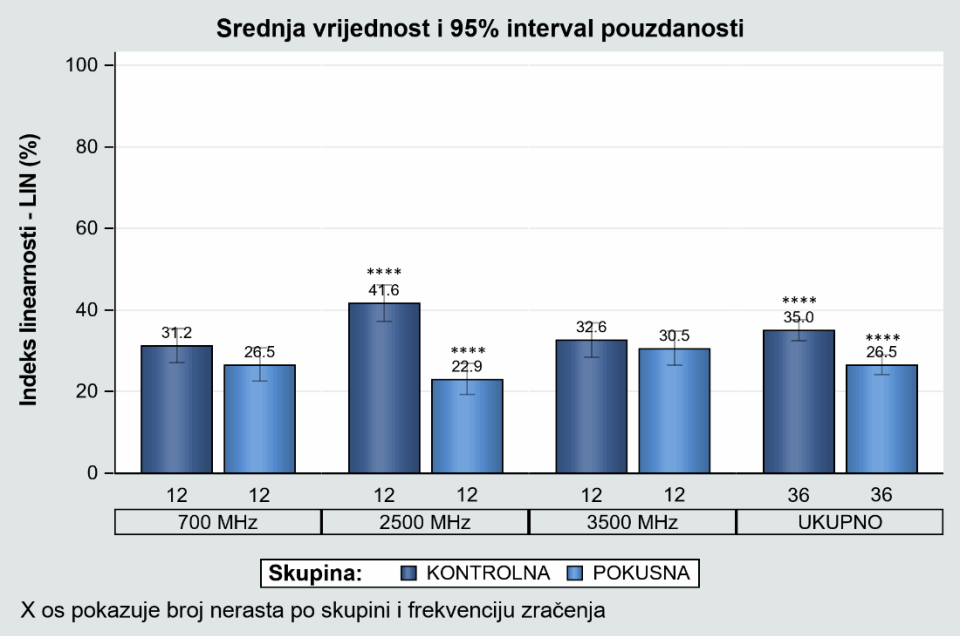
Slika 15. Grafikon srednjih vrijednosti i 95 % intervala pouzdanosti amplitude lateralnog otklona glave spermija - ALH (µm) u uzocima između kontrolne (neozračeni uzorak) i pokusne skupine uzoraka (uzorci ozračeni korištenjem tri različite frekvencije zračenja; 700 MHz, 2500 MHz i 3500 MHz) te ukupno svih uzoraka pokusne skupine bez obzira na frekvenciju zračenja u odnosu na kontrolni uzorak (* p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001; **** p<0,0001).



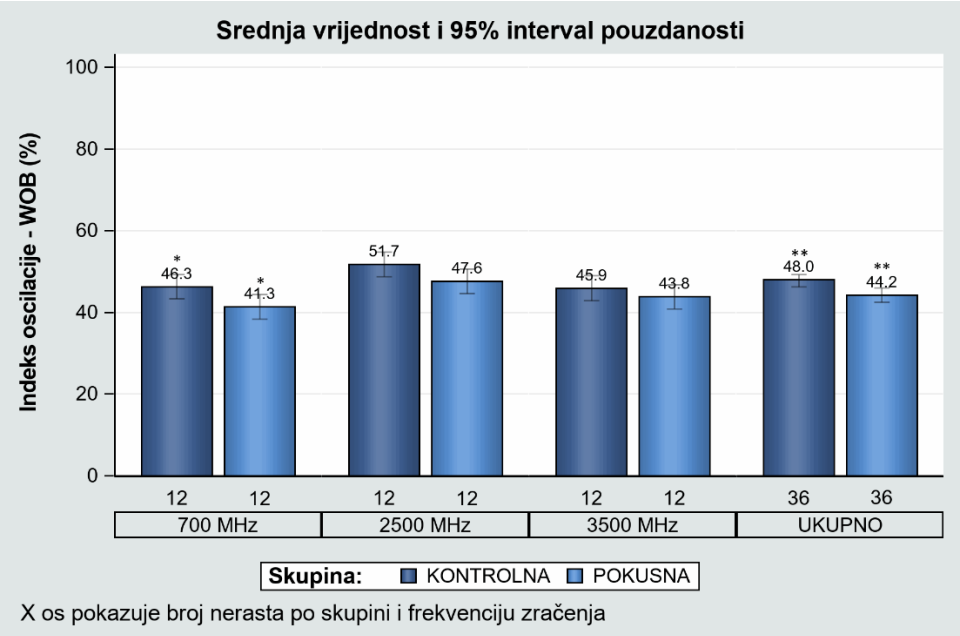
Slika 16. Grafikon srednjih vrijednosti i 95 % intervala pouzdanosti frekvencije prelaska pravolinijske putanje spermija - BCF (Hz) u uzocima između kontrolne (neozračeni uzorak) i pokusne skupine uzoraka (uzorci ozračeni korištenjem tri različite frekvencije zračenja; 700 MHz, 2500 MHz i 3500 MHz) te ukupno svih uzoraka pokusne skupine bez obzira na frekvenciju zračenja u odnosu na kontrolni uzorak (* p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001; **** p<0,0001).



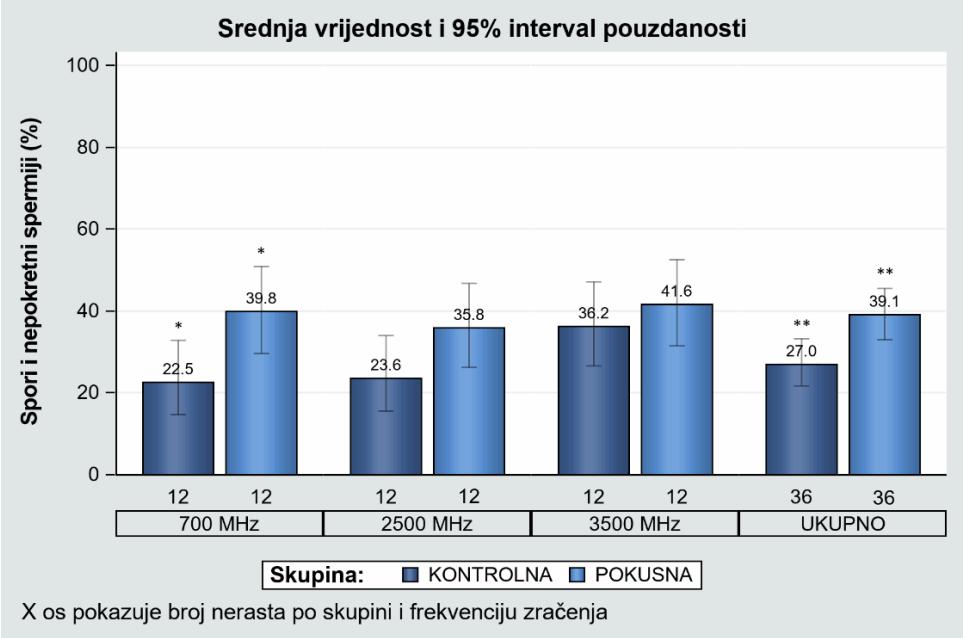
Slika 17. Grafikon srednjih vrijednosti i 95 % intervala pouzdanosti pravolinijskog indeksa spermija - STR (%) u uzorcim između kontrolne (neozračeni uzorak) i pokusne skupine uzoraka (uzorci ozračeni korištenjem tri različite frekvencije zračenja; 700 MHz, 2500 MHz i 3500 MHz) te ukupno svih uzoraka pokusne skupine bez obzira na frekvenciju zračenja u odnosu na kontrolni uzorak (* p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001; **** p<0,0001).



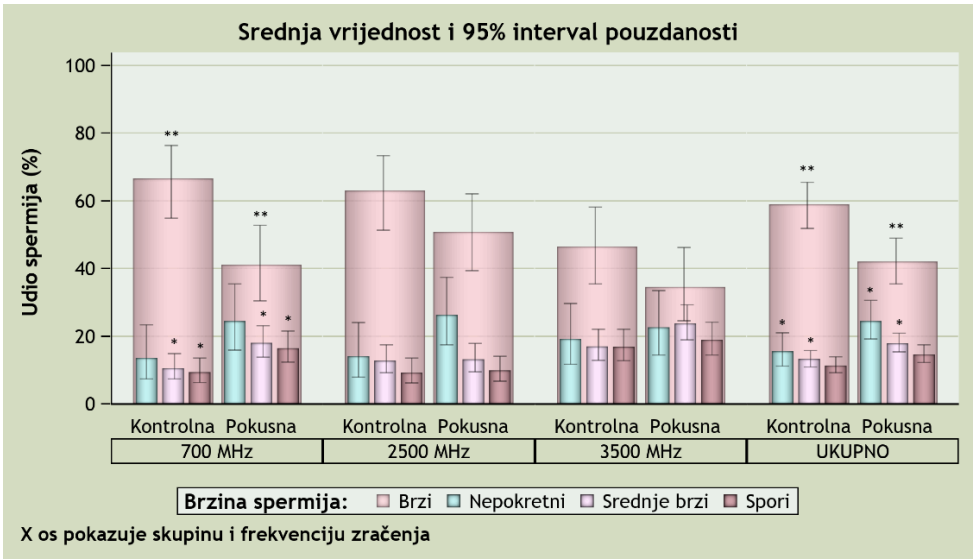
Slika 18. Grafikon srednjih vrijednosti i 95 % intervala pouzdanosti indeksa linearnosti spermija - LIN (%) u uzorcima između kontrolne (neozračeni uzorak) i pokusne skupine uzoraka (uzorci ozračeni korištenjem tri različite frekvencije zračenja; 700 MHz, 2500 MHz i 3500 MHz) te ukupno svih uzoraka pokusne skupine bez obzira na frekvenciju zračenja u odnosu na kontrolni uzorak (* p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001; **** p<0,0001).



Slika 19. Grafikon srednjih vrijednosti i 95 % intervala pouzdanosti indeksa oscilacije spermija - WOB (%) u uzorcima između kontrolne (neozračeni uzorak) i pokusne skupine uzoraka (uzorci ozračeni korištenjem tri različite frekvencije zračenja; 700 MHz, 2500 MHz i 3500 MHz) te ukupno svih uzoraka pokusne skupine bez obzira na frekvenciju zračenja u odnosu na kontrolni uzorak (* p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001; **** p<0,0001).



Slika 20. Grafikon srednjih vrijednosti i 95 % intervala pouzdanosti sporih i nepokretnih spermija (%) u uzrocima između kontrolne (neozračeni uzorak) i pokusne skupine uzoraka (uzorci ozračen korištenjem tri različite frekvencije zračenja; 700 MHz, 2500 MHz i 3500 MHz) te ukupno svih uzoraka pokusne skupine bez obzira na frekvenciju zračenja u odnosu na kontrolni uzorak (* p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001; **** p<0,0001).



Slika 21. Grafikon srednjih vrijednosti i 95 % intervala pouzdanosti brzih, nepokretnih, srednje brzih i sporih spermija (%) u uzrocima između kontrolne (neozračeni uzorak) i pokusne skupine uzoraka (uzorak ozračen korištenjem tri različite frekvencije zračenja; 700 MHz, 2500 MHz i 3500 MHz) te ukupno svih uzoraka pokusne skupine bez obzira na frekvenciju zračenja u odnosu na kontrolni uzorak (* p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001; **** p<0,0001).

5.3. POKAZATELJI VITALNOSTI SPERMIJA

U tablici 5. prikazani su različiti parametri vitalnosti spermija uzorcima sperme nerasta dobiveni pomoću posebnih metoda bojenja između kontrolne (neozračeni uzorak) i pokusne skupine uzoraka (uzorak ozračen korištenjem tri različite frekvencije zračenja; 700 MHz, 2500 MHz i 3500 MHz) te ukupno svih uzoraka pokusne skupine bez obzira na frekvenciju zračenja u odnosu na kontrolni uzorak.

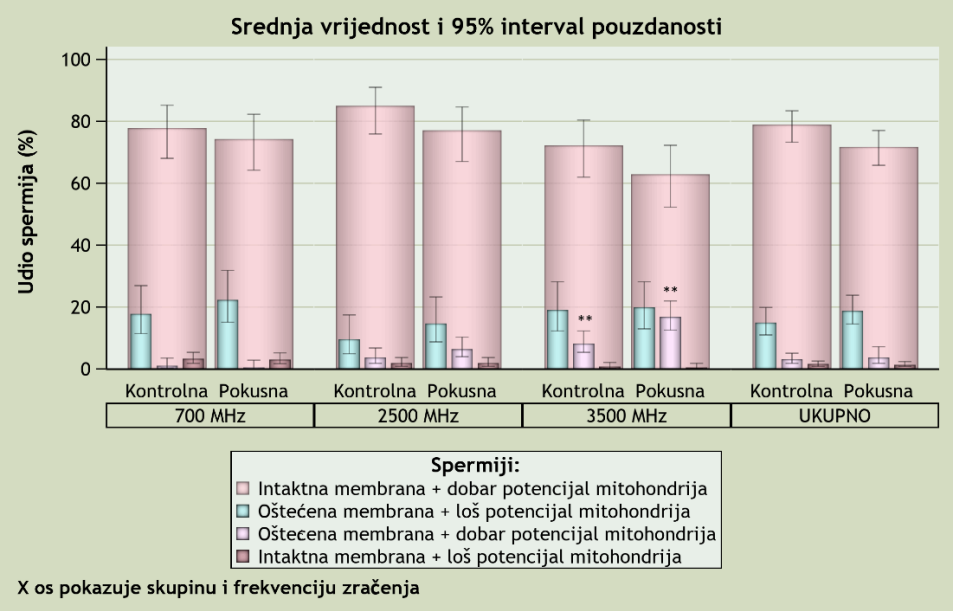
Ukupno svi uzorci ozračenih spermija (sve frekvencije zračenja zajedno) su imali, u odnosu na kontrolnu skupinu uzoraka, statistički značajno veći udio spermija s oštećenjem DNK (6,0 ± 0,9 % vs 2,0 ± 0,5%; $p<0,01$).

Najveći porast u udjelu spermija s oštećenjem DNK (slika 26.) zabilježen je u uzorcima ozračenima s 2500 MHz (9,5 ± 1,8 % vs 1,7 ± 0,8 %; $p<0,01$) dok je nešto manji porast zabilježen u uzorcima ozračenima s 3500 MHz (6,8 ± 1,6 % vs 2,6 ± 1,0 %; $p<0,05$). Porast u udjelu spermija s oštećenom membranom ali dobrim potencijalom mitohondrija (slika 22.) zabilježen je u uzorcima ozračenima s 3500 MHz (16,7 ± 2,3 % vs 8,1 ± 1,7 %). Iako je zbrajanjem udjela spermija s oštećenom membranom i/ili slabim potencijalom mitohondrija (slika 25.) zabilježen porast u svim ozračenima uzorcima, posebno sa svakom frekvencijom zračenja te ukupno bez obzira na frekvenciju zračenja, nije bilo statistički značajne razlike no postoji tendencija da razlike budu značajne ($p<0,10$).

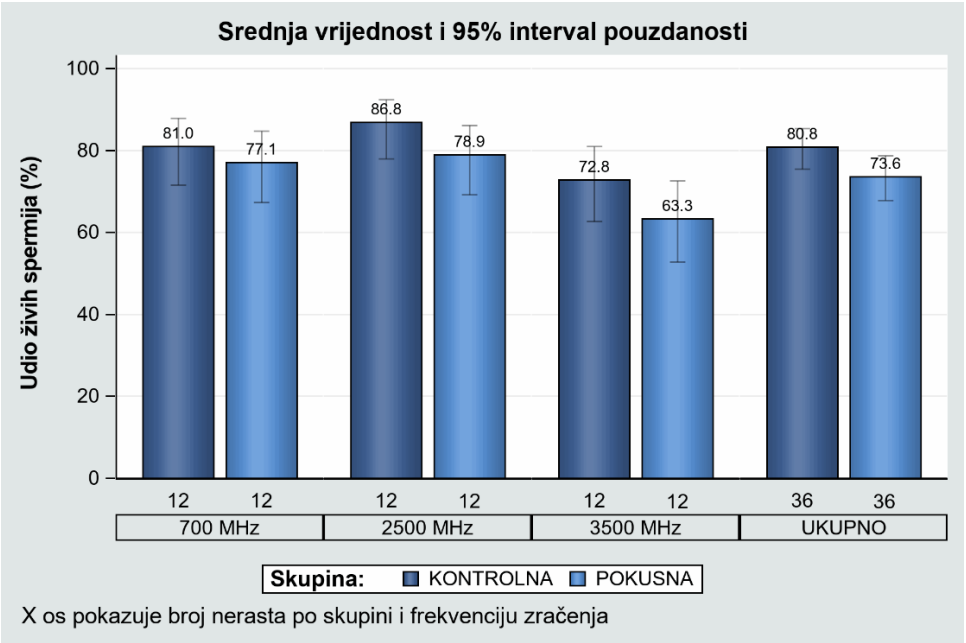
Tablica 5. Pokazatelji vitalnosti spermija (srednja vrijednost ± standardna greška srednje vrijednosti) nerasta između kontrolnog uzorka (neozračeni) i pokusne skupine uzoraka (uzorci ozračeni korištenjem tri različite frekvencije zračenja; 700 MHz, 2500 MHz i 3500 MHz) te ukupno svih uzoraka pokusne skupine bez obzira na frekvenciju zračenja u odnosu na kontrolni uzorak.

	FREKVENCIJA ZRAČENJA							
	700 MHz		**2500 Mhz**		**3500 MHz**		**UKUPNO**	
BROJ NERASTA	**12**	**12**	**12**	**12**	**12**	**12**	**36**	**36**
SKUPINA	**Kontrolna**	**Pokusna**	**Kontrolna**	**Pokusna**	**Kontrolna**	**Pokusna**	**Kontrolna**	**Pokusna**
Intaktna membrana spermija + dobar potencijal mitohondrija (%)	77,8±4,2	74,2±4,5	84,9±3,6	77,0±4,3	72,1±4,6	62,8±4,9	78,8±2,4	71,7±2,7
Oštećena membrana spermija + loš potencijal mitohondrija (%)	17,8±3,8	22,3±4,1	9,6±2,9	14,6±3,5	19,0±3,9	19,9±3,9	14,9±2,1	18,7±2,2
Oštećena membrana spermija + dobar potencijal mitohondrija (%)	1,0±0,6	0,4±0,4	3,6±1,1	6,4±1,5	8,1±1,7**	16,7±2,3**	3,1±0,7	3,7±1,2
Intaktna membrana spermija + loš potencijal mitohondrija (%)	3,2±0,8	3,0±0,8	1,8±0,6	1,8±0,6	0,7±0,3	0,4±0,3	1,6±0,3	1,3±0,3
Oštećenje DNK (%)	1,9±0,8	3,2±1,1	1,7±0,8**	9,5±1,8**	2,6±1,0*	6,8±1,6*	2,0±0,5**	6,0±0,9**

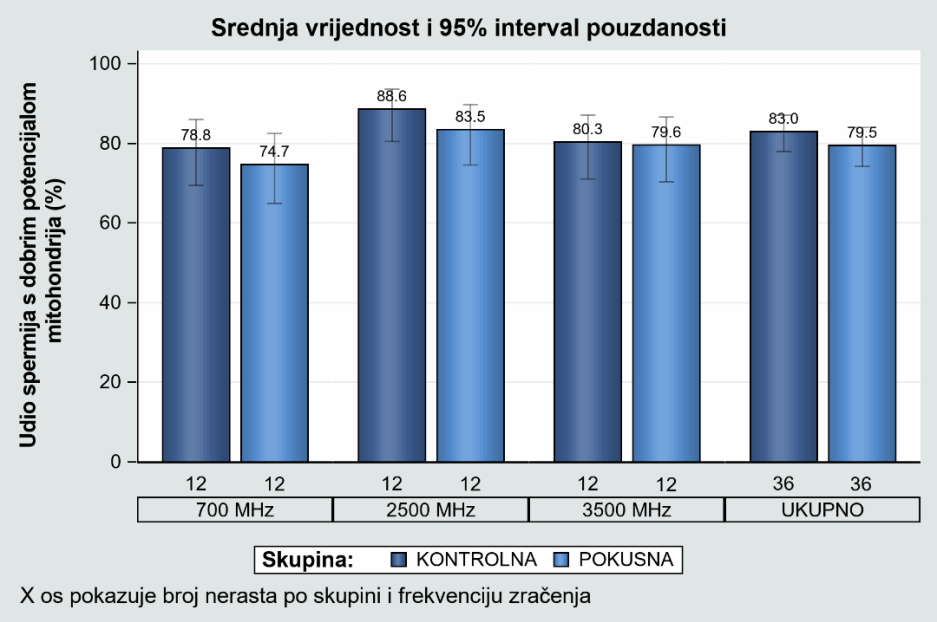
*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001.



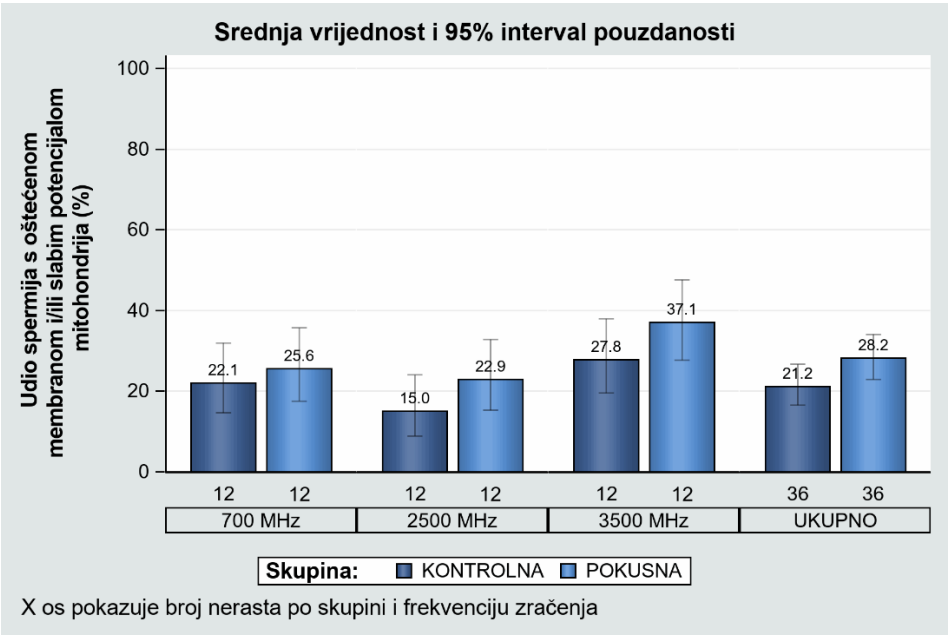
Slika 22. Grafikon srednjih vrijednosti i 95 % intervala pouzdanosti spermija s intaktnom ili oštećenom membranom i dobrim ili lošim potencijalom mitohondrija (%) u uzorcima između kontrolne (neozračeni uzorak) i pokusne skupine uzoraka (uzorci ozračeni korištenjem tri različite frekvencije zračenja; 700 MHz, 2500 MHz i 3500 MHz) te ukupno svih uzoraka pokusne skupine bez obzira na frekvenciju zračenja u odnosu na kontrolni uzorak (* p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001; **** p<0,0001).



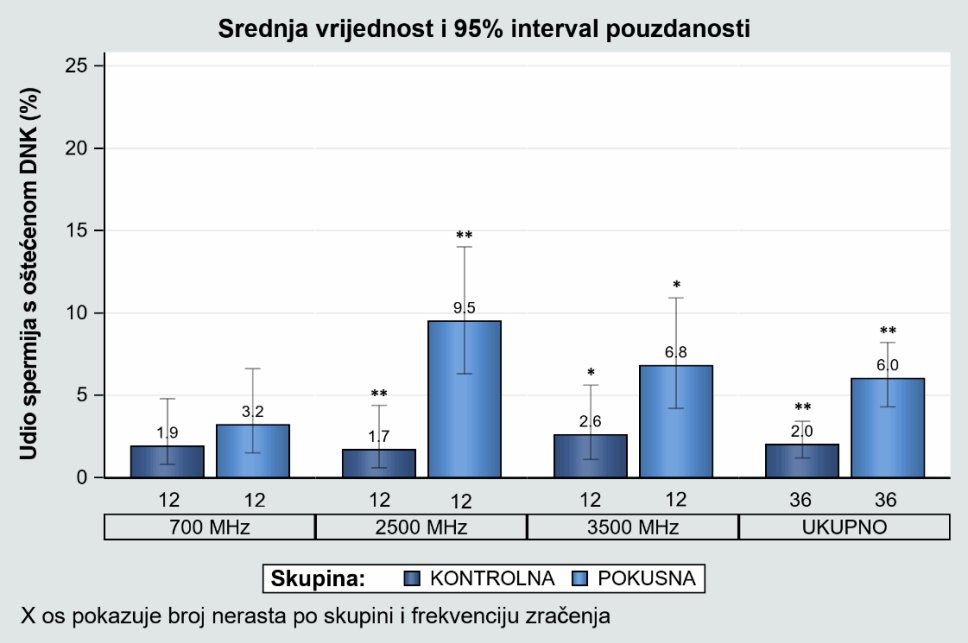
Slika 23. Grafikon srednjih vrijednosti i 95 % intervala pouzdanosti živih spermija (%) u uzorcima sperme između kontrolne (neozračeni uzorak) i pokusne skupine uzoraka (uzorci ozračeni korištenjem tri različite frekvencije zračenja; 700 MHz, 2500 MHz i 3500 MHz) te ukupno svih uzoraka pokusne skupine bez obzira na frekvenciju zračenja u odnosu na kontrolni uzorak (* p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001; **** p<0,0001).



Slika 24. Grafikon srednjih vrijednosti i 95 % intervala pouzdanosti spermija s dobrim potencijalom mitohondrija (%) u uzorcima između kontrolne (neozračeni uzorak) i pokusne skupine uzoraka (uzorci ozračeni korištenjem tri različite frekvencije zračenja; 700 MHz, 2500 MHz i 3500 MHz) te ukupno svih uzorci pokusne skupine bez obzira na frekvenciju zračenja u odnosu na kontrolni uzorak (* p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001; **** p<0,0001).



Slika 25. Grafikon srednjih vrijednosti i 95 % intervala pouzdanosti spermija s oštećenom membranom i/ili slabim potencijalom mitohondrija (%) u uzorcima između kontrolne (neozračeni uzorak) i pokusne skupine uzoraka (uzorak ozračen korištenjem tri različite frekvencije zračenja; 700 MHz, 2500 MHz i 3500 MHz) te ukupno svih uzroci pokusne skupine bez obzira na frekvenciju zračenja u odnosu na kontrolni uzorak (* p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001; **** p<0,0001).



Slika 26. Grafikon srednjih vrijednosti i 95 % intervala pouzdanosti spermija s oštećenom DNK (%) u uzorcima između kontrolne (neozračeni uzorak) i pokusne skupine uzoraka (uzoci ozračeni korištenjem tri različite frekvencije zračenja; 700 MHz, 2500 MHz i 3500 MHz) te ukupno svih uzorci pokusne skupine bez obzira na frekvenciju zračenja u odnosu na kontrolni uzorak (* p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001; **** p<0,0001).

5.4. POKAZATELJI ANTIOKSIDACIJSKOG STATUSA SPERMIJA

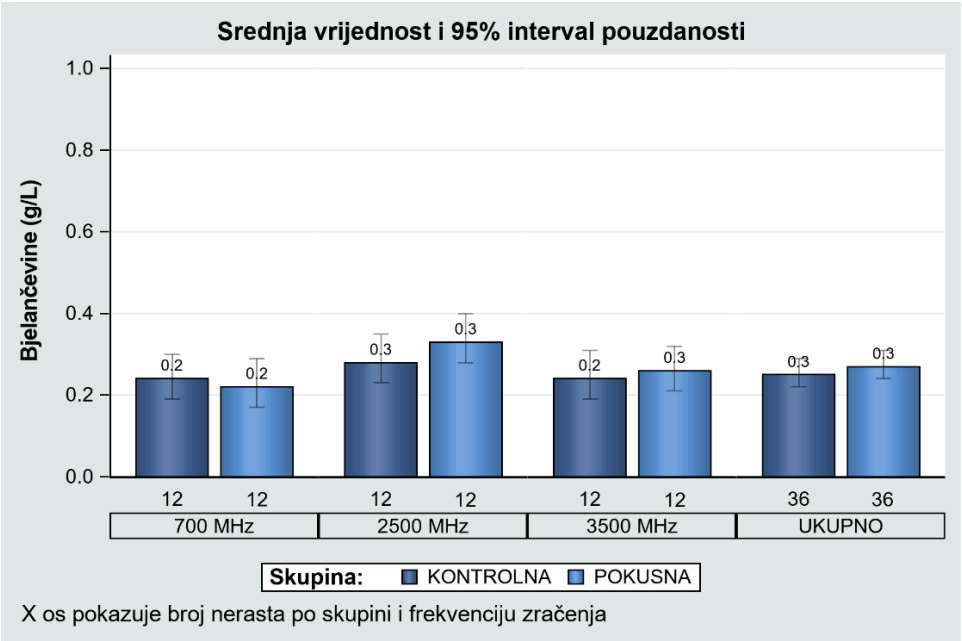
U tablici 6. prikazani su različiti parametri antioksidacijskog statusa spermija uzoraka sperme nerasta između kontrolne (neozračeni uzorak) i pokusne skupine uzoraka (uzorci ozračeni korištenjem tri različite frekvencije zračenja; 700 MHz, 2500 MHz i 3500 MHz) te ukupno svih uzoraka pokusne skupine bez obzira na frekvenciju zračenja u odnosu na kontrolni uzorak.

Svi ozračeni uzorci pokusne skupine (sve frekvencije zračenja zajedno) kao i svaka frekvencija zračenja posebno nije imala statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu skupinu uzoraka.

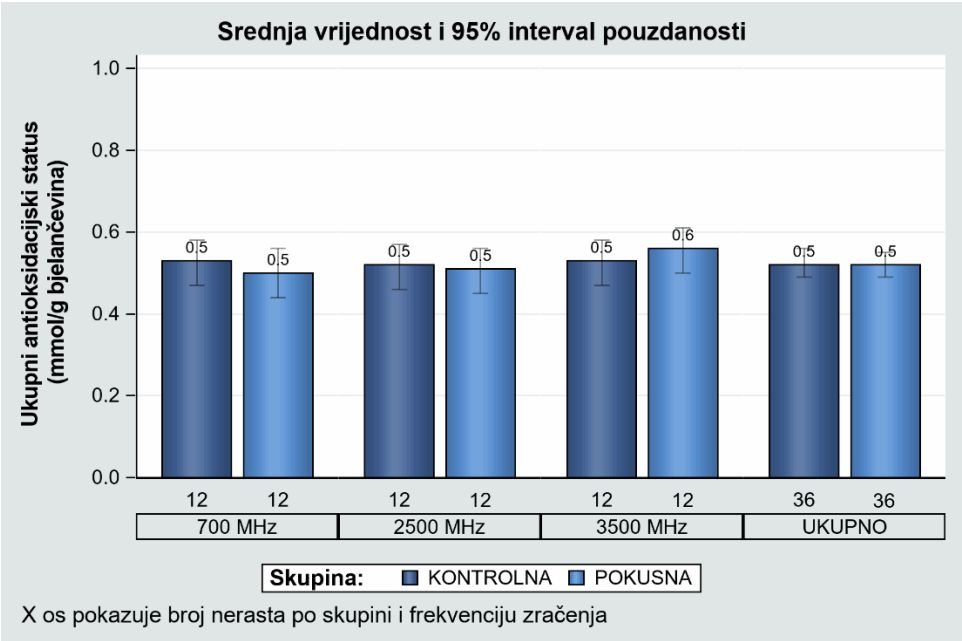
Tablica 6. Pokazatelji antioksidacijskog statusa spermija (srednja vrijednost ± standardna greška srednje vrijednosti) nerasta između kontrolnog uzorka (neozračeni) i pokusne skupine uzoraka (uzorci ozračeni korištenjem tri različite frekvencije zračenja; 700 MHz, 2500 MHz i 3500 MHz) te ukupno svih uzoraka pokusne skupine bez obzira na frekvenciju zračenja u odnosu na kontrolni uzorak.

	FREKVENCIJA ZRAČENJA							
	700 MHz		**2500 Mhz**		**3500 MHz**		**UKUPNO**	
BROJ NERASTA	**12**	**12**	**12**	**12**	**12**	**12**	**36**	**36**
SKUPINA	**Kontrolna**	**Pokusna**	**Kontrolna**	**Pokusna**	**Kontrolna**	**Pokusna**	**Kontrolna**	**Pokusna**
Bjelančevine (g/L)	0,24±0,02	0,22±0,02	0,28±0,02	0,33±0,02	0,24±0,02	0,26±0,02	0,25±0,01	0,27±0,01
Ukupni antioksidacijski status (mmol/g bjelančevina)	0,53±0,02	0,50±0,02	0,52±0,02	0,51±0,02	0,53±0,02	0,56±0,02	0,52±0,01	0,52±0,01
Superoksid dismutaza (U/g bjelančevina)	80,5±5,5	82,8±5,5	79,3±5,5	79,3±5,5	86,0±5,5	86,9±5,5	81,9±3,1	82,9±3,2
Glutation reduktaza (U/g bjelančevina)	22,1±2,9	23,5±2,9	22,3±2,9	22,9±2,9	13,2±2,9	13,6±2,9	19,0±1,7	19,7±1,7
Malondialdehid (U/g bjelančevina)	3,48±0,64	2,97±0,61	1,83±0,56	1,70±0,56	1,11±0,55	1,68±0,56	1,92±0,39	2,04±0,35

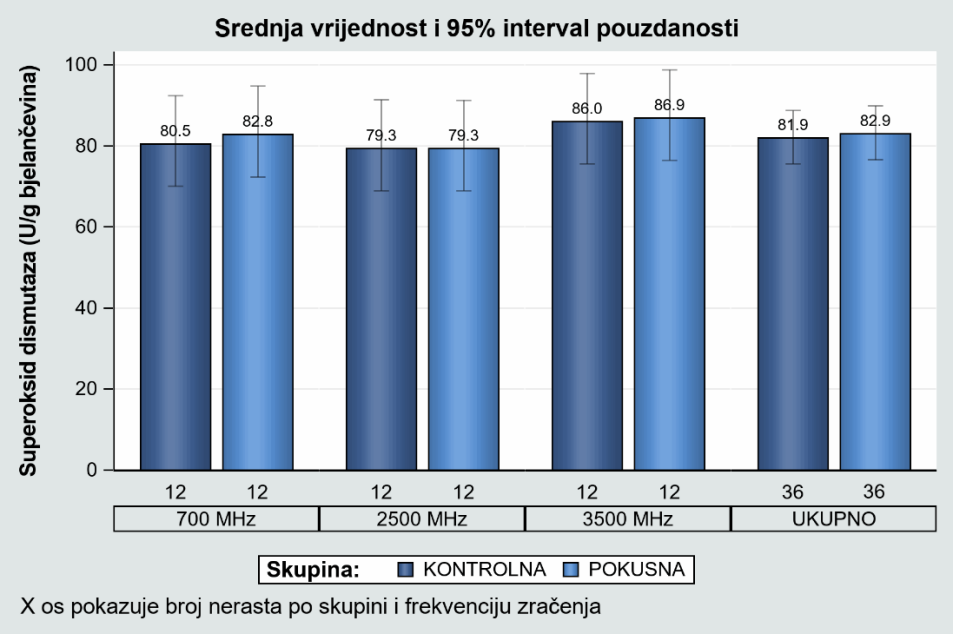
*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001.



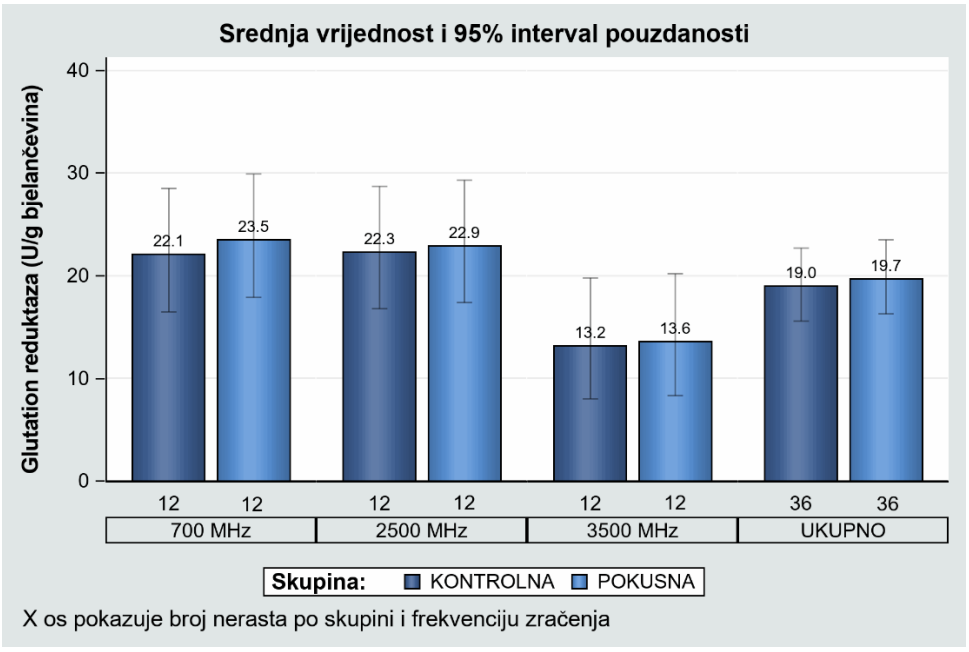
Slika 27. Grafikon srednjih vrijednosti i 95 % intervala pouzdanosti bjelančevina u spermijima nerasta (g/L) između kontrolne (neozračeni uzorak) i pokusne skupine uzoraka (uzorci ozračeni korištenjem tri različite frekvencije zračenja; 700 MHz, 2500 MHz i 3500 MHz) te ukupno svih uzoraka pokusne skupine bez obzira na frekvenciju zračenja u odnosu na kontrolni uzorak (* p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001; **** p<0,0001).



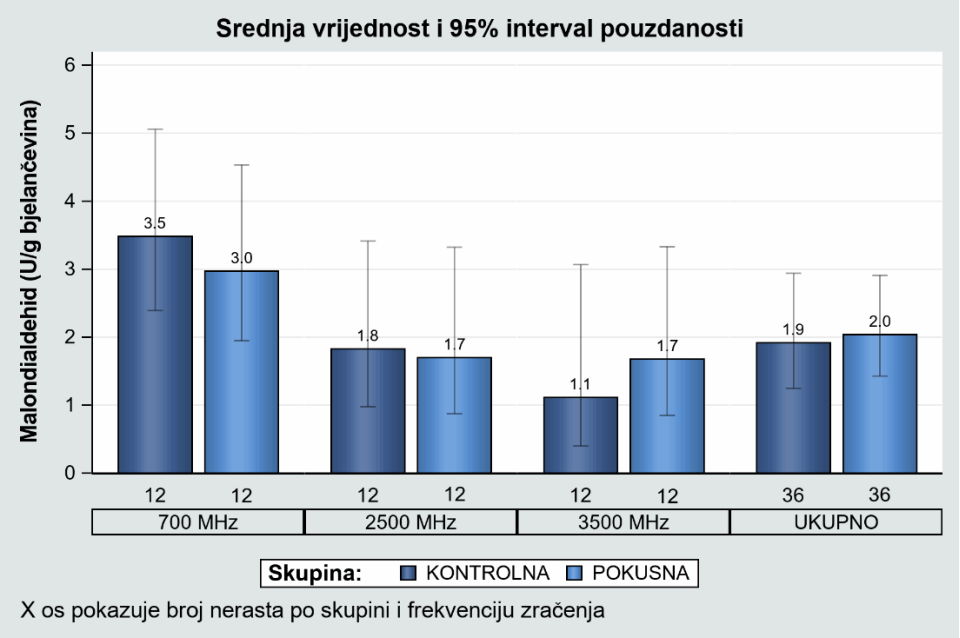
Slika 28. Grafikon srednjih vrijednosti i 95 % intervala pouzdanosti ukupnog antioksidacijskog statusa u spermijima nerasta (mmol/g bjelančevina) između kontrolne (neozračeni uzorak) i pokusne skupine uzoraka (uzorci ozračeni korištenjem tri različite frekvencije zračenja; 700 MHz, 2500 MHz i 3500 MHz) te ukupno svih uzoraka pokusne skupine bez obzira na frekvenciju zračenja u odnosu na kontrolni uzorak (* p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001; **** p<0,0001).



Slika 29. Grafikon srednjih vrijednosti i 95 % intervala pouzdanosti superoksid dismutaze u spermijima nerasta (U/g bjelančevina) između kontrolne (neozračeni uzorak) i pokusne skupine uzoraka (uzorci ozračeni korištenjem tri različite frekvencije zračenja; 700 MHz, 2500 MHz i 3500 MHz) te ukupno svih uzoraka pokusne skupine bez obzira na frekvenciju zračenja u odnosu na kontrolni uzorak (* p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001; **** p<0,0001).



Slika 30. Grafikon srednjih vrijednosti i 95 % intervala pouzdanosti glutation reduktaze u spermijima nerasta (U/g bjelančevina) između kontrolne (neozračeni uzorak) i pokusne skupine uzoraka (uzorci ozračeni korištenjem tri različite frekvencije zračenja; 700 MHz, 2500 MHz i 3500 MHz) te ukupno svih uzoraka pokusne skupine bez obzira na frekvenciju zračenja u odnosu na kontrolni uzorak (* p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001; **** p<0,0001).



Slika 31. Grafikon srednjih vrijednosti i 95 % intervala pouzdanosti malondialdehida u spermijima nerasta (U/g bjelančevina) između kontrolne (neozračeni uzorak) i pokusne skupine uzoraka (uzorci ozračeni korištenjem tri različite frekvencije zračenja; 700 MHz, 2500 MHz i 3500 MHz) te ukupno svih uzoraka pokusne skupine bez obzira na frekvenciju zračenja u odnosu na kontrolni uzorak (* $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$; **** $p<0,0001$).

5.5. ODNOSI IZMEĐU POKAZATELJA GIBLJIVOSTI, BRZINE, KVALITETE I ANTIOKSIDACIJSKIH POKAZATELJA SPERMIJA NERASTA

U tablicama 7., 8., 9., 10., 11. i 12. prikazani su korelacijski odnosi između pokazatelja gibljivosti i brzine spermija, vitalnosti spermija i antioksidacijskog statusa spermija kod kontrolne (neozračeni uzorak) i pokusne skupine uzoraka (uzorci ozračeni korištenjem tri različite frekvencije zračenja; 700 MHz, 2500 MHz i 3500 MHz).

Koeficijent korelacije između oštećenja DNK-a i pokazatelja brzine spermija VCL iznosi $r = - 0,54$; $p<0,001$, odnosno koeficijent determinacije iznosi 29,16 %, znači za toliki postotak je oštećenje DNK-a razlog manje vrijednosti VCL-a.

Koeficijent korelacije između oštećenja DNK-a i pokazatelja brzine spermija ALH iznosi $r = - 0,61$; $p<0,0001$, odnosno koeficijent determinacije iznosi 37,21 %, znači za toliki postotak je oštećenje DNK-a razlog manje vrijednosti ALH-a.

Koeficijent korelacije između oštećenja DNK-a i pokazatelja brzine spermija STR iznosi $r = - 0,64$; $p<0,0001$, odnosno koeficijent determinacije iznosi 40,96 %, znači za toliki postotak je oštećenje DNK-a razlog manje vrijednosti STR-a.

Tablica 7. Korelacijski odnosi između pokazatelja gibljivosti, brzine i vitalnosti spermija kod kontrolne skupine uzoraka (neozračeni uzorak).

		POKAZATELJI GIBLJIVOSTI I BRZINE SPERMIJA													POKAZATELJI VITALNOSTI SPERMIJA		
		GIBLJIVOST	PROGRESIVNA GIBLJIVOST	VAP	VSL	VCL	ALH	BCF	STR	LIN	WOB	BRZI SPERMIJI	SREDNJE BRZI SPERMIJI	SPORI SPERMIJI	NEPOKRETNI SPERMIJI	INTAKTNA MEMBRANA I DOBAR POTENCIJAL MITOHONDRIJA	OŠTEĆENA MEMBRANA I LOŠ POTENCIJAL MITOHONDRIJA	OŠTEĆENJE DNK
POKAZATELJI GIBLJIVOSTI I BRZINE SPERMIJA	GIBLJIVOST		0,76 <0,0001	0,42 <0,05	0,40 <0,05	0,38 <0,05	n.s.	0,46 <0,01	n.s.	n.s.	n.s.	0,77 <0,0001	n.s.	n.s.	- 1,00 <0,0001	0,39 <0,05	- 0,41 <0,05	n.s.
	PROGRESIVNA GIBLJIVOST			0,62 <0,0001	0,78 <0,0001	0,42 <0,01	n.s.	0,38 <0,05	n.s.	n.s.	0,42 <0,01	0,93 <0,0001	- 0,63 <0,0001	- 0,70 <0,0001	- 0,76 <0,0001	0,55 <0,001	- 0,54 <0,001	n.s.
	VAP				0,78 <0,0001	0,91 <0,0001	0,54 <0,001	0,43 <0,01	n.s.	n.s.	n.s.	0,70 <0,0001	- 0,70 <0,0001	- 0,61 <0,0001	- 0,42 <0,05	n.s.	n.s.	n.s.
	VSL					0,50 <0,01	n.s.	0,52 <0,01	0,49 <0,01	0,54 <0,001	0,63 <0,0001	0,63 <0,0001	- 0,59 <0,001	- 0,55 <0,001	- 0,40 <0,05	0,47 <0,01	- 0,48 <0,01	n.s.
	VCL						0,78 <0,0001	n.s.	- 0,46 <0,01	- 0,39 <0,05	- 0,42 <0,05	0,58 <0,001	- 0,56 <0,001	- 0,51 <0,01	- 0,38 <0,05	n.s.	n.s.	n.s.
	ALH							- 0,48 <0,01	- 0,68 <0,0001	- 0,70 <0,0001	- 0,70 <0,0001	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	BCF								0,62 <0,0001	0,43 <0,01	0,36 <0,05	n.s.	n.s.	n.s.	- 0,46 <0,01	n.s.	n.s.	n.s.
	STR									0,94 <0,0001	0,75 <0,0001	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	LIN										0,90 <0,0001	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	WOB											n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	0,41 <0,05	- 0,39 <0,05	n.s.
	BRZI SPERMIJI												- 0,77 <0,0001	- 0,78 <0,0001	- 0,77 <0,0001	0,49 <0,01	- 0,49 <0,01	n.s.
	SREDNJE BRZI SPERMIJI													0,75 <0,0001	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	SPORI SPERMIJI														n.s.	- 0,38 <0,05	0,38 <0,05	n.s.
	NEPOKRETNI SPERMIJI															- 0,39 <0,05	0,41 <0,05	n.s.
POKAZATELJI VITALNOSTI SPERMIJA	INTAKTNA MEMBRANA I DOBAR POTENCIJAL MITOHONDRIJ																-0,93 <0,0001	n.s.
	OŠTEĆENA MEMBRANA I LOŠ POTENCIJAL																	n.s.
	OŠTEĆENJE DNK																	

Tablica 8. Korelacijski odnosi između pokazatelja gibljivosti, brzine i antioksidacijskog statusa spermija kod kontrolne skupine uzoraka (neozračeni uzorak).

		POKAZATELJI GIBLJIVOSTI I BRZINE SPERMIJA														POKAZATELJI ANTIOKSIDACIJSKOG STATUSA SPERMIJA			
		GIBLJIVOST	PROGRESIVNA GIBLJIVOST	VAP	VSL	VCL	ALH	BCF	STR	LIN	WOB	BRZI SPERMIJI	SREDNJE BRZI SPERMIJI	SPORI SPERMIJI	NEPOKRETNI SPERMIJI	TAS	SOD	GR	MDA
POKAZATELJI GIBLJIVOSTI I BRZINE SPERMIJA	GIBLJIVOST		0,76 <0,0001	0,42 <0,05	0,40 <0,05	0,38 <0,05	n.s.	0,46 <0,01	n.s.	n.s.	n.s.	0,77 <0,0001	n.s.	n.s.	- 1,00 <0,0001	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	PROGRESIVNA GIBLJIVOST			0,62 <0,0001	0,78 <0,0001	0,42 <0,01	n.s.	0,38 <0,05	n.s.	n.s.	0,42 <0,01	0,93 <0,0001	- 0,63 <0,0001	- 0,70 <0,0001	- 0,76 <0,0001	n.s.	n.s.	n.s.	0,43 <0,01
	VAP				0,78 <0,0001	0,91 <0,0001	0,54 <0,001	0,43 <0,01	n.s.	n.s.	n.s.	0,70 <0,0001	- 0,70 <0,0001	- 0,61 <0,0001	- 0,42 <0,05	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	VSL					0,50 <0,01	n.s.	0,52 <0,01	0,49 <0,01	0,54 <0,001	0,63 <0,0001	0,63 <0,0001	- 0,59 <0,001	- 0,55 <0,001	- 0,40 <0,05	n.s.	n.s.	n.s.	0,32 <0,05
	VCL						0,78 <0,0001	n.s.	- 0,46 <0,01	- 0,39 <0,05	- 0,42 <0,05	0,58 <0,001	- 0,56 <0,001	- 0,51 <0,01	- 0,38 <0,05	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	ALH							- 0,48 <0,01	- 0,68 <0,0001	- 0,70 <0,0001	- 0,70 <0,0001	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	BCF								0,62 <0,0001	0,43 <0,01	0,36 <0,05	n.s.	n.s.	n.s.	- 0,46 <0,01	n.s.	- 0,38 <0,05	0,45 0,01	n.s.
	STR									0,94 <0,0001	0,75 <0,0001	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	- 0,40 <0,05	n.s.	n.s.
	LIN										0,90 <0,0001	n.s.	n.s.	n.s.	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.
	BRZI SPERMIJI												- 0,77 <0,0001	- 0,78 <0,0001	- 0,77 <0,0001	n.s.	n.s.	n.s.	0,42 <0,05
	SREDNJE BRZI SPERMIJI													0,75 <0,0001	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	- 0,40 <0,05
	SPORI SPERMIJI														n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	- 0,34 <0,05
	NEPOKRETNI SPERMIJI															n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
POKAZATELJI ANTIOKSIDACIJSKOG STATUSA SPERMIJA	TAS																n.s.	n.s.	n.s.
	SOD																	n.s.	n.s.
	GR																		n.s.
	MDA																		

Tablica 9. Korelacijski odnosi između pokazatelji vitalnosti i antioksidacijskog statusa spermija kod kontrolne skupine uzoraka (neozračeni uzorak).

		POKAZATELJI VITALNOSTI SPERMIJA			POKAZATELJI ANTIOKSIDACIJSKOG STATUSA SPERMIJA			
		INTAKTNA MEMBRANA I DOBAR POTENCIJAL MITOHONDRIJA	OŠTEĆENA MEMBRANA I LOŠ POTENCIJAL MITOHONDRIJA	OŠTEĆENJE DNK	TAS	SOD	GR	MDA
POKAZATELJI VITALNOSTI SPERMIJA	INTAKTNA MEMBRANA I DOBAR POTENCIJAL MITOHONDRIJA		-0,93 <0,0001	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	0,37 <0,05
	OŠTEĆENA MEMBRANA I LOŠ POTENCIJAL MITOHONDRIJA			n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	- 0,34 <0,05
	OŠTEĆENJE DNK				-0,41 <0,05	n.s.	n.s.	n.s.
POKAZATELJI ANTIOKSIDACIJSKOG STATUSA SPERMIJA	TAS					n.s.	n.s.	n.s.
	SOD						n.s.	n.s.
	GR							n.s.
	MDA							

Tablica 10. Korelacijski odnosi između pokazatelja gibljivosti, brzine i vitalnosti spermija kod pokusne skupine uzoraka (uzorci ozračeni korištenjem tri različite frekvencije zračenja; 700 MHz, 2500 MHz i 3500 MHz).

		POKAZATELJI GIBLJIVOSTI I BRZINE SPERMIJA														POKAZATELJI VITALNOSTI SPERMIJA		
		GIBLJIVOST	PROGRESIVNA GIBLJIVOST	VAP	VSL	VCL	ALH	BCF	STR	LIN	WOB	BRZI SPERMIJI	SREDNJE BRZI SPERMIJI	SPORI SPERMIJI	NEPOKRETNI SPERMIJI	INTAKTNA MEMBRANA I DOBAR POTENCIJAL MITOHONDRIJA	OŠTEĆENA MEMBRANA I LOŠ POTENCIJAL MITOHONDRIJA	OŠTEĆENJE DNK
POKAZATELJI GIBLJIVOSTI I BRZINE SPERMIJA	GIBLJIVOST		0,70 <0,0001	0,45 <0,01	0,55 <0,001	0,37 <0,05	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	0,69 <0,0001	n.s.	n.s.	- 1,00 <0,0001	n.s.	n.s.	n.s.
	PROGRESIVNA GIBLJIVOST			0,63 <0,0001	0,83 <0,0001	0,58 <0,01	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	0,46 <0,01	0,91 <0,0001	n.s.	- 0,50 <0,01	- 0,70 <0,0001	0,35 <0,05	- 0,33 <0,05	n.s.
	VAP				0,82 <0,0001	0,95 <0,0001	0,66 <0,001	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	0,77 <0,0001	- 0,52 <0,01	- 0,44 <0,01	- 0,45 <0,01	n.s.	n.s.	- 0,39 <0,05
	VSL					0,72 <0,0001	n.s.	n.s.	n.s.	0,39 <0,05	0,49 <0,01	0,80 <0,0001	- 0,44 <0,01	- 0,45 <0,01	- 0,55 <0,001	n.s.	n.s.	n.s.
	VCL						0,81 <0,0001	n.s.	n.s.	n.s.	- 0,34 <0,05	0,71 <0,001	- 0,47 <0,01	- 0,42 <0,05	- 0,37 <0,05	n.s.	n.s.	- 0,54 <0,001
	ALH							n.s.	n.s.	n.s.	- 0,66 <0,0001	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	- 0,61 <0,0001
	BCF								0,48 <0,01	0,50 <0,01	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	- 0,37 <0,05
	STR									0,92 <0,0001	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	- 0,64 <0,0001
	LIN										n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	- 0,38 <0,05
	WOB											0,48 <0,01	- 0,34 <0,05	- 0,33 <0,05	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	BRZI SPERMIJI												- 0,44 <0,01	- 0,59 <0,001	- 0,68 <0,0001	0,34 <0,05	n.s.	n.s.
	SREDNJE BRZI SPERMIJI													0,62 <0,0001	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	SPORI SPERMIJI														n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	NEPOKRETNI SPERMIJI															n.s.	n.s.	n.s.
POKAZATELJI VITALNOSTI SPERMIJA	INTAKTNA MEMBRANA I DOBAR POTENCIJAL MITOHONDRIJA																-0,84 <0,0001	n.s.
	OŠTEĆENA MEMBRANA I LOŠ POTENCIJAL MITOHONDRIJA																	n.s.
	OŠTEĆENJE DNK																	

Tablica 11. Korelacijski odnosi između pokazatelja gibljivosti, brzine i antioksidacijskog statusa spermija kod pokusne skupine uzoraka (uzorci ozračeni korištenjem tri različite frekvencije zračenja; 700 MHz, 2500 MHz i 3500 MHz).

		POKAZATELJI GIBLJIVOSTI I BRZINE SPERMIJA														POKAZATELJI ANTIOKSIDACIJSKOG STATUSA SPERMIJA			
		GIBLJIVOST	PROGRESIVNA GIBLJIVOST	VAP	VSL	VCL	ALH	BCF	STR	LIN	WOB	BRZI SPERMIJI	SREDNJE BRZI SPERMIJI	SPORI SPERMIJI	NEPOKRETNI SPERMIJI	TAS	SOD	GR	MDA
POKAZATELJI GIBLJIVOSTI I BRZINE SPERMIJA	GIBLJIVOST		0,70 <0,0001	0,45 <0,01	0,55 <0,001	0,37 <0,05	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	0,69 <0,0001	n.s.	n.s.	- 1,00 <0,0001	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	PROGRESIVNA GIBLJIVOST			0,63 <0,0001	0,83 <0,0001	0,58 <0,01	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	0,46 <0,01	0,91 <0,0001	n.s.	- 0,50 <0,01	- 0,70 <0,0001	n.s.	n.s.	0,47 <0,01	n.s.
	VAP				0,82 <0,0001	0,95 <0,0001	0,66 <0,001	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	0,77 <0,0001	- 0,52 <0,01	- 0,44 <0,01	- 0,45 <0,01	n.s.	0,39 <0,05	0,35 <0,05	n.s.
	VSL					0,72 <0,0001	n.s.	n.s.	n.s.	0,39 <0,05	0,49 <0,01	0,80 <0,0001	- 0,44 <0,01	- 0,45 <0,01	- 0,55 <0,001	n.s.	0,39 <0,05	0,35 <0,05	n.s.
	VCL						0,81 <0,0001	n.s.	n.s.	n.s.	- 0,34 <0,05	0,71 <0,001	- 0,47 <0,01	- 0,42 <0,05	- 0,37 <0,05	n.s.	0,33 <0,05	0,36 <0,05	n.s.
	ALH							n.s.	n.s.	n.s.	- 0,66 <0,0001	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	BCF								0,48 <0,01	0,50 <0,01	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	- 0,38 <0,05	n.s.	n.s.
	STR									0,92 <0,0001	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	LIN										n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	WOB											0,48 <0,01	- 0,34 <0,05	- 0,33 <0,05	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	- 0,33 <0,05
	BRZI SPERMIJI												- 0,44 <0,01	- 0,59 <0,001	- 0,68 <0,0001	n.s.	n.s.	0,48 <0,01	n.s.
	SREDNJE BRZI SPERMIJI													0,62 <0,0001	n.s.	n.s.	n.s.	-0,45 <0,01	n.s.
	SPORI SPERMIJI														n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	NEPOKRETNI SPERMIJI															n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
POKAZATELJI ANTIOKSIDACIJSKOG STATUSA SPERMIJA	TAS																0,54 <0,001	n.s.	n.s.
	SOD																	n.s.	n.s.
	GR																		n.s.
	MDA																		

Tablica 12. Korelacijski odnosi između pokazatelja vitalnosti i antioksidacijskog statusa spermija kod pokusne skupine uzoraka (uzorci ozračeni korištenjem tri različite frekvencije zračenja; 700 MHz, 2500 MHz i 3500 MHz).

		POKAZATELJI VITALNOSTI SPERMIJA			POKAZATELJI ANTIOKSIDACIJSKOG STATUSA SPERMIJA			
		INTAKTNA MEMBRANA I DOBAR POTENCIJAL MITOHONDRIJA	OŠTEĆENA MEMBRANA I LOŠ POTENCIJAL MITOHONDRIJA	OŠTEĆENJE DNK	TAS	SOD	GR	MDA
POKAZATELJI VITALNOSTI SPERMIJA	INTAKTNA MEMBRANA I DOBAR POTENCIJAL MITOHONDRIJA		- 0,84 <0,0001	n.s.	n.s.	n.s.	0,49 <0,01	n.s.
	OŠTEĆENA MEMBRANA I LOŠ POTENCIJAL MITOHONDRIJA			n.s.	n.s.	n.s.	- 0,35 <0,05	n.s.
	OŠTEĆENJE DNK				n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
POKAZATELJI ANTIOKSIDACIJSKOG STATUSA SPERMIJA	TAS					0,54 <0,001	n.s.	n.s.
	SOD						n.s.	n.s.
	GR							n.s.
	MDA							

6. RASPRAVA

U posljednje vrijeme, elektromagnetsko zračenje svakodnevno izaziva kontroverze vezane za utjecaj moderne tehnologije na biološki život svih jedinki. Ubrzani razvoj tehnologije te ovisnost čovječanstva o istoj, stavlja u drugi plan potencijalno štetne učinke zračenja koje emitiraju moderni tehnološki uređaji. Također, dolazi do sve veće uporabe uređaja koji koriste bežični internet te posljedično tome do povećane izloženosti organizma radiofrekvencijskom zračenju. Međunarodno povjerenstvo za zaštitu od neionizirajućeg zračenja (*International Commision on Non-Ionizing Radiation Protection* - ICNIRP) je međunarodno udruženje znanstvenika koje žele podići svijest javnosti o štetnom učinku neionizirajućeg zračenja. Glavni cilj ICNIRP-a je ukazati na potrebu smanjenja izloženosti organizma zračenju, odnosno minimalizirati ga zbog potencijalno kancerogenih svojstava (IARC, 2011.). Svijest o izloženosti ljudi sve većem broju i raznolikosti izvora elektromagnetskog polja (EMF) na poslu i kod kuće postalo je javnozdravstveno pitanje. Do danas su mnoga *in vivo* i *in vitro* istraživanja na ljudima i životinjama utvrdila da izloženost EMF-u može promijeniti staničnu homeostazu, endokrinu funkciju, reproduktivnu funkciju i razvoj fetusa (GYE i PARK, 2012.; KIVRAK i sur., 2017.). Nadalje, rezultati mnogih istraživanja ukazuju na povezanost korištenja mobitela sa smanjenjem broja i gibljivosti spermija, spermija normalne morfologije i vitalnosti (AGARWAL i sur., 2008.; DE IULIIS i sur., 2009. AGARWAL i sur., 2011.; AL-BAYYARI, 2017.). Također, ROS koji nastaje kao posljedica RF-EMZ-a može imati štetne učinke na DNK spermija te druge biomolekule poput bjelančevina i lipida, što posljedično dovodi do neplodnosti muškaraca (AGARWAL i sur., 2011.; LIU i sur., 2015.; ZALATA i sur., 2015.).

Biološki učinci zračenja ovise o frekvenciji i trajanju izloženosti zračenju (KESARI i sur., 2018). Budući da do sada nisu istraživani potencijalno negativni utjecaji EMZ-a većih frekvencija od 2500 MHz na ljudima i životinjama, u ovom istraživanju ozračeni su uzorci sperme nerasta frekvencijom od 3500 MHz te su istraživani učinci na pokazatelje gibljivosti i brzine spermija, pokazatelje vitalnosti, pokazatelje antioksidacijske zaštite spermija i DNK-a oštećenje.

Svinje su u posljednjim desetljećima kao animalni modeli vrlo česti izbor u biomedicinskim istraživanjima, prvenstveno zbog njihove velike podudarnosti u

fiziološkim procesima odnosno staničnim mehanizmima s ljudima (KANEKO i sur., 2011.). Povrh toga, svinjski je genom tri puta sličniji genomu ljudi u odnosu na genom miša što svinje čini pogodnijim modelom od glodavca (WERNERSSON i sur., 2005.). Osim navedenog, sperma nerasta odabrana je kao model u ovom istraživanju zbog velike količine koju nerasti fiziološki ejakuliraju (cca 250 mL), a u svrhu provedbe velikog broja analiza (WOLF i SMITAL, 2009.).

6.1. POKAZATELJI GIBLJIVOSTI SPERMIJA

U ovom istraživanju, svi ozračeni uzorci pokusne skupine (neovisno o tome kojom su frekvencijom uzorci ozračeni), u odnosu na kontrolnu skupnu odnosno neozračene uzorke, imali su statistički značajno manji udio gibljivih i progresivno gibljivih spermija. Slični rezultati ovima utvrđeni su na ozračenim uzorcima sperme muškaraca (EROGUL i sur. 2006.; AGARWAL i sur. 2008.) te na ozračenim uzorcima sperme štakora (KESARI i sur. 2010.; MORTAZAVI i sur. 2010.). U navedenim je istraživanjima utvrđeno da nakon izlaganja uzorka sperme EMZ-u frekvenciji od 2,45 GHz (frekvencija mobitela i prijenosnog računala), dolazi do značajnog smanjenja gibljivosti spermija. Najsličniji dizajn istraživanja ovom istraživanju proveli su ONI i sur. (2011.); u njihovom istraživanju uzorci sperme muškaraca izloženi su djelovanju zračenja prijenosnog računala (2,45 GHz) kroz vremensko razdoblje od jednog sata. Prethodno navedena istraživanja proučavala su učinak EMZ-a na jednoj frekvenciji, nisu istraživala učinak različitih frekvencije na gibljivost ozračenih spermija. Budući da u ovom istraživanju rezultati udjela progresivne gibljivosti spermija *in vitro* ozračenih uzoraka sperme nerasta ovise i o frekvenciji zračenja odnosno razlikuju se nakon ozračivanja različitom frekvencijom, dobivene rezultate nije moguće usporediti s prethodno navedenim istraživanjima. Naime, u ovom je istraživanju utvrđeno da je najveći pad u udjelu progresivno gibljivih spermija zabilježen u uzorcima sperme ozračenim sa 700 MHz nakon toga s 2500 MHz te je nešto manji pad zabilježen u uzorcima ozračenima s 3500 MHz u odnosu na kontrolnu skupinu. Pretpostavlja se da su mehanizmi djelovanja koji su doveli do smanjenja gibljivosti spermija nakon izloženosti uzorka sperme RF-EMZ-u narušena vitalnosti spermija odnosno sniženi potencijal mitohondrija ili oksidativni stres (DE IULIIS i sur. 2009.; GHANBARI i sur., 2013.). Obzirom da rezultati ovog istraživanja ukazuju da je antioksidacijski status bio nenarušen pretpostavlja se da je

smanjenje gibljivosti spermija nerasta nastalo kao posljedica lošije vitalnosti spermija koja se očitovala u smanjenom udjelu spermija s intaktnom membranom s dobrim potencijalom mitohondrija i statistički značajnim većim udjelom spermija sa oštećenom DNK. Spermiji u svojoj strukturnoj građi sadrže mitohondrije koji su bitan čimbenik za gibanje spermija (KNOX, 2003.) te u slučaju smanjenja potencijala mitohondrija dolazi do smanjene gibljivosti (BERNABO i sur., 2007.).

U ovom se istraživanju pomoću CASA-e utvrđivao učinak EMZ-a na pokazatelje gibljivosti, ali i na pokazatelje brzine spermija *in vitro* ozračenih uzoraka sperme rasplodnih nerasta. Dobivene vrijednosti analiziranih pokazatelja brzine spermija nerasta kontrolne skupine ovog istraživanja podudaraju se s vrijednostima pokazatelja brzine spermija istraživanju kojeg su proveli GIL i sur. (2009.). Prethodno spomenuti autori također su proveli istraživanje na svježem uzorku sperme nerasta u svrhu analize pokazatelja gibljivosti i brzine spermija pomoću CASA-e. Prema istim autorima najznačajniji pokazatelji za procjenu brzine spermija nerastu su VCL, ALH I BCF. Amplituda lateralnog otklona glave je značajan pokazatelj gibljivosti jer je potrebna određena brzina spermija uvjetovana otklonom glave da bi spermij penetrirao barijeru cervikalnog kanala krmače (GIL i sur., 2009.). Vrijednosti ALH-a u ovom istraživanju nisu se razlikovale između pokusne i kontrolne skupine uzoraka sperme. U svim ozračenim uzorcima sperme ovoga istraživanja, neovisno o frekvenciji zračenja, utvrđen je statistički značajno manji udio brzih spermija, STR-a, LIN-a i WOB-a u odnosu na kontrolnu skupinu uzoraka. Isto tako, svi su ozračeni uzorci imali, u odnosu na kontrolnu skupinu uzoraka, statistički značajno niže vrijednosti VAP-a i VSL-a. Jedino dostupno istraživanje koje je utvrđivalo učinak EMZ-a na sjeme nerasta proveli su BERNABO i sur. (2007.) i to u sinusoidnom magnetskom polju od 50 Hz generiranom pomoću solenoida. Navedeni autori su utvrdili da 2 sata izlaganja uzorak sperme nerasta EMZ-u dolazi do značajnog smanjenja vrijednosti VAP, VCL, ALH, VSL te STR. Na temelju rezultata dobivenih od prethodno navedenih autora možemo ustvrditi da pod utjecajem zračenja niže frekvencije od onoga koje su ozračivani uzorci sperme u ovom istraživanju (700 MHz) također dolazi do promjena u vrijednostima pokazatelja brzine gibanja spermija osobito pokazatelja VAP, VSL te STR. U ovom istraživanju rezultati pojedinih pokazatelja brzine ovisili su o frekvenciji zračenja. Primjerice, jedini je pad u udjelu STR-a i LIN-a zabilježen je u uzorcima ozračenim sa 2500 MHz, dok je pad u udjelu WOB-a

zabilježen u uzorcima ozračenima sa 700 MHz. Najveći pad u vrijednostima VSL-a zabilježen je u uzorcima ozračenima sa 2500 MHz i sa 700 MHz, dok je nešto manji pad zabilježen u uzorcima ozračenima sa 3500 MHz. Također, u ovom istraživanju pad vrijednosti BCF-a zabilježen je samo u uzorcima ozračenima sa 2500 MHz. Rezultati ovog istraživanja pokazali su da je frekvencija od 2500 MHz imala najnegativniji učinak na vrijednosti pokazatelja brzine spermija nerasta, odnosno na njihovu brzinu gibanja. U istraživanju LUKAC i sur. (2011.) koji su izlagali sjeme bikova zračenju od 1800 MHz u razdoblju od 30, 120 i 420 minuta, utvrdili su smanjeni udio ukupne gibljivosti i smanjenje broja progresivno gibljivih spermija nakon 120 minuta izlaganja, što je prema vremenu izlaganja te dobivenim rezultatima sukladno rezultatima ovog istraživanja. Nadalje, u prethodno navedenom istraživanju vrijednosti VCL-a, VSL-a te VAP-a bile su najniže nakon 420 minuta izlaganja, odnosno učinak zračenja na prethodno navedene pokazatelje bio je zamjetan tek nakon 420 minuta izlaganja EMZ-u. Dobiveni rezultati glede pokazatelja brzine spermija bikova nakon što su izloženi EMZ-u slični su ovom istraživanju, no učinak EMZ-a se očitovao na brzinu spermija bikova tek nakon duljeg vremenski razdoblja, a u ovom istraživanju učinak na spermiji nerasta bio je nakon 120 minuta. Mogući uzroci kasnijeg odgovora spermija bika na utjecaj EMZ-a su veća koncentracija sjemena bika, $2.68 \pm 0.14 \times 10^9$/mL, osobitosti i specifičnosti metabolizma spermija bika, sastavu drukčijeg razrjeđivača koji se koristio u istraživanju kao i temperatura od 37 °C koja je zabilježena u navedenom istraživanju. Poznato je da učinci EMZ-a ovise o gustoći tkiva odnosno stanica u određenom mediju (KESARI i sur., 2018.). Nadalje, pad udjela brzih spermija nakon izlaganja muškaraca zračenju mobilnih uređaja utvrdili su DAVOUDI i sur. (2002.). Njihovo istraživanje provedeno je *in vivo* na muškarcima koji su u razdoblju od 5 dana po 6 sati dnevno koristili mobilne uređaje koji su odašiljali frekvenciju od 800 MHz. Iako su frekvencija, dužina i način izloženosti i drugačiji dizajn istraživanja bili različiti u odnosu na ovo istraživanje, dobiveni su sukladni rezultati. U ovom istraživanju je pad udjela brzih spermija prouzročilo izlaganje *in vitro* uzoraka sperme nerasta pri frekvenciji od 700 MHz, što ukazuje da je mehanizam djelovanja EMZ-a na spermije isti *in vitro* i *in vivo*, jedino možda učinak ovisi o vremenu izlaganja organizma / stanica.

EMZ može uzrokovati neravnotežu u elektrosenzibilnim kanalićima stanica i membranama organela, što u konačnici dovodi do poremetnje u elektrokemijskoj ravnoteži te funkcioniranju stanice (PANAGOPOULOS i sur., 2002.). Smanjena gibljivost spermija se najvjerojatnije javlja zbog toga što RF-EMZ može uzrokovati poremetnju signalizacije ovisnu o koncentraciji kalcija (GYE i PARK, 2012.). Pretpostavka je da spermiji normalno funkcioniraju u određenom rasponu koncentracije kalcijevih (Ca^{2+}) iona u izvanstaničnom okolišu, međutim kada koncentracija Ca iona prijeđe vrijednosti određenog raspona, uzrokuje smanjenu gibljivost spermija. Nadalje, u nuzsjemeniku, kalcij ima funkciju poticanja sazrijevanja nezrelih spermija, dok u ejakuliranom sjemenu, velika koncentracija iona kalcija sprječavaju gibljivost spermija. BERNABO i sur. (2007.) su proveli istraživanje kojim se potvrđuju pretpostavku da nakon izlaganja EMZ-u uz puno manju frekvenciju zračenja, dolazi do poremetnje u koncentraciji kalcijevih iona. Oni su ustvrdili da EMZ negativno utječe i na izvanstaničnu i unutarstaničnu koncentraciju kalcijevih iona. Autori studije navode da nenerušena citosolna koncentracija kalcijevih iona regulira energetski metabolizam uz pomoć aktivacije mitohondrija preko Krebsovog ciklusa. Porast citosolne koncentracije kalcijevih iona uzrokuje paralelni porast kalcija u matriksu mitotohondrija. Prethodno navedeno, predstavlja izuzetnu važnost jer kalcij i aktivnost mitohondrija su glavni čimbenici gibljivosti spermija. Nadalje, u istom istraživanju utvrđeno je da nakon 2 sata izloženosti uzoraka EMZ-u dolazi do gubitka integriteta akrosoma zbog strukturnih poremetnji u membrani te egzocitoze akrosomalnog sadržaja. Temeljem prethodno navedenih činjenica može se pretpostaviti da povećanje u koncentraciji kalcijevih iona u citosolu spermija nakon izlaganja sperme EMZ-u predstavlja ključni odgovor na pitanje koji mehanizam uzrokuje smanjenje gibljivosti spermija nakon izlaganja uzoraka EMZ-a. U daljnjim bi istraživanjima trebalo utvrditi fiziološki raspon koncentracije kalcijevih iona u sjemenoj plazmi nerasta kako bi mogla poslužiti kao pokazatelj kakvoće sjemena te istražiti i usporediti koncentraciju kalcija prije i nakon EMZ -a, kako bi se u konačnici mogao dobiti odgovor o relevantnosti kalcija u smanjenju gibljivosti spermija.

6.2. POKAZATELJI VITALNOSTI SPERMIJA

Jedno od prvih istraživanja proveli su DIEM i sur. (2005.), u kojemu je utvrđen netoplinski učinak RF-EMZ-a različitih modulacija frekvencija od 1800 MHz na *in vitro* ozračenih fibroblasta te u granuloza stanica štakora. Naime, isti autori dokazali su da različite modulacije uzrokuju jednolančane i dvolančane prekide DNK-a u humanim diploidnim stanicama. U ovom istraživanju, svi ozračeni uzorci pokusne skupine (neovisno o tome kojom su frekvencijom uzorci sperme ozračeni), imali su u odnosu na kontrolnu skupinu uzoraka, statistički značajno veći udio spermija sa oštećenjem DNK-a. Slični rezultati ovome istraživanju utvrđeni su na *in vitro* istraživanju DE IULIIS i sur. (2009.), GORPINCHENKO i sur. (2014.) i ZALATA i sur. (2015.) na uzorcima sperme muškaraca te u *in vivo* istraživanju na štakorima koju su proveli KUMAR i sur. (2014.). U navedenim istraživanjima utvrđeno je da zbog izlaganja uzoraka sperme EMZ-u frekvencijama mobilnog telefona i bežičnog interneta (2500 MHz) dolazi do fragmentacije DNK-a. Smanjena gibljivost spermija te oštećenje DNK-a muškaraca izloženih zračenju moderne tehnologije, posljedica su najvjerojatnije kumulativnog učinka konstantnog izlaganja RF-EMZ-u (AGARWAL i sur., 2011.). Također, SCHULTE i sur., 2010. utvrdili su da većina neplodnih muškaraca ima oštećenje DNK-a koje nastaje zbog dugotrajne izloženosti zračenju iste frekvencije koja je prisutna u svakodnevnom životu. Druga pretpostavka zašto dolazi do oštećenja DNK-a pri manjim frekvencijama zračenja u kraćim vremenskim intervalima je oksidativni stres koji ima ključnu funkciju u fragmentaciji DNK-a (DE IULIIS i sur., 2009.). U ovom istraživanju nije zabilježena statistički značajna razlika u udjelu spermija s oštećenjem DNK-a u uzorcima sperme ozračenim s 700 MHz u odnosu na neozračene uzorke, što bi moglo značiti da 700 MHz nije frekvencija koja uzrokuje značajno oštećenje DNK-a spermija nerasta odnosno oksidativni stres pri izloženosti uzorka od 2 sata. Dostupna istraživanja uglavnom istražuju učinak RF-EMZ-a frekvencije od 2450 MHz na uzorcima sperme te je time ove rezultate teško usporediti i raspraviti.

Najveći porast u udjelu spermija s oštećenjem DNK-a u ovom istraživanju zabilježen je u uzorcima sperme nerasta ozračenima sa 2500 MHz. Dobiveni rezultati podudaraju se s rezultatima koje su dobili AVENDAÑO i sur. (2012.). Navedeni autori ozračili su uzorke sperme muškaraca također na frekvenciji od 2500 MHz, ali na vremensko razdoblje od 4 sata te su također utvrdili značajno DNK-a oštećenje ozračenih

spermija. Značajni porast u udjelu spermija s oštećenjem DNK zabilježen je također u ovom istraživanju u uzorcima sperme ozračenima s 3500 MHz u odnosu na neozračene uzorke. U dosadašnjoj literaturi nisu nađena istraživanja koja su koristila frekvenciju zračenja od 3500 MHz na uzorcima sperme. Smatra se da radiofrekvencijsko neionizirajuće EMZ ima genotoksični učinak upravo zbog oštećenja DNK-a, alteracije u ekspresiji gena te promjena u proliferaciji stanica (KESARI i sur., 2018.). Isti autori navode da je mehanizam djelovanja RF-EMZ-a na spermije oštećenje DNK-a koji dovodi do iskrivljenja glave spermija te oštećenje mitohondrija što u konačnici dovodi do apopotoze, odnosno smanjenog broja spermija u uzorcima sperme.

Poznato je da ROS koji nastaje kao posljedica izloženosti tkivu /stanica RF-EMZ-u može prouzročiti oštećenje bjelančevina odnosno ionskih kanala u membranama stanica uzrokujući tako propusnost membrana te posljedično tome smanjenje i prestanak funkcija stanica (RAHAL i sur., 2014.). Također, budući da apopotozu i vitalnost stanice karakterizira propusnost membrane, reproduktivni potencijal spermija pod utjecajem oksidativnog stresa može se odrediti na temelju propusnosti membrana (PILANE i LA BELLE, 2004.). Pokazatelji vitalnosti u ovom istraživanju nakon što su uzorci sperme bili izloženi RF-EMZ-u procjenjivani su pomoću mitohondrijskog potencijala te propusnosti stanične membrane i oštećenja DNK-a spermija nerasta. U ovom istraživanju, iako je zabilježen porast udjela spermija s oštećenom membranom i/ili slabim potencijalom mitohondrija u svim ozračenim uzorcima, razlika u odnosu na kontrolne uzorke nije bila statistički značajna. Jedino je utvrđen značajno veći udio spermija s oštećenom membranom i dobrim potencijalom mitohondrija u uzorcima ozračenima s 3500 MHz. Mogući razlog takvim rezultatima je u svojstvima primijenjenog razrjeđivača koji čuva membrane spermija ili možda vrijeme izloženosti uzoraka od 2 sata RF-EMZ-u ne uzrokuje takva oštećenja spermija nerasta. Rezultate dobivene na uzorcima sperme ozračenima s 3500 MHz nije moguće usporediti jer je ovo prvo istraživanje prema našem saznanju koje istražuje učinke prethodno navedene frekvenciju na uzorcima sperme životinja.

6.3. POKAZATELJI ANTIOKSIDACIJSKOG STATUSA

Elektromagnetsko polje koje zrače različiti uređaji, (mobilni telefoni i mikrovalne pećnice) osim što dovodi do prekomjernog stvaranja ROS-a, također može prouzročiti promjenu aktivnost antioksidacijskih enzima (MOSKOVTSEV i sur., 2007.). Primjerice, u istraživanju kojeg su proveli MOUSTAFA i sur. (2001.) utvrđeno je smanjenje aktivnosti antioksidacijskih enzima superoksid dismutaze i glutation peroksidaze u eritrocitima ljudi izloženih RF-EMZ-u. U ovom istraživanju vrijednosti pokazatelja antioksidacijskog statusa spermija nerasta nisu se statistički značajno razlikovale u ozračenim i neozračenim uzorcima sperme. Dobiveni rezultati razlikuju se od rezultata koje su dobili AGARWAL i sur. (2009.) prilikom zračenja uzoraka sperme muškaraca. U njihovom istraživanju, nakon zračenja uzorka sperme frekvencijom od 850 MHz tijekom 60 minuta, došlo je do porasta u stvaranju ROS-a te smanjenja ukupnog oksidativnog statusa spermija u uzorku sperme odnosno disbalansa oksidacijskog statusa. Slične su rezultate dobili AGARWAL i sur. (2009.) te LIU i sur. (2015.) u *in vivo* studiji nakon zračenja štakora 2 sata/dan tijekom 50 dana. Navedeni autori su utvrdili da uslijed izlaganja zračenju dolazi do pada ukupnog oksidativnog statusa za 28 % te porasta ROS-a. Postoje mnogobrojna istraživanja koja potvrđuju da uslijed djelovanja RF-EMZ-a na različita tkiva/stanice dolazi do prekomjernog stvaranja ROS-a čija koncentracija prelazi antioksidacijski kapacitet stanice. Neka od istraživanja koje potvrđuju prethodno navedeno su: izlaganje cijelog tijela *Drosophila* (MANTA i sur., 2014.), zračenje fibroblasta miševa (HOU i sur., 2015.), zračenje kulture tumorskih stanica (KAHYA i sur., 2014.) te zračenje spermija sisavaca (KESARI i sur., 2011.). Razlozi zašto u ovom istraživanju nisu dobiveni slični rezultati, odnosno statistički značajne razlike u vrijednostima istraživanih pokazatelja antioksidacijske zaštite između pokusne i kontrolne skupine, vjerojatno leže u razrjeđivaču koji je dodan u uzorak sperme. Razrjeđivač je morao biti dodan u svježi uzorak sperme nerasta kako bi spermiji preživjeli transport i vrijeme zračenja, odnosno kako ne bi došlo do metaboličkih promjena spermija koje bi promijenile pH sperme. Promjena vrijednosti pH sperme posljedično bi utjecala na sve promatrane pokazatelje što bi se zasigurno dogodilo u slučaju nedostatka istog. U ovom istraživanju korišten je komercijalni razrjeđivač Cronos (Medi-Nova, Reggio Emilia, Italija). Točan sastav svih razrjeđivača dostupnih na tržištu je zaštićen te nije moguće dobiti uvid u točan sastav. Glavna funkcija razrijeđivača je

povećanje volumena sperme te očuvanje kvalitete sjemena, odnosno očuvanje integriteta akrosoma i membrane spermija. Razrjeđivači sadržavaju elektrolite, neelektrolite i aditive koji poboljšavaju njihove biološke karakteristike (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.). Primjerice, pretpostavku da se u sastavu komercijalnog Cronos razrijeđivača nalaze aditivi koji imaju antioksidacijska svojstva možemo potvrditi istraživanjem koje su proveli SZCZEŚNIAK-FABIAŃCZYK i sur. (2003.). Oni su dodavali L-cistein hidroklorid u komercijalni razrijeđivač drugog proizvođača te su došli do zaključka da upravo ta kombinacija najbolje djeluje na preživljavanje spermija, njihovu gibljivost i oksidativni status.

U ovom istraživanju aktivnost glutation peroksidaze nije bila mjerljiva u uzorcima ozračenih i neozračenih spermija. Naime, poznato je da spermiji nerasta imaju vrlo oskudan enzimski antioksidacijski zaštitni sustav za razliku od spermija drugih vrsta, te ga čine velika aktivnost SOD-a i mala aktivnost GSH-Px-a. Štoviše u istraživanju kojeg su proveli KOZIOROWSKA-GILUN i sur., (2011a.) aktivnost katalaze nije bila također mjerljiva u spermijima nerasta. Prema prethodni navedenome, dobiveni rezultati ovoga istraživanja vezano uz aktivnost GSH-Px-a u spermijima potvrđuju poznate činjenice. Nadalje, aktivnost antioksidacijskih enzima i koncentracija TAS-a u spermijima nerasta razlikuje se između pasmina i hibrida nerasta (ŽURA ŽAJA i sur. 2016.) te vrijednosti pojedinih antioksidacijskih pokazatelja u sjemenu nerasta ovise i o godišnjem dobu uzorkovanja uzorka sperme (KOZIOROWSKA-GILUN i sur., 2011b.) što može biti također jedan u razloga zašto aktivnost GSH-Px nije bila mjerljiva u ovome istraživanju.

7. ZAKLJUČCI

Rezultati istraživanja učinka radiofrekvencijskog elektromagnetskog zračenja na pokazatelje gibljivosti i brzine spermija, antioksidacijskog statusa i oštećenje DNK-a *in vitro* ozračenoga sjemena rasplodnih nerasta omogućuju sljedeće zaključke glede kakvoće sjemena nerasta:

1. Elektromagnetsko zračenje ima negativan učinak na pokazatelje gibljivosti i brzine spermija.
2. Negativni učinak elektromagnetskog zračenja na pokazatelje gibljivosti i brzine spermija ovisi o frekvenciji zračenja jer je najnegativniji učinak imalo elektromagnetsko zračenje frekvencije od 2500 MHz te 700 MHz, a najmanji negativni učinak zabilježen je u uzorcima ozračenim s 3500 MHz.
3. Elektromagnetsko zračenje značajno povećava udio spermija s oštećenom DNK *in vitro* ozračenoga sjemena rasplodnih nerasta.
4. Udio spermija s oštećenom DNK ovisi o frekvenciji zračenja te je najveći porast zabilježen je u uzorcima ozračenima s 2500 MHz, dok je najmanji porast zabilježen u uzorcima ozračenima s 3500 MHz i 700 MHz.
5. Elektromagnetsko zračenje ima negativni učinak na udio spermija s intaktnom membranom i dobrim potencijalom, no razlika u odnosu na neozračene uzorke nije bila statistički značajna.
6. Zaštitna uloga razrijeđivača je najvjerojatnije dovela do toga da nema promjena u vrijednostima pokazatelja antioksidacijskog statusa spermija *in vitro* ozračenoga sjemena rasplodnih nerasta.
7. Uzorci sperme s najvećim udjelom oštećenja DNK-a ozračenih spermija nerasta su u negativnom korelacijskom odnosu s pokazateljima brzine spermija (VAP, VCL, ALH, BCF, STR i LIN) što ukazuje da je za gibljivost najbitnija vitalnost spermija.

8. POPIS LITERATURE

AARABI, M., H. BALAKIER, S. BASHAR, S. I. MOSKOVTSEV, P. SUTOVSKY, C. L. LIBRACH, R. OKO (2014): Sperm-derived WW domain-binding protein, PAWP, elicits calcium oscillations and oocyte activation in humans and mice. FASEB J. 28, 4434 – 4440.

https://doi.org/10.1096/fj.14-256495

AGARWAL, A., F. DEEPINDER, R. K. SHARMA, G. RANGA, J. LI (2008): Effect of cell phone usage on semen analysis in men attending infertility clinic: an observational study. Fertil. Steril. 89, 124 – 128.

https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2007.01.166

AGARWAL, A., N. R. DESAI, K. MAKKER, A. VARGHESE, R. MOURADI, E. SABANEGH, R. SHARMA (2009): Effects of radiofrequency electromagnetic waves (RF-EMW) from cellular phones on human ejaculated semen: an *in vitro* pilot study. Fertil. Steril. 92, 1318 – 1325.

https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2008.08.022

AGARWAL, A., A. SINGH, A. HAMADA, K. KESARI (2011): Cell phones and male infertility: a review of recent innovations in technology and consequences. Int. Braz. J. Urol. 37, 432 – 454.

https://doi.org/10.1590/s1677-55382011000400002

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.

https://dx.doi.org/10.5534%2Fwjmh.2014.32.1.1

AGNIHOTRI, S. K.; A. K. AGRAWAL, B. A. HAKIM, A. VISHWAKARMA, T. NARENDER, R. SACHAN, M. SACHDEV (2016): Mitochondrial membrane potential (MMP) regulates sperm motility. Vitr. Cell. Dev. Biol. Anim. 52, 953 – 960.

AHMADI A., N. G. SOON-CHYE (1999): Fertilizing ability of DNA damaged spermatozoa. J. Exp. Zool. 284, 696 – 704.

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.

https://doi.org/10.1016/0891-5849(96)00119-0

ALAHMAR, A.T. (2019): Role of Oxidative Stress in Male Infertility: An Updated Review. J. Hum. Reprod. Sci. 12, 4 – 18.

https://dx.doi.org/10.4103%2Fjhrs.JHRS_150_18

ALTHOUSE, G. C., M. E. WILSON, C. KUSTER, M. PARSLEY (1998): Characterization of lower temperature storage limitations of fresh-extended porcine semen. Theriogenology 50, 535 – 543.

https://doi.org/10.1016/s0093-691x(98)00159-9

ALTUN, G., Ö. G. DENIZ, K. K. YURT, D. DAVIS, S. KAPLAN (2018): Effects of mobile phone exposure on metabolomics in the male and female reproductive systems. Environ. Res. 167, 700 – 707.

https://doi.org/10.1016/j.envres.2018.02.031

AL-AKHRAS, M. A., A. ELBETIEHA, M. K. HASAN, I. AL-OMARI, H. DARMANI, B. ALBISS (2001): Effects of extremely low frequency magnetic field on fertility of adult male and female rats. Bioelectromagnetics 22, 340 – 344.

https://doi.org/10.1002/bem.59

AL-BAYYARI, N. (2017): The effect of cell phone usage on semen quality and fertility among Jordanian males. Middle East Fertil. Soc. J. 22, 178 – 182.

https://doi.org/10.1016/j.mefs.2017.03.006

AM-IN, N., R. N. KIRKWOOD, M. TECHAKUMPHU, W. TANTASUPARUK (2011): Lipid profiles of sperm and seminal plasma from boars having normal or low sperm motility. Theriogenology 75, 897 – 903. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.10.032

ANEAS, S. B., B. G. GARY, B. P. BOUVIER (2008): Collectis automated boar collection technology. Theriogenology 70, 1368 – 1373. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.07.011

APRIOKU, J. S. (2013): Pharmacology of Free Radicals and the Impact of Reactive Oxygen Species on the Testis. J. Reprod. Infertil. 14, 158 – 172.

ARSENAKIS, I., R. APPELTANT, S. SARRAZIN, T. RIJSSELAERE, A. VAN SOOM, D. MAES (2015): Relationship between carcass quality characteristics and semen quality in Pietrain boars. Reprod. Domest. Anim. 50, 121.

http://hdl.handle.net/1854/LU-6983902

ATIG, F., M. RAFFA, H. B. ALI, K. ABDELHAMID, A. SAAD, M. AJINA (2012): Altered antioxidant status and increased lipid per-oxidation in seminal plasma of tunisian infertile men. Int. J. Biol. Sci. 8, 139 – 149.

https://doi.org/10.7150/ijbs.8.139

AVENDAÑO, C., A. MATA, C. A. SANCHEZ SARMIENTO, G. F. DONCEL (2012): Use of laptop computers connected to internet through Wi-Fi decreases human sperm motility and increases sperm DNA fragmentation. Fertil. Steril. 97, 39 – 45.

https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2011.10.012

AWANABERNABO,TI, S. M., J. B. INGIN, S. R. JEEVANGI, G. A. PATIL, B. S. AWANTI (2010): The effect of radiofrequency radiation emitted from mobile phones on plasma oxidants and antioxidants in mobile phone users. J. Clini. Diag. Res. 4, 2758 – 2761.

AWDA, B. J., M. MACKENZIE-BELL, M. M. BUHR (2009): Reactive oxygen species and boar sperm function. Biol. Reprod. 81, 553 - 561.

AYAD, B. M. (2018): Basic semen parameters assisted by Computer-Aided sperm analysis (CASA) and their correlations with advanced semen parameters in normozoospermic men with different abstinence periods. Doktorska disertacija, Sveučilište u Stellenbosch, Južnoafrička Republika.

BALMORI, A. (2005): Possible effects of electromagnetic fields from phone masts on a population of White stork (Ciconia ciconia). Electromagn. Biol. Med. 24, 109 – 119.

https://doi.org/10.1080/15368370500205472

BALMORI, A. (2010): Mobile phone masts effects on common frog (Rana temporaria) tadpoles: the city turned into a laboratory. Electromagn. Biol. Med. 29, 31 – 35.

https://doi.org/10.3109/15368371003685363

BANASZEWSKA, D., K. ANDRASZEK, B. BIESIADA-DRZAZGA (2015): Evaluation of sperm chromatin structure in boar semen. Bull. Vet. Inst. Pulawy. 59, 271 – 277.

https://doi.org/10.1515/bvip-2015-0040

BARBAGALLO, F.; S. L. VIGNERA, R. CANNARELLA, A. AVERSA, A. E. CALOGERO, R. A. CONDORELLI (2020): Evaluation of sperm mitochondrial function: A key organelle for sperm motility. J. Clin. Med. 9, 363.

https://doi.org/10.3390/jcm9020363

BARRANCO, I., M. D. ORTEGA, M. J. MARTINEZ-ALBORCIA, J. M. VAZQUEZ, E. A. MARTINEZ, J. ROCA (2013): Season of ejaculate collection influences the freezability of boar spermatozoa. Cryobiology 67, 299 – 304.

https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2013.09.001

BARRANCO, I., A. TVARIJONAVICIUTE, C. PEREZ-PATIÑO, I. PARRILLA, J. J. CERON, E. A. MARTINEZ, H. RODRIGUEZ-MARTINEZ, J. ROCA (2015): High total antioxidant capacity of the porcine seminal plasma (SP-TAC) relates to sperm survival and fertility. Sci. Rep. 5, 1 – 9.

https://doi.org/10.1038/srep18538

BARRANCO, I., A. TVARIJONAVICIUTE, C. PÉREZ-PATIÑO, A. VICENTE-CARRILLO, I. PARRILLA, J. J. CERON, E. A. MARTINEZ, H. RODRIGUEZ-MARTINEZ, J. ROCA (2016): Glutathione peroxidase 5 is expressed by the entire pig male genital tract and once in the seminal plasma contributes to sperm survival and in vivo fertility. PLoS One 11, 1 – 17.

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0162958

BARRANCO, I., L. PADILLA, A. TVARIJONAVICIUTE, I. PARRILLA, E. A.MARTINEZ, H. RODRIGUEZ-MARTINEZ, M. YESTE, J. ROCA (2019.): Levels of activity of superoxide dismutase in seminal plasma do not predict fertility of pig AI semen doses. Theriogenology 140, 18 – 24.

https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.08.010

BENEDETTI, S., M. C. TAGLIAMONTE, S. CATALANI, M. PRIMITERRA, F. CANESTRARI, S. DE STEFANI, S. PALINI, C. BULLETTI (2012): Differences in blood and semen oxidative status in fertile and infertile men, and their relationship with sperm quality. Reprod. Biomed. Online 25, 300 – 306.

https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2012.05.011

BERNABO, N., E. TETTAMANTI, M. G. PISTILLI, D. NARDINOCCHI, P. BERARDINELLI, M. MATTIOLI, B. BARBONI (2007): Effects of 50 Hz extremely low frequency magnetic field on the morphology and function of boar spermatozoa capacitated *in vitro*. Theriogenology 67, 801 – 815.

https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.10.014

BEN ABDALLAH, F., I. DAMMAK, H. ATTIA, B. HENTATI, L. AMMAR-KESKES (2009): Lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in infertile men: correlation with semen parameter. J. Clin. Lab. Anal. 23, 99 – 104.

https://doi.org/10.1002/jcla.20297

BOE-HANSEN, G. B., P. CHRISTENSEN, D. VIBJERG, M. B. NIELSEN, A. M. HEDEBOE (2008): Sperm chromatin structure integrity in liquid stored boar semen and its relationships with field fertility. Theriogenology 69, 728 – 736. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.12.004

BROEKHUIJSE, M. L. W. J., E. ŠOŠTARIĆ, H. FEITSMA, B. M. GADELLA (2011): Application of computer-assisted semen analysis to explain variations in pig fertility. J. Anim. Sci. 90, 779 – 789.

https://doi.org/10.2527/jas.2011-4311

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

https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.11.020

CAI, Z. (2005): Lipid Peroxidation. In: Encyclopedia of Toxicology. (Wexler, P.), Saunders Elsevier, St. Louis, str. 730 – 734.

https://doi.org/10.1016/B0-12-369400-0/00564-0

CAMUS, A., S. CAMUGLI, C. LÉVÊQUE, E. SCHMITT, C. STAUB (2011): Is photometry an accurate and reliable method to assess boar semen concentration? Theriogenology 75, 577 – 583.

https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.09.025

CARDIS, E., I. DELTOUR, M. VRIJHEID (2010): Brain tumour risk in relation to mobile telephone use: results of the INTERPHONE. Int. J. Epidemiol. 39, 675-694.

https://doi.org/10.1093/ije/dyq079

CASAS, I., S. SANCHO, M. BRIZ, E. PINART, E. BUSSALLEU, M. YESTE, S. BONET (2009): Freezability prediction of boar ejaculates assessed by functional sperm parameters and sperm proteins. Theriogenology 72, 930 – 948. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.07.001

CASTELLANO, C. A., I. AUDET, J. L. BAILEY, J. P. LAFOREST, J. J. MATTE (2010): Dietary omega-3 fatty acids (fish oils) have limited effects on boar semen stored at 17 degrees C or cryopreserved. Theriogenology 74, 1482 – 1490.

https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.06.020

CATALÁ, A. (2006): An overview of lipid peroxidation with emphasis in outer segmentsof photoreceptors and the chemiluminescence assay. Int. J. Biochem. Cell B. 38, 1482 – 1495.

https://doi.org/10.1016/j.biocel.2006.02.010

CERGOLJ, M., M. SAMARDŽIJA (2006): Veterinarska andrologija. Veterinarski fakultet, Zagreb, str. 15 – 103.

CHANDRA, A., G. M. MARTINEZ, W. D. MOSHER, J. C. ABMA, J. JONES (2005): Fertility, family planning, and reproductive health of U.S. women: data from the 2002 National Survey of Family Growth. Vital. Health. Stat. 23, 1 – 160.

CHO, C. L., A. AGARWAL (2018): Role of sperm DNA fragmentation in male factor infertility: A systematic review. Arab J. Urol. 16, 21 – 34.

https://doi.org/10.1016/j.aju.2017.11.002

CHRISTENSEN, P., J. P. STENVANG, W. L. GODFREY (2004): A flow cytometric method for rapid determination of sperm concentration and viability in mammalian and avian semen. J. Androl. 25, 255 – 264.

https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.2004.tb02786.x

COSCI, I., E. MORETTI, G. COLLODEL (2008): Lipid peroxidation in human spermatozoa from men with genitourinary infections. Syst. Biol. Reprod. Med. 54, 75 – 83.

https://doi.org/10.1080/19396360801947722

COSTA, D. S., F. J. FARIA, C. A. FERNANDES, J. C. SILVA, S. A. AUHAREK (2013): Testis morphometry and kinetics of spermatogenesis in the feral pig (Sus scrofa). Anim. Reprod. Sci. 142, 63 – 70.

https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2013.09.007

CRNEK-KUNSTELJ, V. (2003): Temeljni genetički mehanizmi. Medicinska biologija. Zagreb. Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu; 51 – 94.

ČVORIŠĆEC, D., I. ČEPELAK (2009): Slobodni radikali i antioksidansi. In: Štrausova medicinska biokemija. (ČVORIŠĆEC, D., I. ČEPELAK), MEDICINSKA NAKLADA, Zagreb, str. 638 – 648.

DAS, P., A. R. CHOUDHARI, A. K. SINGH, R. SINGH (2009): Correlation among routine semen parameters, sperm viability and malondialdehyde levels in human subjects with different fertility potential. Indian J. Physiol. Pharmacol. 53, 253 – 258.

DAS, T. K., V. MANI, S. DE, D. BANERJEE, A. MUKHERJEE, S. POLLEY, N. KEWALRAMANI, H. KAUR (2012): Effect of vitamin E supplementation on mRNA

expression of superoxide dismutase and interleukin-2 in arsenic exposed goat leukocytes. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 89, 1133 – 1137.

https://doi.org/10.1007/s00128-012-0825-2

DAS, K., A. ROYCHOUDHURY (2014): Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. Front. Environ. Sci. 2, 53.

http://dx.doi.org/10.3389/fenvs.2014.00053

DAVOUDI, M., C. BRÖSSNER, W. KUBER (2002): The influence of electromagnetic waves on sperm motility. J. Urol. Urogynakologie. 9, 18 – 22.

DE IULIIS, G. N., R. J. NEWEY, B. V. KING, R. J. AITKEN (2009): Mobile Phone Radiation Induces Reactive Oxygen Species Production and DNA Damage in Human Spermatozoa *In Vitro*. PLoS One 4, 1 – 9.

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006446

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

https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.09.018

DE PAUW, I. (2003): Bovine semen preservation under epididymal conditions and assessment of sperm quality by means of a sperm-oviduct binding assay. Doktorka disertacija, Sveučilište u Ghentu, Nizozemska.

DIEM, E., C. SCHWARZA, F. ADLKOFERB O. JAHNA, H. RÜDIGERA (2005): Non-thermal DNA breakage by mobile-phone radiation (1800 MHz) in human fibroblasts and in transformed GFSH-R17 rat granulosa cells *in vitro*. Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen. 583, 178 – 183.

https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2005.03.006

DOROSTGHOAL, M., S. R. KAZEMINEJAD, N. SHAHBAZIAN, M. POURMEHDI, A. JABBARI (2017): Oxidative stress status and sperm DNA fragmentation in fertile and infertile men. Andrologia. 49, 1 – 9.

doi.org/10.1111/and.12762

DYSART, N. E. (2014): Effect of birth weight and human socialization on reproductive behaviors, sperm production, semen quality, and fertility of AI boars. Doktorska disertacija, Sveučilište Sjeverna Karolina, Raleigh, Sjeverna Karolina.

EROGUL, O., E. OZTAS, I. YILDIRIM, T. KIR, E. AYDUR, G. KOMESLI, H. CEM IRKILATA, M. KEMAL IRMAK, A. F. PEKERCA (2006): Effects of Electromagnetic Radiation from a Cellular Phone on Human Sperm Motility: An *In Vitro* Study. Arch. Med. Res. 37, 840 – 843.

http://dx.doi.org/10.1016/j.arcmed.2006.05.003

EVANS, D. A., P. R. SYALIMA, R. RASEEK (2017): Mobile phone radiation induces sedation in Periplaneta americana. Curr. Sci. 113, 2275 – 2281.

http://dx.doi.org/10.18520/cs/v113/i12/2275-2281

EVENSON D. P., J. E. PARKS, M. T. KAPROTH, L. K. JOST (1993): Rapid determination of sperm cell concentration in bovine semen by flow cytometry. J. Dairy. Sci. 76, 86 – 84.

FALZONE, N., C. HUYSER, P. BECKER, D. LESZCZYNSKI, D. R. FRANKEN (2011): The Effect of Pulsed 900-MHz GSM Mobile Phone Radiation on the Acrosome Reaction, Head Morphometry and Zona Binding of Human Spermatozoa. Int. J. Androl. 34, 20 – 26.

https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2010.01054.x

FEJES, I., Z. ZÁVACZKI, J. SZÖLLOSI, S. KOLOSZÁR, J. DARU, L. KOVÁCS, A. PÁL (2005): Is there a relationship between cell phone use and semen quality? Arch. Androl. 51, 385 – 393.

https://doi.org/10.1080/014850190924520

FRACZEK, M., A. SZUMALA-KAKOL, P. JEDRZEJCZAK, M. KAMIENICZNA, M. KURPISZ (2007): Bacteria trigger oxygen radical release and sperm lipid peroxidation in *in vitro* model of semen inflammation. Fertil. Steril. 88, 1076 – 1085.

https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2006.12.025

FRANÇA, L. R., V. A. SILVA, H. CHIARINI-GARCIA, S. K. GARCIA, L. DEBELJUK (2000): Cell proliferation and hormonal changes during postnatal development of the testis in the pig. Biol. Reprod. 63, 1629 – 1636.

doi.org/10.1095/biolreprod63.6.1629

FRANÇA, L. R., G. F. AVELAR, F. F. L. ALMEIDA (2005**):** Spermatogenesis and sperm transit through the epididymis in mammals with emphasis on pigs. Theriogenology 63, 300 – 318.

doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.09.014

FRANÇA, L. R., R. A. HESS, J. M. DUFOUR, M. C. HOFMANN, M. D. GRISWOLD (2016): The Sertoli cell: One hundred fifty years of beauty and plasticity. Andrology 4, 189 – 212.

doi.org/10.1111/andr.12165

FRUNZĂ, I., H. CERNESCU, G. KORODI (2008): Physical and chemical parameters of boar sperm. Medicină Veterinară 41, 634 – 640.

GALLO, A., M. C. ESPOSITO, E. TOSTI, R. BONI (2021): Sperm Motility, Oxidative Status, and Mitochondrial Activity: Exploring Correlation in Different Species. Antioxidants.10, 1131 – 1142.

https://doi.org/10.3390/antiox10071131

GARNER, D. L., C. A. THOMAS, H. W. JOERG, J. M. DEJARNETTE, C. E. MARSHALL (1997): Fluorometric assessments of mitochondrial function and viability in cryopreserved bovine spermatozoa. Biol. Reprod. 57, 1401 – 1406. https://doi.org/10.1095/biolreprod57.6.1401

GARRIDO, N., M. MESEGUERM, J. ALVAREZ, C. SIMON, A. PELLICER, J. REMOHI (2004): Relationship among standard semen parameters, glutathione peroxidase/glutathione reductase activity, and mRNA expression and reduced glutathione content in ejaculated spermatozoa from fertile and infertile men. Fertil. Steril. 82, 1059 – 1066.

https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2004.04.033

GHANBARI, M., S. B. MORTAZAVI, A. KHAVANIN, M. KHAZAEI (2013): The Effects of Cell Phone Waves (900 MHz-GSM Band) on Sperm Parameters and Total Antioxidant Capacity in Rats. Int. J. Fertil. Steril. 7, 21 – 28.

GIL, M. C., M. GARCÍA-HERREROS, F. J. BARÓN, I. M. APARICIO, A. J. SANTOS, L. J. GARCÍA-MARÍN (2009): Morphometry of porcine spermatozoa and its functional significance in relation with the motility parameters in fresh semen. Theriogenology 71, 254 – 263.

https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.07.007

GORPINCHENKO, I., O. NIKITIN, O. BANYRA, A. SHULYAK (2014): The influence of direct mobile phone radiation on sperm quality. Cent. European. J. Urol. 67, 65 – 71.

https://doi.org/10.5173/ceju.2014.01.art14

GYE, M. C., C. J. PARK (2012): Effect of electromagnetic field exposure on the reproductive system. Clin. Exp. Reprod. Med. 39, 1 – 9.

https://dx.doi.org/10.5653%2Fcerm.2012.39.1.1

HALLIWELL, B., J. M. C. GUTTERIDGE (2007): Free radicals in biology and medicine. (HALLIWELL, B., J. M. C. GUTTERIDGE), 4th ed., Oxford University Press, New York.

HALLIWELL, B., J. M. C. GUTTERIDGE (2015): Oxidative stress and redox regulation: adaptation, damage, repair, senescence, and death. In. Free Radicals in Biology and Medicine. Oxford University Press, Oxford, str. 199 – 283.

HANCOCK, J., G. HOVELL (1959): The Collection of Boar Semen. Vet. Rec. Open 71, 664 – 665.

HEYNICK, L. N., J. H. MERRITT (2003): Radiofrequency fields and teratogenesis. Bioelectromagnetics 6, 174 – 186.

https://doi.org/10.1002/bem.10127

HIDALGO, D. M., M. J. BRAGADO, A. R. BATISTA, P. F. OLIVEIRA, M. G. ALVES (2019): Antioxidants and Male Fertility: From Molecular Studies to Clinical Evidence. Antioxidants 8, 89 – 110.

https://doi.org/10.3390/antiox8040089

HOMAN, G. F., M. DAVIES, R. NORMAN (2007): The impact of lifestyle factors on reproductive performance in the general population and those undergoing infertility treatment: a review. Hum. Reprod. Update. 13, 209 – 23.

https://doi.org/10.1093/humupd/dml056

HOU, Q., M. WANG, S. WU, X. MA, G. AN, H. LIU, F. XIE (2015): Oxidative changes and apoptosis induced by 1800-MHz electromagnetic radiation in NIH/3T3 cells. Electromagn. Biol. Med. 34, 85 – 92.

http://dx.doi.org/doi:10.3109/15368378.2014.900507

HOUSTON, B. J., B. NIXON, B. V. KING, G. N. DE IULIIS, R. J. AITKEN (2016): The effects of radiofrequency electromagnetic radiation on sperm function. Reproduction 152, 236 – 276.

https://doi.org/10.1530/REP-16-0126

HSIEH, Y. Y., C. C. CHANG, C. S. LIN (2006): Seminal malondialdehyde concentration but not glutathione peroxidase activity is negatively correlated with seminal concentration and motility. Int. J. Biol. Sci. 2, 23 – 29.

https://dx.doi.org/10.7150%2Fijbs.2.23

HUO, L. J., X. H. MA, Z. M. YANG (2002): Assessment of sperm viability, mitochondrial activity, capacitation and acrosome intactness in extended boar semen during long-term storage. Theriogenology 58, 1349 – 1360.

https://doi.org/10.1016/s0093-691x(02)00953-6

IARC (2021): Agents classified by the IARC monographs. Dostupno na: http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/index.php [1. srpnja 2021. godine]

IBRAHEIM, M. H., Z. K. KHATER (2013): The Effect of Electromagnetic Field on Water and Fish Clarias Garpienus, Zagazig, Egypt. Life. Sci. J. 10, 3310 – 3324.

JELEZARSKY L., C. VAISBERG, T. CHAUSHEV, E. SAPUNDJIEV (2008): Localization and characterization of glutathione peroxidase (GPx) in boar accessory sex

glands, seminal plasma, and spermatozoa and activity of GPx in boar semen. Theriogenology 69, 139 – 145.

https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.08.016

JOHNSON, L. A., K. F. WEITZE, P. FISER, W. M. MAXWELL (2000): Storage of boar semen. Anim. Reprod Sci. 62, 143 – 172.

doi.org/10.1016/S0378-4320(00).

JONWAL, C., R. SISODIA, V. K. SAXENA, K. K. KESARI (2018): Effect of 2.45 GHz microwave radiation on the fertility pattern in male mice. Gen. Physiol. Biophys. 37, 453 – 460.

JUYENA, N. S., C. STELLETTA (2012): Seminal plasma: an essential attribute to spermatozoa. J. Androl. 33, 536 – 551.

https://doi.org/10.2164/jandrol.110.012583

KAHYA, M. C., M. NAZIROGLU, B. CIG (2014): Selenium reduces mobile phone (900 MHz)-induced oxidative stress, mitochondrial function, and apoptosis in breast cancer cells. Biol. Trace Elem. Res. 160, 285 – 293.

http://dx.doi.org/doi:10.1007/s12011-014-0032-6

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. 296, 1570 – 1578.

https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2002.02809.x

KANEKO, N., K. ITOH, A. SUGIYAMA, Y. IZUMI (2011): Microminipig, a non-rodent experimental animal optimized for life science research: Preface. J. Pharmacol. Sci. 115, 112-114.

https://doi.org/10.1254/jphs.10r16fm

KENNEDY, C. E., K. B. KRIEGER, M. SUTOVSKY, W. XU, P. VARGOVIC, B. A. DIDION, M. R. ELLERSIECK, M. E. HENNESSY, J. VERSTEGEN, R. OKO, P.

SUTOVSKY (2014): Protein expression pattern of PAWP in bull spermatozoa is associated with sperm quality and fertility following artificial insemination. Mol. Reprod. Dev. 81, 436 – 449.

https://doi.org/10.1002/mrd.22309

KESARI, K. K., S. KUMAR, J. BEHARI (2010): Mobile phone usage and male infertility in Wistar rats. Indian. J. Exp. Biol. 48, 987 – 992.

KESARI, K. K., K. SANJAY, B. JITENDRA (2011): Effects of Radiofrequency Electromagnetic Wave Exposure From Cellular Phones on the Reproductive Pattern in Male Wistar Rats. Appl. Biochem. Biotechnol. 164, 546 – 559.

http://dx.doi.org/10.1007/s12010-010-9156-0

KESARI, K. K., J. BEHARI (2012): Evidence for mobile phone radiation exposure effects on reproductive pattern of male rats: role of ROS. Electromagn. Biol. Med. 31, 213 – 222.

https://doi.org/10.3109/15368378.2012.700292

KESARI, K. K., A. AGARWAL, R. HENKEL (2018): Radiations and male fertility. Reprod. Biol. Endocrinol. 16, 118.

https://doi.org/10.1186/s12958-018-0431-1

KHALIFA, T., C. REKKAS, F. SAMARTZI, A. LYMBEROPOULOS, K. KOUSENIDIS, T. DOVENSKI (2013): Highlights on artificial insemination (AI) technology in the pigs. Mac. Vet. Rev. 37, 5 – 34.

http://dx.doi.org/10.14432/j.macvetrev.2013.09.001

KHOSRAVI, F., M. R. VALOJERDI, M. AMANLOU, L. KARIMIAN., F. ABOLHASSANI (2014): Relationship of seminal reactive nitrogen and oxygen species and total antioxidant capacity with sperm DNA fragmentation in infertile couples with normal and abnormal sperm parameters. Andrologia 46, 17 – 23.

https://doi.org/10.1111/and.12034

KILGALLON, S. J., L. W. SIMMONS (2005): Image content influences men's semen quality. Biol Lett. 22, 253 – 255.

https://doi.org/10.1098/rsbl.2005.0324

KIM, S., Y. J. LEE, Y. J. KIM (2011): Changes in sperm membrane and ROS following cryopreservation of liquid boar semen stored at 15 °C. Anim. Reprod. Sci. 124, 118 – 124.

https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2011.01.014

KIM, Y.W., H. S. KIM, J. S. LEE, Y. J. KIM, S. K. LEE, J. N. SEO, K. C. JUNG, N. KIM, Y. M. GIMM (2009): Effects of 60 Hz 14 microT magnetic field on the apoptosis of testicular germ cell in mice. Bioelectromagnetics 30, 66 – 72.

https://doi.org/10.1002/bem.20448

KIVRAK, E. G. ,K. K. YURT, A. A. KAPLAN, I. ALKAN, G. ALTUN (2017): Effects of electromagnetic fields exposure on the antioxidant defense system. J. Microsc. Ultrastruct. 5, 167 – 176.

https://dx.doi.org/10.1016%2Fj.jmau.2017.07.003

KNOX, R. V. (2003): The Anatomy & Physiology of Sperm Production in Boars. Dostupno na: http://www.ansci.wisc.edu/jjp1/pig_case/html/library/boara&p.pdf [1. lipnja 2021. godine]

KO, J. C., L. E. EVANS, G. C. ALTHOUSE (1989): Toxicity effects of latex gloves on boar spermatozoa. Theriogenology 31, 1159 – 1164.

https://doi.org/10.1016/0093-691X(89)90084-8

KOHEN, R., A. NYSKA (2002): Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. Toxicol. Pathol. 30, 620 – 650.

KOLENC, D. (2010): Imunohistokemijska koekspresija 4-hidroksinonenala i prominina-1 u glijalnim tumorima mozga. Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, Hrvatska.

KOMMISRUD, E., H. PAULENZ, E. SEHESTED, I. S. GREVLE (2002): Influence of boar and semen parameters on motility and acrosome integrity in liquid boar semen stored for five days. Acta. Vet. Scand. 43, 49 – 55.

https://doi.org/10.1186/1751-0147-43-49

KONIG, H. E., H. G. LIEBICH (2009): Anatomija domaćih sisavaca. Naklada Slap, Zagreb, str. 417 – 435.

KOZARIĆ, Z. (1998): Spolni sustav. U: Veterinarska histologija (Bošnjak, M., ur.). Naklada Karolina. Zagreb, str. 195 – 211.

KOZIOROWSKA-GILUN, M., M. KOZIOROWSKI, L. FRASER, J. STRZEZEK (2011a): Antioxidant defence system of boar cauda epididymidal spermatozoa and reproductive tract fluids. Reprod. Domest. Anim. 46, 527 – 533.

KOZIOROWSKA-GILUN, M., M. KOZIOROWSKI, J. STRZEŻEK, L. FRASER (2011b): Seasonal changes in antioxidant defence systems in seminal plasma and fluids of the boar reproductive tract. Reprod. Biol. 11, 37 – 47.

KUMAR, S., K. K. KESARI, J. BEHARI (2011): The therapeutic effect of a pulsed electromagnetic field on the reproductive patterns of male Wistar rats exposed to a 2.45-GHz microwave field. Clin. (Sao Paulo). 66, 1237 – 1245.

https://doi.org/10.1590/s1807-59322011000700020

KUMAR, S., J. P. NIRALA, J. BEHARI, R. PAULRAJ (2014): Effect of electromagnetic irradiation produced by 3G mobile phone on male rat reproductive system in a simulated scenario. Indian. J. Exp. Biol. 52, 890 – 897.

KUMAR, P., M. SAINI, D. KUMAR, A. BHARADWAJ, P. S. YADAV (2017): Estimation of endogenous levels of osteopontin, total antioxidant capacity and malondialdehyde in seminal plasma: 20 Application for fertility assessment in buffalo (Bubalus bubalis) bulls. Reprod. Domest. Anim. 52, 221 – 226.

https://doi.org/10.1111/rda.12882

KUMARESAN, A., G. KADIRVEL, K. M. BUJARBARUAH, R. K. BARDOLOI, D. ANUBRATA, K. SATISH, S. NASKAR (2009): Preservation of boar semen at 18 ◦C

induces lipid peroxidation and apoptosis like changes in spermatozoa. Anim. Reprod. Sci. 110, 162 – 171.

https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2008.01.006

KUNAVONGKRIT, A., P. CHANTARAPRATEEP, P. PRATEEP (1988): Study on boar infertilities: epididymal dysfunction. Acta Vet. Scand. Suppl. 83, 128 – 132.

LAFONT, O. (2007): Life and death of free radicals. Rev. Hist. Pharm. 54, 475 – 478.

LANDIS, G. N., J. TOWER (2005): Superoxide dismutase evolution and life span regulation. Mech. Ageing Dev. 126, 365 – 379.

https://doi.org/10.1016/j.mad.2004.08.012

LANGER, C. E., P. LLOBET, A. DALMAU (2017): Patterns of Cellular Phone Use Among Young People in 12 Countries: Implications for RF Exposure. Environ Int. 107, 65 – 74.

https://doi.org/10.1016/j.envint.2017.06.002

LEE, J. S., S. S. AHN, K. C. JUNG, Y. W. KIM, S. K. LEE (2004): Effects of 60 Hz electromagnetic field exposure on testicular germ cell apoptosis in mice. Asian. J. Androl. 6, 29 – 34.

LEE, S. H., C. K. PARK (2015): Effect of magnetized extender on sperm membrane integrity and development of oocytes *in vitro* fertilized with liquid storage boar semen. Anim. Reprod. Sci. 154, 86 – 94.

https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2014.12.015

LI, D. K., B. YAN, Z. LI, E. GAO, M. MIAO, D. GONG, X. WENG, J. R. FERBER, W. YUAN (2010): Exposure to magnetic fields and the risk of poor sperm quality. Reprod. Toxicol. 29, 86 – 92.

https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2009.09.004

LI, J., I. BARRANCO, A. TVARIJONAVICIUTE, F. M. MOLINA, E. A. MARTINEZ, H. RODRIGUEZ-MARTINEZ, I. PARRILLA, J. ROCA (2017): Seminal plasma

antioxidants are directly involved in boar sperm cryotolerance. Theriogenology 107, 27 – 35.

http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.10.035

LIU, Q., T. SI, X. XU, F. LIANG, L. WANG, S. PAN (2015): Electromagnetic radiation at 900 MHz induces sperm apoptosis through bcl-2, bax and caspase-3 signaling pathways in rats. Reprod. Health 12, 1 – 9.

http://dx.doi.org/doi:10.1186/s12978-015-0062-3

LÓPEZ, A., T. RIJSSELAERE, A. VAN SOOM, J. L. M. R. LEROY, J. B. P. DE CLERCQ, P. E. J. BOLS, D. MAES (2010): Effect of Organic Selenium in the Diet on Sperm Quality of Boars. Reprod. Domest. Anim. 45, 297 – 305.

https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2009.01560.x

LÓPEZ - RODRÍGUEZ, A., T. RIJSSELAERE, P. VYT, A. VAN SOOM, D. MAES (2012): Effect of dilution temperature on boar semen quality. Reprod. Domest. Anim. 47, 63 – 66.

https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2011.01938.x

LÓPEZ - RODRÍGUEZ, A., T. RIJSSELAERE, J. BEEK, P. VYT, A. VAN SOOM, D. MAES (2013): Boar seminal plasma components and their relation with semen quality. Syst. Biol. Reprod. Med. 59, 5 – 12.

https://doi.org/10.3109/19396368.2012.725120

LÓPEZ - RODRIGUEZ, A., A. VAN SOOM, I. ARSENAKIS, D. MAES (2017): Boar management and semen handling factors affect the quality of boar extended semen. Porc. Health Manag. 3, 1 – 12.

https://doi.org/10.1186/s40813-017-0062-5

LOVERCAMP, K. W., T. J. SAFRANSKI, K. A. FISCHER, G. MANANDHAR, M. SUTOVSKY, W. HERRING, P. SUTOVSKY (2007): Arachidonate 15-lipoxygenase and ubiquitin as fertility markers in boars. Theriogenology 67, 704 – 718. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.08.019

LOVERCAMP, K. W., K. R. STEWART, X. LIN, W. L. FLOWERS (2013): Effect of dietary selenium on boar sperm quality. Anim. Reprod. Sci. 138, 268 – 275.

https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2013.02.016

LUKAC, N., P. MASSANYI, S. ROYCHOUDHURY, M. CAPCAROVA, E. TVRDA, Z. KNAZICKA, A. KOLESAROVA, J. DANKO (2011): *In vitro* effects of radiofrequency electromagnetic waves on bovine spermatozoa motility. J. Environ. Sci. Health. A. Tox. Hazard. Subst. Environ. Eng. 46, 1417-1423.

LUO, Y., X. WANG, Y. CHEN, S. XU, G. DING, C. SHI (2013): Effects of electromagnetic radiation on morphology and TGF-β3 expression in mouse testicular tissue. Toxicology 9, 8 – 14.

https://doi.org/10.1016/j.tox.2013.05.004

MAILANKOT, M., A. P. KUNNATH, H. JAYALEKSHMI, B. KODURU, R. VALSALAN (2009): Radio frequency electromagnetic radiation (RF-EMR) from GSM (0.9/1.8GHz) mobile phones induces oxidative stress and reduces sperm motility in rats. Clinics. 64, 561 – 565.

https://doi.org/10.1590/s1807-59322009000600011

MALARIĆ, K., J. BARTOLIĆ, R. MALARIĆ (2005): Immunity measurments of TV and FM/AM receiver in GTEM-cell. MEAS. 38, 219 – 229.

MANELLA, M., R. JONES (1980): Properties of spermatozoal superoxide dismutase and lack of involvement of superoxides in metal-ion-catalysed lipid peroxidation reactions in semen. Biochem. 191, 289 – 297.

https://dx.doi.org/10.1042%2Fbj1910289

MANTA, A. K., D. J. STRAVOPODIS, I. S. PAPASSIDERI, L. H. MARGARITIS (2014): Reactive oxygen species elevation and recovery in Drosophila bodies and ovaries following short-term and long-term exposure to DECT base EMF. Electromagn. Biol. Med. 33, 118 – 131.

http://dx.doi.org/doi:10.3109/15368378.2013.791991

MARIN, S., K. CHIANG, S. BASSILIAN, W. N. LEE, L. G. BOROS, J. M. FERNANDEZ-NOVELL, J. J. CENTELLES, A. MEDRANO, J. E. RODRIGUEZ-GIL, M. CASCANTE (2003): Metabolic strategy of boar spermatozoa revealed by a metabolomic characterization. FEBS J. 554, 342 – 346.

http://dx.doi.org/10.1016/S0014-5793(03)01185-2

MARIN-GUZMAN, J., D. C. MAHAN, Y. K. CHUNG, J. L. PATE, W. F. POPE (1997): Effects of dietary selenium and vitamin E on boar performance and tissue responses, semen quality, and subsequent fertilization rates in mature gilts. J. Anim. Sci. 75, 2994 – 3003.

https://doi.org/10.2527/1997.75112994x

MARKS, J. M. (2021): Definition of Antioxidant – RxList. Dostupno na: https://www.rxlist.com/antioxidant/definition.htm [15. lipnja 2021. godine]

MARTINEZ, P., F. PROVERBIO, M. I. CAMEJO (2007): Sperm lipid peroxidation and pro-inflammatory cytokines. Asian J. Androl. 9, 102 – 107.

https://doi.org/10.1111/j.1745-7262.2007.00238.x

MARTINS, S., A. DE ANDRADE, F. ZAFFALON, L. PARAZZI, F. BRESSAN, S. PUGINE, M.P. MELOD, M.R. CHIARATTIE, C.T. MARINOB, E.R. AFONSOB, A.S. MORETTIB, R.P. ARRUDAA (2014): Organic selenium increases PHGPx, but does not affect quality sperm in raw boar semen. Livest. Sci. 164, 175 – 178.

https://doi.org/10.1111/and.12226

McCORD, J. M., I. FRIDOVICH (1969): Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). J. Biol. Chem. 244, 6049 – 6055.

MCGLONE J. J., E. O. AVILES-ROSA, C. ARCHER, M. M. WILSON, K. D. JONES, E. M. MATTHEWS, A. A. GONZALEZ, E. REYES (2020): Understanding Sow Sexual Behavior and the Application of the Boar Pheromone to Stimulate Sow Reproduction. In: Animal Reproduction in Veterinary Medicine. (Aral, F., R. Payan-Carreira, M. Quaresma), IntechOpen. Dostupno na: https://www.intechopen.com/chapters/71105 [3. lipnja 2021. godine]

http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.90774

MEENA, R., K. KUMARI, J. KUMAR, P. RAJAMANI, H. N. VERMA, K. K. KESARI (2013): Therapeutic approaches of melatonin in microwave radiations-induced oxidative stress-mediated toxicity on male fertility pattern of Wistar rats. Electromagn. Biol. Med. 33, 81–91.

https://doi.org/10.3109/15368378.2013.781035

MENDEZ, M. F. B., M. G. ZANGERONIMO, L. G. P. ROCHA, B. G. FARIA, B. A. PEREIRA, C. D. FERNANDES, B. R. CHAVES, L. D. S. MURGAS, R. V. SOUSA (2012): Effect of the addition of IGF-I and vitamin E to stored boar semen. Anim. 7, 793 – 798.

https://doi.org/10.1017/s1751731112002285

MILEUSNIĆ, E. (2006): Izloženost ljudi elektromagnetskim poljima. Energija 55, 550-577.

MONTJEAN, D., Y. MÉNÉZO, M. BENKHALIFA, M. COHEN, S. BELLOC, P. COHEN-BACRIE, J. DE MOUZON (2010): Malonaldehyde formation and DNA fragmentation: two independent sperm decays linked to reactive oxygen species. Zygote 18, 265 – 268.

https://doi.org/10.1017/s0967199409990311

MORETTI, E., I. COSCI, A. SPREAFICO, T. SERCHI, A. M. CUPPONE, G. COLLODEL (2009): Semen characteristics and inflammatory mediators in infertile men with different clinical diagnoses. Int. J. Androl. 32, 637 – 646.

https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2008.00911.x

MORRELL, J. M., M. WALLGREN (2011): Removal of bacteria from boar ejaculates by Single Layer Centrifugation can reduce the use of antibiotics in semen extenders. Anim. Reprod. Sci. 123, 64 – 69.

https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2010.11.005

MORTAZAVI, S. M. J., A. R. TAVASSOLI, F. RANJBARI, P. MOAMMAIEE (2010): Effects of laptop computers electromagnetic field on sperm quality. J. Reprod. Infertil. 11, 251 – 258.

MOSKOVTSEV, S.I., J. WILLIS, J. WHITE, J.B. MULLEN (2007): Leukocytospermia: relationship to sperm deoxyribonucleic acid integrity in patients evaluated for male factor infertility.Fertil. Steril. 88, 737 – 740.

MOUSTAFA, Y. M., R. M. MOUSTAFA, A. BELACY, S. H. ABOU-EL-ELA, F. M. ALI (2001): Effects of acute exposure to the radiofrequency fields of cellular phones on plasma lipid peroxide and antioxidase activities in human erythrocytes. J. Pharm. Biomed. Anal. 26, 605 – 608.

MRUK, D. D., C. Y. CHENG (2015): The mammalian blood-testis barrier: Its biology and regulation. Endocr. Rev. 36, 564 – 591.

doi.org/10.1210/er.2014-1101

MURAWSKI, M., J. SACZKO, A. MARCINKOWSKA, A. CHWIŁKOWSKA, M. GRYBOŚ, T. BANAŚ (2010): Evaluation of superoxide dismutase activity and its impact on semen quality parameters of infertile men. Folia. Histochem. Cytobiol. 45, 123 – 126.

N.A.S.A. (2010): An introduction to the electromagnetic spectrum. Science@NASA. Dostupno na: https://science.nasa.gov/ems/01_intro [25. lipnja 2021. godine]

NAZIROĞLU, M., N. GÜMRAL (2009): Modulator effects of L-carnitine and selenium on wireless devices (2.45 GHz)-induced oxidative stress and electroencephalography records in brain of rat. Int. J. Radiat. Biol. 85, 680 – 699.

https://doi.org/10.1080/09553000903009530

NOAKES, D. E., T. J. PARKINSON, G. C. W. ENGLAND (2019): Veterinary Reproduction and Obstetrics. 10th ed., Elsevier, Edinburgh, London, New york, Oxford, Philadelphia, St. Louis, Sydney, Toronto, str. 35 – 54.

NOVAK, S., A. RUIZ-SÁNCHEZ, W. T. DIXON, G. R. FOXCROFT, M. K. DYCK (2010): Seminal plasma proteins as potential markers of relative fertility in boars. J. Androl. 31, 188 – 200.

https://doi.org/10.2164/jandrol.109.007583

OCHSENDORF, F. R. (1999): Infections in the male genital tract and reactive oxygen species. Hum. Reprod. 5, 399 – 420.

OKAMURA, N., Y. IWAKI, S. HIRAMOTO, M. TAMBA, S. BANNAI, Y. SUGITA, P. SYNTIN, F. DACHEUX, J. L. DACHEUX (1997): Molecular cloning and characterization of the epididymis-specific glutathione peroxidase-like protein secreted in the porcine epididymal fluid. Biochim. Biophys. Acta. 19, 99 – 109.

https://doi.org/10.1016/s0304-4165(97)00016-0

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. Dev. 55, 326 – 334.

https://doi.org/10.1002/(sici)1098-2795(200003)55:3%3C326::aid-mrd11%3E3.0.co;2-a

ONI, O. M., D. B. AMUDA, C. E. GILBERT (2011): Effects of radiofrequency radiation from wifi devices on human ejaculated semen. IJRRAS 9, 292 – 294.

ORZOLEK, A., P. WYSOCKI, J. STRZEŻEK, W. KORDAN (2013): Superoxide dismutase (SOD) in boar spermatozoa: Purification, biochemical properties and changes in activity during semen storage (16 °C) in different extenders. Reprod. Biol. 13, 34 – 40.

http://dx.doi.org/10.1016/j.repbio.2013.01.176

PAHUNE, P. P., A. R. CHOUDHARI, P. A. MULEY (2013): The total antioxidant power of semen and its correlation with the fertility potential of human male subjects. J. Clin. Diagn. Res. 7, 991 – 995.

https://doi.org/10.7860/jcdr/2013/4974.3040

PANAGOPOULOS, D. J., A. KARABARBOUNIS, L. H. MARGARITIS (2002): Mechanism for action of electromagnetic fileds on cells. Biocehm. Biophys. Res. Commun. 298, 95 – 102.

https://doi.org/10.1016/s0006-291x(02)02393-8

PANNER SELVAM, M. K., A. AGARWAL (2018): A systematic review on sperm DNA fragmentation in male factor infertility: Laboratory assessment. Arab J. Urol. 16, 65 – 76.

https://doi.org/10.1016/j.aju.2017.12.001

PARRILLA, I., E. A. MARTINEZ, M. A. GIL, C. CUELLO, J. ROCA, H. RODRIGUEZ-MARTINEZ, C. A. MARTINEZ (2020): Boar seminal plasma: current insights on its potential role for assisted reproductive technologies in swine. Thematic Section: 36th Annual Meeting of the Association of Embryo Technology in Europe (AETE). Anim. Reprod. 17.

doi.org/10.1590/1984-3143-AR2020-0022

PARRISH, J. J., K. L. WILLENBURG, K. M. GIBBS, K. B. YAGODA, M. M. KRAUTKRAMER, T. M. LOETHER, F. C.S.A. MELO (2017): Scrotal insulation and sperm production in the boar. Mol. Reprod. Dev. 84, 969 – 978.

doi.org/10.1002/mrd.22841

PEREIRA, B. A., L. G. P. ROCHA, M. C. TELES, W. E. SILVA, J. A. BARBOSA, S. S. RABELO, A. S. UCHOA, J. E. RODRIGUEZ-GIL, L. J. PEREIRA, M. G. ZANGERONIMO (2019.): Addition of chlorogenic acid and caffeine during the processing of cooled boar semen. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 71, 489 – 499.

https://doi.org/10.1590/1678-4162-10415

PETLEVSKI, R., D. JURETIĆ, M. HADŽIJA, M. SLIJEPČEVIĆ, J. LUKAČ-BAJALO (2006): Koncentracija malondialdehida u NOD miševa tretiranih akarbozom. Biochem. Med. 16, 43 – 49.

PETRUJKIC, B., D. ŠEFER, I. JOVANOVIĆ, M. JOVIČIN, S. JANKOVIĆ, G. JAKOVLJEVIĆ, R. C. BEIER, R. C. ANDERSON (2014): Effects of commercial selenium products on glutathione peroxidase activity and semen quality in stud boars. Anim. Feed. Sci. Technol. 197, 194 – 205.

PETRUNKINA, A. M., J. FRIEDRICH, W. DROMMER, G. BICKER, D. WABERSKI, E. TÖPFER-PETERSEN (2001): Kinetic characterization of the changes in protein

tyrosine phosphorylation of membranes, cytosolic Ca2+ concentration and viability in boar sperm populations selected by binding to oviductal epithelial cells. Reproduction 122, 469 – 480.

https://doi.org/10.1530/rep.0.1220469

PETRUNKINA, A. M., G. VOLKER, K. F. WEITZE, M. BEYERBACH, E. TOPFER-PETERSEN, D. WABERSKI (2005): Detection of cooling-induced membrane changes in the response of boar sperm to capacitating conditions. Theriogenology. 63, 2278 – 2299.

https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.10.008

PETRUNKINA, A. M., R. A. HARRISON (2013): Fluorescence technologies for evaluating male gamete (dys)function. Reprod. Domest. Anim. 48, 11 – 24. https://doi.org/10.1111/rda.12202

PHAM-HUY, L. A., H. HE, C. PHAM-HUY (2008): Free radicals, antioxidants in disease and health. Int. J. Biomed. Sci. 4, 89 – 96.

PILANE, C. M., E. F. LA BELLE (2004): No Induced Apoptosis of Vascular Smooth Muscle Cells Accompanied by Ce-ramide Increase. J. Cell. Physiol. 199, 310 – 315.

https://doi.org/10.1002/jcp.10464

PIPAN, M. Z., J. MRKUN, M. KOSEC, A. NEMEC SVETE, P. ZRIMŠEK (2014): Superoxide Dismutase: A Predicting Factor for Boar Semen Characteristics for Short-Term Preservation. Biomed. Res. Int. 2014.

doi.org/10.1155%2F2014%2F105280

PIPAN, M. Z., J. MRKUN, B. J. STRAJN, K. P. VRTAČ, J. KOS, A. PIŠLAR, P. ZRIMŠEK (2017): The influence of macro- and microelements in seminal plasma on diluted boar sperm quality. Acta Vet. Scand. 59, 11.

https://doi.org/10.1186/s13028-017-0279-y

PLESSIS, S. S. D., K. MAKKER, N. R. DESAI, A. AGARWAL (2008): Impact of oxidative stress on IVF. Ob. Gyn. 3, 539 – 554.

POLJAK, D. (2006): Izloženost ljudi neionizacijskom zračenju. Kigen, Zagreb.

POPLAŠEN, D., V. BRUMEN, D. BUĆAN (2015): Djelovanje elektromagnetskog zračenja na ljudski organizam. Sigurnost 57, 371 – 374.

PURDY, P. H. (2008): Ubiquitination and its influence in boar sperm physiology and cryopreservation. Theriogenology 70, 818 – 826.

https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.05.044

PURSEL, V. G., L. A. JOHNSON, G. B. RAMPACEK (1972): Acrosome morphology of boar spermatozoa incubated before cold shock. J. Anim. Sci. 34, 278 – 283.

https://doi.org/10.2527/jas1972.342278x

RADOMIL, L., M. J. PETTITT, K. M. MERKIES, K. D. HICKEY, M. M. BUHR (2011): Stress and dietary factors modify boar sperm for processing. Reprod. Domest. Anim. 46, 39 – 44.

https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2011.01865.x

RAHAL, A., A. KUMAR, V. SINGH, B. YADAV, R. TIWARI, S. CHAKRABORTY, K. DHAMA (2014): Oxidative Stress, Prooxidants, and Antioxidants: The Interplay. Biomed Res. Int. 2014, 1 – 19.

http://dx.doi.org/10.1155/2014/761264

RAVANAT, J. C., T. DOUKI, J. CADET (2001): Direct and indirect effects of UV radiation on DNA and its components. J. Photochem. Photobiol. 63, 88 – 102.
https://doi.org/10.1016/s1011-1344(01)00206-8

RENGAN, A. K., A. AGARWAL, M. VAN DER LINDE, S. S. DU PLESSIS (2012): An investigation of excess residual cytoplasm in human spermatozoa and its distinction from the cytoplasm droplet. Reprod. Biol. Endocrinol. 10, 92.

https://doi.org/10.1186/1477-7827-10-92

ROCA, J., M. J. RODRÍGUEZ, M. A. GIL, G. CARVAJAL, E. M. GARCIA, C. CUELLO, J. M. VAZQUEZ, E. A. MARTINEZ (2005): Survival and *in vitro* fertility of

boar spermatozoa frozen in the presence of superoxide dismutase and/or catalase. J. Androl. 26, 15 − 24.

http://dx.doi.org/10.1002/j.1939-4640.2005.tb02867.xPMid:15611562

ROCA, J., C. PÉREZ-PATIÑO, I. BARRANCO, L. C. PADILLA, E. A. MARTINEZ, H. RODRIGUEZ-MARTINEZ, I. PARRILLA (2020): Proteomics in fresh and preserved pig semen: recent achievements and future challenges. Theriogenology 150, 41 – 47. doi.org/10.1016/j.theriogenolo

RODRÍGUEZ-GIL, J. E. (2013): Energy management of mature mammalian spermatozoa. In: Success in artificial insemination: quality of semen and diagnostics employed (Lemma, A.) IntechOpen. Dostupno na: https://www.intechopen.com/chapters/38559 [20. lipnja 2021. godine.]

http://dx.doi.org/10.5772/51711

RODRIGUEZ-MARTINEZ, H., U. KVIST, F. SARAVIA, M. WALLGREN, A. JOHANNISSON, L. SANZ, F. J. PEÑA, E. A. MARTINEZ, J. ROCA, J. M. VAZQUEZ, J. J. CALVETE (2009): The physiological roles of the boar ejaculate. In: Control of pig reproduction VIII. (Rodriguez-Martinez H., Vallet J. L., Ziecik A. J.), Nottingham University Press, Nottingham, str. 1 – 21 .

RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H., U. KVIST, J. ERNERUDH, L. SANZ, J. J. CALVETE (2011): Seminal plasma proteins: what role do they play? Am. J. Reprod. Immunol. 66, 11 – 22.

https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.2011.01033.x

ROOKE, J. A., C. C. SHAO, B. K. SPEAKE (2001): Effects of feeding tuna oil on the lipid composition of pig spermatozoa and *in vitro* characteristics of semen. Reprod. 121, 315–22.

https://doi.org/10.1530/rep.0.1210315

RÖÖSLI, M. (2008): Radiofrequency electromagnetic field exposure and non-specific symptoms of ill health: A systematic review. Environ. Res. 107, 277 – 287.

https://doi.org/10.1016/j.envres.2008.02.003

ROS-SANTAELLA, J. L., E. PINTUS (2021): Plant extracts as Alternative Additives for Sperm Preservation. Antioxidants 10, 772.

https://doi.org/10.3390/antiox10050772

ROZEBOOM, K. J. (2000): Evaluating Boar Semen Quality. North Carolina Coop. Ext. Swine Husb. ANS00812S Dostupno na: https://projects.ncsu.edu/project/swine_extension/publications/factsheets/812s.htm [10. lipnja 2021. godine]

RYBAR, F., L. FALDIKOVA, M. FALDYNA, M. MACHATKOVA, J. RUBES (2004): Bull and boar sperm DNA integrity evaluated by sperm chromatin structure assay in the Czech Republic. Vet. Med. Czech. 49, 1 – 8.

SAEFL (2005): Electrosmog in the enviroment. Swiss Agency for the Enviroment, Forests and Landscape, Bern, Switzerland.

SAID, T. M., A. AGARWAL, R. K. SHARMA, E. MASCHA, S. C. SIKKA, A. J. THOMAS (2004): Human sperm superoxide anion generation and correlation with semen quality in patients with male infertility. Fertil. Steril. 82, 871 – 877.

https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2004.02.132

SAILER B. L., L. K. JOST, D. P. EVENSON (1995): Mammalian sperm DNA susceptibility to in situ denaturation associated with the presence of DNA strand breaks as measured by the terminal deoxynukleotidyl transferase assay. J. Androl. 16, 80 – 87.

SALEH, R. A., A. AGARWAL, E. A. NADA, M. H. EL-TONSY, R. K. SHARMA, A. MEYER, D. R. NELSON, A. J. THOMAS (2003): Negative effects of increased sperm DNA damage in relation to seminal oxidative stress in men with idiopathic and male factor infertility. Fertil. Steril. 79, 597 – 605.

https://doi.org/10.1016/s0015-0282(03)00337-6

SCHMIDT, H., G. KAMP (2004): Induced hyperactivity in boar spermatozoa and its evaluation by computer-assisted analysis. Reprod. 128, 171 – 179.

https://doi.org/10.1530/rep.1.00153

SCHULTE, R. T., D. A. OHL, M. SIGMAN, G. D. SMITH (2010): Sperm DNA damage in male infertility: etiologies, assays, and outcomes. J. Assist. Reprod. Genet. 27, 3 – 12.

https://doi.org/10.1007/s10815-009-9359-x

SCHULZE, M., H. HENNING, K. RUDIGER, U. WALLNER, D. WABERSKI (2013): Temperature management during semen processing: impact on boar sperm quality under laboratory and field conditions. Theriogenology 80, 990 – 998.

https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.07.026

SCHULZE, M., C. AMMON, K. RUDIGER, M. JUNG, M. GROBBEL (2015): Analysis of hygienic critical control points in boar semen production. Theriogenology 83, 430 – 437.

https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.10.004

SENGER, P. L. (2005): Pathways to pregnancy and parturition. Current Conceptions Inc., Pullman, 2nd ed., WA, SAD, str. 80 – 100.

SILVA, P. F. N., B. GADELLA (2006): Detection of damage in mammalian sperm cells. Theriogenology 65, 958 – 978.

http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.09.010

SHAMSI, M. B., S. VENKATESH, R. KUMAR, N. P. GUPTA, N. MALHOTRA, N. SINGH, S. MITTAL, S. ARORA, D. S. ARYA, P. TALWAR, R. K. SHARMA, R. DADA (2010): Antioxidant levels in blood and seminal plasma and their impact on sperm parameters in infertile men. Indian J. Biochem. Biophys 47, 38 – 43.

SHARMA, R. K., A. AGARWAL (1996): Role of reactive oxygen species in male infertility. Urology. 48, 835 – 850.

https://doi.org/10.1016/s0090-4295(96)00313-5

SHINDE, A., J. GANU, P. NAIK (2012): Effect of free radicals & antioxidants on oxidative stress. J. Dent. Allied Sci. 1, 63 – 66.

http://dx.doi.org/10.4103/2277-4696.159144

SOMEDA, C. G. (2006): Electromagnetic Waves. 2nd ed., Champan & Hall, London, Weinheim, New York, Tokyo, Melbourne, Madras, str. 1 – 30.

SONG, G. J., E. P. NORKUS., V. LEWIS (2006): Relationship between seminal ascorbic acid and sperm DNA integrity in infertile men. Int. J. Androl. 29, 569 – 575.

https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2006.00700.x

STEWART, K., B. BELESTRA, W. L. FLOWERS (2017): Collection gloves can impair semen quality. NationalHogFarmer. Dostupno na: https://www.nationalhogfarmer.com/animal-health/collection-gloves-can-impair-semen-quality [30. svibnja 2021. godine.]

STRZEZEK, J., S. LAPKIEWICZ, M. LECEWICZ (1999): A note on antioxidant capacity of boar seminal plasma. Anim. Sci. Pap. Rep. 17, 181 – 188.

STRZEŻEK, J. (2002): Secretory activity of boar seminal vesicle glands. Reprod. Biol. 2, 243 – 266.

SUAREZ, S. S., A. A. PACEY (2006): Sperm transport in the female reproductive tract. Hum. Reprod. Update. 12, 23 – 37.

https://doi.org/10.1093/humupd/dmi047

SUTOVSKY, P., K. LOVERCAMP (2010): Molecular markers of sperm quality. Soc. Reprod. Fertil. Suppl. 67, 247 – 256.

https://doi.org/10.7313/upo9781907284991.021

SUTOVSKY, P., C. E. KENNEDY (2013): Biomarker-based nanotechnology for the improvement of reproductive performance in beef and dairy cattle. Ind. Biotechnol. 9, 24 – 30.

https://doi.org/10.1089/ind.2012.0035

SUTOVSKY, P. (2015): New Approaches to Boar Semen Evaluation, Processing and Improvement. Reprod. Domest. Anim. 50, 11 – 19.

https://doi.org/10.1111/rda.12554

SZCZEŚNIAK-FABIAŃCZYK, B., M. BOCHENEK, Z. SMORAG, F. RYSZKA (2003): Effect of antioxidants added to boar semen extender on the semen survival time and sperm chromatin structure. Reprod. Biol. 3, 81 – 87.

ŠTEFAN, L., T. TEPŠIĆ, T. ZAVIDIĆ, M. URUKALO, D. TOTA, R. DOMITROVIĆ (2007): Lipidna peroksidacija - uzroci i posljedice. Medicina 43, 84 – 93.

ŠVERKO, A. (2011): Povezanost pojavnosti i proširenosti bubrežnog karcinoma i tkivne ekspresije citokroma P450. Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, Hrvatska.

TAVILANI, H., M. DOOSTI, H. SAEIDI (2005): Malondialdehyde levels in sperm and seminal plasma of asthenozoospermic and its relationship with semen parameters. Clin. Chim. Acta. 356, 199 – 203.

https://doi.org/10.1016/j.cccn.2005.01.017

TAVILANI, H., M. T. GOODARZI, M. DOOSTI, A. VAISI-RAYGANI, T. HASSANZADEH, S. SALIMI, H. R. JOSHAGHANI (2008): Relationship between seminal antioxidant enzymes and the phospholipid and fatty acid composition of spermatozoa. Reprod. Biomed. Online 16, 649 – 656.

https://doi.org/10.1016/s1472-6483(10)60478-6

TAWADROUS, G. A., A. A. AZIZ, T. MOSTAFA (2013): Seminal soluble fas relationship with oxidative stress in infertile men with varicocele. Urology 82, 820 – 823.

https://doi.org/10.1016/j.urology.2013.06.018

THOMPSON, L. K.,S. D. FLEMING, R. J. AITKEN, G. N. DE LULIIS, J. A. ZIESCHANG, A. M. CLARK (2009): Cryopreserva-tion-Induced Human Sperm DNA damage is predominantly mediated by oxidative stress rather than apoptosis. Hum. Reprod. 24, 2061 – 2070.

https://doi.org/10.1093/humrep/dep214

TKALEC, M., K. MALARIĆ, B. PEVALEK-KOZLINA (2005): Influence of 400, 900, and 1900 MHz electromagnetic fields on *Lemna minor* growth and peroxidase activity. Bioelectromagnetics. 26, 185-193.

https://doi.org/10.1002/bem.20104

TROŠČIĆ, I. (2014): Elektromagnetski smog i učinci na žive sustave. 28. međunarodni elektroinženjerski simpozij. EIS 2014 - Dani Josipa Lončara. Šibenik, Hrvatska.

TURNER, R. M. (2006): Moving to the beat: A review of mammalian sperm motility regulation. Reprod. Fertil. Dev. 18, 25 – 38.

https://doi.org/10.1071/rd05120

VILAGRAN, I., M. YESTE, S. SANCHO, I. CASAS, M. M. RIVERA DEL ALAMO, S. BONET (2014): Relationship of sperm small heat-shock protein 10 and voltage-dependent anion channel 2 with semen freezability in boars. Theriogenology 82, 418 – 426.

https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.04.023

VILAGRAN, I., M. YESTE, S. SANCHO, J. CASTILLO, R. OLIVA, S. BONET (2015): Comparative analysis of boar seminal plasma proteome from different freezability ejaculates and identification of Fibronectin 1 as sperm freezability marker. Andrology 3, 345 – 56.

https://doi.org/10.1111/andr.12009

VILAGRAN, I., M. CASTILLO-MARTÍN, N. PRIETO-MARTÍNEZ, S. BONET, M. YESTE (2016.): Triosephosphate isomerase (TPI) and epididymal secretory glutathione peroxidase (GPX5) are markers for boar sperm quality. Anim. Reprod. Sci. 165, 22 – 30.

https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2015.12.001

VYT, P. (2007): Examination and storage of liquid boar semen. Doktorska disertacija, Faculty of Veterinary Medicine, Merelbeke, Belgija.

VYT, P., D. MAES, S. U. SYS, T. RIJSSELAERE, A. VAN SOOM (2007): Air contact influences the pH of extended porcine semen. Reprod. Domest. Anim. 42, 218 – 220.

WANG, Y., Y. JIA, M. YUCHI, M. DING (2011): The Computer-assisted Sperm Analysis (CASA) Technique for sperm Morphology Evaluation; Proceedings of 2011 International Conference on Intelligent Computation and Bio-Medical Instrumentation, 14 – 17 Pros, Wuhan, Kina, str. 279 – 282.

http://dx.doi.org/10.1109/ICBMI.2011.21

WARD, W. S., D. S. COFFEY (1991): DNA packaging and organization in mammalian spermatozoa: comparison with somatic cells. Biol. Reprod. 44, 569 – 574.

WDOWIAK, A., S. BAKALCZUK, G. BAKALCZUK (2015): Decreased activity of superoxide dismutase in the seminal plasma of infertile men correlates with increased sperm deoxyribonucleic acid fragmentation during the first hours after sperm donation. Andrology 3, 748 – 755.

https://doi.org/10.1111/andr.12061

WEN, Q., C. Y. CHENG, Y. X. LIU (2016): Development, function and fate of fetal Leydig cells. Semin. Cell Dev. Biol. 59, 89 – 98.

doi.org/10.1016%2Fj.semcdb.2016.03.003

WERNERSSON, R., M. H. SCHIERUP, F. G. JØRGENSEN, J. GORODKIN, F. PANITZ, H. H. STÆRFELDT, O. F. CHRISTENSEN, T. MAILUND, H. HORNSHOJ, A. KLEIN, J. WANG, B. LIU, S. HU, W. DONG, W. LI, G. K. S. WONG, J. YU, C. BENDIXEN, M. FREDHOLM, S. BRUNAK, H. YANG, L. BOLUND (2005): Pigs in sequence space: a 0.66X coverage pig genome survey based on shotgun sequencing. BMX Genomics. 6, 1 – 7.

https://doi.org/10.1186/1471-2164-6-70

WETTEMANN, R. P., M. E. WELLS, I. T. OMTVEDT, C. E. POPE, E. J. TURMAN (1976): Influence of elevated ambient temperature on reproductive performance of boars. J. Anim. Sci. 42, 664 – 669.

https://doi.org/10.2527/jas1976.423664x

WILLIAMS K., J. FRAYNE, L. HALL (1998): Expression of extracellular glutathione peroxidase type 5 (GPX5) in the rat male reproductive tract. Mol. Hum. Reprod. 4(9), 841 – 848.

https://doi.org/10.1093/molehr/4.9.841

WOLF, J., J. SMITAL (2009): Quantification of factors affecting semen traits in artificial insemination boars from animal model analyses. J. Anim. Sci. 87, 1620 – 1627.

https://doi.org/10.2527/jas.2008-1373

XU, S., Z. ZHOU, L. ZHANG, Z. YU, W. ZHANG, Y. WANG, X. WANG, M. LI, Y. CHEN, C. CHEN, M. HE, G. ZHANG, M. ZHONG (2010): Exposure to 1800 MHz radiofrequency radiation induces oxidative damage to mitochondrial DNA in primary cultured neurons. Brain. Res. 1311, 189 – 196.

https://psycnet.apa.org/doi/10.1016/j.brainres.2009.10.062

YADAV, S. B., A. N. SURYAKAR, A. D. HUDDEDAR, P. P. DURGAWALE, P. S. SHUKLA (2006): Antioxidant treatment a new therapeutic approach to reversible male infertility. Biomed. Res. 17, 175 - 178.

YAN, J. G., M. AGRESTI, T. BRUCE, Y. H. YAN, A. GRANLUND, H. S. MATLOUB (2007): Effects of cellular phone emissions on sperm motility in rats. Fertil. Steril. 88, 957 – 964.

doi.org/10.1016/j.fertnstert.2006.12.022

YASTE OLIVER, M. (2008): New insights into boar sperm function and survival from integrated field and laboratory studies. PhD Thesis. University de Girona, Girona, Spain.

YESTE, M., J. E. RODRÍGUEZ-GIL, S. BONET (2017): Artificial insemination with frozen-thawed boar sperm. Mol. Reprod. Dev. 84, 802 – 813.

https://doi.org/10.1002/mrd.22840

ZALATA, A., A. Z. EL-SAMANOUDY, D. SHAALAN, Y. EL-BAIOMY, T. MOSTAFA (2015): *In vitro* effect of cell phone radiation on motility, DNA fragmentation and clusterin gene expression in human sperm. Int. J. Fertil. Steril. 9, 129 –136.

https://dx.doi.org/10.22074%2Fijfs.2015.4217

ZHANG, X. G., G. J. YAN, J. Y. HON, Z. Z. SU, G. S. YANG, Q. W. LI, J. H. HU (2015): Effects of bovine serum album on boar sperm quality duringliquid storage at 17°C. Reprod. Domest. Anim. 50, 263 – 269.

doi.org/10.1111/rda.12481

ZHANG, X. G., H. LI, L. WANG, Y. Y. HAO, G. D. LIANG, Y. H. MA, G. S. YANG, J. H. HU (2016.): The effects of different levels of superoxide dismutase in Modena on boar semen quality during liquid preservationat 17°C. Anim. Sci. J. 88, 55 – 62.

doi.org/10.1111/asj.12574

ZINI, A., E. DE LAMIRANDE, C. GAGNON (1995): Low Levels of Nitric Oxide Promote Human Sperm Capacitation *in vitro*. J. Androl. 16,424 – 431.

ZRIBI, N., N. F. CHAKROUN, H. ELLEUCH, F. B. ABDALLAH, A. S. BEN HAMIDA, J. GARGOURI, F. FAKHFAKH, L. A. KESKES (2011): Sperm DNA fragmentation and oxidation are independent of malondialdheyde. Reprod. Biol. Endocrinol. 9, 47.

doi.org/10.1186/1477-7827-9-47

ŽURA ŽAJA, I., M. SAMARDŽIJA, S. VINCE, M. VILIĆ, I. MAJIĆ-BALIĆ, D. ĐURIČIĆ, S. MILINKOVIĆ TUR (2016): Differences in seminal plasma and spermatozoa antioxidative systems and seminal plasma lipid and protein levels among boar breeds and hybrid genetic traits. Anim. Reprod. Sci. 170, 75 – 82.

doi.org/10.1016/j.anireprosci.2016.04.006

ŽURA ŽAJA, I., M. VILIĆ, I. TOMULIĆ, A. SHEK VUGROVEČKI, K. MALARIĆ, P. TUCAK, I. TLAK GAJGER (2021): Učinak radiofrekvencijskog zračenja na ljude i životinje, s posebnim osvrtom na zajednice medonosne pčele (Apis mellifera). Vet. Stanica 52, 347 – 357.

https://doi.org/10.46419/vs.52.3.5

9. POPIS KORIŠTENIH SKRAĆENICA

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

ATP – adenozin trifosfat

Ca - kalcij

CASA – kompjuterski potpomognuta analiza spermija (engl. computer assisted sperm analysis)

ChA – klorogenska kiselina

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

DHA – dokozaheksaenska kiselina

DNK – deoksiribonukleinska kiselina

EM – elektromagnetsko polje

EMR – electromagnetic radiation

EMZ – elektromagnetsko zračenje

FSH – folikulo-stimulirajući hormon

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

GSH-RD - glutation reduktaza (engl. glutathione reductase)

GTEM - gigahercna transverzalna elektromagnetska komora

ICNIRP - International Commission on Non-Ionizing Radiation Protection

IGF-I – inzulinu sličan faktor rasta I

JC-1 - tetraetilbenizimdazolkarbocijanin jodid

LH – luteinizirajući hormon

LIN - indeks linearnosti (engl. linearity)

MDA – malondialdehid (engl. malondialdehyd)

PAWP - sperm postacrosomal WW binding protein

RF – EMZ – radiofrekvencijsko eletromagnetsko zračenje

ROS – reaktivni kisikovi spojevi (engl. reactive oxygen species)

SOD - ukupna superoksid dismutaza (engl. total superoxide dismutase)

STR - pravolinijske indeks (engl. straightness)

TAS - ukupni antioksidacijski status (engl. total antoxidant status)

TBA – tiobarbituratna kiselina (engl. thiobarburic acid)

TBARS - kompleks reaktivnih supstanci tiobarbiturne kiseline (engl. thiobarbituric acid-reactive substances)

TEM - transverzalna elektromagnetska komora

TEP - tetraetoksipropan (engl. tetraethoxypropane)

U.O. – umjetno osjemenjivanje

VAP - prosječna brzina spermija na njegovoj prosječnoj putanji (engl. average path velocity)

VCL - prosječna brzina spermija na njegovoj pravoj putanji (engl. curvilinear velocity)

VSL - prosječna brzina spermija na pravolinijskoj putanji (engl. straight-line velocity)

WOB - indeks oscilacije (engl. wobble)

10. ŽIVOTOPIS

Ivan Butković rođen je 17. lipnja 1989. godine u Slavonskom Brodu u Hrvatskoj. Osnovno i srednjoškolsko obrazovanje je završio u Slavonskom Brodu te 2008. godine upisuje prediplomski integrirani studij veterinarske medicine na Veterinarskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Tijekom studija je obnašao dužnost predsjednika studentske udruge IVSA Croatia u trajanju od tri godine. Studij završava krajem 2015. godine, te je od travnja 2016. godine zaposlen kao asistent na Klinici za porodništvo i reprodukciju na Veterinarskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. 1. ožujka 2017. godine upisuje doktorski studij veterinarske znanosti na Veterinarskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. 13. – 16. studeni 2018. godine sudjeluje na 2. međunarodnom Kongresu o sigurnosti i kvaliteti hrane, Opatija, Hrvatska.11. srpnja 2018. godine nakon završetka tečaja, dobiva Potvrdu o osposobljenosti osoba koje provode pokuse na životinja (kategorija C). 2. ožujka 2019. godine održava predavanje u sklopu Programa osposobljavanja za uzgoj pasa u organizaciji Hrvatskog kinološkog saveza. 10. – 12. ožujka 2019. sudjeluje na 8. međunarodnom kongresu „Veterinarska znanost i struka“. 8. – 13. travnja 2019. godine - sudjelovanje na Festivalu znanosti u Tehničkom muzeju Nikole Tesle. 14. – 17. lipnja 2019. godine – voditelj radionice „Assisted Reproductive Technology, Ovum Pick-Up and *In Vitro* Embryo Production in cattle“ u sklopu 2. međunarodnog seminara za studente veterinarske medicine u organizaciji EVSS. 12. listopad 2019. godine – radionica „Određivanje krvnih grupa i utvrđivanje njihove podudarnosti u pasa i mačaka“; međunarodni kongres „Veterinarska znanost i struka“. 15. – 17. studeni 2019. godine – sudjelovanje na Simpoziju veterinara male prakse Srbije, SASAP. 18. siječnja 2021. godine – pozvano predavanje „Hitna neonatologija“; Međužupanijsko stručno vijeće u Veterinarskoj školi u Zagrebu. 31. siječnja 2020. godine – sudjelovanje u Noći muzeja 2020. godine „Stota obljetnica suživota“ na Veterinarskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. 10. – 15. svibnja 2021. godine – organizacija Prezentacije: Poremećaji razvoja – od fetusa do novorođenčeta.

U sklopu porodništva i reprodukcije, uže područje interesa mu predstavlja neonatalna skrb mladunčadi te kirugija i anestezija malih mesoždera.

POPIS OBJAVLJENIH ZNANSTVENIH RADOVA

Radovi objavljeni u časopisima indeksiranim u WoSCC (*Web of Science Core Collection*), Scopus i Medline bazi

SAMARDŽIJA, M., M. LOJKIĆ, N. MAĆEŠIĆ, H. VALPOTIĆ, **I. BUTKOVIĆ**, J. ŠAVORIĆ, I. ŽURA ŽAJA, D. LEINER, D. ĐURIČIĆ, F. MARKOVIĆ (2020): Reproductive immunology in viviparous mammals: evolutionary paradox of interactions among immune mechanisms and autologous or allogeneic gametes and semiallogeneic foetuses. Vet. Q. 40, 353-383. doi:g/10.1080/01652176.2020.1852336

BUTKOVIĆ, I., S. VINCE, K. MARJANOVIC, I. FOLNOŽIĆ, N. MAĆEŠIĆ, B. ŠPOLJARIĆ, J. ŠAVORIĆ, M. SAMARDŽIJA, M. LOJKIĆ, D. ĐURIČIĆ, G. BAČIĆ, T. KARADJOLE (2020): Laparoscopic ovariectomy in a pygmy goat. Vet. Med. (Praha) 65, 409-414. doi:10.17221/113/2020-VETMED

ŠPOLJARIĆ, B., D. SVOBODA, D. GEREŠ, S. VINCE, D. ŠPOLJARIĆ, M. POPOVIĆ, D. ŽUBČIĆ, **I. BUTKOVIĆ**, J. ŠAVORIĆ, J. GRIZELJ, M. SAMARDŽIJA (2020): Combination of dopamine agonist and prostaglandin administration for pregnancy termination in bitches – a novel approach. J. Appl. Anim. Res. 48, 402-405. doi:10.1080/09712119.2020.1814784

GAMULIN, E., M. SAMARDŽIJA, **I. BUTKOVIĆ**, J. PLEADIN (2018): Biokemijski mehanizmi sinteze spolnih hormona u domaćih sisavaca. Vet. Stanica 49, 425-438.

ĐURIČIĆ, D., R. GELLI, R. TURK, I. FOLNOŽIĆ, J. ŠURAN, D. GRAČNER, H. VALPOTIĆ, **I. BUTKOVIĆ**, M. SAMARDŽIJA (2017): The influence of body condition score on serum metabolite profiles in Boer does before and after parturition. Vet. Arh. 87, 543-556. doi:10.24099/vet.arhiv.160512

Radovi u časopisima indeksiranim u ostalim publikacijama

JOSIPOVIĆ, T., **I. BUTKOVIĆ**, J. GRIZELJ, S. VINCE, B. ŠPOLJARIĆ (2017): Dijagnostika gravidnosti koza. Veterinar: časopis studenata veterinarske medicine Zagreb. 55, 28-33.

PEŠA, R., R. TURK, D. ĐURIČIĆ, I. FOLNOŽIĆ, D. GRAČNER, **I. BUTKOVIĆ**, M. KOVAČIĆ, M. SAMARDŽIJA (2016): Mehanizam nastanka masne jetre tijekom prijelaznog razdoblja u mliječnih krava. Vet. Stanica. 47, 455-464.

Znanstveni i stručni radovi u zbornicima skupova

GRIZELJ, J., B. ŠPOLJARIĆ, **I. BUTKOVIĆ**, F. SANCHEZ DAVILA, N. FONSECA FUENTES, S. VINCE (2017): Reproduktivno upravljanje u kozarstvu. Zbornik predavanja II Međunarodni simpozijum "Zdravstvena zaštita i reprodukcija papkara" 2017. Beograd, Srbija. str. 67-76.

GRIZELJ, J., B. ŠPOLJARIĆ, **I. BUTKOVIĆ**, J. ŠAVORIĆ, S. VINCE (2018): Métodos no hormonales para la sincronización de celos y utilidad de la inseminación artificial en caprino lechero. XLIII CONGRESO NACIONAL Y XIX CONGRESO INTERNACIONAL DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE OVINOTECNIA Y CAPRINOTECNIA. Zaragoza, Španjolska, 2018. str. 211-218.

Sažeci znanstvenih radova objavljenih u zbornicima međunarodnih i domaćih znanstvenih skupova

PROPADALO, T., M. LOJKIĆ, N. PRVANOVIĆ BABIĆ, J. JELEN ORLIĆ, S. VINCE, I. FOLNOŽIĆ, **I. BUTKOVIĆ**, I. GETZ (2019): Breeding soundness examination of young military working dogs. Book of Abstracts 8th International Congress "Veterinary Science and Profession"/ Brkljača Bottegaro, Nika ; Zdolec, Nevijo; Vrbanac, Zoran (ur.). Zagreb: Faculty of Veterinary Medicine, University of Zagreb, 2019. str. 94-94.

MARJANOVIĆ, K., I. BACAN, T. KARADJOLE, N. MAĆEŠIĆ**,** I. FOLNOŽIĆ, J. ŠAVORIĆ, **I. BUTKOVIĆ** (2019): Anaesthesia protocol for laparoscopic ovariectomy in bitch diagnosed with immune- mediated meningoencephalitis. Book of Abstracts 8th International Congress "Veterinary Science and Profession" / Brkljača Bottegaro, Nika ;

Zdolec, Nevijo ; Vrbanac, Zoran (ur.). Zagreb: Faculty of Veterinary Medicine, University of Zagreb, 2019. str. 81-81.

GRIZELJ, J., S. VINCE, **I. BUTKOVIĆ**, J. ŠAVORIĆ, B. ŠPOLJARIĆ (2019): The usage of hormonal serological profiles in advancement of sexual season in goats. Book of Abstracts / Sava, Daciana ; Schroder, Verginica ; Zamfirescu, Stela ; Lepadatu, Anca Cristina ; Mihalcescu, Ana Maria (ur.). Constanta: Romanian Society for Cell Biology, 2019. str. 86 – 86.

SAMARDŽIJA, M., **I. BUTKOVIĆ**, E. GAMULIN, J. PLEADIN (2018): Biochemical mechanisms of sex hormones synthesis in domestic animals. Abstracts of the 2nd International Congress on Food Safety and Quality "Food Life Cycle" / Šostar, Zvonimir; Šikić, Sandra; Krivohlavek, Adela (ur.). Opatija: Arhiv za higijenu rada i toksikologiju, 2018. str. 31-31.

ĐURIČIĆ, D., H. VALPOTIĆ, R. TURK, S. VINCE, J. GRIZELJ, B. ŠPOLJARIĆ, I. ŽURA ŽAJA, I. FOLNOŽIĆ, **I. BUTKOVIĆ**, M. SAMARDŽIJA (2018): Seasonal lambing distribution of the Romanov breed in northwestern Croatia during five consecutive years. Abstract book of the 30th World Buiatics Congress, Sapporo, Japan / Toshihiko, Nakao (ur.). Sapporo: Japanwaw Society of Farm Animal Veterinary Medicine, Japan Veterinary Medical Association, 2018. str. 345-345.

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): Spermatozoa subpopulations in buck based on head and tail morphometric parameters. Book of Abstracts The 7th International Congress „Veterinary Science and Profession" / Vrbanac, Zoran ; Brkljača Bottegaro, Nika ; Zdolec, Nevio (ur.). Zagreb: Faculty of Veterinary Medicine, Universti of Zagreb,, 2017. str. 69-69.

ĐURIČIĆ, D., R. TURK, H. VALPOTIĆ, L. CVETNIĆ, **I. BUTKOVIĆ**, M. SAMARDŽIJA (2017): Influence of body weight on the onset of puberty in Cameroon Dwarf goats in northwestern Croatia. XVII. Middle European Buiatrics Congress Proceedings book / Mudron, Pavol ; Tothova Csilla (ur.). Košice: University of Veterinary Medicine and Pharmacy in Košice, Slovakia, 2017. str. 116-116.

SAMARDŽIJA, M., L. RADMANIĆ, **I. BUTKOVIĆ**, J. PLEADIN (2017): Control of illegal use of natural sex hormones in farming of food animals. Arhiv za higijenu rada i toksikologiju, Supplement 1, Vol. 68, pp. 1-80, 2017 / Herman, Makso ; Pavlaković, Željana (ur.). Opatija: Arhiv za higijenu rada i toksikologiju, 2017. str. 45-45.

ŠPOLJARIĆ, B., S. VINCE, **I. BUTKOVIĆ**, J. F. VÁZQUEZ ARMIJO, J. GRIZELJ (2017): Ovsynch efficiency in anoestrous dairy goats. Book of abstracts/ Brkljača Bottegaro, N.; Zdolec, N.; Vrbanac, Z. (ur.). Zagreb: Tiskara Zelina d.d., 2017. str. 101-101.

Druga sudjelovanja na skupovima

VINCE, S., J. GRIZELJ, B. ŠPOLJARIĆ, **I. BUTKOVIĆ**, F. SANCHEZ DAVILA, N. FONSECA FUENTES (2017): Reproductive management in goats. Zbornik Predavanja II Međunarodni simpozijum "Zdravstvena zaštita i reprodukcija papkara" / Blond, Bojan (ur.). Beograd, Srbija.