Antioksidacijska zaštita i lipidna peroksidacija u tkivu testisa i različitim dijelovima epididimisa nerasta

Sluganović, Anamaria

Master's thesis / Diplomski rad

2018

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:178:876114

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

zir.nsk.hr

DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

VETERINARSKI FAKULTET

SLUGANOVIĆ ANAMARIA

ANTIOKSIDACIJSKA ZAŠTITA I LIPIDNA PEROKSIDACIJA U TKIVU TESTISA I RAZLIČITIM DIJELOVIMA EPIDIDIMISA NERASTA

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, 2018.

Ovaj je rad izrađen na Zavodu za fiziologiju i radiobiologiju i Klinici za porodništvo i reprodukciju Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Zavod za fiziologiju i radiobiologiju
Predstojnica: prof. dr. sc. Suzana Milinković Tur
Klinika za porodništvo i reprodukciju
Predstojnik: prof. dr. sc. Marko Samardžija

Mentori rada:
doc. dr. sc. Ivona Žura Žaja
izv. prof. dr. sc. Silvijo Vince

Članovi povjerenstva za obranu diplomskog rada:

1. prof. dr. sc. Suzana Milinković Tur
2. doc. dr. sc. Ivona Žura Žaja
3. izv. prof. dr. sc. Sivijo Vince
4. doc. dr. sc. Branimira Špoljarić (zamjena)

ZAHVALA

Zahvaljujem se svojim dragim mentorima, doc. dr. sc. Ivoni Žura Žaja i izv. prof. dr. sc. Silviju Vince na uloženom trudu i vremenu te pomoći pri cjelokupnom nastanku rada. Zahvale dugujemo Igoru DelVechiju, dr. med. vet., na brizi za životinje te omogućenom uzorkovanju potrebnih tkiva.

Željela bih zahvaliti svojoj obitelji na ljubavi i podršci koju su mi pružali tijekom posljednjih šest godina.

POPIS KRATICA

ACP: kisela fosfataza (engl. *acid phosphatase*)

ATP: adenozin trifosfat

CAT: katalaza (engl. *catalase*)

DNK: deoksiribonukleinska kiselina

FOSFO: fosfolipidi

GGT: gama-glutamil transferaza

GSH: reducirani glutation (engl. *reduced glutathione*)

GSSG: oksidirani se glutation (engl. *oxidized glutathione*)

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

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

KOLE: kolesterol

LDH: laktat dehidrogenaza

LDL: lipoproteini male gustoće (engl. *low density lipoproteins*)

LPO: lipidna peroksidacija (engl. *lipid peroxidation*; *LPO*)

MDA: malondialdehid (engl. *malondialdehyde*)

NADPH: reducirani oblik nikotinamid adenin dinukleotid fosfata (eng. *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*)

$NADP^+$: oksidirani oblik nikotinamid adenin dinukleotid fosfata

PUFA: višestruko nezasićene masne kiseline

ROS: reaktivni kisikovi spojevi (eng. *reactive oxygen species*)

SMK: slobodne masne kiseline (eng: *free fatty acids*; *FFA*)

SOD: superoksid dismutaza (eng. *superoxide dismutase*)

TAG: triacilglicerol

SADRŽAJ

1. UVOD **1**
2. PREGLED DOSADAŠNJIH SPOZNAJA **3**
2.1. Spolni sustav nerasta **3**
2.2. Reaktivni kisikovi spojevi i oksidacijski stres **7**
2.3. Lipidna peroksidacija **9**
2.4. Antioksidacijski sustav **10**
2.5. Posttestikularni učinaka na spermije i mikrookoliš epididimisa **11**
3. MATERIJALI I METODE **15**
3.1. Držanje životinja **15**
3.2. Uzorkovanje i analize **15**
3.3. Statistička obrada rezultata **16**
4. REZULTATI **18**
4.1. Antioksidacijska zaštita i intenzitet lipidne peroksidacije **18**
4.2. Biokemijski pokazatelji **20**
4.3. Korelacije istraživanih pokazatelja **22**
5. RASPRAVA **23**
6. ZAKLJUČCI **27**
7. LITERATURA **28**
8. SAŽETAK **34**
9. SUMMARY **35**
10. ŽIVOTOPIS **38**

1. UVOD

Reprodukcija je jedna od temeljnih bioloških funkcija čiji je cilj nastavljanje vrste, održavanje biološke raznolikosti i opstanka života. Uloga doktora veterinarske medicine je znatna u svim fazama reprodukcije domaćih životinja, a obuhvaća sustavni nadzor zdravlja te prevenciju i po potrebi liječenje poremećaja građe i funkcije spolnih organa muških i ženskih jedinki. Nadalje, doktor veterinarske medicine upravlja rasplođivanjem domaćih životinja uporabom biotehnologijskih postupaka u asistiranoj reprodukciji koji obuhvaćaju: umjetno osjemenjivanje, embriotransfer, oplodnju i uzgoj *in vitro,* seksiranje sperme i zametaka. Stoga, u cilju genetskog napretka koji se odražava kroz uspješniji komercijalni uzgoj stoke nužne su nove spoznaje koje bi razjasnile fiziološke procese zaštite spolnih stanica od štetnih posljedica oksidacijskih procesa tijekom njihove diferencijacije, tvorbe, sazrijevanja i pohrane.

Spermatogeneza je izuzetno aktivan replikacijski proces tijekom kojeg se stvara približno 1000 spermija u sekundi. Veliki stupanj staničnih dioba, svojstven procesu spermatogeneze, zahtijeva potrošnju velike količine kisika u mitohondrijima stanica zametnog epitela (spermatogonije). Mitohondriji su najznačajniji unutarstanični izvor reaktivnih kisikovih spojeva (engl. *reactive oxygen species;* ROS) koji nastaju u sustavu prijenosa elektrona (procesima oksidativne fosforilacije) zbog stvaranja ATP-a. Oskudna vaskularizacija testisa uvjetuje nizak parcijalni tlak kisika u njegovu mikrookolišu, no unatoč tome tkivo testisa je podložno oksidacijskom stresu zbog velikog udjela višestrukonezasićenih masnih kiselina i prisustva sustava koji stvaraju ROS. Stanje oksidacijskog stresa, koje nastaje narušavanjem ravnoteže između oksidansa (ROS i dr.) i prooksidansa (antioksidansi) u korist oksidansa, može za posljedicu imati narušavanje spermatogeneze i steroidogeneze (HALES i sur., 2005.). Narušene funkcije testisa mogu se odraziti i na sposobnost stvaranja gibljivih, vijabilnih i morfološki normalnih spermija koji imaju sposobnost oploditi jajne stanice te održati rast i razvoj zametka (AITKEN i ROMAN, 2008.).

U sisavaca se posttestikularno sazrijevanje spermija u epididimisu smatra nužnim procesom u pretvorbi nezrelih gameta u zrele spermije koji su sposobni za oplodnju jajne stanice. Shodno tome, epididimis osigurava optimalan mikrookoliš za koncentriranje, prijenos, zaštitu, sazrijevanje i skladištenje spermija. Poznato je da su ROS ključni čimbenici u procesu sazrijevanja spermija te da su u primjerenim količinama nužni za njihove fiziološke funkcije, primjerice u procesima kapacitacije, hiperaktivacije, akrosomske reakcije i fuzije spermija s oocitom (De LAMIRANDE i GAGNON, 1993., SANOCKA i KURPISZ, 2004.). Međutim, tijekom procesa sazrijevanja i skladištenja u epididimisu sve do oplodnje, spermiji su izloženi

oštećenjima koja nastaju kao posljedica oksidacijskog stresa, i to znatno više od drugih stanica u organizmu (CHABORY i sur., 2010., NOBLANC i sur., 2012.). Štoviše, spermiji su izrazito podložni oksidacijskom stresu prouzročenom prekomjernim stvaranjem ROS-a zbog prisustva velikog udjela višestrukonezasićenih masnih kiselina u njihovoj staničnoj membrani i oskudnoj količini citoplazme, a samim time i neadekvatnom količinom antioksidacijskih enzima (KOZIOROWSKA-GILUN i sur., 2011.). Specifična struktura stanične membrane spermija osigurava fleksibilnost i funkcionalnu sposobnost spermija. Sve lipidne komponente koje se nalaze u membrani spermija odgovorne su za razne procese kao što su: spermatogeneza, sazrijevanje spermija, kapacitacija, akrosomska reakcija te spajanje membrana gameta, no istodobno su glavni supstrati za lipidnu peroksidaciju (engl. *lipid peroxidation*; LPO) (ALVAREZ i sur., 1987., ŽURA ŽAJA, 2015.). Epididimisi i akcesorne spolne žlijezde imaju važnu funkciju u zaštiti spermija od oksidacijskog stresa uklanjanjem suvišne količine ROS-a i izlučivanjem antioksidansa u sjemenu plazmu (VERNET i sur., 2004., KOZIOROWSKA-GILUN i sur., 2011.). U 50% slučajeva muška je neplodnost povezana s izostalom spermatogenezom, dok je druga polovica idiopatske muške neplodnosti povezana s poremetnjom u procesima sazrijevanja i pohrane spermija u epididimisu, čiji je najznačajniji uzrok oksidacijski stres. Bolje razumijevanje funkcije i biokemijske osobitosti epididimisa, zaštite od oksidacijskog stresa i zbivanja koji prate posttestikularne procese sazrijevanja spermija, predstavljaju nužne spoznaje koje bi mogle biti od koristi u liječenju određenih oblika muške neplodnosti i boljeg očuvanja sjemena (CHABORY i sur., 2010., ARROTÉIA i sur., 2012., NOBLANC i sur., 2012.).

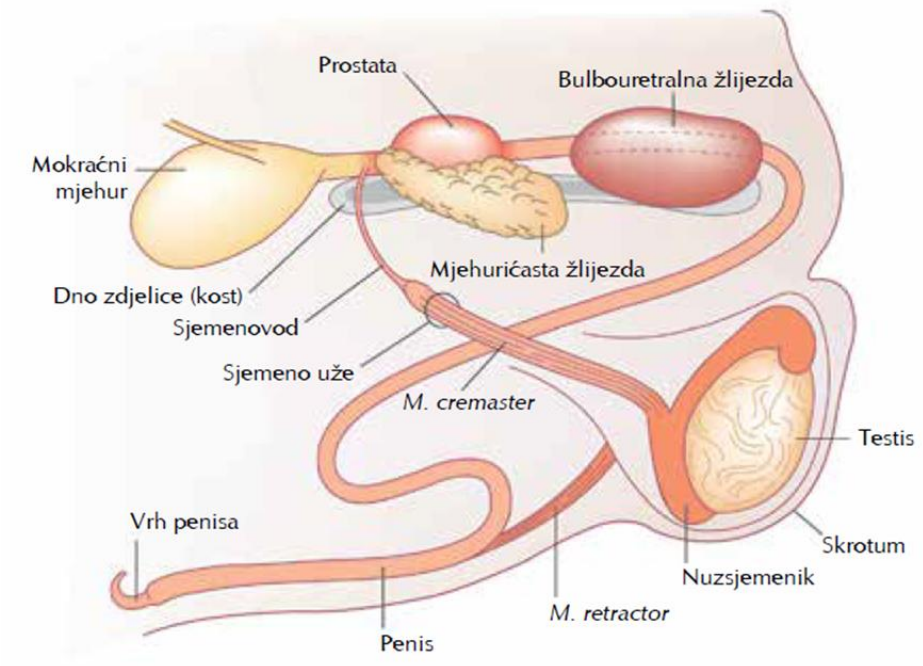
Slijedom prethodno navedenog, opći cilj ovog rada bio je istražiti razlike u razini antioksidacijske zaštite, intenziteta oksidacijskih oštećenja lipida i vrijednostima biokemijskih pokazatelja u testisima te različitim dijelovima epididimisa spolno zrelih nerasta. Nadalje, cilj je također bio utvrditi međusobnu povezanost određivanih pokazatelja, što bi moglo doprinijeti boljem razumijevanju procesa sazrijevanja spermija i mehanizama antioksidacijske zaštite muških spolnih stanica. Nadalje, specifični ciljevi ovoga rada bili su: 1). određivanje vrijednosti pokazatelja antioksidacijske zaštite i intenziteta oksidacijskih oštećenja lipida u testisima i glavi, tijelu i repu epididimisa spolno zrelih nerasta, 2). uspoređivanje vrijednosti pokazatelja antioksidacijske zaštite i intenziteta oksidacijskih oštećenja lipida navedenih dijelova spolnog sustava nerasta i 3). određivanje biokemijskih pokazatelja u testisima i različitim dijelovima epididimisa i istraživanje povezanosti malondialdehida, antioksidacijskih i biokemijskih pokazatelja u različitim dijelovima spolnog sustava i u spermijima različitog stupnja zrelosti.

2. PREGLED DOSADAŠNJIH SPOZNAJA

2.1. Spolni sustav nerasta

Osnovna funkcija spolnoga sustava nerasta je stvaranje, sazrijevanje, pohrana i prijenos spermija. Spolni hormoni reguliraju stvaranje velikog broja muških spolnih stanica (spermatogenezom i spermiogenezom), prijenos spermija tijekom spolnog čina i na posljetku njihovo ubacivanje u ženski spolni sustav u vrijeme spolnog žara (CAMPBELL i sur., 2003., GUYTON i HALL, 2006.).

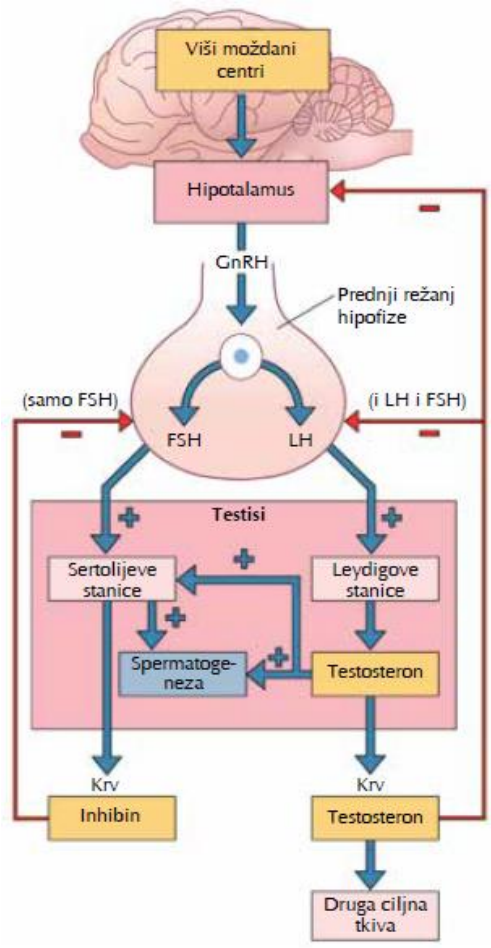
Ovaj sustav se u svih domaćih sisavaca sastoji od parnih testisa (muške sjemenske žlijezde, *testes*) smještenih u mošnji (*scrotum*), nuzjaja (*epididimis*), sjemenovoda (*ductus deferens*), mokraćnice (*uretra*), akcesornih spolnih žlijezda: mjehurićaste žlijezde (*glandulae vesiculosae*), prostate (*glandula prostatica*), bulbouretralne (Cowperove) žlijezde (*glandulae bulbourethrales*), uretralne (Litreove) žlijezde (*glandulae urethrales*), uda (*penis*) i prepucija (*praeputium*) (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.), no sam izgled spolnog organa očituje se vrsnim specifičnostima (Slika 1.).



Slika 1. Spolni organi nerasta (SJAASTAD i sur., 2017.).

Glans penisa nerasta je oblika svrdla (spirale), a kaudalni dio penisa formira sigmoidalni zavoj (*flexura sigmoidalis*). Ovaj zavoj se pri erekciji izravnava te produljuje dužinu penisa. U nerasta na dorzalnoj stani prepucija postoji proširenje u obliku slijepe vreće (*diverticulim praeputiale*) u kojemu se nakuplja smegma (stanični detritus i urin). Ova tekućina daje nerastu izrazito jak i specifičan urinarni miris. Nerasti proizvode veliku količinu sjemena zbog izrazito dobro razvijenih bulbouretralnih i mjehurićastih žlijezda, a specifičnost spolnog sustava nerasta je i u tome što oni imaju najveće testise u odnosu na tjelesnu masu od svih domaćih životinja.

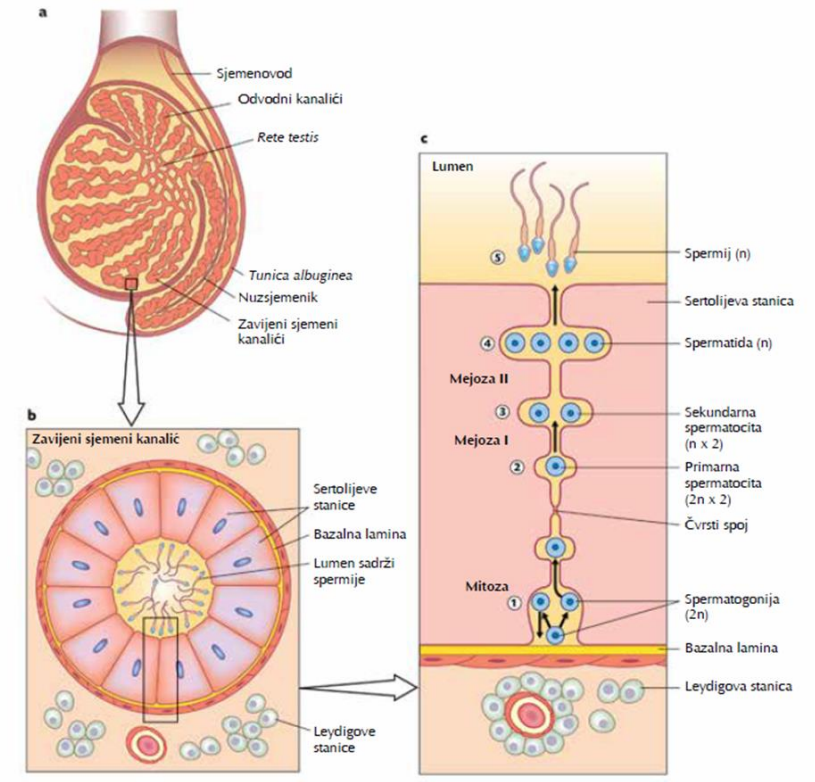
Muške spolne gonade (testisi) obavljaju dvije izrazito bitne funkcije, proizvodnju spermija (spermatogenezom i spermiogenezom) i stvaranje steroidnih spolnih hormona, testosterona i adolesterona. Kolesterol je prekursor za nekoliko važnih steroidnih hormona, koje luče kora nadbubrežne žlijezde, jajnici i testisi, a utvrđena je i pozitivna korelacija između koncentracije kolesterola i testosterona u krvnom serumu nerasta (WISE i sur., 1993.). Nadalje, testosteron stimulira rast i razvoj spolnih organa, spermatogenezu i spolnu aktivnost (Slika 2.). Ejakulirani spermiji iz sjemene plazme dobivaju dodatnu količinu kolesterola (CROSS, 1998., JACYNO i sur., 2009.).



Slika 2. Lučenje testosterona i djelovanje testosterona na spermatogenezu (SJAASTAD i sur., 2017.)

Spermatogeneza je početni proces stvaranja spermija koji započinje u pubertetu te traje do staračke atrofije testisa (*atrofia senilis*). Spermatogeneza i spermatogonija su procesi koji se odvijaju u zavinutim kanalićima testisa u kojima se uvijek može naići na različite razvojne stadije spermija. Razvitak spermija počinje spermatogonijama, primarnim i sekundarnim spermatocitama, spermatidama i završava zrelim spermijima (SJAASTAD i sur., 2017.).

Spermatogonije nakon više mitotičkih dioba stvaraju spermatocite, a one se dijele te nakon dvije mejoze pretvaraju u spermatide koje tada imaju haploidan broj kromosoma. Spermatide prolaze metmorfozu (spermiogenezu) i nastaju spermiji. Kroz ove procese dolazi do promjena u staničnoj jezgri i citoplazmi. Jezgra se postepeno smanjuje i njen se kromatin zgrušava. Citoplazma se izduljuje te stanica odbacuje njen višak. Uz navedene promjene dolazi i do razvoja akrosomalne kape od Golgijevog aparata jezgre, a istovremeno se sinteteiziraju i akrosomski enzimi. Centrioli putuju na drugu stranu jezgre i stapaju se u rep spermija uz sintezu tubulina. Mitohondriji se izduljuju i obavijaju područje vrata spermija iz kojega će narasti rep spermija (Slika 3.) (KOZARIĆ, 1998.).



Slika 3. Spermatogeneza. **a** Longitudinalni presjek testisa i nuzsjemenika prikazuje raspored zavijenih sjemenih kanalića, dijela testisa u kojem nastaju spermiji, i drugih kanalića koji odvode spermije iz testisa. **b** Povećani presjek zavijenog sjemenog kanalića prikazuje smještaj Leydigovih stanica. **c** Odnos Sertolijevih stanica i spermija u razvoju (SJAASTAD i sur., 2017.).

Nastanak spermija u sjemeni kanalićima testisa traje 40-45 dana nakon čega spermiji dolaze u epididimis (nuzsjemenik), organ koji se sastoji od glave, tijela i repa. Spermiji koji tek

dospiju u epididimis su nepokretni i nisu sposobni za oplodnju. Epididimis, osim transportne funkcije sudjeluje i u koncentriranju, sazrijevanju i pohrani spermija. Kroz nuzsjemenik nerasta spermiji putuju oko dvanaest do četrnaest dana, a prolazak spermija se odbija peristaltičkom kontrakcijom kanalića i trepetljikavog epitela epididimisa. Glava epididimisa koncentrira pristigle spermija, a sluznica stjenke glave epididimisa resorbira veliku količinu tekućine iz sjemenih kanalića. Tijekom prolaska spermija kroz epididimis dolazi do fizioloških, funkcionalnih, kemijskih i morfoloških promjena u spermijima, a sve se odvija pod utjecajem enzima, proteina i glikoproteina epididimisa. U procesu zrenja spermiji dobivaju lipoproteinsku ovojnicu koja ih štiti od nepovoljnih čimbenika i sprječava aglutinaciju čineći ih negativno nabijenima.

Androgeni hormoni djeluju na epitelne stanice epididimisa na način da djeluju na sekreciju bjelančevina, aminokiselina, iona, organskih molekula i ostalih sastajaka i tako osiguravaju pogodne uvjete za spermije tijekom njihove pohrane u tkivu epididimisa.

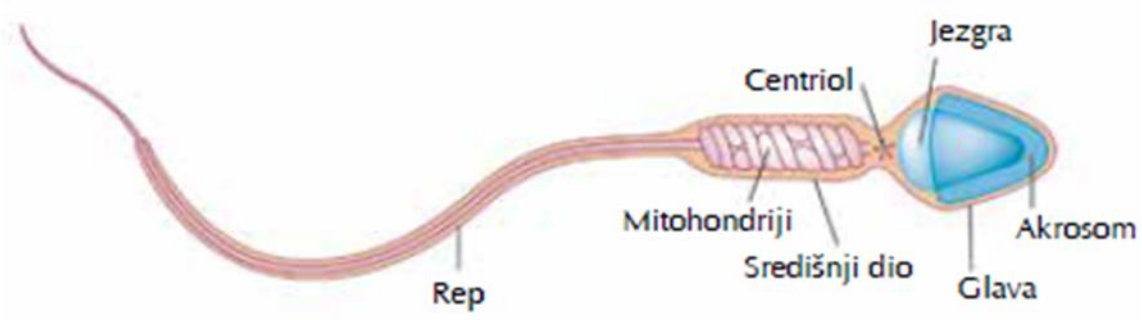
Bjelančevine koje se nalaze u epididimalnoj tekućini imaju važnu funkciju u sazrijevanju spermija, kapacitaciji spermija i reakciji spermija s jajnom stanicom, a najistraženije su laktoferin, klasterin, bjelančevina koja prenosi kolesterol, glutation peroksidaza, prostaglandin D2 sintetaza i glukozidaza.

Prolaskom kroz rep epididimisa spermiji postaju pokretni i sposobni za oplodnju jajne stanice, a tijekom ejakulacije sperme dolazi do miješanja spermija i sjemene plazme čime spermiji iz stadija anabioze postaju potpuno gibljivi i spremni na oplodnju jajne stanice (REECE, 2004., CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006., FABIOLA ARROTÉIA i sur., 2012., ŽURA ŽAJA, 2015.).

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

Spermiji su muške spolne stanice koje nemaju sposobnost diobe i rasta, samostalno se gibaju i održivi su izvan organizma u aerobnim i anaerobnim uvjetima. Sastoje se od glave, središnjeg dijela, koji se dijeli na vrat i tijelo, i repa. Glava spermija dijeli se na jezgru i akrosomu. U jezgri se nalazi genetski materijal, DNK, i ribonukleinska kiselina, kromatin, bjelančevine i alkalna fostaza koja je obavijena tankim slojem citoplazme. Akrosoma je vezikula koja nastaje iz Golgijevog aparata i sadrži bitne enzime kao što su akrozin i hijaluronidaza. Ovi hidrolitički enzimi su važni za penetraciju međustaničnog matriksa

folikularnih stanica (*zona pellucida*). Akrosomu okružuju unutarnja akrosomska membrana (najbliža jezgri) i vanjska akrosomska membrana (nalazi se ispod stanične membrane). Vrat spermija je vrlo kratak, a čine ga centriola građena od devet segmenata, središnja aksonema i spiralna aksonema. Glavu i rep povezuje tijelo koje pokreće rep. Tijelo se sastoji od bjelančevina, ugljikohidrata i masti. Oko središnje aksoneme se nalaze mitohondriji koji su izrazito bitni za pokretljivost spermija. Rep se sastoji od središnjeg, glavnog i završnog dijela. (YASTE OLIVER, 2008.) (Slika 4.).



Slika 4. Shematski prikaz spermija (SJAASTAD i sur., 2017.).

2.2. Reaktivni kisikovi spojevi i oksidacijski stres

Kisik je neophodan aerobnim organizmima koji kao izvor energije koriste oksidacijski metabolizam. Međutim, potrošnja kisika stvara međuproizvode, reaktivne oblike kisikovih metabolita koji se nazivaju ROS i peroksidirane molekule, a mogu biti štetni za stanicu (CHABORY i sur., 2010., OGBUEWU i sur., 2010.). U organizmu su ROS najzastupljeniji radikali te obuhvaćaju superoksidni anion ($O_2^{\bullet-}$), hidroksilni radikal ($OH^{\bullet-}$), vodikov peroksid (H_2O_2), singletni kisik ($^1O_2$), hipoklornu kiselinu i peroksilne radikale. U stanicama eukariota postoje mnogi metabolički putovi koji sudjeluju u stvaranju ROS-a, a potaknuti su unutarstaničnim i izvanstaničim čimbenicima. Slobodni radikali nastaju u stanici tijekom fizioloških i patoloških procesa, primjerice u respiratornom lancu mitohondrija, metabolizmu arahidonske kiseline u staničnim membranama, oksidacijom masnih kiselina u peroksisomima, aktivnošću fagocita, neenzimskim reakcijama kisika te pod utjecajem ultraljubičastog i ionizirajućeg zračenja i drugo (POLJSAK i sur., 2013.). Spajanjem $O_2^{\bullet-}$ s H_2O_2 u reakcijama koje kataliziraju prijelazni metali nastaje hidroksilni radikal. Hidroksilni je radikal vrlo reaktivan te reagira sa svim molekulama u staničnom okolišu, ponajprije s tkivima koja sadrže

veliki udio lipida stvarajući pri tome niz štetnih učinaka. Stres, anestezija, lijekovi (citostatici, analgetici), upalna stanja pa čak i normalni stanični metabolizam stvaraju ROS u različitim količinama. Za razliku od atmosferskog O_2, ROS može prouzročiti neograničenu oksidaciju različitih staničnih molekula, što dovodi do uništenja stanica posredovano ROS-om. Zbog stvaranja velike količine ili neučinkovitog uklanjanja ROS-a dolazi do oksidacijskog stresa, a time i do oksidacijskih oštećenja lipida, aminokiselina, ugljikohidrata te DNK-a (OGBUEWU i sur., 2010., ŽURA ŽAJA, 2015.). Iako je oksidacijski stres dominantan čimbenik u etiologiji muške neplodnosti, temeljni mehanizmi koji ga prouzroče još uvijek nisu u potpunosti razjašnjeni (AITKEN i ROMAN, 2008.).

Pored njihovih štetnih učinaka, male količine ROS-a neophodne su za mnoge stanične funkcije te sudjeluju u regulaciji gena i staničnog rasta, unutarstaničnoj signalizaciji i ostalih vrsta prijenosa signala (CHABORY i sur., 2010., RAHAL i sur., 2014.). Međutim, prekomjerno stvaranje ROS-a može dovesti do stanične patologije i smrti. Tkivo testisa je izrazito ovisno o kisiku za odvijanje normalne spermatogeneze, ali je istodobno jako podložno toksičnim učincima reaktivnih kisikovih metabolita (CHABORY i sur., 2010.). Oksidacijsko oštećenje DNK-a i bjelančevina prouzročeno ROS-om, može mijenjati strukturu i funkciju spermija te prouzročiti povećanu osjetljivost spermija na majčinske makrofage (AITKEN i sur., 1994.).

Oksidacijsko se oštećenje mitohondrijske DNK-a zbiva u svim stanicama koje su poput spermija bogate mitohondrijima, a negativno utječe na fosforilaciju i stvaranje ATP-a, što uzrokuje gubitak gibljivosti i oplodni potencijal spermija (CUMMINS i sur., 1994., ŽURA ŽAJA, 2015.). Endogeno oksidacijsko oštećenje DNK-a u jezgri zametnih stanica (spermatogonija) povezano je s ranim prekidom gravidnosti, nasljednim mutacijama, genetskim bolestima i povećanom učestalošću urođenih psihofizičkih mana, morbiditetom potomaka i karcinomima u ranoj dobi. Većina se oštećenja DNK-a poprave sustavom za reparaciju, no oštećeni se dijelovi mogu ispoljiti kao mutacije tijekom DNK-a replikacije koja prati diobu stanica u spermatogenezi, oogenezi i embriogenezi (AITKEN i SAWYER, 2003., KEMAL DURU i sur., 2000., ŽURA ŽAJA, 2015.). Tijekom oksidacije bjelančevina nastaje mnoštvo fizikalnih i biokemijskih promjena kao što su primjerice: povećanje osjetljivosti oksidiranih bjelančevina na proteolitičku enzimsku razgradnju, promjene mehaničkih svojstava, promjene u građi, povećanje hidrofobnosti, promjena u vezanju kočimbenika, promjene enzimske aktivnosti i ionskog prijenosa itd. (DAVIES, 2003., LJUBIČIĆ i sur., 2013., ŽURA ŽAJA, 2015.). Nadalje, ROS može u staničnim membranama spermija oksidirati višestrukonezasićene masne kiseline koje su sastavni dio fosfolipida i lipoproteine male gustoće (engl. *low density lipoproteins*; LDL), a sam se proces naziva lipidna peroksidacija (LPO).

2.3. Lipidna peroksidacija

Lipidi su funkcionalne i strukturne komponente bioloških membrana, najznačajnije energetske rezerve u organizmu, prekursori za vitamine i hormone, a sudjeluju i u međustaničnoj komunikaciji i regulaciji ekspresije gena (CATALÁ, 2006., CATALÁ, 2009.). Lipidna je peroksidacija oksidativna degradacija lipida, potaknuta djelovanjem ROS-a i/ili reaktivnim dušikovim spojevima. U tom procesu slobodni radikali "kradu" elektrone lipidima (u staničnim membranama, lipoproteinima i drugim molekulama), što dovodi do oštećenja stanica, a proces se nastavlja mehanizmom lančane reakcije slobodnih radikala. Staničnu membranu čine lipidi (fosfolipidi, glikolipidi, kolesterol) koji sadrže višestruko nezasićene masne kiseline (PUFA), koje su pak izrazito podložne lipidnoj peroksidaciji. Osjetljivost PUFA prema lipidnoj peroksidaciji raste sa povećanjem broja dvostrukih veza, stoga dokozaheksaenska kiselina (C22:6) ima veću sposobnost oksidacije od linolne kiseline (C18:2) (WAGNER i sur., 1994., CATALÁ, 2006., ŠTEFAN i sur., 2007.). Započeta reakcija lipidne peroksidacije ima progresivni tijek te se sastoji od: inicijacije, propagacije i terminacije.

Lipidna peroksidacija može prouzročiti gubitak integriteta stanične membrane, poremetiti funkcije spermija i potpuno inhibirati spermatogenezu (OGBUEWU i sur., 2010., BANSAL i BILASPURI, 2011.). Lipidna peroksidacija često nastaje kao odgovor na oksidacijski stres, a uključena je u mnogobrojna patološka stanja kao što su: upale, ateroskleroza, neurodegenerativne bolesti, karcinomi i neplodnost. Tijekom lipidne peroksidacije dolazi do razgradnje primarnih proizvoda LPO te nastanka sekundarnih proizvoda, raznih aldehida (GIROTTI, 1998., GUÉRAUD i sur., 2010.). Neki su od tih aldehida izrazito reaktivni i mogu se smatrati sekundarnim toksičnim agensima te su u usporedbi s ROS-om relativno stabilni.

Intenzitet oksidacijskog stresa može se pratiti mjerenjem proizvoda oksidacije bioloških molekula i/ili određivanjem enzimskih i neenzimskih antioksidansa (POLJSAK i sur., 2013.). Malonilaldehid (engl. *malondialdehyde*; MDA) je najpoznatiji proizvod LPO čije se mjerenje koncentracije u tkivima koristi u određivanju intenziteta lipidne peroksidacije, odnosno oksidacijskog stresa. MDA je biološki vrlo aktivna molekula koja može prouzročiti znatna oštećenja bjelančevina i DNK-a s posljedičnim gubitkom stanične funkcije (CATALÁ, 2006., ŠVERKO, 2011., ŽURA ŽAJA, 2015.). Prekomjerno izlaganje spermija ROS-u povezano je s njihovom smanjenom gibljivošću, abnormalnom morfologijom te umanjenim kapacitetom za penetraciju oocite. Prema tome, antioksidacijska sposobnost spermija i okoliša u kojem su

nastali i/ili su pohranjeni znatan su čimbenik u određivanju etiologije muške plodnosti, odnosno neplodnosti (POTTS i sur., 1999., SIKKA, 2001., AITKEN i ROMAN, 2008., CHABORY i sur., 2010.).

2.4. Antioksidacijski sustav

Antioksidansi su u muškom spolnom sustavu nerasta najznačajniji čimbenici u zaštiti protiv oksidacijskog stresa prouzročenog stvaranjem prekomjerne količine ROS-a, što može poremetiti spermatogenezu, steroidogenezu, funkciju spermija i prouzročiti smanjenu plodnost, odnosno neplodnost (AITKEN i ROMAN, 2008., KOZIOROWSKA-GILUN i sur., 2013.). Antioksidacijska zaštita spolnog sustava nerasta obuhvaća enzimski i neenzimski sustav koji djeluju interaktivno prekidajući oksidacijsku lančanu reakciju smanjujući pri tome oksidacijski stres. Primarni antioksidacijski enzimi uključeni u uklanjanje ROS-a u spermijima i različitim dijelovima muškog spolnog sustava su: superoksid dismutaza (engl. *superoxide dismutase*; SOD), glutation peroksidaza (engl. *glutathione peroxidase*; GSH-Px), katalaza (engl. *catalase*; CAT), ali i mnogi drugi poput sekundarnog antioksidacijskog enzima glutation reduktaze (engl. *glutathione reductase*; GSH-RD) i gama glutamil transferaze (engl. *gamma glutamyl transferase*; GGT), koji su povezani s mehanizmom antioksidacijske zaštite (KOZIOROWSKI-GILUN i sur., 2013., KOZIOROWSKA-GILUN i sur., 2015.).

Prvu liniju zaštite od ROS-a čini metaloenzim SOD, koji katalizira dismutaciju superoksidnog radikala na molekulu kisika i H_2O_2. U testisima su prisutna tri izoenzima: citosolna, mitohondrijska i izvanstanična SOD, koje stvaraju Sertolijeve i zametne stanice testisa (POTTS, 1999.). Enzimi GSH-Px i CAT kataliziraju istu reakciju, odnosno pretvorbu H_2O_2 u vodu. Iako je CAT enzim s velikom sposobnošću uklanjanja H_2O_2, smatra se da je GSH-Px ključni enzim u regulaciji i prevenciji oštećenja koja može prouzročiti H_2O_2. Nadalje, GSH-Px može razložiti i organske hidroperokside, poput fosfolipidskih hidroperoksida, do vode ili alkohola, koristeći glutation kao reducens (BRIGELIUS-FLOHÉ i MAIORINO, 2013., KOZIOROWSKA-GILUN i sur., 2013.). Osim navedenog, skupina GSH-Px enzima ima najznačajniju funkciju u zaštiti i očuvanja oplodne sposobnosti spermija tijekom njihovog stvaranja, sazrijevanja i pohrane u epididimisu (CHABORY i sur., 2010.).

Neenzimska molekula glutation ima važnu funkciju u zaštiti stanica od oksidansa nastalih normalnim metabolizmom u stanici. GGT je uključen u metabolizam glutationa u prijenosu gama-glutamil funkcionalne skupine na različite akceptore, oslobađajući cistein kao

proizvod za očuvanje unutarstanične homeostaze oksidacijskog stresa (WHITFIELD, 2001.). Na taj način GGT ima važnu funkciju u održavanju unutarstaničnog cisteina i glutationa. Enzim GSH-RD također sudjeluje u metabolizmu glutationa i to tako da obnavlja reducirani oblik glutationa iz njegovog oksidiranog oblika uz redukciju nikotinamid adenin dinukleotid fosfata (NADPH) u oksidirani oblik nikotinamidnog adenin dinukleotida ($NADP^+$). Reducirani oblik glutationa je u takvom obliku neophodan za primjereno funkcioniranje GSH-Px-a i niz drugih značajnih funkcija u kojima sudjeluje (KOZIOROWSKA-GILUN i sur., 2011.).

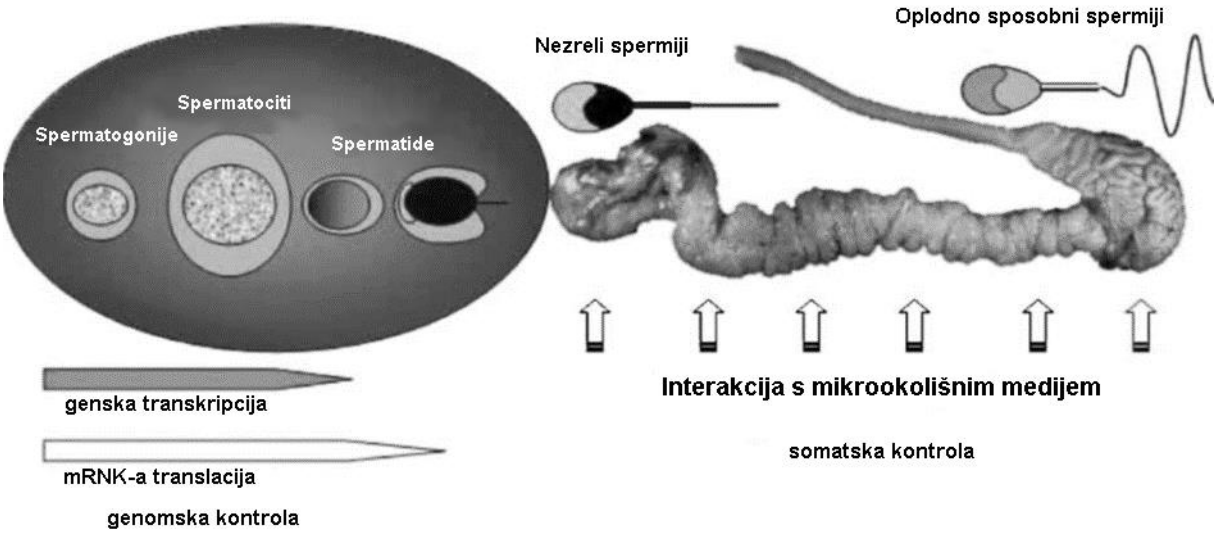
Razni egzogeni i endogeni čimbenici mogu poremetiti odnos antioksidansa i ROS-a u organizmu, a ukoliko se u organizmu oksidansi povećano stvaraju i/ili izostane adekvatna antioksidacijska zaštita dolazi do oksidacijskog stresa.

2.5. Posttestikularni učinaka na spermije i mikrookoliš epididimisa

Stvaranje muških gameta je rezultat opsežne stanične diferencijacije i preobrazbe okruglastih spermatida u izrazito polarizirane i gibljive stanice. Većina se složenih biokemijskih, fizioloških i morfoloških zbivanja stanične diferencijacije odvija u testisima tijekom procesa spermiogeneze i to uglavnom pod genomskom regulacijom gameta. Međutim, kada se DNK počne kondenzirati u izduženim spermatidama, proces transkripcije DNK-a u spermatogonijama se smanjuje, a zatim zaustavlja. U završnom testikularnom stadiju diferencijacije muških gameta, spermiji koji nisu gibljivi pa stoga ni plodni, podvrgnuti su dodatnoj, diskretnoj i nužnoj postgonadnoj modifikaciji da bi postali sposobni oploditi jajnu stanicu. Smatra se da prisutnost specifičnog mikrookoliša spermija tijekom navedenih stadija modifikacije u epididimisu ima važnu funkciju u kontroli i indukciji završnih promjena stanične membrane spermija te njihovoj zaštiti (DACHEUX i sur., 2005.).

Sazrijevanje spermija u epididimisu je izvan kontrole genoma spermatogonija pa je stoga u velikoj mjeri posljedica njihove interakcije s tekućinom epididimisa, uglavnom sa specifičnim bjelančevinama prisutnim u lumenu tubula epididimisa (Slika 5.). Sam proces sazrijevanja i prolaska spermija kroz epididimis u nerasta traje od 12 do 14 dana. Specifični mikrookoliš epididimisa, koji je od krvnog optjecaja izoliran krvno-epididimisnom barijerom, štiti gamete do ejakulacije te utječe na regulaciju funkcije i integriteta epididimisa. U lumenu epididimisa spermiji se održavaju u vrlo specifičnom okolišu s optimalnom temperaturom, parcijalnim tlakom kisika, pH vrijednosti i uz prisutnost energetskih supstrata. Poznato je da u nedostatku supstrata za glikolizu, endogeni i egzogeni lipidi imaju značajnu funkciju u opskrbi spermija energijom za njihovu održivosti i gibljivost (JUYENA i STELLETTA, 2012.). Svi su

navedeni uvjeti specifični za mikrookoliš epididimisa i bitni za sazrijevanje spermija, a narušavanjem bilo kojeg od njih može dovesti do poremećaja oplodne sposobnosti i očuvanja spermija (DACHEUX i sur., 2005., ARROTÉIA i sur., 2012.). Razumijevanje posttestikularnih učinaka na spermije i mikrookoliš epididimisa značajno je za utvrđivanje povoljnih biljega u procjeni plodnosti životinja, oplodne sposobnosti te očuvanja spermija.



Slika. 5. Shematski prikaz procesa tvorbe i kontrole muških gameta u testisima i epididimisima (preuzeto od Dacheux i sur., 2005.)

Epididimisi imaju veliku sekretornu aktivnost, a iz tekućine koju izlučuju različita područja epididimisa prepoznato je nekoliko stotina bjelančevina. Uglavnom sve bjelančevine testisa koje dospiju u epididimis brzo se apsorbiraju u njegovom prvom dijelu. Sastav bjelančevina u lumenu epididimisa je uglavnom povezan sa specifičnom sekretornom aktivnošću koju karakterizira svako područje epididimisa (*caput, corpus* i *cauda*) u spolno zrelih jedinki (THIMON i sur., 2008.). U nerasta je utvrđeno više od 100 bjelančevina epididimisa (SYNTIN i sur., 1996.), a većina ih se izlučuje u njegovom prednjem dijelu. U nerasta se 6 do 8 puta više bjelančevina izlučuje u prednjem dijelu u odnosu na repni dio, odnosno glava (*caput*) izlučuje približno 83%, tijelo (*corpus*) izlučuje približno 16%, a rep (*cauda*) izlučuje svega 1% bjelančevina. Primjerice, prednji dio epididimisa (*caput*) karakteriziran je između ostalih bjelančevina sintezom i sekrecijom enzima glutation peroksidaze, koji je važan u zaštiti spermija od oksidacijskih oštećenja (DACHEUX i sur., 2005.).

Uspostava sekrecije bjelančevina u pojedinim dijelovima epididimisa zbiva se progresivno tijekom postnatalnog razvoja i prije puberteta, sukladno razvoju testisa. Laydigove

stanice testisa nerasta luče testosteron i estrogen koji se stvaraju iz kolesterola uz prisustvo specifičnih enzima. Spolni hormoni su važni endogeni čimbenici koji pozitivno utječu na stvaranje i aktivnost antioksidansa, a samim time i na smanjenje oksidacijskog stresa (RAESIDE i RENAUD, 1983., AITKEN i ROMAN, 2008., ZDUŃCZYK i sur., 2011.). Androgeni hormoni kontroliraju približno polovicu bjelančevina koju sintetiziraju epididimisi s pozitivnim ili negativnim učinkom. Preostalih su 43% bjelančevina modulirane lokalnim čimbenicima, a svega 6% bjelančevina nije pod sustavnom ni lokalnom kontrolom. Prvi dio epididimisa kontroliraju čimbenici iz tekućine koju izlučuju testisi (SYNTIN i sur., 1999.). Ostale specifične bjelančevine prednjeg dijela epididimisa, kao što su GSH-Px i heksozaminidaza, pozitivno su regulirane testosteronom, ali s vrlo različitim razinama osjetljivosti (THIMON i sur., 2008.).

Nakon što spermiji dospiju u epididimise, tijekom procesa sazrijevanja, stanična membrana spermija se znatno preoblikuje odnosno mijenja se sastav i lokalizacija bjelančevina i lipida (kolesterola i fosfolipida) u njihovim membranama. Uslijed ove promjene u staničnim membranama spermija zastupljenost fosfolipida se smanjuje, a kolesterola povećava, odnosno molarni omjer kolesterola i fosfolipida postaje dvostruko veći (NIKOLOPOULOU i sur., 1985.). Budući da nije topljiv u vodi, kolesterol se iz lumena epididimisa na membranu spermija prenosi specifičnom bjelančevinom. Bjelančevine epididimisa mijenjaju svojstva membrana spermija tako što vrše izmjenu bjelančevina ili lipida iz njihovog mikrookoliša ili izmjenom položaja prisutnih bjelančevina u membrani. Bjelančevine koje sudjeluju u navedenim procesima imaju prijenosnu, odnosno vezujuću funkciju. Površina membrane spermija može se mijenjati i enzimskom aktivnošću nekolicine značajnih bjelančevina iz epididimisne tekućine, a obuhvaćaju enzime poput glikozidaza, fosfataza i proteaza. Primjerice, kisela je fosfataza (engl. *acid phosphatase*; ACP) u epididimisu uključena u post testikularne procese sazrijevanja spermija tj. u fosforilacijsko-defosforilacijske procese te se nalazi u staničnim membranama spermija (SOUCEK i VARY, 1984., WYSOCKI i STRZEZEK, 2006.). Neki enzimi, odnosno bjelančevine epididimisa odgovorne su za procese u kojima negibljivi spermiji postaju gibljivi, a navedene procese prate i promjene metaboličkih procesa kojima se osigurava energija za gibanje spermija. Laktat dehidrogenaza (engl. *lactate dehydrogenase*; LDH) je enzim značajan u metaboličkim procesima koji osiguravaju energiju za preživljavanje i gibljivost spermija (BEU i sur., 2007.). Aktivnost navedenih enzima u tekućini epididimisa je neobično velika, odnosno najveća u odnosu na ostale tjelesne tekućine (DACHEUX i sur., 2005.).

U svih do danas istraživanih vrsta, uključujući i neraste, čini se da specifične testikularne površinske bjelančevine spermija bivaju uklonjene ili podvrgnute daljnjoj obradi tijekom

prolaska spermija kroz epididimise. Nestanak nekih bjelančevina povezan je sa specifičnim mehanizmom proteolize, koja inducira molekularnu preraspodjelu membrane ili otpuštanje odcjepljene bjelančevine u lumen epididimisa. Povezanost sazrijevanja membrane spermija i fizioloških promjena koje se zbivaju u spermijima nisu u potpunosti razjašnjene. Prisutnost ili odsutnost definiranih antigena često je u korelaciji sa svojstvima spermija, kao što su prepoznavanje i vezanje spermija za zona pellucidu i membranu oocita ili početak gibanja spermija. Međutim, stvarni molekularni mehanizmi koji uzrokuju "sazrijevanje spermija" nisu do danas u potpunosti utvrđeni (DACHEUX i sur., 2005., ARROTÉIA i sur., 2012., NOBLANC i sur., 2012.).

Tijekom prolaska kroz epididimis spermiji su podvrgnuti stalnoj promjeni mikrookoliša u lumenu, koje je modificirano zbog sekrecijskih i endocitotičkih aktivnosti stanica sluznice epitela. U konačnici, usklađena aktivnost u sekreciji različitih tvari kao i endocitozi u epitelnim stanicama duž kanala, utječe na konačno sazrijevanje spermija, njihovu koncentraciju, zaštitu, pohranu i oplodnu sposobnost. Navedene uzastopne promjene prati i promjena osobitosti spermija tijekom njihovog prolaska kroz epididimis, a osobito promjene u svojstvima njihovih membrana. No, mijenja se i sastav bjelančevina, lipida i ostalih tvari u različitim dijelovima epididimisa, koje sudjeluju u procesima sazrijevanja spermija, a čije funkcije nisu u potpunosti razjašnjene. Međutim, ni sposobnost testisa i epididimisa da štite spermije od štetnih učinka oksidacijskih procesa koji se zbivaju tijekom njihove tvorbe, pohrane i sazrijevanja u epididimisima pomoću lokalno sintetiziranih antioksidansa, nije do sada u nerasta dostatno istražena.

3. MATERIJALI I METODE

U ovom istraživanju nisu žrtvovane životinje, jer su uzorci tkiva testisa i epididimisa uzimani od životinja koje su usmrćivanje na liniji klanja radi ekonomske iskoristivosti (sukladno Pravilniku o zaštiti životinja u vrijeme usmrćivanja NN 83/2011).

3.1. Držanje životinja

Istraživanje je provedeno na 5 nerasta pasmine Švedski landras držanih na svinjogojskoj farmi Kaznionice u Požegi, gdje su tovljeni u svrhu ekonomske iskoristivosti svinjskoga mesa. Nakon odbića prasad je do 4 mjeseca starosti boravila u odjeljcima veličine 3 x 2 m (0,42 m^2/životinji) i imala pristup hrani i vodi *ad libitum*. Prasad je hranjena potpunom krmnom smjesom za odbijenike (Starter za prasad 20%-peletirani, TSH d.d., Čakovec). U dobi od 6 mjeseci prasad je premještena u odjeljke veličine 2,5 x 4,3 m (1,5 m^2/životinji) i imala je pristup vodi *ad libitum*, a hranjena je podnim načinom tri puta na dan potpunom krmnom smjesom za svinje u rastu i tovu do 60 kg tjelesne mase (BEK-1, TSH d.d., Čakovec). Od 8. mjeseca starosti pa sve do klanja tovljenici su držani u odjeljcima veličine 3 x 6 m (2,6 m^2/životinji) s prirodnom ventilacijom. Tovljenici su imali pristup vodi *ad libitum,* a hranjeni su podnim načinom tri puta na dan potpunom krmnom smjesom za svinje u rastu i tovu preko 60 kg tjelesne mase. Zadnji mjesec tova hranjeni su dopunskom krmnom smjesom za tovne i rasplodne svinje (Superkoncentrat za svinje 40%, TSH d.d., Čakovec) sa siliranim zrnom kukuruza.

3.2. Uzorkovanje i analize

Klinički zdravi spolno zreli nerasti zaklani su u klaonici Papuk d.o.o., Požega, u dobi od 10 mjeseci i prosječne tjelesne mase od 147 ± 20 kg. Na liniji klanja nerastima su uklonjeni testisi s epididimisima i odmah nakon toga stavljeni na led te osušeni papirnatim ručnikom. Potom su odpreparirani od vezivnotkivnih ovojnica testisa i masnog tkiva. Nadalje, uzorci tkiva rubnog dijela glave testisa (*extremitas capitata testis*), glave (*caput epididymis*), tijela (*corpus epididymis*) i repa (*cauda epididymis*) epididimisa u kojima su sadržani spermiji različitog stupnja zrelosti, narezani su na komadiće težine oko jednoga grama i stavljeni u eppendorf

epruvete od 2,5 mL. Uzorci tkiva spolnog sustava nerasta, tijekom cjelokupnog postupka uzorkovanja te njihovog transporta do laboratorija na Veterinarskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, držani su na ledu. Tijekom prvih 24 sata od uzorkovanja uzorci su pohranjeni na – 20 ˚C, a nakon toga na – 80 ˚C do biokemijskih analiza.

Uzorci tkiva testisa i epididimisa sa spermijima homogenizirani su u 0,14 M KCl (kalijev klorid) u omjeru 1:5 (w/v) s teflon–staklo Schüthomogen plus homogenizatorom (Schütt labortechnik, Njemačka) pri 2800 okr/min kroz 60 s uz hlađenje ledom. Homogenati tkiva su centrifugirani pomoću centrifuge Sigma 3 K 15 (Sigma, Njemačka) pri 20000 g tijekom 30 min na 4 ˚C, a u dobivenim nadtalozima određene su aktivnosti glutation peroksidaze (GSH-Px; EC 1.11.1.9), glutation reduktaze (GSH-RD; EC 1.6.4.2), superoksid dismutaze (SOD; EC 1.15.1.1), gama glutamil transferaze (GGT; EC 2.3.2.2), laktat dehidrogenaze (LDH; EC 1.1.1.27) i kisele fosfataze (ACP; E. C. 3.1.3.2) te koncentracije malondialdehida (MDA), slobodnih masnih kiselina (SMK), triacilglicerola, fofsolipida i kolesterola.

U dobivenim uzorcima aktivnosti i koncentracije prethodno navedenih pokazatelja određene su spektrofotometrijski na automatskom analizatoru SABA 18 (AMS, Rim, Italija). Aktivnosti GSH-Px-a, GSH-RD-a i SOD-a te koncentracija SMK-a određene su gotovim kompletima tvrtke Randox (Crumlin, Velika Britanija), aktivnosti GGT-a, LDH-a i ACP-a te koncentracije triacilglicerola i kolesterola određene su gotovim kompletima tvrtke Dijagnostika (Sisak, Hrvatska), a koncentracija fosfolipida određena je gotovim kompletom tvrtke bioMérieux Inc. (Durham, SAD) prema uputama proizvođača. Nadalje, koncentracije ukupnog malondialdehida izmjerene su metodom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (GROTTO i sur., 2007.) na TSP-130 sustavu (Thermo Separation Products, Inc, Thermo Fisher Scientific, Inc.,Waltham, MA, SAD). Dobivene vrijednosti u tkivima testisa i epididimisa izražene su po gramu vlažnog tkiva.

3.3. Statistička obrada rezultata

Statistička je analiza podataka načinjena pomoću programskog paketa SAS (Statistical Analysis Software) 9.4 (2002-2012 by SAS Institute Inc., Cary, SAD).

Deskriptivna je statistika načinjena pomoću SAS modula PROC MEANS i PROC FREQ. Normalna je raspodjela podataka testirana pomoću modula PROC UNIVARIATE, a homogenost/heterogenost varijanci podataka između grupa analizirana je Levene testom pomoću GLM modula (PROC GLM) i opcije HOVTEST. Kada su pretpostavke normalne distribucije analiziranih zavisnih varijabli bile narušene te kod heterogenosti varijanci različitih

skupina, načinjena je transformacija varijabli. Budući da je većina podataka imala asimetriju u desnu stranu upotrjebljene su transformacije logaritma na bazu 10 te inverzija podataka. Zaključci dobiveni testiranjem hipoteze na transformiranim podatcima u ovom radu odnose i na originalne podatke.

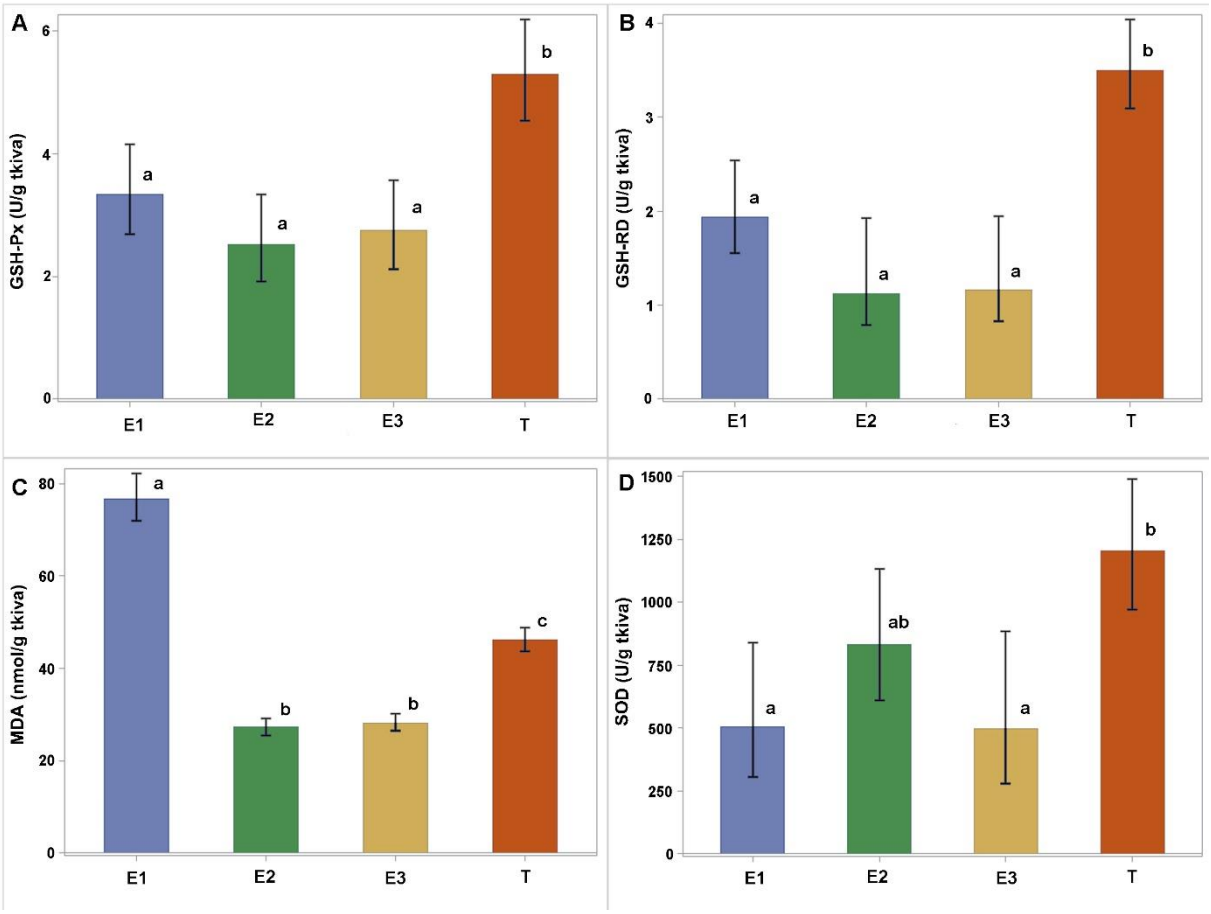
Generalni je linearni model (PROC GLM) uporabljen za analizu biokemijskih i antioksidacijskih pokazatelja te pokazatelja oksidacijskog stresa između tkiva testisa i različitih dijelova epididimisa. Rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti najmanjih kvadrata i 95 %-tni interval pouzdanosti, a izračunati su metodom najmanjih kvadrata (LSM - least squares means) korištenjem LSMEANS naredbe i opcija PDIFF i CL. Za usporedbu srednjih vrijednosti korištena je Tukey-Kramer-ova metoda višestrukih usporedbi na razini statističke značajnosti $P<0,05$. Rezultati su nakon analize, ukoliko su podatci bili transformirani, obrnutom transformacijom vraćeni na originalne vrijednosti (srednje vrijednosti najmanjih kvadrata i 95 %-tni interval pouzdanosti) i kao takvi prikazani u tekstu, tablici ili grafikonu.

Koeficijent je korelacije između različitih pokazatelja izračunat korištenjem CORR modula SAS-a (PROC CORR).

4. REZULTATI

4.1. Antioksidacijska zaštita i intenzitet lipidne peroksidacije

Dobivene vrijednosti pokazatelja antioksidacijske zaštite i intenziteta lipidne peroksidacije u testisima te u različitim dijelovima epididimisa spolno zrelih nerasta u kojima se nalaze spermiji različitog stupnja zrelosti prikazani su u Grafikonu 1.



Grafikon 1. Vrijednosti i raspon pokazatelja antioksidacijske zaštite (A, B, D) i intenziteta lipidne peroksidacije (C) u tkivima spolnog sustava nerasta (srednja vrijednost najmanjih kvadrata ± 95% CI)

[a,b]Vrijednosti označene različitim slovima značajno se razlikuju na razini statističke značajnosti $p<0,05$
GSH-Px - glutation peroksidaza; GSH-RD - glutation reduktaza; SOD - superoksid dismutaza; MDA - malondialdehid

Iz rezultata prikazanih u Grafikonu 1. uočljivo je da su se istraživani pokazatelji antioksidacijske zaštite i intenziteta lipidne peroksidacije u tkivima spolnog sustava nerasta razlikovali ovisno o anatomskoj lokaciji uzorkovanja. Najviša je aktivnost GSH-Px-a zabilježena u tkivu testisa (5,30 U/g), zatim u tkivu glave (3,34 U/g) i repu epididimisa (2,75 U/g) dok je najniža bila u tkivu tijela epididimisa (2,52 U/g). Usporedbom vrijednosti dobivenih rezultata, utvrđena je značajno viša aktivnost GSH-Px-a u tkivu testisa od onih izmjerenih u tkivu glave, tijela i repa epididimisa ($p<0,05$). Pri tome je aktivnost GSH-Px-a u testisima bila gotovo dvostruko viša od one u tijelu i repu epididimisa. Nadalje, najviša je aktivnost GSH-RD-a također zabilježena u testisima nerasta (3,50 U/g). U tkivu glave epididimisa izmjerena je gotovo dvostruko niža vrijednost 1,93 U/g od one u testisima, dok su aktivnosti GSH-RD-a u tijelu (1,12 U/g) i repu epididimisa (1,16 U/g) bile približno jednake i još niže u odnosnu na one u glavi epididimisa. Usporedbom rezultata, nakon statističke analize, utvrđena je značajno viša aktivnost GSH-RD-a u tkivu testisa u odnosu na onu u tkivu glave, tijela i repa epididimisa ($p<0,05$). Srednja vrijednost aktivnosti SOD-a također serazlikovala ovisno o istraživanim tkivima spolnog sustava nerasta. U repu je epididimisa izmjerena najniža aktivnost SOD-a (497,15 U/g), a slična je vrijednost zabilježena u glavi epididimisa (505,28 U/g). Međutim, najviša vrijednost SOD-a te ostalih antioksidacijskih enzima zabilježena je u testisima nerasta (1202,20 U/g), a u tijelu epididimisa zabilježena je prosječna vrijednost SOD-a od 830,1 U/g, ali je bila niža od one u testisima. Uočene razlike srednjih vrijednosti SOD-a u istraživanim tkivima spolnog sustava nerasta bile su i statistički značajne, pri tome je aktivnost SOD-a u testisu bila značajno viša u odnosu na one u glavi i repu epididimisa ($p<0,05$). Nadalje, najviša koncentracija MDA izmjerena je u glavi (76,69 nmoL/g), a najniža u tijelu epididimisa (27,19 nmoL/g). Malo viša vrijednost od one u tijelu epididimisa izmjerena je u repu epididimisa (28,19 nmoL/g), dok je koncentracija MDA u tkivu testisu (46,09 nmoL/g) bila viša od one u repu epididimisa. Koncentracija MDA u glavi epididimisa bila je statistički značajno viša od one u testisima, tijelu i repu epididimisa ($p<0,05$). Istodobno, statistički značajno niže vrijednosti MDA utvrđene su u tijelu i repu epididimisa u odnosu na onu u testisima ($p<0,05$).

4.2. Biokemijski pokazatelji

Dobivene vrijednosti biokemijskih pokazatelja u testisima spolno zrelih nerasta te u različitim dijelovima epididimisa sa spermijima različitog stupnja zrelosti prikazani su u Tablici 1.

Tablica 1. Vrijednosti i raspon biokemijskih pokazatelja u tkivima različitih dijelova spolnog sustava nerasta (srednja vrijednost najmanjih kvadrata ± 95% CI)

Pokazatelj	Testis	Glava epididimisa	Tijelo epididimisa	Rep epididimisa
GGT (U/g)	6,67^{b} (2,46 - 18,07)	24,92^{b} (18,67 - 33,28)	22,18^{b} (16,11 - 30,52)	53,43^{a} (45,12 - 63,28)
ACP (U/g)	1,80^{b} (1,23 - 2,62)	2,74^{ab} (2,14 - 3,51)	2,66^{ab} (2,00 - 3,53)	4,07^{a} (3,37 - 4,90)
LDH (U/g)	82,65^{b} (60,34 - 104,96)	120,03^{c} (97,71 - 142,34)	171,24^{a} (148,93 - 193,55)	105,00^{c} (82,69 - 127,31)
SMK (µmoL/g)	0,70^{ab} (0,36 - 1,04)	1,13^{b} (0,78 - 1,47)	1,20^{b} (0,86 - 1,54)	0,35^{a} (0,004 - 0,687)
TAG (µmoL/g)	3,18^{b} (2,61 - 3,75)	4,28^{a} (3,71 - 4,85)	3,08^{bc} (2,51 - 3,65)	2,05^{c} (1,48 - 2,62)
FOSFO (µmoL/g)	2,07 (1,58 - 2,55)	2,89 (2,41 - 3,38)	2,77 (2,28 - 3,25)	2,36 (1,87 - 2,84)
KOLE (µmoL/g)	*	*	*	0,26 (0,18 – 0,34)

^{a,b}Vrijednosti u istom redu označene različitim slovima značajno se razlikuju na razini statističke značajnosti $p<0,05$

* koncentracije nisu bile mjerljive

GGT - gama glutamil transferaza; ACP - kisela fosfataza; LDH - laktat dehidrogenaza; SMK - slobodne masne kiseline; TAG.- triacilgliceroli; FOSFO - fosfolipidi; KOLE – kolesterol

Iz rezultata prikazanih u Tablici 1. uočljivo je da su se istraživani biokemijski pokazatelji u tkivima spolnog sustava nerasta razlikovali ovisno o anatomskoj lokaciji uzorkovanja. U repu epididimisa zabilježena je najviša srednja vrijednost aktivnosti GGT-a (53,43 U/g), a najniža je vrijednost zabilježena u tkivu testisa (6,67 U/g). Približno jednake vrijednosti GGT-a zabilježene su u glavi (24,92 U/g) i tijelu epididimisa (22,18 U/g). Statističkom analizom utvrđena je značajno viša vrijednost GGT-a u repu epididimisa u odnosu na onu u testisima, glavi i tijelu epididimisa ($p<0,05$). Kao i kod GGT-a, srednja vrijednost aktivnosti LDH-a bila je najniža u testisima (82,65 U/g), a najviša u tijelu epididimisa (171,24 U/g). Niža aktivnost LDH-a od one u testisima zabilježena je u glavi (120,03 U/g), a još niža u repu epididimisa (105,00 U/g). Uočene razlike srednjih vrijednosti LDH-a u različitim

tkivima spolnog sustava nerasta bile su i statistički značajne, tako da je aktivnost LDH-a u tijelu epididimisa bila značajno viša u odnosu na onu u testisima, glavi i repu epididimisa ($p<0,05$). Istodobno, statistički značajno niže vrijednosti aktivnosti LDH-a utvrđene su u glavi i repu epididimisa u odnosu na onu u testisima ($p<0,05$). Najviša je aktivnost ACP-a izmjerena u repu (4,07 U/g), zatim u glavi (2,74 U/g) i tijelu epididimisa (2,66 U/g) dok je najniža bila u tkivu testisa (1,80 U/g). Usporedbom rezultata, utvrđena je značajno viša aktivnost ACP-a u repu epididimisa u odnosu na onu u testisima ($p<0,05$). Koncentracija SMK-a bila je najviša u tijelu epididimisa (1,20 μmoL/g), zatim u glavi epididimisa (1,13 μmol/g), testisima (0,70 μmoL/g) dok je najniža bila u repu epididimisa (0,35 μmoL/g). Vrijednost SMK-a bila je značajno niža u repu epididimisa u odnosu na onu u glavi i tijelu epididimisa ($p<0,05$). Nadalje, najniža je koncentracija TAG-a izmjerena u tkivu repa (2,05 μmoL/g), a najviša u tkivu glave epididimisa (4,28 μmoL/g). Slične koncentracije TAG-a zabilježene su u tkivu testisa (3,18 μmoL/g) i tijela epididimisa (3,08 μmoL/g). Usporedbom dobivenih vrijednosti, utvrđena je značajno viša koncentracija TAG-a u glavi epididimisa u odnosu na onu u tkivu testisa i repa epididimisa ($p<0,05$). Koncentracije fosfolipida u testisima i različitim dijelovima epididimisa bile su približno jednakih vrijednosti te se nisu međusobno značajnije razlikovale ($p>0,05$). Koncentracija kolesterola bila je mjerljiva jedino u repu epididimisa.

4.3. Korelacije istraživanih pokazatelja

Dobivene korelacije između istraživanih biokemijskih pokazatelja te pokazatelja antioksidacijske zaštite i oksidacijskog stresa u testisima spolno zrelih nerasta te u različitim dijelovima epididimisa sa spermijima različitog stupnja zrelosti prikazane su u Tablici 2.

Tablica 2. Koeficijent korelacije (r) između istraživanih biokemijskih pokazatelja te pokazatelja antioksidacijske zaštite i oksidacijskog stresa u tkivima različitih dijelova spolnog sustava nerasta

	GSH-Px	GSH-RD	SOD	MDA	GGT	LDH	ACP	SMK	TAG	FOSFO	KOLE
GSH-Px		0,880 <0,05	n.s.	0,635 <0,05	-0,602 <0,05	-0,516 <0,05	-0,486 <0,05	n.s.	n.s.	n.s.	-0,464 <0,05
GSH-RD	0,880 <0,05		0,463 <0,05	0,693 <0,05	-0,626 <0,05	-0,457 <0,05	-0,493 <0,05	n.s.	0,451 <0,05	n.s.	-0,464 <0,05
SOD	n.s.	0,463 <0,05		n.s.	-0,451 <0,05	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
MDA	0,635 <0,05	0,693 <0,05	n.s.		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	0,550 <0,05	n.s.	n.s.
GGT	-0,602 <0,05	-0,626 <0,05	-0,451 <0,05	n.s.		n.s.	0,564 <0,05	n.s.	n.s.	n.s.	0,741 <0,05
LDH	-0,516 <0,05	-0,457 <0,05	n.s.	n.s.	n.s.		n.s.	0,653 <0,05	n.s.	0,468 <0,05	n.s.
ACP	-0,486 <0,05	-0,493 <0,05	n.s.	n.s.	0,564 <0,05	n.s.		n.s.	n.s.	n.s.	0,569 <0,05
SMK	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	0,653 <0,05	n.s.		0,585 <0,05	0,553 <0,05	-0,676 <0,05
TAG	n.s.	0,451 <0,05	n.s.	0,550 <0,05	n.s.	n.s.	n.s.	0,585 <0,05		0,547 <0,05	-0,696 <0,05
FOSFO	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	0,468 <0,05	n.s.	0,553 <0,05	0,547 <0,05		n.s.
KOLE	n.s.	-0,464 <0,05	n.s.	n.s.	0,741 <0,05	n.s.	0,569 <0,05	-0,676 <0,05	-0,696 <0,05	n.s.	

U tablici su prikazani samo podatci s koeficijentom korelacije većim od ± 0,400 te statistički značajni podatci ($p<0,05$).
n.s. – nije statistički značajno
GSH-Px - glutation peroksidaza; GSH-RD - glutation reduktaza; SOD - superoksid dismutaza; MDA – malondialdehid; GGT - gama glutamil transferaza; LDH - laktat dehidrogenaza; ACP - kisela fosfataza; SMK - slobodne masne kiseline; TAG.- triacilgliceroli; FOSFO - fosfolipidi; KOLE – kolesterol

5. RASPRAVA

Mehanizam nastanka ROS-a nije u potpunosti razjašnjen, no u više je studija utvrđeno da ROS nastaju kao sporedni proizvodi staničnih procesa koji se zbivaju tijekom steroidogeneze i spermatogeneze u testisima, ali i tijekom sazrijevanja i skladištenja spermija u epididimisima (KOZIOROWSKA-GILUN i sur., 2013.). Fiziološki procesi spermatogeneze, sazrijevanja, prolaska i pohrane spermija u epididiimisu zahtjevaju povoljne uvjete kako bi spermiji stekli funkcionalne sposobnosti za oplodnju jajne stanice. Zaštitu navedenih procesa u testisima i epididimisima od štetnih učinaka ROS-a osiguravaju uglavnom antioksidacijski enzimi, koji imaju komplementarne funkcije u stanicama tkiva spolnog sustava i spermijima (KOZIOROWSKA-GILUN i sur., 2015.).

Prema našim saznanjima, još uvijek nisu provedena istraživanja koja bi utvrđivala aktivnost antioksidacijskih enzima i koncentraciju pokazatelja lipidne peroksidacije u tkivima spolnog sustava nerasta. Rezultati ovoga istraživanja ukazuju da se pokazatelji antioksidacijske zaštite i intenziteta lipidne peroksidacije u tkivima spolnog sustava nerasta značajno razlikuju ovisno o anatomskoj lokaciji uzorkovanja. Tako je u tkivu testisa utvrđena značajno viša aktivnost GSH-Px-a i GSH-RD-a od onih izmjerenih u tkivu glave, tijela i repa epididimisa. Istodobno je aktivnost GSH-Px-a u testisima bila gotovo dvostruko viša od one u tijelu i repu epididimisa. Dobiveni se rezultati podudaraju s rezultatima istraživanja KOZIOROWSKA-GILUN i sur. (2013.) i KOZIOROWSKA-GILUN i sur. (2015.), koji su također u tkivu testisa bivola i jelena utvrdili značajno veću aktivnost GSH-Px-a u odnosu na onu u tkivima glave, tijela i repa epididimisa. Međutim, u istraživanju KOZIOROWSKA-GILUN i sur. (2013.) utvrđena je gotovo tri puta viša aktivnost GSH-Px-a u tijelu epididimisa bivola u odnosu na onu u glavi i repu epididimisa, dok je u našem istraživanju utvrđena najniža aktivnost GSH-Px-a u tijelu epididimisa nerasta. Nadalje, rezultati ovog istraživanja upućuju na istovjetnu pojavnost i značajnost aktivnosti GSH-Px-a i GSH-RD-a u tkivu testisa glave, tijela i repa epididimisa, što ukazuje na njihovo sinergijsko djelovanje i učinak u zaštitnim antioksidacijskim sustavima koji su potrebni za regulaciju redoks potencijala pri tvorbi, sazrijevanju i pohrani spermija u mikrookolišu epididimisa. Utvrđena pozitivna korelacija GSH-Px-a i GSH-RD-a ($r=0,880$; $p<0,05$) dodatno potvrđuje navedeno. Pripominjemo da se komplementarni učinak istraživanih enzima očituje time da SOD dismutira $O_2^{\bullet-}$ u H_2O_2, kojeg tada GSH-Px uklanja uz oksidaciju reduciranog glutationa (GSH), a oksidirani se glutation (GSSG) zatim pomoću NADPH-a i enzima GSH-RD-a prevodi u GSH (KOZIOROWSKA-GILUN i sur., 2011., BRIGELIUS-FLOHE i MAIORINO, 2013., LJUBIČIĆ i sur., 2013.).

Prema rezultatima ovoga istraživanja aktivnost SOD-a u tkivu testisa nerasta je bila značajno viša u odnosu na onu u glavi i repu epididimisa. Utvrđena značajno viša aktivnost SOD-a, GSH-Px-a i GSH-RD-a u tkivu testisa te pozitivna korelacija aktivnosti SOD-a i GSH-RD-a ($r=0,463$; $p<0,05$) dodatno potvrđuje da navedeni enzimi imaju komplementarne funkcije u zaštitnim antioksidacijskim sustavima muškog spolnog sustava. U ovom istraživanju utvrđena višestruko viša aktivnosti SOD-a, u odnosu na aktivnost GSH-Px-a, u tkivima spolnog sustava nerasta u suglasju je s rezultatima KOZIOROWSKA-GILUN i sur. (2011.). Navedeni autori pripisuju SOD-u najznačajniju enzimsku funkciju u zaštiti tkiva i spermija od štetnih učinaka ROS-a. Rezultati ovog istraživanja ukazuju na važnost visoke aktivnosti istraživanih antioksidacijskih enzima u testisima nerasta, koja je potrebna kako bi primjereno zaštitila spermije i stanice tkiva testisa od oksidacijskog oštećenja tijekom procesa spermatogeneze i steroidogeneze. Štoviše, spolni hormoni koji se lokalno stvaraju i izlučuju imaju znatan i neposredan utjecaj na enzimski antioksidacijski status u mikrookolišu testisa i epididimisa (AITKEN i ROMAN, 2008.). Naši rezultati suprotni su rezultatima KOZIOROWSKA-GILUN i sur. (2013.) koji su utvrdili značajno višu aktivnost SOD-a u repu epididimisa spolno zrelih bizona u odnosu na onu u tkivu testisa i glavi epididimisa. Zabilježene slične vrijednosti SOD-a u glavi i repu epididimisa nerasta u ovom istraživanju, također nisu sukladni rezultatima prethodno navedenih autora. Naime, KOZIOROWSKA-GILUN i sur. (2013.) su utvrdili slične aktivnosti SOD-a u tkivu tijela i repa epididimisa. No, ni rezultati KOZIOROWSKA-GILUN i sur. (2015.) nisu u suglasju s našim rezultatima, gdje je u sezoni parenja ustvrđena značajno viša aktivnost SOD-a u tkivima glave i tijela epididimisa jelena, u odnosu na onu u testisima i repu epididimisa. Nepodudarnost između naših i njihovih rezultata mogla bi se pripisati vrsnim razlikama, različitoj dobi i reproduktivnom statusu istraživanih životinja.

U ovom je istraživanju utvrđena značajno viša koncentracija MDA u glavi epididimisa od one u testisima, tijelu i repu epididimisa te značajno viša koncentracija MDA u tkivu testisa u odnosu na one u tijelu i repu epididimisa. Isto je tako utvrđena pozitivna korelacija koncentracije MDA s aktivnosti GSH-Px-a ($r=0,635$; $p<0,05$) i aktivnosti GSH-RD-a ($r=0,693$; $p<0,05$) u tkivima spolnoga sustava nerasta u ovom istraživanju što ukazuje na utjecaj koncentracije MDA na aktivnosti antioksidacijskih enzima. Organizam, odnosno tkivo uslijed povećanog stvaranja ROS-a pojačano stvara antioksidanse kako bi se održala ravnoteža između stvaranja antioksidansa i uklanjanja prekomjerne količine ROS-a. U nerasta se GSH-Px uglavnom izlučuje u glavi epididimisa gdje su spermiji najkoncentriraniji (DACHEUX i sur., 2005.). Slični rezultati dobiveni su i u ovom istraživanju, odnosno u glavi epidimisa utvrđena je viša aktivnost GSH-Px-a i koncentracija MDA u odnosu na tijelo i rep epididimisa, što bi

moglo biti popraćeno povećanim stvaranjem ROS-a zbog najveće koncentracije spermija i najintenzivnijih staničnih procesa u tim tkivima. GSH-Px katalizira reakcije u uklanjanju mnogih peroksida, uključujući i lipidne perokside, čime se osigurava bolja antioksidativna zaštita zametnih stanica i spermija od oštećenja prouzročenih ROS-om u spolnom sustavu (DREVET, 2006.). Dobiveni rezultati ovoga istraživanja ukazuju da su tkiva glave epididimisa i testisa nerasta najpodložnija lipidnoj peroksidaciji uslijed pojačanog stvaranja ROS-a.

Rezultati ovog istraživanja ukazuju da je u tkivu testisa nerasta zabilježena najniža aktivnost istraživanih biokemijskih enzima i najviša aktivnost antioksidacijskim enzimima, što je potvrđeno i njihovim međusobnim negativnim korelacijama (Tablica 2.). Najviše vrijednosti GGT-a i ACP-a izmjerene su u repu epididimisa, a LDH-a u tijelu epididimisa. Enzim GGT ima zaštitnu funkciju protiv oksidacijskog stresa tijekom spermatogeneze, dozrijevanja i pohranjivanja spermija u epididimisu (SELIGMAN i sur., 2005., LÓPEZ RODRÍGUEZ i sur., 2013.). Nadalje, taj se enzim nalazi u području akrosome i središnjem dijelu spermija nerasta (FUNAHASHI i sur., 1996.) te je važan u održavanju njihove gibljivosti i brzine hiperaktivacije (IRVINE, 1996., STEFANOV i sur., 2013.). Naši rezultati nisu u suglasju sa rezultatima KOHDAIRA i sur. (1986.) i SELIGMAN i sur. (2005.), koji su pronašli najveću aktivnost GGT-a u glavi epididimisa štakora. Našim je istražiavnjem utrvđena značajno manja aktivnost GGT-a u glavi i tijelu epididimisa u odnosu na one u repu epididimisa nerasta. Dobiveni rezultati mogu upućivati na važnost unutarstaničnog glutationa, kojeg osigurava GGT, u zaštiti spermija nerasta od oksidacijskog stresa tijekom njihovog pohranjivanja u repu epididimisa. Najvjerojatniji uzrok nepodudarnosti naših rezultata s onim drugih autora jesu vrsno specifične razlike.

ACP je uključena u fosforilacijsko-defosforilacijske procese bjelančevina koji oblažu spermije i tako mijenjaju njihovu funkciju, a što je povezano sa sazrijevanjem spermija u epididimisu. Osim toga ACP se nalazi i u izvanjskoj akrosomalnoj membrani, odnosno sastavni je dio staničnih membrana spermija (SOUCEK i VARY, 1984.). U ovome je istraživanju aktivnost ACP bila najviša u tkivu repa epididimisa u odnosu na ostale dijelove epididdimisa te značajno viša u odnosu na onu u testisima. Dobiveni se rezultati djelomično podudaraju sa stajalištem WYSOCKI i STRZEZEK, (2006.), koji smatraju da se ACP sintetizira u repu epididimisa nerasta. Rezultati naših istraživanja ukazuju da se ACP sintetizira u svim dijelovima epididimisa, a najviša je aktivnost zabilježena u tkivu repa epididimisa nerasta.

LDH sudjeluje u metaboličkim staničnim procesima u kojima se stvara energija za spermatogenezu, diferencijaciju, sazrijevanje, preživljavanje i gibljivost spermija (DIACONESCU i sur., 2014.). Rezultati istraživanja EGBUNIKE i sur. (1986.) ne podudaraju

se s našima jer su autori ustvrdili značajno višu vrijednost LDH u spermijima nerasta iz testisa u odnosu na onu iz spermija glave epididimisa, a manje su razlike u vrijednostima LDH-a uočene u preostalim dijelovima epididmisima. Međutim, rezultati našeg istraživanja ukazuju na značajno nižu vrijednost LDH-a u testisima te značajno višu vrijednost LDH-a u tijelu epididimisa u odnosu na preostale dijelove epididimisa. Dobiveni bi se rezultati mogli protumačiti činjenicom da su metabolički stanični procesi u kojima sudjeluje LDH za osiguravanje energije spermija intenzivniji u tijelu epididimisa u odnosu na one u testisima. Različita dob nerasta, pasmina te pokusni dizajn mogući su uzroci nepodudarnosti naših rezultata s onima drugih autora.

Biokemijske modifikacije sterola i masnih kiselina koji se zbivaju u epididimisu imaju izravan utjecaj na građu i dinamiku staničnih membrana spermija (SAEZ i sur., 2011.). Kolesterol regulira fluidnost stanične membrane, te se tijekom sazrijevanja spermija ugrađuje u stanične membrane spermija (JACYNO i sur., 2009.). Tijekom ove promjene u staničnim membranama spermija smanjuje se zastupljenost fosfolipida, a kolesterola povećava pa se povećava omjer kolesterola i fosfolipida (NIKOLOPOULOU i sur., 1985., REJRAJI i sur., 2006.). Stanična membrana spermija i sjemena plazma nerasta sadrži mnogo manje kolesterola u usporedbi s drugim vrstama (JACYNO i sur., 2009., DIACONESCU i sur., 2014.). Slični nalaz potvrđuju i rezultati ovog istraživanja gdje je koncentracija kolesterola bila mjerljiva jedino u repu epididimisa, a što ukazuje da se veća koncentracija kolesterola sintetizira u repu epididimisa. Nadalje, koncentracija fosfolipida nije se značajno razlikovala između različitih dijelova spolnog sustava nerasta, iako je zabilježen pad koncentracije fosfolipida u tkivu epididimisa, i to od glave prema repu.

U nedostatku supstrata za glikolizu, endogeni i egzogeni lipidi imaju značajnu funkciju u opskrbi spermija energijom za njihovu gibljivost i održivosti (SCOTT i DAWSON, 1968., BEER-LJUBIĆ i sur., 2009., JUYENA i STELLETTA, 2012.). U ovom istraživanju utvrđena je značajno viša koncentracija TAG-a i SMK-a u tkivu glave epididimisa u odnosu na rep epididimisa, a dobivena pozitivna korelacija TAG-a i SMK-a potvrđuje njihovu proporcionalnu povezanost ($r=0,585$; $p<0,05$). Dobiveni rezultati mogu ukazivati na povećanu sintezu TAG-a i SMK-a u glavi epididimisa ili na njihovu povećanu potrošnju tijekom pohranjivanja spermija u repu epididimisa. Nužna su daljnjaistraživanja u razjašnjavanju složenih funkcija i optimalnih količina lipida tijekom procesa tvorbe, sazrijevanja i pohranjivanja spermija u epididimisu. Istraživanje ovog područja fiziologije reprodukcije zasigurno će doprinijeti boljem razumijevanju muške neplodnosti nerasta zbog pojave dislipidemije pri tvorbi i sazrijevanju spermija.

6. ZAKLJUČCI

Istraživani pokazatelji antioksidacijske zaštite, intenziteta lipidne peroksidacije i biokemijski pokazatelji značajno su se razlikovali ovisno o anatomskoj lokaciji uzorkovanja u tkivima spolnog sustava nerasta.

Visoka aktivnost svih istraživanih antioksidacijskih enzima (SOD, GSH-Px i GSH-RD) u testisima nerasta nužna je za primjerenu zaštitu spermija i stanica tkiva testisa od oksidacijskog oštećenja tijekom procesa spermatogeneze i steroidogeneze. Utvrđene pozitivne korelacije između aktivnosti navedenih enzima potvrđuju da oni imaju komplementarne funkcije u zaštitnim antioksidacijskim sustavima muškog spolnog sustava.

Najviše izmjerene vrijednosti MDA u tkivima glave epididimisa i testisima ukazuju da su tkiva glave epididimisa i testisa nerasta najpodložnija lipidnoj peroksidaciji zbog pojačanog stvaranja ROS-a te najveće koncentracije spermija i najintenzivnijih staničnih procesa u tim tkivima. Utvrđene pozitivne korelacije koncentracije MDA s aktivnosti antioksidacijskih enzima u tkivima spolnoga sustava nerasta ukazuju na njihovu povezanost i direktnu proporcionalnu međuovisnost.

Značajno viša aktivnost GGT-a u repu epididimisa u odnosu na ostale dijelove epididimisa upućuje na značajnost unutarstaničnog glutationa, kojeg osigurava GGT, u zaštiti spermija nerasta od oksidacijskog stresa tijekom njihovog pohranjivanja u repu epididimisa.

Rezultati ovog istraživanja ukazuju da se sinteza ACP-a ovija u svim dijelovima epididimisa nerasta, a ne samo u repu epididimisa, iako je u repu epididimisa zabilježena njena najviša aktivnost.

Budući da je u različitim dijelovima spolnog sustava nerasta utvrđena različita količina i sastav lipida, dobiveni rezultati ukazuju na važnost daljnjih istraživanja koji su nužna u razjašnjavanju složenih funkcija i optimalnih količina lipida tijekom procesa tvorbe, sazrijevanja i pohranjivanja spermija u epididimisu. Istraživanje ovog područja fiziologije reprodukcije nerasta zasigurno će pridonijeti boljem razumijevanju muške neplodnosti nastale kao posljedica dislipidemije pri tvorbi i sazrijevanju spermija.

7. LITERATURA

1. AITKEN, R. J. and D. SAWYER (2003): The human spermatozoon - not waving but drowning. Adv. Exp. Med. Biol. 518, 85-98.
2. AITKEN, R. J., K. WEST and D. W. BUCKINGHAM (1994): Leukocytic infiltration into the human ejaculate and its association with semen quality, oxidative stress and sperm function. J. Androl. 15, 343-352.
3. AITKEN, R. J., S. D. ROMAN (2008): Antioxidant systems and oxidative stress in the testes. Oxid. Med. Cell. Longev. 1, 15-24.
4. ALVAREZ, J. G., J. C. TOUCHSTONE, L. BLASCO, B. T. STOREY (1987): Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa Superoxide dismutase as major enzyme protectant against oxygen toxicity. J. Androl. 8, 338-348.
5. ARROTÉIA, K. F., P. V. GARCIA, M. F. BARBIERI, M. L. JUSTINO, L. A. V. PEREIRA (2012). The Epididymis: Embryology, Structure, Function and Its Role in Fertilization and Infertility, Embryology - Updates and Highlights on Classic Topics, Prof. Luis Violin Pereira (Ed.), ISBN: 978- 953-51-0465-0, InTech, Available from: http://www.intechopen.com/books/embryology-updates-and-highlightson-classic topics/the-epididymis-embryology-structure-function-and-its-role-in-fertilization-and-infertility.
6. BANSAL A. K., G. S. BILASPURI (2011): Impacts of Oxidative Stress and Antioxidants on Semen Functions. Vet. Med. Int. Article ID 686137, 7 pages doi:10.4061/2011/686137
7. BEER-LJUBIĆ, B., J. ALADROVIĆ, T. S. MARENJAK, R. LAŠKAJ, I. MAJIĆ-BALIĆ, S. MILINKOVIĆ-TUR (2009): Cholesterol concentration in seminal plasma as a predictive tool for quality semen evaluation. Theriogenology 72, 1132-1140.
8. BEU, C. C. L., A. M. ORSI, R. F. DOMENICONI, E. L. B. NOVELLI (2007): Localization of total proteins and lactate dehydrogenase in hamster epididymis. Int. J. MorphoL. 25, 259-264.
9. BRIGELIUS-FLOHÉ, R., M. MAIORINO (2013): Glutathione peroxidases, Biochim. Biophys. Acta 1830, 3289-3303.
10. CAMPBELL, J. R., M. D. KENEALYAND, K. L. CAMPBELL (2003): Anatomy and physiology of reproduction and related technologies in farm mammals. In: Animal Sciences. The Biology, Care and Production of Domestic Animals. (Campbell, J. R., M.

D. Kenealyand, K. L. Campbell, Eds.), McGraw-Hill Companies Inc., New York, pp. 219 - 240.

11. 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.
12. CERGOLJ, M., M. SAMARDŽIJA (2006): Veterinarska andrologija. Veterinarski fakultet. Zagreb.
13. CHABORY E., C. DAMON, A. LENOIR, J. HENRY-BERGER, P. VERNET, R. CADET, F. SAEZ, J. R. DREVET (2010): Mammalian glutathione peroxidases control acquisition and maintenance of spermatozoa integrity. J. Anim. Sci. 88 (4), 1321-1331.
14. CROSS, N. L. (1998): Role of cholesterol in sperm capacitation. Biol. Reprod. 59, 7 - 11.
15. CUMMINS, J. M., A. M. JEQUIER and K. RAYMOND (1994): Molecular biology of human male infertility: Links with aging, mitochondrial genetics and oxidative stress. Mol. Rep. Dev. 37, 345-362.
16. DACHEUX, J.-L., S. CASTELLA, J. L. GATTI, F. DACHEUX (2005): Epididymal cell secretory activities and the role of proteins in boar sperm maturation. Theriogenology 63, 319-341.
17. DAVIES, M. J. (2003): Singlet oxygen-mediated damage to proteins and its consequences. Biochem. Biophys. Res. Comm. 305, 761-770.
18. De LAMIRANDE, E. and C. GAGNON (1993): A positive role for the superoxide anion in triggering hyperactivation and capacitation of human spermatozoa. Int. J. Androl. 16, 21-25.
19. DIACONESCU, C., M. MATEI, G. TĂLPU, P. TĂPĂLOAGĂ (2014): Comparative physicochemical and biochemical characterization of bull and boar semen. Scientific Papers. Series D. Animal Science. LVII, 141 - 145.
20. DREVET, J. R. (2006): The antioxidant glutathione peroxidase family and spermatozoa: a complex story. Mol. Cell Endocrinol. 250, 70-79.
21. EGBUNIKE, G. N., W. BRANSCHEID, J. PFISTERER, W. HOLTZ (1986): Changes in porcine sperm lactate dehydrogenase isoenzymes during sperm maturation. Andrologia 18, 108-113.
22. FABIOLA ARROTÉIA, K., P. V. GARCIA, M. F. BARBIERI, M. L. JUSTINO, L. A. VIOLIN PEREIRA (2012): The Epididymis: Embryology, Structure, Function and Its Role in Fertilization and Infertility. In: Embryology - Updates and Highlights on Classic

Topics, (Violin Pereira, L., Ed.), ISBN: 978-953-51-0465-0, InTech, Available from: http://www.intechopen.com/books/embryology-updates-and-highlightson-classic-topics/the-epididymis-embryology-structure-function-and-its-role-in-fertilization-and-infertility (20.3. 2015.)

23. FUNAHASHI, H., Z. MACHATY, R. S. PRATHER, B. N. DAY (1996): Gamma-glutamyl transpeptidase of spermatozoa may decrease oocyte glutathione content at fertilization in pigs. Mol. Reprod. Dev. 45, 485-490.
24. GIROTTI, A. W. (1998): Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. J. Lipid Res. 39, 1529-1542.
25. GROTTO, D., L. D. SANTA MARIA, S. BOEIRA, J. VALENTINI, M. F. CHARÃO, A. M. MORO, P. C. NASCIMENTO, V. J. POMBLUM, S. C. GARCIA (2007): Rapid quantification of malondialdehyde in plasma by high performance liquid chromatography–visible detection. J. Pharm. Biomed. Anal. 43, 619-624.
26. GUÉRAUD, F., M. ATALAY, N. BRESGEN, A. CIPAK, P. M. ECKL, L. HUC, I. JOUANIN, W. SIEMS, K. UCHIDA (2010): Chemistry and biochemistry of lipid peroxidation products. Free Radical Res. 44, 1098-1124.
27. GUYTON, A. C., J. E. HALL (2006): Reprodukcijske i hormonske funkcije muškaraca; epifiza. U: Medicinska fiziologija. (Guyton, A. C., J. E. Hall, Eds.), Medicinska naklada, Zagreb, str. 996 - 1009.
28. HALES, D. B., J. ALLEN, T. SHANKARA, P. JANUS, S. BUCK, T. DIEMER, K. HELD HALES (2005): Mitochondrial function in Leydig cell steroidogenesis. Ann. N. Y. Acad .Sci. 1061, 120-134.
29. IRVINE, D. S. (1996): Glutathione as a treatment for male infertility. Rev. Reprod. 1, 6 - 12.
30. JACYNO, E., A. KOŁODZIEJ, M. KAWĘCKA, A. PIETRUSZKA, B. MATYSIAK, M. KAMYCZEK (2009): The relationship between blood serum and seminal plasma cholesterol content in young boars and their semen qualitative traits and testes size. Arch. Tierzucht 52, 161-168.
31. JUYENA, N. S., C. STELLETTA (2012): Seminal plasma: an essential attribute to spermatozoa. J. Androl. 33, 536-551.
32. l DURU, N., M. MORSHEDI and S. OEHNINGER (2000): Effects of hydrogen peroxide on DNA and plasma membrane integrity of human spermatozoa. Fertil. Steril. 74, 1200-1207.

33. KOHDAIRA, T., Y. KINOSHITA, M. KONNO, H. OSHIMA (1986): Distribution of gamma-glutamyl transpeptidase in male reproductive system of rats and its age-related changes. Andrologia 18,610-617.
34. KOZARIĆ, Z. (1998): Spolni sustav. U: Veterinarska histologija (Bošnjak, M., ur.). Naklada Karolina. Zagreb, str. 195 - 211.
35. KOZIOROWSKA-GILUN, M., P. GILUN, L. FRASER, M. KOZIOROWSKI, W. KORDAN, S. STEFANCZYK-KRZYMOWSKA (2013): Antioxidant Enzyme Activity and mRNA Expression in Reproductive Tract of Adult Male European Bison (Bison bonasus, Linnaeus 1758). Reprod. Dom. Anim. 48, 7-14.
36. KOZIOROWSKA-GILUN, M., L. FRASERA, P. GILUNB, M. KOZIOROWSKIC, W. KORDANA (2015): Activity of antioxidant enzymes and their mRNA expressionin different reproductive tract tissues of the male roe deer (Capreolus capreolus) during the pre-rut and rut seasons. Small Rumin. Res. 129, 97-103.
37. KOZIOROWSKA-GILUN, M., M. KOZIOROWSKI, L FRASER, J STRZEZEK (2011): Antioxidant Defence System of Boar Cauda Epididymidal Spermatozoa and Reproductive Tract Fluids. Reprod. Dom. Anim. 46, 527-533.
38. 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.
39. LJUBIČIĆ, I., L. RADIN, I. ŽURA ŽAJA, J. PEJAKOVIĆ HLEDE i S. MILINKOVIĆ-TUR (2013): Slobodni radikali, oksidacijski stres i parazitarne bolesti. Vet. stn. 44, 285-297.
40. NIKOLOPOULOU, M., D. A. SOUCEK, J. C. VARY (1985): Changes in the lipid content of boar sperm plasma membranes during epididymal maturation. Biochim. Biophys. Acta 815, 486-98.
41. NOBLANC, A., A. KOCER, J. R. DREVET (2012): Post-testicular protection of male gametes from oxidative damage. The role of the epididymis. Med. Sci. 28,519-525.
42. OGBUEWU, I. P., N. O. ALADI, I. F. ETUK, M. N. OPARA, M. C. UCHEGBU, I. C. OKOLI and M. U. ILOEJE (2010): Relevance of oxygen free radicals and antioxidants in sperm production and function. Res. J. Vet. Sci. 3, 138-164.
43. POLJSAK, B., D. ŠUPUT and I. MILISAV (2013): Achieving the balance between ros and antioxidants: when to use the synthetic antioxidants. Oxid. Med. Cell Longev. Article ID 956792, 11 pages. doi:10.1155/2013/956792

44. RAESIDE, J. I., R. L. RENAUD (1983): Estrogen and androgen production by purified leydig cells of mature boars. Biol. Reprod. 28, 727-733.
45. RAHAL, A., A. KUMAR, V. SINGH, B. YADAV, R. TIWARI, S. CHAKRABORTY and K. DHAMA (2014): Oxidative Stress, Prooxidants, and Antioxidants: The Interplay. Biomed. Res. Int. Article ID 761264, 19 pages http://dx.doi.org/10.1155/2014/761264
46. REECE, W. O. (2004): Dukes' physiology of domestic animals. 12th ed., Cornell University Press. Ithaca, London.
47. REJRAJI, H., B. SION, G. PRENSIER, M. CARRERAS, C. MOTTA, J.-M. FRENOUX, E. VERICEL, G. GRIZARD, P. VERNET, J. R. DREVET (2006): Lipid remodeling of murine epididymosomes and spermatozoa during epididymal maturation. Biol. Res. 74, 1104-1113.
48. SAEZ, F. A. OUVRIER, J. R. DREVET (2011): Epididymis cholesterol homeostasis and sperm fertilizing ability Asian Journal of Andrology 13, 11-17.
49. SANOCKA, D. and M. KURPISZ (2004): Reactive oxygen species and sperm cells. Reprod. Biol. Endocrinol. 2, 1-7.
50. SCOTT, T. W., R. M. C. DAWSON (1968): Metabolism of phospholipids by spermatozoa and seminal plasma. Biochem. J. 108, 457-463.
51. SELIGMAN, J., G. L. NEWTON, R. C. FAHEY, R. SHALGI, N. S. KOSOWER (2005): Nonprotein thiols and disulfides in rat epididymal spermatozoa and epididymal fluid: role of g-glutamyl-transpeptidase in sperm maturation. J. Androl. 26, 629-637.
52. SIKKA, S. C. (2001): Relative impact of oxidative stress on male reproductive function. Curr. Med. Chem. 8, 851-862.
53. SJAASTAD, Ø.V., O. SAND, K. HOVE (2017): Fiziologija domaćih životinja. Naklada Slap, Zagreb, 683-734.
54. SOUCEK, D. A., J. C. VARY (1984): Some properties of acid and alkaline phosphatases from boar sperm plasma membranes. Biol. Reprod. 31, 687-693.
55. STEFANOV, R., D. ABADJIEVA, M. CHERVENKOV, E. KISTANOVA, D. KACHEVA, P. TAUSHANOVA, B. GEORGIEV (2013): Enzyme activities and motility of boar spermatozoa during 72-hour lowtemperature storage. Bulg. J. Vet. Med. 16, 237-242.
56. SYNTIN, P., F. DACHEUX, X. DRUART, J. L. GATTI, N. OKAMURA, J. L. DACHEUX (1996): Characterization and identification of proteins secreted in the various regions of the adult boar epididymis. Biol. Reprod. 55, 956-974.

57. SYNTIN, P., J. L. DACHEUX, F. DACHEUX (1999): Postnatal development and regulation of proteins secreted in the boar epididymis. Biol. Reprod. 61,1622-1635.
58. ŠVERKO, A. (2011): Povezanost pojavnosti i proširenosti bubrežnog karcinoma i tkivne ekspresije citokroma P450. Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, Hrvatska.
59. THIMON, V., G. FRENETTE, F. SAEZ, M. THABET, R. SULLIVAN (2008): Protein composition of human epididymosomes collected during surgical vasectomy reversal: a proteomic and genomic approach. Hum. Reprod. 23, 1698-1707.
60. VERNET, P., R. J. AITKEN, J. R. DREVET (2004): Antioxidant strategies in the epididymis. Mol. Cell Endocrinol. 216, 31-39.
61. WAGNER, B. A., G. R. BUETTNER, C. P. BURNS (1994): Free radical mediated lipid peroxidation in cells: Oxidizability is a function of cell lipid bis-allylic hydrogen content. Biochemistry 33, 4449 - 4453.
62. WHITFIELD, J. B. (2001): Gamma glutamyl transferase. Crit. Rev. Clin. Lab. Sci. 38, 263-355.
63. WYSOCKI, P., J. STRZEZEK (2006): Isolation and biochemical characteristics of a molecular form of epididymal acid phosphatase of boar seminal plasma. Theriogenology 66, 2152-2159.
64. WISE, T., L. D. YOUNG, W. G. POND (1993): Reproductive endocrine and organ weight differences of swine selected for high or low serum cholesterol. J. Anim. Sci. 71, 2732 - 2738.
65. 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.
66. ZDUŃCZYK, S., T. JANOWSKI, A. RAŚ, W. BARAŃSKI (2011): Concentrations of oestrogens in blood plasma and seminal plasma of boars during the postpuberal period. Pol. J. Vet. Sci. 14, 539-544.
67. ŽURA ŽAJA, I. (2015): Pokazatelji antioksidacijskoga sustava u sjemenoj plazmi i spermijima rasplodnih nerasta različitih pasmina. Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, Hrvatska.

8. SAŽETAK

ANTIOKSIDACIJSKA ZAŠTITA I LIPIDNA PEROKSIDACIJA U TKIVU TESTISA I RAZLIČITIM DIJELOVIMA EPIDIDIMISA NERASTA

Za održavanje fizioloških procesa spermatogeneze i steroidogeneze u testisima te povoljnih mikorookolišnih uvjeta u tkivima epididimisa tijekom sazrijevanja, prolaska i pohrane spermija nužno je primjereno djelovanje antioksidativnih enzima radi održavanja fiziološke razine reaktivnih kisikovih spojeva. Nadalje, stjecanje gibljivosti i oplodne sposobnosti spermija tijekom njihovog prolaska kroz epididimis povezano je s različitim biokemijskim promjenama osobito u svojstvima njihovih membrana, čiji molekularni mehanizmi nisu do danas u potpunosti utvrđeni. Međutim, sposobnost testisa i epididimisa da štite spermije od štetnih učinka oksidacijskih procesa pomoću lokalno sintetiziranih antioksidansa, nije do sada u nerasta dostatno istražena.

Cilj ovoga rada bio je istražiti razlike u razini antioksidacijske zaštite, intenziteta oksidacijskih oštećenja lipida i vrijednostima biokemijskih pokazatelja u testisima te različitim dijelovima epididimisa spolno zrelih nerasta. Osim toga, istraživana je i međusobna povezanost određivanih pokazatelja u različitim dijelovima spolnog sustava i spermijima različitog stupnja zrelosti. Istraživanje je provedeno na 5 klinički zdravih spolno zrelih nerasta pasmine Švedski landras u dobi od 10 mjeseci. Na liniji klanja uzeti su uzorci tkiva testisa te glave, tijela i repa epididimisa. U dobivenim nadtalozima homogeniziranih tkiva određene su aktivnosti glutation peroksidaze (GSH-Px), glutation reduktaze (GSH-RD), superoksid dismutaze (SOD), gama glutamil transferaze (GGT), kisele fosfataze (ACP) i laktat dehidrogenaze (LDH) te koncentracije triacilglicerola, fosfolipida, kolesterola, slobodnih masnih kiselina (SMK) i malonildialdehida (MDA).

Značajno viša aktivnost GSH-Px-a i GSH-RD-a ($p<0,05$) utvrđena je u tkivu testisa u odnosu na tkiva epididimisa. U tkivu je testisa utvrđena i značajno viša aktivnost SOD-a u odnosu na tkiva glave i repa epididimisa ($p<0,05$). Koncentracija MDA u glavi epididimisa bila je značajno viša od one u testisima, tijelu i repu epididimisa te značajno niža u tkivima tijela i repa epididimisa u odnosu na onu u testisima ($p<0,05$). U tkivu repa epididimisa zabilježene su značajno više aktivnosti GGT-a, ACP-a i LDH-a u odnosu na one u testisima. Značajno niže koncentracije TAG-a i SMK-a zabilježene su u tkivu repa epididimisa u odnosu na one u tkivu glave epididimisa ($p<0,05$).

Iz dobivenih rezultata može se zaključiti da je visoka aktivnost antioksidacijskih enzima u testisima nerasta nužna za primjerenu zaštitu spermija i stanica tkiva testisa od oksidacijskih oštećenja. Tkiva testisa i glave epididimisa nerasta podložnija su lipidnoj peroksidaciji, odnosno oksidacijskom stresu. Znatnu zaštitnu funkciju od oksidacijskog stresa tijekom pohranjivanja spermija u repu epididimisa ima unutarstanični glutation kojeg osigurava GGT. Rezultati ovog istraživanja ukazuju na fiziološko značenje antioksidacijskih enzima u tkivima spolnog sustava nerasta. Osim toga, dobiveni bi rezultati mogli poslužiti za bolje razumijevanje mehanizama nastanka muške neplodnosti i unapređenju očuvanja sjemena nerasta.

Ključne riječi: antioksidacijska zaštita, lipidna peroksidacija, testisi, epididimisi, nerast

9. SUMMARY

ANTIOXIDANT PROTECTION AND LIPID PEROXIDATION IN THE TESTES AND DIFFERENT PARTS OF THE EPIDIDYMIS IN BOARS

For maintenance of physiological processes of spermatogenesis and steroidogenesis in testes and favorable microenvironmental conditions in tissues of epididymis during maturation, transport and storage of spermatozoa it is of crucial importance that antioxidative enzymes act properly in order to control physiological levels of reactive oxygen species.

Further, acquisition of spermatozoa motility and fertile capability during transport through epididymis is associated with different biochemical changes particularly in characteristics of their cell membranes and corresponding molecular mechanisms, which are not fully defined yet. However, the ability of testes and epididymis to protect spermatozoa from detrimental effects of oxidation processes by locally synthesized antioxidants is not studied in details up to now.

The aim of this study was to investigate differences in level of antioxidative protection, intensity of lipid peroxidation and values of biochemical parameters in testes and different parts of epididymis in reproductive mature boars. Besides, the correlation among tested parameters in different parts of reproductive system and spermatozoa of different stages of maturity were studied. Study was performed on 5 clinically healthy and reproductive mature boars of Swedish landrace breed aging 10 months. Tissue samples of testes and head, body and tail of epididymis were taken. In obtained supernatants of homogenized tissues the activity of glutathione peroxidase (GSH-Px), glutathione reductase (GSH-RD), superoxide dismutase (SOD), gamma glutamyl transferase (GGT), acid phosphatase and lactate dehydrogenase (LDH) as well as concentrations of triacylglycerols, phopsholipids, cholesterol, free fatty acids (FFA) and malondialdehyde (MDA) were determined.

Significantly higher activities of GSH-Px and GSH-RD ($P<0.05$) were determined in tissue of testes as compared to those in tissues of epididymis. In tissue of testes it was established significantly higher activity of SOD in comparison to that found in tissues of head and tail od epididymis ($P<0.05$). Concentration of MDA in head of epididymis was significantly higher from that in testes, body and tail of epididymis but significantly lower than that in tissues of body and tail of epididymis as compared to that in testes ($P<0.05$). In tissue of epididymis tail significantly higher activities of GGT, ACP and LDH were recorded in relation to those in testes. Significantly lower concentrations of TAG and FFA were recorded in epididymis tail tissue in comparison to those in epididymis head tissue ($P<0.05$).

From the obtained results it could be concluded that high activities of antioxidative enzymes in testes of boars are essential for appropriate protection of spermatozoa and cells of testes tissue against oxidative damages. The tissues of testes and epididymis head in boars were more susceptible to lipid peroxidation, *i.e.* to oxidative stress. A significant protective function has intracellular glutathione which is maintained by GGT against oxidative stress during storage of spermatozoa in epididymis tail. The results of current study indicate physiological importance of antioxidative enzymes in tissues of reproductive system in boars. Furthermore, the obtained results may serve for better understanding of mechanisms of male infertility and for improvement of boar semen storage.

Key words: antioxidative protection, lipid peroxidation, testes, epididymis, boar

10. ŽIVOTOPIS

Anamaria Sluganović rođena je 24.02.1994. godine u Zagrebu, RH. Nakon završene Osnovne škole Petra Zrinskog i V. gimnazije u Zagrebu, 2012. godine upisuje integrirani preddiplomski i diplomski studij na Veterinarskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Tijekom školovanja svirala je glasovir te završila osno1vnu i srednju glazbenu školu Blagoje Berse u Zagrebu te dvije godine opernog pjevanja u glazbenoj školi Vatroslava Lisinskog u Zagrebu. Kao predsjednica Vijeća učenika V. Gimnazije i članica odbora Vijeća učenika Grada Zagreba (VUGZ-a) godinama je aktivno sudjelovala u radu Gimnazije i učeničkim pitanjima na nivou Grada Zagreba. 2013./2014. godine postaje aktivni član studentske udruge eSTUDENT i 2016./2017. godine vodi Udrugu. Pohađala je nastavu njemačkog jezika u školi stranih jezika "Vodnikova", engleskog jezika u školi stranih jezika "Porta Vitae", te francuskog jezika u školi stranih jezika "Alliance française". 2010. godine pohađala je školu stranih jezika "Actilingua" u Beču.