

# Utjecaj oksidacijskog stresa na plodnost muških rasplodnjaka

---

**Lovrić, Zoran**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2014**

*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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:178:757687>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-01-11**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of Faculty of Veterinary Medicine -  
Repository of PHD, master's thesis](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
VETERINARSKI FAKULTET**

Zoran Lovrić

**UTJECAJ OKSIDACIJSKOG STRESA NA PLODNOST  
MUŠKIH RASPLODNJAKA**

**Diplomski rad**

Zagreb, 2014.

**Diplomski rad je izrađen u:**

- Zavodu za fiziologiju i radiobiologiju  
Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu
- Zavod za farmakologiju i toksikologiju  
Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

**Mentorice:** prof. dr. sc. Jasna Aladrović  
prof. dr. sc. Andreja Prevendar Crnić

**Predstojnik Zavoda za fiziologiju i radiobiologiju:** prof. dr. sc. Miljenko Šimpraga

**Predstojnik Zavod za farmakologiju i toksikologiju:** prof. dr. sc. Darko Sakar

## SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
2. PREGLED REZULTATA DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA .....	2
2.1. GRAĐA SPERMIJA .....	3
2.2. SASTAV SJEMENE PLAZME .....	6
2.3. UTJECAJ REAKTIVNIH KISI KOVIH I DUŠIKOVIH SPOJEVA NA SPERMIJE ...	7
2.3.1. Fiziološki uvjeti .....	7
2.3.2. Oksidacijski stres .....	7
2.4. ANTIOKSIDACIJSKI SUSTAV SJEMENA .....	10
2.4.1. Superoksid dismutaza (SOD) .....	11
2.4.2. Glutation peroksidaza (GSH-Px) .....	11
2.4.3. Katalaza .....	12
2.4.4. Paraoksonaza 1 .....	13
2.4.5. Glutation (GSH) .....	14
3. ZAKLJUČCI .....	15
4. LITERATURA .....	16
5. SAŽETAK .....	23
6. ABSTRACT .....	24
ŽIVOTOPIS .....	25

## 1. UVOD

Razmnožavanje je temeljni proces koji omogućuje životinjama i ljudima prijenos gena na potomstvo. Reproductivni sustav muških životinja proizvodi spermije, sudjeluje u parenju te proizvodi i luči brojne hormone koji u sprezi s živčanim sustavom reguliraju rast, spolno sazrijevanje i reproductivnu funkciju mužjaka.

Za preživljavanje i funkciju spermija neophodna je ravnoteža između prooksidativnih i antioksidativnih mehanizama. Muški reproductivni sustav pa tako i spermiji izloženi su reaktivnim kisikovim i dušikovim spojevima koji se sintetiziraju u prijenosu elektrona u mitohondrijima. Također, spermiji su izloženi kisiku prilikom prirodnog pripusta kao i prilikom polučivanja sjemena, manipulacije i pripreme sjemena za osjemenjivanje. Uvjeti u ženskom reproductivnim organima potiču stvaranje reaktivnih kisikovitih spojeva u spermijima tijekom transporta do mjesta oplodnje. Svi navedeni procesi u organizmu kao i postupci *in vitro* izlažu spermije oksidacijskom stresu.

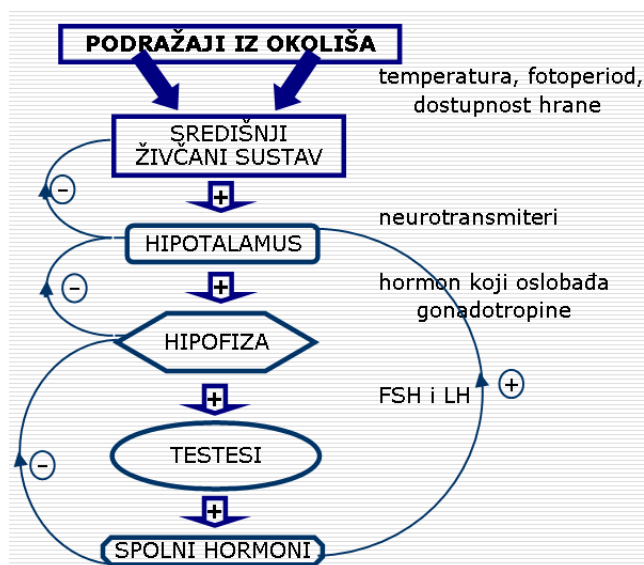
Jedan od glavnih čimbenika loše kvalitete sjemena<sup>6</sup> je upravo oksidacijski stres. Ovo se stanje razvija bilo da se radi o povećanom stvaranju kisikovih i dušikovih reaktivnih spojeva (ROS/RNS) i/ili smanjenoj mogućnosti antioksidativne obrane zbog smanjene sinteze ili unosa antioksidativnih spojeva. ROS mogu inducirati lipidsku peroksidaciju u membrani spermija, oksidativna oštećenja genetskog materijala, a posljedično tome i gubitak funkcije spermija. Spermije štiti od oksidacijskih oštećenja veliki broj antioksidativnih molekula u sjemennoj plazmi i spermijima.

## 2. PREGLED REZULTATA DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA

Fiziologija reprodukcije muških životinja obuhvaća proizvodnju i sazrijevanje muških spolnih stanica i prenošenje spermija u ženske reproduktivne organe.

Reproduktivni sustav muških životinja sastoji se od više organa koji sudjeluju u nastanku, sazrijevanju i izbacivanju spermija u ženski reproduktivni sustav. Muški spolni organi sastoje se od parnih sjemenskih žlijezda ili testisa koji su smješteni u mošnji, nuzjaja, sjemenovoda, uda, mokraćnice i prepucija te akcesornih spolnih žlijezda: mjehurićastih žlijezda, prostate, bulbouretralnih žlijezda i Literovih žlijezda (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.). Akcesorne spolne žlijezde izlučuju fruktozu, limunsku kiselinu, cink, kalcij, citrate, fosfate te bjelančevine što čini povoljan medij za preživljavanje spermija do oplodnje jajne stanice.

Reproduktivna aktivnost pod nadzorom je hipotalamus-hipofizne osi (slika 1.). Podražaji iz okoliša djeluju na središnji živčani sustav, neurotransmiterima se informacija prenosi u hipotalamus koji putem hormona koji oslobađa gonadotropine potiče hipofizu na lučenje folikulostimulirajućeg hormona (FSH) i luteinizirajućeg hormona (LH). Ovi hormoni dovode do stvaranja i sazrijevanja spermija te lučenja steroidnih hormona testosterona i estrogena neophodnih za spermatogenezu i sazrijevanje te oplodnu sposobnost muških rasplodnjaka (GUYTON i HALL, 2006.).



Slika 1. Shema regulacije reproduktivne aktivnosti muških rasplodnjaka

## 2.1. GRAĐA SPERMIJA

Sjeme ili sperma se sastoji od staničnog dijela i sjemene plazme. Pri tome spermiji čine oko 98-99,75% stanica. Prosječni volumen, broj spermija i pH vrijednosti ejakulata razlikuju se od vrste do vrste (tabela 1).

Tabela 1. Volumen i broj spermija te pH ejakulata (BRINZEJ i sur., 1991.).

Vrsta	Prosječni volumen (mL)	Broj spermija u mL	pH sperme
PASTUH	100 (40-320)	$60 \cdot 10^6$	7,0-7,6
BIK	3,5 (0,5-14)	$800 \cdot 10^6$	6,6-7,4
NERAST	200 (125-500)	$100 \cdot 10^6$	7,2-7,8
OVAN	0,8 (0,5-2)	$1000 \cdot 10^6$	6,5-7,2
PJETAO	0,6 (0,1-1,5)	$3000 \cdot 10^6$	7,04

U ejakulatu mogu biti prisutne i epitelne stanice, eritrociti i leukociti (JEYENDRAN, 2003.). Spermiji su stanice koje se po brojnim karakteristikama razlikuju od drugih tjelesnih stanica. Specifičnog su izgleda, ne mogu se dijeliti i rasti. Pokretne su zahvaljujući pokretima repa spermija, te mogu preživljavati *in vivo* i *in vitro*. Nastaju u testisima, u procesu spermatogeneze, tj. stvaranja spermatozoida, a sazrijevaju u epididimisu (UREMOVIĆ i sur., 1997.). Epididimis izlučuje tekućinu bogatu bjelančevinama i steroidima s ciljem zaštite spermija od štetnoga djelovanja slobodnih radikala i drugih kemijskih tvari. Zaštita od slobodnih radikala ostvarena je putem molekula s antioksidativnim djelovanjem kao što su glutation, tioredoksin, gama-glutamil transferaza i superoksid dizmutaza koji se nalaze u tekućini.



Slika 2. Spermiji nerasta. Bojanje po Papanicolaou.

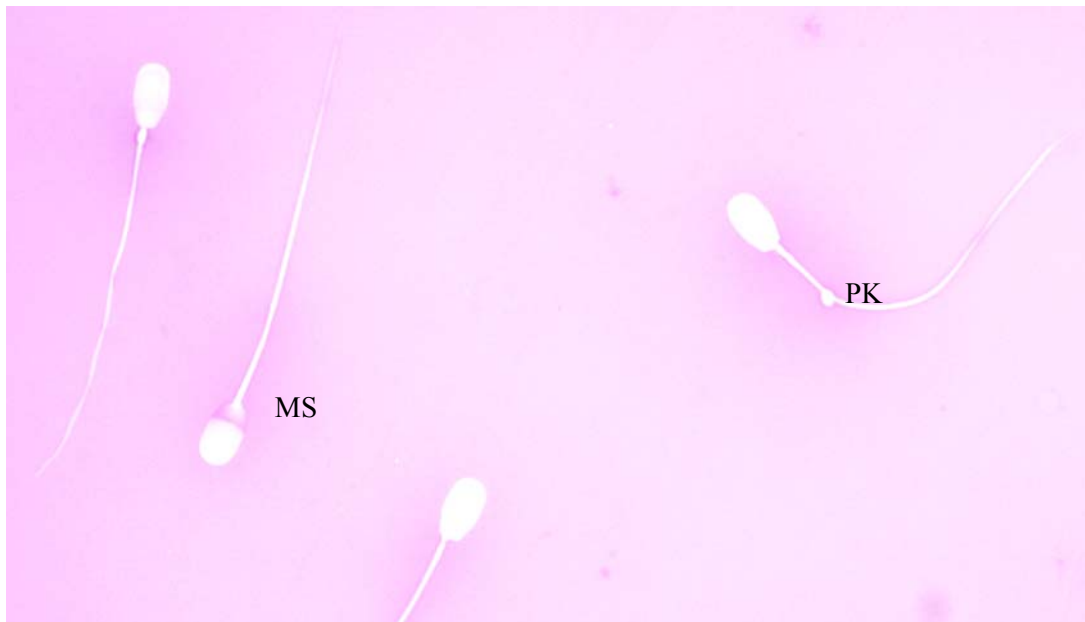
Spermiji se sastoje iz glave, vrata i tijela te repa (slika 2). Glava spermija asimetričnog je oblika, čini osnovu stanice spermija (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.). Na prednjoj strani pokrivena je akrosomom. Integritet akrosome neophodan je za uspješnu oplodnju i svaka promjena propusnosti akrosomske i/ili stanične membrane dovodi do gubitka sadržaja akrosome i nesposobnosti spermija da proдре u jajnu stanicu (BEDFORD i HOSKINS, 1990., PARKINSON, 1996.). U citoplazmi glave spermija nalazimo DNK, RNK, kromatin, te enzim alkalnu fosfatazu. Glavu s repom spaja tijelo spermija koje je pokretač spermija. U tijelu se nalaze mitohondriji, bjelančevine, lipidi, ugljikohidrati.

Sazrijevanje spermija nakon ejakulacije nastavlja se u spolnim organima ženki što se naziva kapacitacija i dovodi do akrosomske reakcije (GETZ, 1999., SHADAN i sur., 2004.). Sekreti maternice i jajovoda uklanjaju inhibicijske faktore čime spermiji postaju sposobni za oplodnju. Pri kapacitaciji dolazi do uklanjanja kolesterola (BEER LJUBIĆ i sur., 2009.) iz membrane spermija te se mijenja fluidnost i propusnost membrane za kalcij, bikarbonate i vodikov peroksid. Ovim reakcijama se pospješuje sinteza cikličnog adenozin monofosfata koji kao sekundarni glasnik aktivira protein kinaze koje fosforiliraju određene bjelančevine (WITTE i SCHÄFER-SOMI, 2007.). Tijekom kapacitacije dolazi i do promjene u propusnosti akrosome, egzocitoze enzima hijaluronidaze i akrozina što se naziva akrosomska reakcija. Navedeni enzimi otapaju granuloza stanice čime je omogućen ulazak genetskog materijala u citoplazmu jajne stanice.



Brzina kapacitacije ovisi o brzini uklanjanja kolesterola iz membrane spermija (GADELLA i sur., 2008.). Tijekom kapacitacije, kolesterol se uklanja iz membrane i zamjenjuje s fosfolipidima (CROSS, 2003., CROSS, 2004.). Iz navedenog slijedi kako je za kapacitaciju važan omjer kolesterola i fosfolipida. Sjeme s većim omjerom kolesterola i fosfolipida je otpornije na manipulaciju tijekom postupaka smrzavanja i odmrzavanja (CROSS, 1998.). Određivanje koncentracije kolesterola i fosfolipida te izračunavanje omjera ova dva pokazatelja je važan marker kvalitete sjemena (BRINSKO i sur., 2007., BEER LJUBIĆ i sur., 2012.).

Nezreli oblici spermija imaju proksimalnu ili distalnu protoplazmatsku kapljicu (slika 3) koja se nalazi ispod glave ili na repu spermija. Takvi nezreli oblici spermija su neotporni i afertilni (GUYTON i HALL, 2006.). Upravo ovi spermiji kao i mrtvi oblici su glavni izvor slobodnih radikala u sjemenu (HALLIWEL i GUTTERIDGE, 1999.).



Slika 3. Mrtvi spermij (MS) nerasta i prisustvo protoplazmatske kape (PK) na spermiju. Bojanje eozin-nigrosin, 100x

## **2.2. SASTAV SJEMENE PLAZME**

Ejakulat se sastoji iz spermija i sjemene plazme. Pri tome ovisno o životinjskoj vrsti udio sjemene plazme u sjemenu iznosi od 50 do 90%. Nastaje u akcesornim spolnim žljezdama, posebice sjemennoj vrećici, te epididimisu, manjim dijelom čini je sekret sjemenih kanalića i sjemenovoda. Sadrži elemente cink, kalcij, bakar, natrij, magnezij, kalij, mangan, limunsku kiseline, fruktozu, fosfate, sulfate, kloride, bikarbonate, aminokiseline, enzime, prostaglandine i vitamin C, B, A, D i E (PESCH i sur., 2006). Izotonična je otopina, a najvažnije su joj funkcije održavanje osmotskog tlaka, hranjenje, aktivacija i zaštita spermija te služi kao transportni medij spermija kroz rodnicu, maternicu i jajovode. Kao glavne energetske supstrate spermiji nerasta metaboliraju prvenstveno fruktozu, glukozu i laktat, iako mogu koristiti i masne kiseline (JONES, 1997.; JONES i MILMLOW, 1997.). Sastav sjemene plazme ovisi o funkciji reproduktivnih organa, prvenstveno akcesornih spolnih žlijezda, ali i o funkciji, metaboličkoj aktivnosti i integritetu stanične membrane spermija. Tako su aktivnosti alkalne i kisele fosfataze kao i gama glutamil transferaze višestruko više negoli u krvnom serumu (ŠTRAUS, 2009.; GUTZMIRTL, 2013.). Također, sjemena plazma ima veću koncentraciju/aktivnost antioksidativnih molekula nego druge biološke tekućine te je na taj način kompenziran niski antioksidativni kapacitet spermija (AGARWAL i sur., 2003.).

Sastav lipida membrane spermija i sjemene plazme znatno utječe na funkciju i kvalitetu sjemena (ZALATA i sur., 1998.; MESEGUER i sur., 2004.; ARGOV i sur., 2007.). Pri tome, sjemena plazma je bogata kolesterolom koji stabilizira membranu spermija. Dodavanje kolesterola u razrjeđivače tijekom postupka proizvodnje sjemena za umjetno osjemenjivanje dovodi do ugradnje kolesterola u membranu spermija čime ih štiti tijekom postupka odmrzavanja (JIANG i sur., 2007.), odnosno prije samog smrzavanja štiti ih od preuranjene kapacitacije omogućujući dulje preživljavanje (MOORE i sur., 2005.).

## **2.3. UTJECAJ REAKTIVNIH KISIKOVIH I DUŠIKOVIH SPOJEVA NA SPERMIJE**

Stvaranje reaktivnih kisikovih spojeva (ROS) i reaktivnih dušikovih spojeva (RNS) u zdravih aerobnih organizama otprilike je u ravnoteži s antioksidativnim zaštitnim sustavom. Oštećenja koja nastaju oksidacijom s ROS/RNS stalno se pojavljuju pri čemu organizam neka oštećenja može popraviti, a neke se molekule mehanizmima antioksidativne zaštite uklanjaju. Kada stupanj oštećenja nadvlada zaštitne mehanizme razvija se oksidacijski stres.

### 2.3.1. Fiziološki uvjeti

Pri fiziološkim uvjetima spermiji koji imaju oplodnu sposobnost proizvode ROS u malim koncentracijama. Mjesta sinteze ROS u spermijima nisu poznata, no u somatskim stanicama nastaju u lancu transporta elektrona u mitohondrijima (BECKAM i AMES, 1998.). Reaktivni kisikovi spojevi: superoksidni radikal, vodikov peroksid i dušikov oksid su neophodni za normalno odvijanje kapacitacije, akrosomske reakcije spermija i stabilizacije membrane mitohondrija u srednjem dijelu spermija (De LAMIRANDE i sur., 1997., O' FLAHERTI i sur., 1999., JUYENA i STELLETA, 2012.). Pri kapacitaciji stvara se superoksidni radikal u većim koncentracijama djelovanjem oksidaza. Superoksidni radikal i vodikov proksid koji nastaje djelovanjem enzima superoksid dismutaze potiču kapacitaciju spermija. Kapacitacija spermija uzrokovana je i djelovanjem dušikovog oksida koji se vjerojatno stvara u ženskim spolnim organima (de LAMIRANDE i sur., 1997.).

Akrosomska reakcija kod spermija koji su završili proces kapacitacije pobuđuje stvaranje superoksidnog radikala što dovodi do oslobađanja nezasićenih masnih kiselina iz membrane spermija. Također u odvijanje akrosomske reakcije uključen je i vodikov peroksid (de LAMIRANDE i sur., 1997.).

### 2.3.2. Oksidacijski stres

Pojam oksidacijski stres opisuje poremećaj ravnoteže između proizvodnje ROS/RNS i antioksidativnih zaštitnih mehanizama. Rezultat je smanjene aktivnosti antioksidativnih molekula npr. mutacijama promijenjenih antioksidativnih enzima kao što su CuZnSOD, MnSOD ili GSH-Px, smanjene koncentracije antioksidansa kao i drugih esencijalnih sastojaka hrane. Uzrok oksidacijskog stresa također može biti pojačano stvaranje ROS i RNS kao kod sjemena s velikim brojem mrtvih i nezrelih oblika spermija i velikim udjelom upalnih stanica u ejakulatu (IRVINE, 1996., MAKKER i sur., 2009.).

Lipidska peroksidacija kao posljedica djelovanja ROS najčešće je istraživana u literaturi. Radi se o lančanoj reakciji koja započinje slobodnim radikalom u kojima radikal može oksidirati molekule višestrukonezasićenih masnih kiselina što dovodi do stvaranja lipidnog radikala. Jednostrukonezasićene masne kiseline kao i one zasićene mnogo su manje reaktivne i obično ne sudjeluju u opisanim reakcijama. Lipidska peroksidacija počinje reakcijom radikala dovoljne reaktivnosti s višestrukonezasićenom masnom kiselinom nakon čega dolazi do širenja ili umnažanja (engl. propagation), jer se od početne oksidacije, proces može širiti i dovoditi do nastanka lipidskih hidroperoksida iz velikog broja masnih kiselina (SANTANAM i sur., 1998.; ABUJA i ALBERTINI, 2001.).

Citoplazmatska membrana spermija bogata je višestrukonezasićenim masnim kiselinama (PUFA). Dokozaheksaenska kiselina (DHA) čini oko 50% ukupnih esterificiranih masnih kiselina u spermijima (HALLIWELL i GUTTERIDGE, 1999.). Visoki udio PUFA daje membrani spermija fluidnost potrebnu za fuziju s jajnom stanicom. Upravo PUFA su glavna meta oksidacije reaktivnim spojevima (SIKKA, 1996., BROUWERS i GADELLA, 2003., KASIMANICKAM i sur., 2007.). Peroksidacija membranskih PUFA pri oksidacijskom stresu smanjuje fluidnost membrane, a time oplodnu sposobnost spermija. Pri tome kao peroksidaciju u najvećoj mjeri uzrokuje prekomjerno stvaranje superoksidnog radikala (GAVELLA, 1996.). Oksidacijski stres uzrokuje porast slobodnog ionskog kalcija u stanici, smanjenje koncentracije ATP što ima za posljedicu smanjenu pokretljivost spermija (HALLIWELL i GUTTERIDGE, 1999.).

Lipidska peroksidacija naročito je izražena u srednjem dijelu i repu smrznutih/odmrznutih spermija i značajno manje izražena u glavi spermija, dok je antioksidativna aktivnost najizraženija u glavi svježih spermija inkubiranih s t-butilhidroperoksidom (BROUWERS i GADELLA, 2003.).

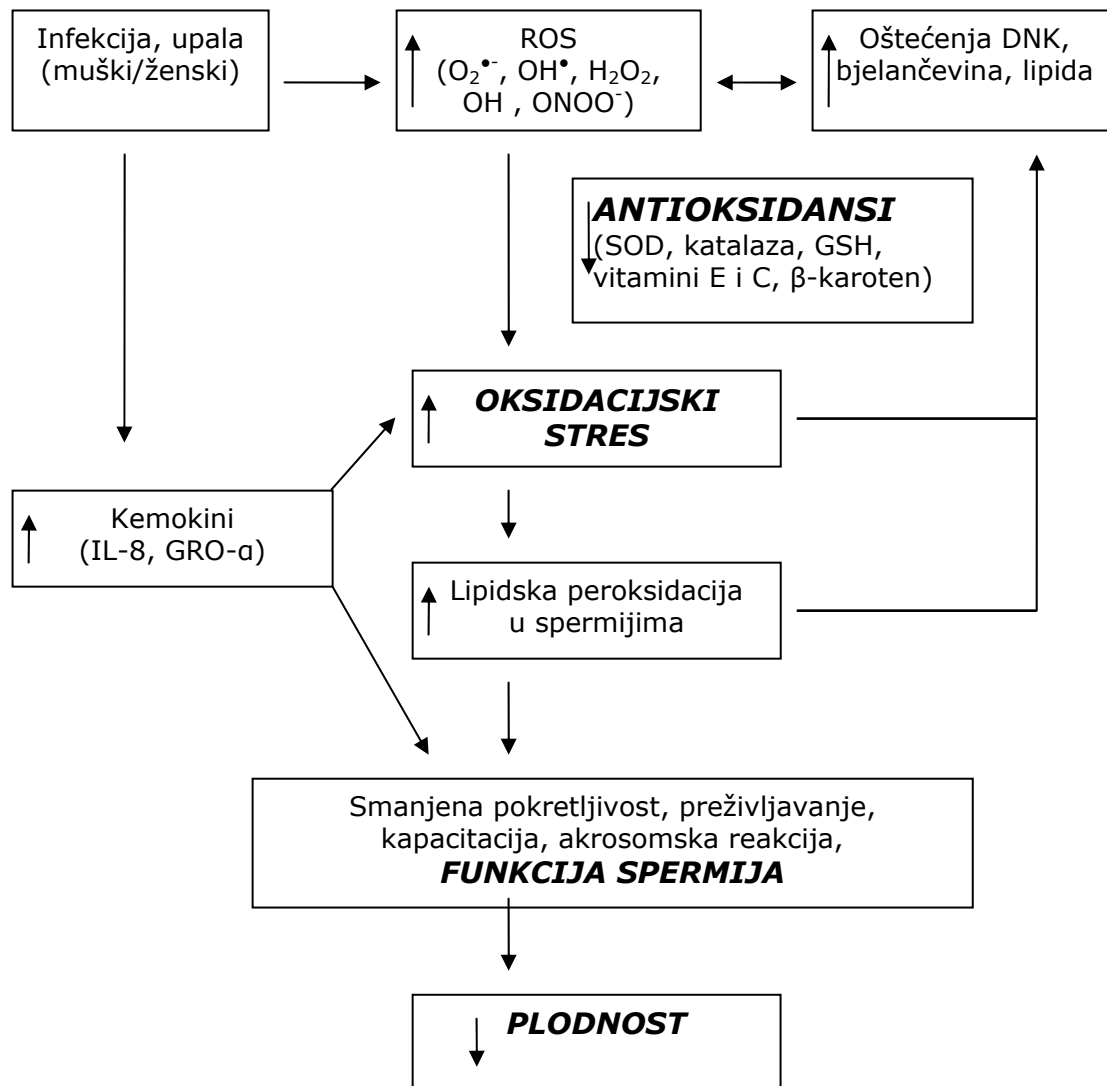
Osim staničnih membrana ROS oštećuje DNK (AGARWAL i sur., 2003.), a mogu potaknuti oksidaciju sulfhidrilnih skupina u bjelančevinama te na taj način promijeniti strukturu, poremetiti funkciju spermija te dovesti do smanjenja pokretljivosti spermija (KOVALSKI i sur., 1992.).

Glavni izvor ROS u većim koncentracijama u nezrelim oblicima spermija su proksimalni i distalni protoplazmatski mjehurići koji se nalaze ispod glave ili na repu spermija (AGARWAL i sur., 2008.). U sjemenu bikova i ovnova ROS primarno proizvode mrtvi spermiji (BANSAL i BILASPURI, 2011.). Sjemena plazma može biti izvor ROS. Također, važan izvor ROS su leukociti kod ljudi (AGARWAL i sur., 2003.) kao i u sjemenu pastuha (BAUMBER i sur., 2002). ALADROVIĆ i sur. (2013.) utvrdili su da oko 20% sjemena nerastova je kontaminirano leukocitima.

Već je napomenuto da se ROS stalno stvaraju u spermijima no, spermiji nakon pripusta ili umjetnog osjemenjivanja putuju kroz ženske spolne organe gdje su visoke razine kisika za vrijeme procesa oplodnje. Ženski spolni sustav stvara ROS ili potiče njihovo stvaranje u spermijima (FUJII i sur., 2003.) što pospješuje kapacitaciju i akrosomsku reakciju u spermijima. Lipidska peroksidacija izazvana niskim koncentracijama ROS pospješuje vezanje spermija za zonu pelucidu i oslobađanje nezasićenih masnih kiselina iz membrane spermija (De LAMIRANDE i sur., 1997.).

Spermiji koji su izloženi? podvrgnuti? procesima pripreme za umjetno osjemenjivanje (smrzavanje/otapanje) izloženi su štetnom djelovanju ROS u većoj mjeri (BILODEAU i sur., 2000.).

Učinak oksidacijskog stresa na oksidativna oštećenja spermija i smanjenje plodnosti prikazan je na slici 4.



Slika 4. Učinak oksidacijskog stresa na oksidativna oštećenja spermija i smanjenje plodnosti (SIKKA, 1996.). (ključni pojmovi su masno otisnuti i u italic obliku slova)

## **2.4. ANTIOKSIDACIJSKI SUSTAV SJEMENA**

Kao što je već napomenuto, spermiji su neprestano izloženi ROS koji se sintetiziraju tijekom stvaranja i sazrijevanja spermija kao i nakon prijenosa u ženske spolne organe pri čemu prolaze kroz biokemijske promjene koje se nazivaju kapacitacija spermija i pripremu za oplodnju što se naziva akrosomska reakcija.

Kako bi spermiji bili oplodno sposobni kada dospiju do jajne stanice bilo da se radi o svježem sjemenu ili sjemenu pripremljenom za umjetno osjemenjivanje sjeme treba imati zaštitne mehanizme od oksidacije ROS i RNS kako ne bi došlo do oksidacijskog stresa i ugibanja spermija prije oplodnje. Kako bi spermiji bili što bolje zaštićeni od oksidacije u samim spermijima kao i u sjemenjnoj plazmi nalazimo brojne molekule s antioksidativnim djelovanjem (VALKO i sur., 2005.; VALKO i sur., 2006.). U membrani, citoplazmi i organelama spermija i sjemenjnoj plazmi nalazimo enzime superoksid dismutazu, glutation peroksidazu, glutation reduktazu, katalazu, paraoksonazu 1. Također brojne su nenezimske antioksidativne molekule prisutne kao što su: glutation, piruvat, taurin, albumini, tioredoksin, vitamioni E i C (ZINI i sur., 1993.; IRVINE, 1996.; RAIJMAKERS i sur., 2003.).

Antioksidansi mogu sprječavati nastanak slobodnih radikala enzimski (superoksid dismutaza, glutation reduktaza, katalaza, glutation peroksidaza), neenzimski zbog svog redoks potencijala (glutation i tioredoksin sustav), kao i vežući metale željezo i bakar (ceruloplazmin, transferin, haptoglobin, feritin, mioglobin, albumini). Antioksidativno djelovanje može se očitovati također u sprječavanju i ograničavanju lančane reakcije stvaranja i širenja peroksidacije kojim putem djeluju: vitamini A, E, C, karotenoidi, ubikinoli, glutation, glutation peroksidaza, mokraćna kiselina. Ukoliko je oksidacijom neka molekula oštećena moguće je obnavljanje oštećenih dijelova molekula ili uklanjanje pomoću lipaza, peptidaza, proteaza, transferaza, enzima koji uklanjaju oštećenja DNK, ligaza, nukleaza, polimeraza, proteinaza i fosfolipaza (SURAI, 2002.).

Zbog svoje specifične građe glave, oskudne citoplazme kao i ograničene mogućnosti sinteze aktivnost antioksidativnih enzima u spermijima je vrlo niska (AITKEN i sur., 1989.), a kako su stanice bogate višestrukonezasićenim masnim kiselinama vrlo su osjetljive na peroksidaciju. Fiziološki slabiju zaštitu samih spermija kompenziraju antioksidativne molekule u sjemenjnoj plazmi (AGARWAL i sur., 2003.).

U antioksidativnoj zaštiti spermija sudjeluje veliki broj antioksidativnih spojeva. Pri tome naročitu važnost imaju enzimi superoksid dismutaza (FUJII i sur., 2003.; PEEKER i

sur., 1997.), glutation peroksidaza (IMAI i sur., 2001.; VAISBERG i sur., 2005.), katalaza (KOSKINEN i sur., 2002.) kao i glutation (RAIJMAKERS i sur., 2003.; IRVINE, 1996.).

#### 2.4.1. Superoksid dismutaza (SOD)

Superoksid dismutaza (SOD, EC 1.15.1.1) je enzim koji katalizira reakciju razgradnje superoksidnog radikala do molekule kisika i vodikovog peroksida. Stoga u fiziološkim uvjetima, SOD održava ravnotežnu koncentraciju superoksidnog radikala na niskoj razini, od  $10^{-10}$  do  $10^{-11}$  M (HALLIWELL i GUTTERIDGE, 1999.).

Kod sisavaca izdvojena su tri oblika SOD koji se razlikuju po metalima kofaktorima i lokalizaciji u stanici i izvanstaničnom prostoru. Superoksid dismutaza koja sadrži cink i bakar (bakar-cink superoksid dismutaza CuZnSOD) prisutna je najvećim dijelom u citoplazmi, ali ima je u lizosomima, peroksisomima, jezgri i prostoru između vanjske i unutrašnje membrane mitohondrija (HALLIWELL i GUTTERIDGE, 1999.). Cink stabilizira enzim i ne sudjeluje u reakciji katalize superoksidnog radikala.

Organizam životinja osim CuZnSOD sadrži i superoksid dismutazu koja u aktivnom centru ima mangan - MnSOD (HALLIWELL i GUTTERIDGE, 1999.). U mitohondrijima u lancu oksidativne fosforilacije dolazi do "curenja" superoksidnog radikala, aktivnost je MnSOD to veća što je veći broj mitohondrija u tkivu.

Izvanstanična SOD (EC-SOD) nalazi se u izvanstaničnoj tekućin. Sadrži četiri atoma bakra i cinka, očituje veliku SOD aktivnost, a kao i CuZnSOD inaktivira se cijanidom. Nalazi se u tjelesnim tekućinama i izvanstaničnom matriksu tkiva (OOKAWARA i sur., 1998.). Visoka aktivnost ovog izoenzima potvrđena je u epididimisu (MRUK i sur., 2002.).

Kao što je napomenuto ranije upravo superoksidni radikal je potreban za kapacitaciju i akrosomsku reakciju u malim količinama, a ako se proizvodi u većim koncentracijama dovodi do oksidacijskog stresa (GAVELLA, 1996.), pa je promjena aktivnosti ovog enzima dobar pokazatelj stupnja oksidacijskog stresa u stanicama.

#### 2.4.2. Glutation peroksidaza (GSH-Px)

Glutation peroksidaza (EC 1.11.1.9) je enzim koji se nalazi u svim eukariotskim stanicama. Glutation peroksidaza štiti stanice od oksidativnih oštećenja, uklanjajući vodikov

peroksid i lipidne hidroperokside uz oksidaciju reduciranog glutationa. Enzim sadrži četiri atoma selena u obliku selenocisteina (BRIGELIUS-FLOHE, 1999.).

Glutation peroksidaza pripada skupini enzima, a identificirano je barem sedam izoenzima GSH-Px i to citoplazmatska (cGSH-Px ili GSH-Px1), gastrointestinalna (GI-GSH-Px ili GSH-Px2), plazmatska (pGSH-Px ili GSH-Px3), fosfolipid-hidroperoksidna (PH-GSH-Px ili GSH-Px4) te glutation peroksidaze GSH-Px5 i GSH-Px6 (BRIGELIUS-FLOHE, 1999.; ČEPELAK, 2009.). Razlikuju se po građi, supstratu, ali sve sadrže selen u aktivnom centru.

Fosfolipid-hidroperoksidna GSH-Px je naročito potrebna za embriogenezu i mušku plodnost (VAISBERG i sur., 2005.), a smanjena aktivnost ovoga enzima dovodi do smanjene plodnosti (IMAI i sur., 2001., IMAI i NAKAGAWA, 2003.). Visoka aktivnost zabilježena je u testesima (FUJII i sur., 2003.)

Epididimalnu GSH-Px (GSH-Px5) prvi su opisali GHYSELINCK i sur. (1989.). Nalazi u epididimisu (FUJII I SUR., 2003.).

Glutation peroksidaza specifična za glavu spermija otkrivena je u testesima štakora 2001. godine (PFEIFER i sur., 2001.). Molekulska masa sn-GSH-Px enzima je 34 kDa i u njoj je sadržano 80% ukupnog selena u spermijima. Pokazuje slične osobine kao fosfolipidhidroperoksidna GSH-Px od koje se razlikuje po N-terminalnoj sekvenci. Biološka uloga ovog izoenzima glutacion peroksidaze je stabilizacija kondenziranog kromatina i zaštita DNK spermija od oksidacije, tako da se pri manjku selena u organizmu štakora aktivnost sn-GSH-Px smanjuje na trećinu što rezultira ozbiljnim narušavanjem kondenzacije kromatina (PFEIFER i sur., 2001.).

### 2.4.3. Katalaza

Katalaza (EC 1.11.1.6) je enzim koji neposredno uklanja vodikov peroksid. Osnovna uloga katalaze je razgradnja vodikovog peroksida putem katalaznog i/ili peroksidaznog oblika reakcije. Pri fiziološkim koncentracijama vodikovog peroksida glavnu ulogu u odstranjivanju ima glutacion peroksidaza (GSH-Px). Katalazna aktivnost se očituje tek pri većim koncentracijama  $H_2O_2$ , što govori da je katalaza odgovorna za razgradnju peroksida u uvjetima oksidacijskog stresa (HALLIWELL i GUTTERIDGE, 1999.). Za razliku od male aktivnosti katalaze u spermijima kod ljudi i ovnova, u spermijima bikova aktivnost ovoga enzima nije utvrđena (BILODEAU i sur., 2000.). U stanici se katalaza nalazi najviše u peroksisomima. Prema tome vodikov peroksid nastao u peroksisomima oksidira katalaza, a



onaj nastao u mitohondrijima, endoplazmatskoj mrežici i citoplazmi uklanja glutathion peroksidaza (HALLIWEL i GUTTERIDGE, 1999.).

Aktivnost katalaze u spermijima je vrlo niska/nemjerljiva (FUJII i sur., 2003.), uz visoku aktivnost u sjemenjnoj plazmi (KOSKINEN, i sur., 2002).

#### 2.4.4. Paraoksonaza 1

Paraoksonaza 1 (PON1; E.C. 3.1.8.1.) u serumu je esteraza ovisna o kalciju koja se sintetizira u jetri, a u serum se izlučuje kao sastavni dio lipoproteina velike gustoće (engl. high density lipoprotein, HDL). PON1 hidrolizira organofosfate te time ima vrlo važnu ulogu u detoksikaciji (MACKNESS i sur., 1998.). Međutim, istraživanja su pokazala da PON1 sudjeluje i u zaštiti serumskih lipoproteina od oksidativnih oštećenja jer hidrolizira oksidirane fosfolipide te tako sprječava njihovo nakupljanje u lipoproteinima male gustoće (engl. low density lipoprotein, LDL) (AVIRAM i sur., 1999.), a ubrzava njihovo uklanjanje s lipoproteina velike gustoće (engl. high density lipoprotein, HDL) (AVIRAM i sur., 1998.).

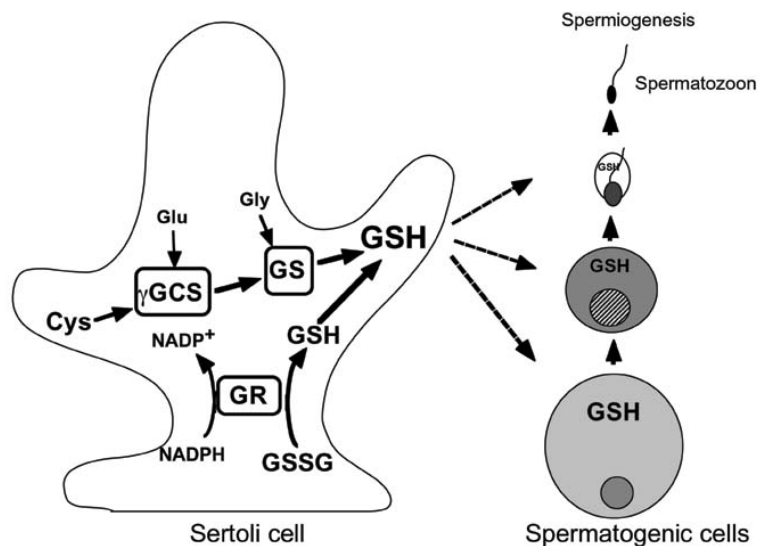
Osim što osigurava prijenos PON1 u serumu, HDL doprinosi i aktivnosti i stabilnosti PON1, a time posljedično i funkciji. S tim u vezi promjenjenoj aktivnosti vjerojatno doprinose promjene sastava HDL i lipidnog okruženja enzima (SORAN i sur., 2009.). Izračunavanjem omjera PON1/HDL-C dobiva se uvid u specifičnu aktivnost paraoksonaze.

Na aktivnost PON1 utječu brojni čimbenici kao što su spol (ALI i sur., 2003.), dob, hranidba, okoliš te lijekovi i patofiziološki uvjeti (COSTA i sur., 2005.). ALI i sur. (2003.) su utvrdili značajno veće aktivnosti PON1 u serumu mišica u odnosu na mužjake dok su TURK i sur. (2005.) i MIYAMOTO i sur. (2005.) utvrdili značajno veće vrijednosti kod krava nego ILIČIĆ i sur. (2013.) kod bikova.

Aktivnost PON1 u sjemenjnoj plazmi izrazito je mala i kod životinja (ILIČIĆ i sur., 2013.) i u uzorcima zdravih muškaraca (VERIT i sur., 2009.; MARSILLACH i sur., 2011.). Razlog tome je vjerojatno činjenica da je PON1 vezana za HDL koji je i kod ljudi i kod bikova (BEER LJUBIĆ i sur., 2009.) u sjemenjnoj plazmi prisutan u vrlo niskoj koncentraciji. Niske vrijednosti aktivnosti PON 1 u sjemenjnoj plazmi tumače se na različite načine. VERIT i sur. (2009.) su utvrdili povezanost niske aktivnosti PON1 u sjemenjnoj plazmi ljudi sa smanjenom sposobnošću oplodnje dok MARSILLACH i sur. (2011.) smatraju da su vrlo niske vrijednosti koncentracije i aktivnosti PON1 u sjemenjnoj plazmi ljudi posljedica staničnog metabolizma te nemaju značajnu biološku funkciju.

### 2.4.5. Glutation (GSH)

Glutation (GSH) je tripeptid sljedećeg aminokiselinskog sastava: glutaminska kiselina, glicin i cistein, čija je struktura prvi puta otkrivena još davne 1935. godine (MEISTER i ANDERSON, 1983.). Najkoncentriraniji je stanični antioksidans. Sadržuje sulfhidrilnu skupinu (SH-) i veliki redoks potencijal te održava unutrašnjost stanice u reduciranom stanju i sudjeluje kao donor elektrona u reakciji katalize peroksida pomoću glutacion peroksidaze. Koncentracija mu se održava na dva načina: *de novo* sinteza ili redukcija oksidiranog glutaciona pomoću glutacion reduktaze (FUJII i sur., 2003.). Oba su procesa učinkovitija u Sertolijevim stanicama te one osiguravaju visoku razinu glutaciona u sjemenu, jer spermatogene stanice imaju mnogo manji kapacitet obnavljanja glutaciona (slika 5).



Slika 5. U Sertolijevim stanicama se odvija *de novo* sinteza glutaciona kao i redukcija pomoću glutacion reduktaze, spermatogene stanice imaju mnogo manji kapacitet obnavljanja glutaciona (FUJII i sur., 2003).

### 3. ZAKLJUČCI

1. u radu je opisan utjecaj oksidacijskog stresa na plodnost muških rasplodnjaka
2. reaktivni spojevi dušika i kisika u fiziološkim uvjetima neophodni su za normalno odvijanje kapacitacije i akrosomske reakcije spermija
3. glavni izvor ROS u većim koncentracijama su nezreli oblici spermija, mrtvi spermiji, leukociti koji kontaminiraju sjeme
4. spermije od oksidacijskog stresa štite antioksidansi u spermijima i sjemenoj plazmi: supreroksid dismutaza, glutacion peroksidaza, katalaza, paraoksonaza 1, glutation, tioredoksin, abumini, vitamini E i C

#### 4. LITERATURA

- ABUJA, P. M., R. ALBERTINI (2001): Methods for monitoring oxidative stress, lipid peroxidation and oxidation resistance of lipoproteins. *Clin. Chim. Acta* 306, 1-17.
- AGARWAL, A., A. RAMADAN, M. D. SALEH, M. A. BEDAIWY (2003): Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertil. Steril.* 4, 829-843.
- ALADROVIĆ, J., D. CARIĆ, B. BEER LJUBIĆ, R. LAŠKAJ, M. KARADJOLE, I. MAJIĆ BAJIĆ, F. MARKOVIĆ, N. MALTAR-STRMEČKI (2013): Reduction of boar semen sperm motility by oxidation on membrane lipid bilayer. *Book of Abstract The 5th International Congress "Veterinary Science and Profession"*, Ur.: Horvatek Tomić, D. K. Severin, A. Slavica, Zagreb, Faculty of Veterinary Medicine, 73-73.
- ALI, B. A., Q. ZHANG, Y. K. LIM, D. FANG, L. RETNAM, S-K. LIM (2003): Expression of major HDL-associated antioxidant PON-1 is gender dependent and regulated during inflammation. *Free Rad. Biol. Med.* 34, 824-829.
- ARGOV, N., D. SKLAN, Y. ZERON, Z. ROTH (2007): Association between seasonal changes in fatty-acid composition, expression of VLDL receptor and bovine sperm quality. *Theriogenology.* 67, 878-885.
- AVIRAM, M., M. ROSENBLAT, C. L. BISGAIER, R. S. NEWTON, S. L. PRIMO-PARMO, B. N. LA DU (1998): Paraonase inhibits high-density lipoprotein oxidation and preserves its function. *J. Clin. Inves.t* 101, 1581-1590.
- AVIRAM, M., M. ROSENBLAT, S. BILLECKE, J. EROGUL, R. SORENSON, C. L. BISGAIER, R. S. NEWTON, B. N. LA DU (1999): Human serum paraonase (PON1) is inactivated by oxidized low density lipoprotein and preserved by antioxidants. *Free Rad. Biol. Med.* 26, 892-894.
- BANSAL, A. K., G. S. BILASPURI (2011): Impacts of Oxidative Stress and Antioxidants on Semen Functions. *Veterinary Medicine International*, Volume 2011, Article ID 686137 doi:10.4061/2011/686137.
- BAUMBER, J., A. VO, K. SABEUR, B. A. BALL (2002): Generation of reactive oxygen species by equine neutrophils and their effect on motility of equine spermatozoa. *Theriogenology* 57, 1025-1033.
- BECKMAN, K. B., B. N. AMES (1998): The free radical theory of aging matures. *Physiol. Rev.*, 2, 547-581.

- BEDFORD, J. M., D. D. HOSKINS (1990): U: Marshall's Physiology of reproduction. (Lamming, G. E., ur.). Churchill Livingstone. Edinburgh, str. 379-568.
- BEER LJUBIĆ, B., J. ALADROVIĆ, T. S. MARENJAK, I. MAJIĆ-BALIĆ, R. LAŠKAJ S. MILINKOVIĆ-TUR (2012): Biochemical properties of bull spermatozoa separated in iodixanol density solution. *Res vet sci* 92, 292-294.
- BEER-LJUBIĆ, B., J. ALADROVIĆ, T. S. MARENJAK, R. LAŠKAJ, I. MAJIĆ-BALIĆ, S. MILINKOVIĆ-TUR (2009): Cholesterol concentration in seminal plasma as a predictive tool for quality semen evaluation. *Theriogenology* 72, 1132-1140.
- BILODEAU, J. F., S. CHATTERJEE, M. A. SIRARD, C. GAGNON (2000): Levels of antioxidant defenses are decreased in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing. *Mol. Reprod. Dev.* 55, 282-288.
- BRIGELIUS-FLOHE, R. (1999): Tissue –specific functions of individual glutathione peroxidases. *Free Radical Bio. Med.* 27, 951-965.
- BRINSKO, S. P., C. C. LOVE, J. E. BAUER, M. L. MACPHERSON, D. D. VARNER (2007): Cholesterol-to-phospholipid ratio in whole sperm and seminal plasma from fertile stallions and stallions with unexplained subfertility *Anim. Reprod. Sci.* 99, 65-71.
- BRINZEJ, M., P. CAPUT, Z. ČAUŠEVIĆ, I. JURIĆ, G. KRALIK, S. MUŽIĆ, M. NIKOLIĆ, A. PETRIČEVIĆ, A. SREĆKOVIĆ, Z. STEINER (1991): *Stočarstvo. Školska knjiga, Zagreb*, 19-21.
- BROWERS, J. F. H., B. M. GADELLA (2003): In situ detection and localization of lipid peroxidation in individual bovine sperm cells. *Free Radical Bio. Med.* 35, 1382-1391.
- CERGOLJ, M., M. SAMARDŽIJA (2006): *Veterinarska andrologija. (Samardžija, M., ur.). Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb.*
- COSTA, L. G., A. VITALONE, T. B. COLE, C. E. FURLONG (2005): Modulation of paraoxonase (PON1) activity. *Biochem. Pharmacol.* 69, 541-550.
- CROSS, N. L. (1998): Role of cholesterol in sperm capacitation. *Biology of Reproduction* 59, 7–11.
- CROSS, N. L. (2003): Decrease in order of human sperm lipids during capacitation. *Biol reprod* 69, 529-534.
- CROSS, N. L. (2004): Reorganization of lipids rafts during capacitation of human sperm. *Biol reprod* 71, 1367-1373.
- Čepelak, I. (2009): *Slobodni radikali i antioksidansi. U: Štrausova medicinska biokemija. Urednice: Dubravka Čvorišćec i Ivana Čepelak, Medicinska naklada Zagreb, str. 638-648.*

- De LAMIRANDE E., H. JIANG, A. ZINI, H. KODAMA, C. GAGNON (1997): Reactive oxygen species and sperm physiology. *Rev. Reprod.* 2, 48–54.
- FUJII, J., Y. IUCHI, S. MATSUKI, T. ISHII (2003): Cooperative function of antioxidant and redox systems against oxidative stress in male reproductive tissues. *Asian J. Androl.* 5, 231-242.
- GADELLA, B. M., P.-S. TSAI, A. BOERKE, I. A. BREWIS (2008): Sperm head membrane reorganisation during capacitation. *Int. J. Dev. Biol.* 52, 473-480.
- GAVELLA, M (1996): Uloga pro i antioksidativnih mehanizama u humanojoj reprodukciji. *Biochemia medicina* 1, 38.
- GETZ, I. (1999): Dozrijevanje, oplodnja i uzgoj oplodjenih govedih jajnih stanica *in vitro*. Magistarski rad, Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb.
- GHYSELINCK, N. B., C. JIMENEZ, J. P. COURTY DUFAURE (1989): Androgen-dependent messenger RNA (S) related to secretory proteins in the mouse epididymis. *J. Reprod. Fertil.* 85, 631-639.
- GUTZMIRTL, H. (2013.): Utjecaj hibridne linije, dobi i individualnih svojstava na biokemijski sastav sjemene plazme nerastova. Disertacija. Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, 2013.
- GUYTON, A. C., J. E. HALL (2006): Medicinska fiziologija. 11. izdanje, Medicinska naklada, Zagreb, str. 996-1010.
- HALLIWEL, B., J. M. C. GUTTERIDGE (1999): Antioxidant defence enzymes: Catalase. U: *Free radicals in biology and medicine*. 3<sup>rd</sup> edition. Oxford University Press. Oxford.
- ILIČIĆ, L., E. KLEPO, B. BEER LJUBIĆ, R. LAŠKAJ, I. MAJIĆ-BALIĆ, L. RADIN, I. ŠTOKOVIĆ, J. ALADROVIĆ (2013): Paraoxonase 1 activity and lipid concentrations in serum and seminal plasma of simmental bulls. *Book of Abstract The 5th International Congress "Veterinary Science and Profession"*, Ur.: Horvatek Tomić, D. K. Severin, A. Slavica, Zagreb, Faculty of Veterinary Medicine, 72-72.
- IMAI, H., K. SUZUKI, K. ISHIZAKA, S. ICHINOSE, H. OSHIMA, I. OKAYASU, K. EMOTO, M. UMEDA, Y. NAKAGAWA (2001): Failure of the Expression of Phospholipid Hydroperoxide Glutathione Peroxidase in the Spermatozoa of Human Infertile Males. *Biol. Reprod.* 64, 674–683.
- IMAI, H., Y. NAKAGAWA (2003): Biological significance of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx, GPx4) in mammalian cells. *Free Radical Bio. Med.* 2, 145-169.
- IRVINE, D. S. (1996): Glutathione as a treatment for male infertility. *Rev. Reprod.* 1, 6-12.

- JEYENDRAN, R. S. (2003): Protokols for semen analysis in clinical diagnosis. Parthenon Publishing Group, New York, SAD.
- JIANG, Z. L., Q. W. LI, J. H. HU, W. Y. LI, H. W. ZHAO, S. S. ZHANG (2007): Improvement of the quality of boar cryopreservation semen by supplementing with low density lipoprotein in diluents. *Cryobiol.* 54, 301-304.
- JONES, A. R. (1997): Metabolism of lactate by mature boar spermatozoa. *Reprod. Fertil. Dev.* 9, 227-237.
- JONES, A. R. D. MILMLOW (1997): Endogenous energy production by mature boar spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 111, 285-290.
- JURKOVIĆ, S., J. OSREDKAR, J. MARC (2008): Molekularni utjecaj glutation-peroksidaza u antioksidacijskim procesima. *Biochem. Medica* 18, 162-174.
- JUYENA, N. S., C. STELLETTA (2012): Seminal Plasma: An Essential Attribute to Spermatozoa. *Journal of Andrology*, 4, 536-551.
- KASIMANICKAM, R., V. KASIMANICKAM, C. D. THATCHER, R. L. NEBEL, B. G. CASSELL (2007): Relationships among lipid peroxidation, glutathione peroxidase, superoxide dismutase, sperm parameters, and competitive index in dairy bulls. *Theriogenology* 67, 1004-1012.
- KOSKINEN, E., M. KARLSSON, T. REILAS, S. SANKARI. A. L. ESALA, T. KATILA (2002): Catalase activity and total protein in fractionated stallion seminal plasma. *Theriogenology* 58, 337-340.
- KOVALSKI, N. N., E. De LAMIRANDE, C. GAGNON (1992): Reactive oxygen species generated by human neutrophils inhibit sperm motility: protective effect of seminal plasma and scavengers. *Fertil. Steril.* 58, 809-816.
- MACKNESS, B., P.N. DURRINGTON, M. I. MACKNESS (1998): Human serum paraoxonase. *Gen. Pharmac.* 31, 329-336.
- MAKKER, K., A. AGARWAL, R. SHARMA (2009): Oxidative stress & male infertility. *Indian J. Med. Res.* 129, 357-367.
- MARSILLACH, J., R. LAFUENTE, M. A. CHECA, C. MAESTRE-MARTÍNEZ, E. FABIÁN, M. BRASSESCO, R. BELTRÁN-DEBÓN, G. ARAGONÈS, R. CARRERAS, J. PEDRO-BOTET, J. JOVEN, J. CAMPS (2011): Paraoxonase-1 is only present in traceable amounts in seminal fluid and does not show any relationship with male subfertility. *BJU International* 108, 566-570.
- MEISTER, A., M. A. ANDERSON (1983): Glutathione. *Annu. Rev. Biochem.* 52, 711-760.

- MESEGUER, M., N. GARRIDO, J. A. MARTÍNEZ-CONEJERO, C. SIMÓN, A. PELLICER, J. REMOHÍ (2004): Relationship between standard semen parameters, calcium, cholesterol content, and mitochondrial activity in ejaculated spermatozoa from fertile and infertile males. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 21, 445-451.
- MIYAMOTO, T., Y. TAKAHASHI, T. OOHASHI, K. SATO, S. OIKAWA (2005): Bovine paraoxonase 1 activities in serum and distribution in lipoproteins. *J. Vet. Med. Sci.* 67, 243-8.
- MOORE, A. I., E. L. SQUIRES, J. K. GRAHAM (2005): Adding cholesterol to the stallion sperm plasma membrane improves cryosurvival. *Cryobiology* 51, 241-249.
- MRUK D. D., B. SILVESTRINI, M. Y. MO, C Y. CHENG (2002): Antioxidant superoxide dismutase - a review: its function, regulation in the testis, and role in male fertility. *Contraception*, 65: 305-311.
- O'FLAHERTY C. M., N. B. BEORLEGUI, M. T. BECONI (1999): Reactive oxygen species requirements for bovine sperm capacitation and acrosome reaction. *Theriogenology* 52, 289-301.
- OOKAWARA, T., N. IMAZEKI, O. MATSUBARA, T. KIZAKI, S. OH-ISHI, C. NAKAO, Y. SATO, H. OHNO (1998): Tissue distribution of immunoreactive mouse extracellular superoxide dismutase. *Am. J. Physiol.* 275 (Cell Physiol. 44), C840-C847.
- PARKINSON, T. J. (1996): The male animal; Structure and function of spermatozoa. U: *Veterinary Reproduction & Obstetrics*. Seventh edit., W. B. Saunders Company Ltd. str. 561-563.
- PEEKER, R., L. ABRAMSSON, S. L.MARKLUND (1997): Superoxide dismutase isoenzymes in human seminal plasma and spermatozoa. *Mol. Hum. Reprod.* 12, 1061-1066.
- PESCH, S., M. BERGMANN, H. BOSTEDT (2003): Determination of some enzymes and macro- and microelements in stallion seminal plasma and their correlations to semen quality. *Theriogenology* 66, 307-313.
- PFEIFER, H., M. CONRAD, D. ROETHLEIN, A. KYRIAKOPOULOS, M. BRIELMEIER, G. W. BORNKAMM, D. BEHNE (2001): Identification of a specific sperm nuclei selenoenzyme necessary for protamine thiol crosslinking during sperm maturation. *FASEB J.* 15, 1236-1238.
- RAIJMAKERS, M. T. M., H. M. J. ROELOFS, E. A. P. STEEGERS, R. P. M. STEEGERS-THEUNISSEN, T. P. J. MULDER, M. F. C. M. KNAPEN, W. YEE WON, W. H. M. PETERS (2003): Glutathione and glutathione S-transferases A1-1 and P1-1 in seminal



- plasma may play a role in protecting against oxidative damage to spermatozoa. *Fertil. Steril.* 1, 169-172.
- SANTANAM N., S. RAMACHANDRAN, S. PARTHASARATHY (1998): Oxygen radicals, antioxidants, and lipid peroxidation. *Semin. Reprod. Endocrinol.* 16, 275-280.
- SHADAN, S., P. S. JAMES, E. A. HOWES, R. JONES (2004): Cholesterol Efflux Alters Lipid Raft Stability and Distribution During Capacitation of Boar Spermatozoa. *Biology of reproduction* 71, 253–265.
- SIKKA, S. C. (1996): Oxidative stress and role of antioxidants in normal and abnormal sperm function. *Front. Biosci.* 1, 78-86.
- SORAN, H., N. N. YOUNIS, V. CHARLTON-MENYS, N. P. DURRINGTO (2009): Variation in paraoxonase-1 activity and atherosclerosis. *Curr. Opin. Lipidol.* 20, 265-274.
- SURAI, P. F. (2002): Natural antioxidants in avian nutrition and reproduction. Nottingham University Press, Nottingham.
- ŠTRAUS, B. (2009): Enzimi. U: Štrausova medicinska biokemija. Urednice: Dubravka Čvorišćec i Ivana Čepelak, Medicinska naklada Zagreb, str. 245-312.
- TURK, R., D. JURETIĆ, D. GEREŠ, N. TURK, B. REKIĆ, V. SIMEON-RUDOLF, M. ROBIĆ, A. SVETINA (2005): Serum paraoxonase activity in dairy cows during pregnancy. *Res. Vet. Sci.* 79, 15-18.
- UREMOVIĆ, M., Z. UREMOVIĆ (1997): Svinjogojstvo. Agronomski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, pp. 172-173.
- VAISBERG, C. N., L. V. JELEZARSKY, B. DISHLIANOVA, T. A. CHAUSHEV (2005): Activity, substrate detection and immunolocalization of glutathione peroxidase (GPx) in bovine reproductive organs and semen. *Theriogenology* 2, 416-428.
- VALKO, M., C. J. RHODES, J. MONCOL (2006): Free radicals, methods and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem. Biol. Interact.* 160, 1-40.
- VALKO, M., H. MORRIS, M. T. DRONIN (2005): Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr. Med. Chem.* 12, 1161-1208.
- VERIT, F. F., A. VERIT, H. CIFTCI, O. EREL, H. ÇELIK (2009): Paraoxonase-1 activity in subfertile men and relationship to sperm parameters. *J. Androl.* 30, 183-189.
- WITTE, T. S., S. SCHÄFER-SOMI (2007): Involvement of cholesterol, calcium and progesterone in the induction of capacitation and acrosome reaction of mammalian spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.* 102, 181-193.

- Zalata, A. A., A. B. Christophe, C. E. Depuydt, F. Schoonjans, F. H. Comhaire (1998): The fatty acid composition of phospholipids of spermatozoa from infertile patients. *Molecular Human Reproduction*, 2, 111–118.
- ZINI, A., E. DE LAMIRANDE, C. GAGNON (1993): Reactive oxygen species in semen of infertile patients: levels of superoxide dismutase- and catalase-like activities in seminal plasma and spermatozoa. *Int. J. Androl.* 16, 183-188.

## 5. SAŽETAK

### Utjecaj oksidacijskog stresa na plodnost muških rasplodnjaka

Jedan od glavnih čimbenika loše kvalitete sjemena, a time i reproduktivne funkcije muških životinja je upravo oksidacijski stres. Ovo se stanje razvija bilo da se radi o povećanom stvaranju kisikovih i dušikovih reaktivnih spojeva (ROS/RNS) i/ili smanjenoj mogućnosti antioksidativne obrane zbog smanjene sinteze ili smanjenog unosa antioksidativnih spojeva kao što su vitamin E, A, C, karotenoidi i selen. Membrana spermija sisavaca bogata je višestrukonezasićenim masnim kiselinama koje su osjetljive na peroksidaciju uzrokovanu reaktivnim kisikovim spojevima. Zaštita spermija od oksidacijskog stresa od najveće je važnosti. Spermiji i sjemena plazma sadrže enzime superoksid dismutazu, glutaton peroksidazu, katalazu, paraoksonazu 1, glutation, tioredoksin, albumine i vitamine E i C. Sjemena plazma ima veću koncentraciju antioksidansa od drugih bioloških tekućina te nadoknađuje manju razinu ovih molekula prisutnih u spermijima.

Glavni izvor reaktivnih kisikovih spojeva su nezreli i mrtvi spermiji kao i leukociti koji kontaminiraju sjeme.

Ključne riječi: spermiji, sjemena plazma, oksidacijski stres, antioksidansi

## 6. ABSTRACT

### **Oxidative stress and antioxidants in male animal fertility**

One of the most important factors contributing to poor quality semen and thus reproductive functions of male animals has been reported to be oxidative stress. This condition develops due to some or all of these factors: a) increased production of oxygen derived oxidants commonly known as ROS; b) reduced antioxidant defense because of the reduced synthesis of antioxidant molecules or c) a decreased intake of natural antioxidants such as vitamin E, A, C, carotenoids and selenium. Mammalian spermatozoa membranes are rich in polyunsaturated fatty acids (PUFA) and are sensitive to oxygen-induced damage mediated by lipid peroxidation.

In order to maintain vital reproductive ability, a protective mechanism against oxidative stress has great importance. To protect spermatozoa from oxidative stress, both spermatozoa and seminal plasma contain antioxidants superoxide dismutase, glutathione peroxidases, catalase, paraoxonase 1, glutathione,  $\alpha$ -tocopherol, ascorbic acid, glutathione, thoredoxine and albumin. Seminal plasma has a higher concentration of antioxidants than any other biological fluid, including blood serum, which compensates for the low antioxidative capacity of spermatozoa themselves.

The main source of ROS in immature forms of spermatozoa is considered to be proximal or distal protoplasmic droplet, located below the head or on the tail in some of spermatozoa. Such forms of immature sperms are not enduring and are infertile. In bovine and ram semen, ROS are generated primarily by dead spermatozoa. Contaminating leukocytes in the ejaculate are an important source of ROS in human and stallion semen.

Key words: spermatozoon, seminal plasma, oxidative stress, antioxidants

## **ŽIVOTOPIS**

Moje ime je Zoran Lovrić, rođen sam 7. kolovoza 1971. u Splitu. Osnovnu školu (Vinko Paić Ožić) završio sam 1986. u Splitu. Nakon toga upisao sam srednju školu – smjer veterinarski tehničar u Kaštel Štafiliću – Nehaj, te ju završavam 1990. Potom upisujem Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, ak. god. 1991./1992. Redovno sam upisao svih 5 godina, te 1998., završetkom studentskih prava, a zbog određenog spleta okolnosti prelazim na turističku djelatnost. Istovremeno sam pohađao seminare i tečajeve na temu poduzetništva, stranih jezika, informatičke pismenosti (ECDL operater, ECDL specijalist) i dr. Odobrenjem Fakultetskog vijeća Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, ak. god. 2006./2007., upisao sam razliku nastavnog plana i programa, odslušao i položio sve ispite, zaključno sa 16.6.2014. g.