



UDK 636.4.082.453.5:612.616.2:542.816:577.152(043.3)

Maja Zakošek Pipan, dr. vet. med.

**VPLIV ODSTRANITVE NIZKOMOLEKULSKIH SESTAVIN SEMENSKE
PLAZME NA OKSIDATIVNI STATUS IN LASTNOSTI HLAJENEGA
MERJAŠČEVEGA SEMENA V POGOJIH *IN VITRO***

Doktorska disertacija

**THE IMPACT OF REMOVING LOW-MOLECULAR WEIGHT
COMPONENTS FROM SEMINAL PLASMA ON OXIDATIVE STATUS
AND SEMEN CHARACTERISTICS OF COOLED BOAR SEMEN *IN
VITRO***

Doctoral thesis

Ljubljana, 2014

Maja Zakošek Pipan

**VPLIV ODSTRANITVE NIZKOMOLEKULSKIH SNOVI SEMENSKE PLAZME NA OKSIDATIVNI
STATUS IN LASTNOSTI HLAJENEGA MERJAŠČEVEGA SEMENA V POGOJIH *IN VITRO***

Delo je bilo opravljeno na:

- Kliniki za reprodukcijo in konje Veterinarske fakultete v Ljubljani
- Kliniki za kirurgijo in male živali Veterinarske fakultete v Ljubljani
- Katedri za farmacevtsko biologijo, Fakulteta za farmacijo v Ljubljani

Javni zagovor je bil opravljen v Ljubljani, dne _____

Mentor: izr. prof. dr. Petra Zrimšek, univ. dipl. kem., prof. kem.

Somentor: izr. prof. dr. Janko Mrkun, dr. vet. med.

Izjavljam, da je doktorska disertacija rezultat lastnega raziskovalnega dela, da so rezultati pravilno navedeni in nisem kršila avtorskih pravic in intelektualne lastnine drugih.

Člani strokovne komisije za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Robert Frangež, dr. vet. med.

Član: prof. dr. Marjan Kosec, dr. vet. med.

Član: doc. dr. Primož Klinc, dr. vet. med.

Član: izr. prof. dr. Irma Virant Klun, univ. dipl. biol.

Član: doc. dr. Branko Zorn, dr. med.

IZVLEČEK

Ključne besede: Reprodukcija – veterinarska; seme – citologija; analize semena; semenčice, gibljivost; dializa; oksidativni stres – lipidna peroksidacija; antioksidanti – analize; superoksid dismutaza; TAC; seme, shranjevanje – metode; prašiči; samci

Semenska plazma vsebuje nizkomolekulske sestavine, ki imajo lahko negativen učinek na funkcijo semenčic. V naši raziskavi smo proučili vpliv dialize in dodatka antioksidanta na kakovost, lipidno peroksidacijo in antioksidantni status tekoče hranjenega merjaščevega semena. Parametre oksidativnega stresa v semenski plazmi smo diagnostično ovrednotili z vidika napovedne vrednosti kakovosti semena po treh dneh hranjenja.

V semenu, ki smo mu z dializo odstranili nizkomolekulske sestavine semenske plazme, se je ohranil statistično značilno večji delež morfološko normalnih semenčic in nekapacitiranih semenčic, delež semenčic z akrosomsko reakcijo pa je bil po treh dneh hranjenja v primerjavi z nedializiranimi vzorci statistično značilno manjši. Ugotavljanje tirozin fosforiliranih proteinov na semenčicah je potrdilo, da je bila kapacitacija hranjenih semenčic navidezna. Dializirano seme je imelo nižjo skupno antioksidantno kapaciteto in višjo stopnjo lipidne peroksidacije v primerjavi z nedializiranim. Z dodatkom 200 µM α-tokoferola dializiranemu semenu smo uspeli ohraniti lipidno peroksidacijo in membranski mitohondrijski potencial semenčic na enaki ravni, kot sta bila le-ta v nativnih vzorcih. Poleg tega je imelo omenjeno seme statistično značilno večji delež živih in progresivno gibljivih semenčic v primerjavi z nedializiranim semenom ter od vseh hranjenih vzorcev najmanjši delež semenčic s fragmentirano DNK. Aktivnost superoksid dismutaze (SOD) se je med hranjenjem semena poviševala in je v nedializiranih vzorcih dosegla statistično značilno višjo vrednost v primerjavi z dializiranim semenom. Aktivnost SOD v sveži semenski plazmi se je izkazala za zanesljiv prognostični pokazatelj kakovosti kratkotrajno hranjenega merjaščevega semena.

ABSTRACT

Key words: Reproduction – veterinary; semen – cytology; semen analysis; sperm motility; dialysis; oxidative stress – analysis; lipid peroxidation; antioxidants – analysis; superoxide dismutase; TAC; semen preservation – methods; boar; male

Seminal plasma contains low-molecular weight components that can exert a harmful effect on sperm function. In our study we evaluated the effect of dialysis of seminal plasma, and the addition of an antioxidant on semen quality, and on lipid peroxidation and antioxidant status in liquid stored boar semen. Oxidative stress parameters in fresh boar seminal plasma were evaluated as potential predictors of semen quality after three days of liquid storage.

The removal of low-molecular weight components from seminal plasma by dialysis resulted in significantly better preservation of morphologically normal and non-capacitated spermatozoa. The percentage of acrosomally reacted spermatozoa after three days of storage was significantly lower than that of non-dialysed samples. Determination of tyrosine phosphorylated proteins in stored spermatozoa confirmed capacitation-like modifications. We observed a significant decrease in total antioxidant capacity and an increase in lipid peroxidation of spermatozoa in dialysed samples when compared to non-dialysed samples. Addition of 200 µM α-tocopherol to dialysed semen maintained lipid peroxidation and mitochondrial membrane potential at the same levels as in native samples. The percentage of progressive motile and viable spermatozoa was statistically significantly higher than in non-dialysed semen and level of DNA fragmentation the lowest of all groups of stored semen. Superoxide dismutase (SOD) activity increased on storage and reached significantly higher levels of SOD in non-dialysed samples than in dialysed semen. SOD activity in fresh boar seminal plasma proved to be a reliable prognostic marker of semen quality in short-term stored boar semen.

KAZALO VSEBINE

IZVLEČEK	4
ABSTRACT	5
KAZALO VSEBINE	6
KAZALO SLIK.....	10
LIST OF FIGURES	12
KAZALO TABEL.....	14
LIST OF TABLES	15
SEZNAM OKRAJŠAV	17
SEZNAM OKRAJŠAV	17
1 UVOD	19
2 PREGLED LITERATURE	22
2.1 KRATKOTRAJNO HRANJENJE MERJAŠČEVEGA SEMENA	22
2.1.1 Pomen shranjevanja semena.....	22
2.1.2 Značilnosti kratkotrajno hrانjenega semena	22
2.2 NIZKOMOLEKULSKE SESTAVINE SEMENSKE PLAZME IN NJIHOV VPLIV NA FUNKCIJO SEMENČIČ ..	25
2.2.1 Semenska plazma	25
2.2.2 Nizkomolekulske sestavine semenske plazme	26
2.2.3 Dializa	28
2.3 OKSIDATIVNI STRES IN REAKTIVNE KISIKOVE ZVRSTI	30
2.3.1 REAKTIVNE KISIKOVE ZVRSTI (ROS)	30
2.3.2 ROS V SEMENU	30
2.3.3 LIPIDNA PEROKSIDACIJA	35
2.4 KLINIČNI POMEN OKSIDATIVNEGA STRESA V SEMENU	39
2.5 ANTIOKSIDANTI V SEMENU.....	39
2.5.1 ENCIMSKI ANTIOKSIDANTI.....	40
2.5.2 NIZKOMOLEKULSKI ANTIOKSIDANTI.....	44
2.5.3 CELOKUPNA ANTIOKSIDANTNA KAPACITETA (TAC)	48
3 MATERIALI IN METODE	50
3. 1 ZASNOVA RAZISKAVE.....	50
3.1.1 VZORCI SEMENA	50

3.1.1.1 DIALIZA	50
3.1.1.2 PRIPRAVA SEMENSKE PLAZME	51
3.1.2 UGOTAVLJANJE LASTNOSTI KRATKOTRAJNO HRANJENEGA SEMENA PO DIALIZI.....	51
3.1.3 OPTIMIZACIJA DODATKA ANTIOKSIDANTOV.....	54
3.1.4 UGOTAVLJANJE LASTNOSTI KRATKOTRAJNO HRANJENEGA SEMENA PO DIALIZI IN DODATKU ANTIOKSIDANTA	55
3.1.5 UGOTAVLJANJE POTENCIJALNIH DIAGNOSTIČNIH POKAZATELJEV KAKOVOSTI KRATKOTRAJNO HRANJENEGA SEMENA	57
3.2 METODE ZA UGOTAVLJANJE LASTNOSTI SEMENA	57
3.2.1 DOLOČANJE KONCENTRACIJE SEMENČIC	57
3.2.2 DOLOČANJE GIBLIVOSTI SEMENČIC	57
3.2.3 DOLOČANJE MORFOLOŠKO SPREMENJENIH SEMENČIC	58
3.2.4 DOLOČANJE PREŽIVITVENE SPOSOBNOSTI.....	61
3.2.5 DOLOČANJE INTEGRITETE MEMBRANE SEMENČIC – HIPOOZMOTSKI TEST	62
3.2.6 DOLOČANJE PRESNOVNE AKTIVNOSTI SEMENČIC	64
3.2.7 DOLOČANJE SPONTANE KAPACITACIJE SEMENČIC IN AKROSOMSKE REAKCIJE.....	64
3.2.8 DOLOČANJE KAPACITACIJSKE SPOSOBNOSTI SEMENČIC V IN VITRO POGOJIH	67
3.2.9 LOKALIZACIJA TIROZIN FOSFORILIRANIH PROTEINOV NA SEMENČICAH	67
3.2.10 DOLOČANJE SPREMEMB V PREPUSTNOSTI PLAZEMSKE MEMBRANE SEMENČIC.....	73
3.2.11 DOLOČANJE MITOHONDRIJSKEGA MEMBRANSKEGA POTENCIALA	77
3.2.12 DOLOČANJE FRAGMENTACIJE DNK SEMENČIC	80
3.2.13 DOLOČANJE CELOKUPNE ANTIOKSIDANTNE KAPACITETE (TAC).....	81
3.2.14 DOLOČANJE AKTIVNOSTI SUPEROKSID DISMUTAZE (SOD)	82
3.2.15 DOLOČANJE LIPIDNE PEROKSIDACIJE	82
3.2.16 STATISTIČNO VREDNOTENJE REZULTATOV	85
4 REZULTATI	91
4.1 UGOTAVLJANJE LASTNOSTI KRATKOTRAJNO HRANJENEGA SEMENA PO DIALIZI.....	91
4.1.1 OSNOVNI PARAMETRI	91
4.1.2 MORFOLOŠKE NAPAKE SEMENČIC	93
4.1.3 PRESNOVNA AKTIVNOST SEMENČIC	95
4.1.4 KAPACITACIJA SEMENČIC	96
4.1.5 DOLOČANJE TIROZIN FOSFORILIRANIH PROTEINOV V SEMENČICAH	98
4.1.6 PARAMETRI OKSIDATIVNEGA STRESA	100
4.2 OPTIMIZACIJA DODATKA ANTIOKSIDANTOV	103

4.3 UGOTAVLJANJE LASTNOSTI KRATKOTRAJNO HRANJENEGA SEMENA PO DIALIZI IN DODATKU ANTIOKSIDANTA	103
4.3.1 GIBLJIVOST SEMENČIC	104
4.3.2 MORFOLOŠKE NAPAKE SEMENČIC	105
4.3.3 INTEGRITETA PLAZEMSKE MEMBRANE SEMENČIC	107
4.3.4 PRESNOVNA AKTIVNOST SEMENČIC	110
4.3.5 KAPACITACIJA SEMENČIC	110
4.3.6 KAPACITACIJA SEMENČIC PO IZPOSTAVITVI SEMENA MEDIJU ZA KAPACITACIJO	112
4.3.7 MEMBRANSKI POTENCIAL SEMENČIC	114
4.3.8 MITOHONDRIJSKI POTENCIAL SEMENČIC.....	117
4.3.9 DNK FRAGMENTACIJA	117
4.3.10 PARAMETRI OKSIDATIVNEGA STRESA	118
4.3.10.4 8-ISOPROSTAN	119
4.4 POTENCIALNI DIAGNOSTIČNI POKAZATELJI KAKOVOSTI KRATKOTRAJNO HRANJENEGA SEMENA	123
4.4.1 KORELACIJE MED PARAMETRI OKSIDATIVNEGA STRESA IN KAKOVOSTJO SEMENA PO 72 URAH HRANjenja	126
4.4.2 DIAGNOSTIČNO VREDNOTENJE SOD IN TBARS V SEMENSKI PLAZMI NA DAN ODVZEMA SEMENA Z VIDIKA NAPOVEDI KAKOVOSTI KRATKOTRAJNO HRANJENEGA MERJAŠČeveGA SEMENA.....	127
4.5 DIAGNOSTIČNO VREDNOTENJE SOD IN TBARS V SEMENSKI PLAZMI Z VIDIKA POTENCIALNEGA POKAZATELJA KAKOVOSTI SEMENA	132
5 RAZPRAVA.....	138
6 SKLEPI	157
7 POVZETEK.....	159
8 SUMMARY.....	162
9 ZAHVALA	165
10 LITERATURA.....	167
11 PRILOGE	186
11.1 Priloga 1: Primerjava koncentracij izmerjenih spektorfotometrično in s štetjem z Neubauerjevo kamrico	186
11.2 Priloga 2: Koeficient variacij za ponovitev v testu za posamezne metode uporabljene za ugotavljanje lastnosti kratkotrajno hranjenega semena po dializi.....	187
11.3 Priloga 3: Ugotavljanje lastnosti kratkotrajno hranjenega semena po dializi - Vrednosti osnovnih parametrov	188

11.4 Priloga 4: Ugotavljanje lastnosti kratkotrajno hranjenega semena po dializi - Morfološke napake semenčic	189
11.5 Priloga 5: Ugotavljanje lastnosti kratkotrajno hranjenega semena po dializi - Stopnja kapacitacije semenčic	191
11.6 Priloga 6: Ugotavljanje lastnosti kratkotrajno hranjenega semena po dializi - Parametri merjeni v semenski plazmi (TAC, SOD, TBARS)	192
11.7 Priloga 7: Optimizacija dodatka antioksidantov - osnovni semenski parametri.....	193
11.8 Priloga 8: Koeficient variacij za ponovitev v testu za posamezne metode uporabljene za ugotavljanje lastnosti kratkotrajno hranjenega semena po dializi in dodatku antioksidanta.....	194
11.9 Priloga 9: Ugotavljanje lastnosti kratkotrajno hranjenega semena po dializi in dodatku antioksidanta - Gibljivost semenčic	195
11.10 Priloga 10: Ugotavljanje lastnosti kratkotrajno hranjenega semena po dializi in dodatku antioksidanta – Morfološke napake semenčic	196
11.11 Priloga 11: Ugotavljanje lastnosti kratkotrajno hranjenega semena po dializi in dodatku antioksidanta – Integriteta plazemske membrane semenčic.....	198
11.12 Priloga 12: Ugotavljanje lastnosti kratkotrajno hranjenega semena po dializi in dodatku antioksidanta – Stopnja kapacitacije semenčic	200
11.13 Priloga 13: Ugotavljanje lastnosti kratkotrajno hranjenega semena po dializi in dodatku antioksidanta – Stopnja kapacitacije semenčic po izpostavitvi semena mediju za kapacitacijo.....	201
11.14 Priloga 14: Ugotavljanje lastnosti kratkotrajno hranjenega semena po dializi in dodatku antioksidanta – Membranski potencial	202
11.15 Priloga 15: Ugotavljanje lastnosti kratkotrajno hranjenega semena po dializi in dodatku antioksidanta – Mitohondrijski potencial.....	203
11.16 Priloga 16: Ugotavljanje lastnosti kratkotrajno hranjenega semena po dializi in dodatku antioksidanta – DNK fragmentacija	204
11.17 Priloga 17: Ugotavljanje lastnosti kratkotrajno hranjenega semena po dializi in dodatku antioksidanta – Parametri merjeni v semenski plazmi (TAC, SOD, TBARS, 8-isoprostan)	205
11.18 Priloga 18: Število vzorev razvrščenih glede na ustreznost semena in rezultat testa, v katerem smo diagnostično vrednotili SOD z vidika napovedi kakovosti semena po 72 urah hranjenja	206
11.19 Priloga 19: Število vzorev razvrščenih glede na ustreznost semena in rezultat testa, v katerem smo diagnostično vrednotili SOD z vidika pokazatelja kakovosti semena po 72 urah hranjenja	207

KAZALO SLIK

Slika 1: Shematski prikaz lipidne peroksidacije	36
Slika 2: Shematski prikaz nastanka MDA iz nenasičenih maščobnih kislin	37
Slika 3: Shematski prikaz nastanka 8-isoprostana	38
Slika 4: Shematski prikaz obrambnega delovanja antioksidantnih encimov v semenu	41
Slika 5: Shematski prikaz pretvorbe ergotionina	45
Slika 6: Shematski prikaz nastanka oksidirane oblike α -tokoferola	46
Slika 7: Shematski prikaz sinteze glutationa	47
Slika 8: Shematski prikaz prvega dela raziskave	53
Slika 9: Shematski prikaz drugega dela raziskave	56
Slika 10: Semenčice obarvane z barvilom Giems	59
Slika 11: Semenčici, obarvani z barvilom eosin-nigrosin	60
Slika 12: Semenčica z distalno protoplazmatsko kapljico in zavitim repom	60
Slika 13: Semenčice obarvane z bis-benzimidinom (Hoechst 33258)	62
Slika 14: Shematski prikaz različnih morfoloških podtipov repov semenčic po izpostavitvi semenčic hipoozmotski raztopini	63
Slika 15: Semenčice obarvane s CTC	66
Slika 16: Grafični prikaz subpopulacij semenčic v različnih skupinah kratkotrajno hranjenega semena, določenih s pretočnim citometrom	76
Slika 17: Grafični prikaz mitohondrijskega potenciala v različnih skupinah kratkotrajno hranjenega semena	79
Slika 18: Semenčice po testu Halomax	81
Slika 19: Grafični prikaz deleža gibljivih semenčic v vzorcih nedializiranega in dializiranega semena med kratkotrajnim hranjenjem	92
Slika 20: Grafični prikaz deleža morfološko normalnih semenčic v vzorcih nedializiranega in dializiranega semena med kratkotrajnim hranjenjem	94
Slika 21: Grafični prikaz deleža semenčic z napakami na akrosomu v vzorcih nedializiranega in dializiranega semena med kratkotrajnim hranjenjem	95
Slika 22: Grafični prikaz deleža nekapacitiranih semenčic v vzorcih nedializiranega in dializiranega semena med kratkotrajnim hranjenjem	96
Slika 23: Grafični prikaz deleža semenčic z akrosomsko reakcijo v vzorcih nedializiranega in dializiranega semena med kratkotrajnim hranjenjem	97
Slika 24: Imunoblot štirih vzorcev za ugotavljanje tirozin fosforiliranih proteinov	99
Slika 25: Grafični prikaz vrednosti TAC v semenski plazmi nedializiranega in dializiranega semena med kratkotrajnim hranjenjem	100
Slika 26: Grafični prikaz aktivnosti SOD v semenski plazmi nedializiranega in dializiranega semena med kratkotrajnim hranjenjem	101
Slika 27: Grafični prikaz lipidne peroksidacije merjene s TBARS v semenski plazmi nedializiranega in dializiranega semena med kratkotrajnim hranjenjem	102

Slika 28: Grafični prikaz deleža progresivno gibljivih semenčic v nativnih vzorcih in različnih skupinah kratkotrajno hranjenega semena	105
Slika 29: Grafični prikaz deleža semenčic z napako na akrosomu v nativnih vzorcih in različnih skupinah kratkotrajno hranjenega semena	107
Slika 30: Grafični prikaz deleža semenčic z rahlo nabreklo spodnjo polovico repa v nativnih vzorcih in različnih skupinah kratkotrajno hranjenega semena.....	108
Slika 31: Grafični prikaz deleža semenčic z nabreklo spodnjo polovico repa v nativnih vzorcih in v različnih skupinah kratkotrajno hranjenega semena.....	109
Slika 32: Grafični prikaz deleža semenčic z akrosomsko reakcijo v nativnih vzorcih in različnih skupinah kratkotrajno hranjenega semena	111
Slika 33: Grafični prikaz deleža semenčic z akrosomsko reakcijo v nativnih vzorcih in različnih skupinah kratkotrajno hranjenega semena po izpostavitvi semena mediju za kapacitacijo	113
Slika 34: Grafični prikaz deleža živih semenčic (YoPro-1 -/PI -) v nativnih vzorcih in različnih skupinah kratkotrajno hranjenega semena	115
Slika 35: Grafični prikaz deleža mrtvih semenčic (YoPro-1 +/PI +) v nativnih vzorcih in različnih skupinah kratkotrajno hranjenega semena	116
Slika 36: Razvrstitev vzorcev glede na posamezen parameter.....	120
Slika 37: Razvrstitev vzorcev glede na posamezen parameter.....	122
Slika 38: Krivulja ROC za SOD na dan 0 glede na razdelitev vzorcev med ustrezne in neustrezne.....	131
Slika 39: Krivulja ROC za SOD ($U/10^6$ semenčic) na dan 0 glede na razdelitev vzorcev med ustrezne in neustrezne	132
Slika 40: Krivulja ROC za SOD, izmerjen v semenski plazmi po treh dneh hranjenja, glede na razdelitev vzorcev med ustrezne in neustrezne	136
Slika 41: Krivulja ROC za SOD ($U/10^6$ semenčic), izmerjen v semenski plazmi po treh dneh hranjenja, glede na razdelitev vzorcev med ustrezne in neustrezne	137

LIST OF FIGURES

Figure 1: Schematic diagram of lipid peroxidation.....	36
Figure 2: Schematic diagram of MDA formation from polyunsaturated fatty acids	37
Figure 3: Schematic diagram of 8-isoprostanate production	38
Figure 4: Schematic diagram of the enzymatic antioxidant defence system in semen	41
Figure 5: Schematic diagram of ergothioneine conversion.....	45
Figure 6: Schematic diagram of oxidized α -tocopherol formation.....	46
Figure 7: Schematic diagram of glutathione synthesis.....	47
Figure 8: Schematic diagram of the first part of the research	53
Figure 9: Schematic diagram of the second part of the research	56
Figure 10: Spermatozoa stained with the Giemsa stain.....	59
Figure 11: Spermatozoa stained with eosin-nigrosin stain	60
Figure 12: Spermatozoon with distal protoplasmic droplet and bent tail	60
Figure 13: Spermatozoa stained with bis-benzimidine (Hoechst 33258).....	62
Figure 14: Schematic representation of different subtypes of spermatozoa tail after incubation in hypoosmotic solution.....	63
Figure 15: Spermatozoa stained with CTC.....	66
Figure 16: Graphic diagram of spermatozoa subpopulations in different groups of short-term stored semen as defined with flow cytometry	76
Figure 17: Graph showing mitochondrial potential in different groups of short-term stored semen	79
Figure 18: Spermatozoa after Halomax test.....	81
Figure 19: Graphic demonstration of the proportions of motile spermatozoa in dialysed and non-dialysed semen samples during short storage	92
Figure 20: Graphic demonstration of the proportion of morphologically normal spermatozoa in dialysed and non-dialysed semen samples during short storage.....	94
Figure 21: Graphic demonstration of the proportion of spermatozoa with damaged acrosomes in dialysed and non-dialysed semen samples during short storage.....	95
Figure 22: Graphic demonstration of the proportion of non-capacitated spermatozoa in dialysed and non-dialysed semen samples during short storage	96
Figure 23: Graphic demonstration of the proportion of acrosome reacted spermatozoa in dialysed and non-dialysed semen samples during short storage	97
Figure 24: Immunoblot of four samples for detecting tyrosine phosphorylated proteins	99
Figure 25: Graphic demonstration of TAC values in seminal plasma of dialysed and non-dialysed semen samples during short storage	100
Figure 26: Graphic demonstration of SOD activity in seminal plasma of dialysed and non-dialysed semen samples during short storage	101
Figure 27: Graphic demonstration of lipid peroxidation measured with TBARS in seminal plasma of dialysed and non-dialysed semen samples during short storage.....	102

Figure 28: Graphic demonstration of proportion of progressively motile spermatozoa in native samples and in different groups of short-term stored semen	105
Figure 29: Graphic demonstration of proportion spermatozoa with acrosomal damage in native samples and in different groups of short-term stored semen	107
Figure 30: Graphic demonstration of the proportions of spermatozoa with a tail swollen at the tip in native samples and in different groups of short-term stored semen	108
Figure 31: Graphic demonstration of proportion of spermatozoa with swelling of the tail's distal half in native samples and in different groups of short-term stored semen	109
Figure 32: Graphic demonstration of proportion of acrosome reacted spermatozoa in native samples and in different groups of short-term stored semen	111
Figure 33: Graphic demonstration of proportions of acrosome reacted spermatozoa in native samples and in different groups of short-term stored semen after semen incubation in capacitating medium	113
Figure 34: Graphic demonstrations of proportion of live spermatozoa (YoPro-1-/PI-) in native samples and in different groups of short-term stored semen	115
Figure 35: Graphic demonstration of the proportion of dead spermatozoa (YoPro-1+/PI+) in native samples and those in different groups of short-term stored semen	116
Figure 36: Clasification of semen samples according to semen parameter	120
Figure 37: Clasification of semen samples according to semen parameter	122
Figure 38: ROC curve for SOD on day 0 according to sample distribution between satisfactory and unsatisfactory	131
Figure 39: ROC curve for SOD ($U/10^6$ spermatozoa) on day 0 according to sample distribution between satisfactory and unsatisfactory	132
Figure 40: ROC curve for SOD measured in seminal plasma after three days of storage according to sample distribution between satisfactory and unsatisfactory	136
Figure 41: ROC curve for SOD ($U/10^6$ spermatozoa) measured in seminal plasma after three days of storage according to sample distribution between satisfactory and unsatisfactory	137

KAZALO TABEL

Tabela 1: Kompletna tabela 2 x 2 za izračun diagnostičnih parametrov testa	89
Tabela 2: Korelacje med pokazatelji oksidativnega stresa in osnovnimi semenskimi parametri	124
Tabela 3: Korelacje med pokazatelji oksidativnega stresa v semenski plazmi in med osnovnimi semenskimi parametri po treh dneh hranjanje semena	126
Tabela 4: Mejne vrednosti in diagnostični parametri za SOD in TBARS	128
Tabela 5: Mejne vrednosti in diagnostični parametri za SOD v semenski plazmi po kratkotrajnem hranjenju ..	133
Tabela 6: Primerjava koncentracij izmerjenih spektrofotometrično in s štetjem z Neubauerjevo kamrico	186
Tabela 7: Koeficienti variacij za ponovitev v testu	187
Tabela 8: Vrednosti osnovnih parametrov (povprečna vrednost ± SD, mediana) v dializiranem in nedializiranem semenu v času kartkotrajno hranjenega semena.....	188
Tabela 9: Vrednosti deležev različnih morfoloških napak (povprečna vrednost ± SD, mediana) v dializiranem in nedializiranem semenu v času kartkotrajno hranjenega semena.....	189
Tabela 10: Vrednosti deležev nekapacitiranih, kapacitiranih semenčic in semenčic z akrosomsko reakcijo (povprečna vrednost ± SD, mediana) v dializiranem in nedializiranem semenu v času kartkotrajno hranjenega semena	191
Tabela 11: Vrednosti parametrov TAC, SOD, TBARS (povprečna vrednost ± SD, mediana) v dializiranem in nedializiranem semenu v času kartkotrajno hranjenega semena.....	192
Tabela 12: Osnovni semenski parametri (povprečna vrednost ± SD) po treh dneh hranjenja pri skupinah semena z dodatkom različnih koncentracij L-cisteina in / ali α-tokoferola (n=8).....	193
Tabela 13: Koeficienti variacij za ponovitev v testu	194
Tabela 14: Vrednosti gibljivosti (povprečna vrednost ± SD, mediana) na dan 0 in v različnih skupinah kratkotrajno hranjenega semena	195
Tabela 15: Vrednosti deležev različnih morfoloških napak (povprečna vrednost ± SD, mediana) v nativnih vzorcih in v različnih skupinah kratkotrajno hranjenega semena	196
Tabela 16: Deleži semenčic z različnimi oblikami nabrekanja repov (povprečna vrednost ± SD, mediana) v nativnih vzorcih in v različnih skupinah kratkotrajno hranjenega semena	198
Tabela 17: Vrednosti deležev nekapacitiranih, kapacitiranih semenčic in semenčic z akrosomsko reakcijo (povprečna vrednost ± SD, mediana) v nativnih vzorcih in v različnih skupinah kratkotrajno hranjenega semena	200
Tabela 18: Vrednosti deležev nekapacitiranih, kapacitiranih semenčic in semenčic z akrosomsko reakcijo (povprečna vrednost ± SD, mediana) v nativnih vzorcih in v različnih skupinah kratkotrajno hranjenega semena po izpostavitvi semena mediju za kapacitacijo	201
Tabela 19: Deleži različnih kategorij semenčic (povprečna vrednost ± SD, mediana) v testu membranskega potenciala v nativnih vzorcih in v različnih skupinah kratkotrajno hranjenega semena	202
Tabela 20: Vrednosti porušenega mitohondrijskega potenciala (povprečna vrednost ± SD, mediana) v nativnih vzorcih in v različnih skupinah kratkotrajno hranjenega semena	203
Tabela 21: Vrednosti različnih tipov DNK fragmentacije (povprečna vrednost ± SD, mediana) v nativnih vzorcih in v različnih skupinah kratkotrajno hranjenega semena.....	204
Tabela 22: Vrednosti parametrov TAC, SOD, TBARS in 8-isoprostan (povprečna vrednost ± SD, mediana) v nativnih vzorcih in v različnih skupinah kratkotrajno hranjenega semena	205

Tabela 23: Prikaz števila vzorcev (N) za vsak posamezen parameter razvrščenih glede na ustreznost semena in rezultat testa, v katerem smo diagnostično vrednotili SOD z vidika napovedi kakovosti semena po 72 urah hranjenja	206
Tabela 24: Prikaz števila vzorcev (N) za vsak posamezen parameter, razvrščenih glede na ustreznost semena in rezultat testa, v katerem smo diagnostično vrednotili SOD z vidika pokazatelja kakovosti semena po 72 urah hranjenja	207

LIST OF TABLES

Table 1: 2 x 2 Contingency Table for measures of diagnostic parameters	89
Table 2: Correlations between oxidative stress markers and basic semen parameters	124
Table 3: Correlations between oxidative stress markers in seminal plasma and basic semen parameters after 3 days of storage	126
Table 4: Cut-off values (breaking points) and diagnostic parameters for SOD and TBARS	128
Table 5: Cut-off values (breaking points) and diagnostic parameters for SOD in seminal plasma after short storage.....	133
Table 6: Comparison of concentrations measured with spectrophotometer and with counting spermatozoa with Neubauer chamber	186
Table 7: Intra-assay coefficients of variability	187
Table 8: Values of basic semen parameters (mean \pm SD, median) in dialysed and non-dialysed semen during short storage of semen	188
Table 9: Proportions of different morphological abnormalities (mean \pm SD, median) in dialysed and non-dialysed semen during short semen storage.....	189
Table 10: Proportions of non-capacitated, capacitated and acrosome reacted spermatozoa (mean \pm SD, median) in dialysed and non-dialysed semen during short semen storage	191
Table 11: Values of TAC, SOD, TBARS (mean \pm SD, median) in dialysed and non-dialysed semen during short semen storage	192
Table 12: Basic semen parameters (mean \pm SD) after three days of storage in groups of semen with different concentrations of L-cysteine and / or α -tocopherol (n=8)	193
Table 13: Intra-assay coefficients of variability	194
Table 14: Motility values (mean \pm SD, median) on day 0 and in different semen groups of short-term stored semen	195
Table 15: Values of proportions of different morphological abnormalities (mean \pm SD, median) in native samples and in different groups of short-term stored semen	196
Table 16: Percentage of spermatozoa with different types of tail swelling (mean \pm SD, median) in native samples and in different groups of short-term stored semen	198
Table 17: Values of proportions of non-capacitated, capacitated and acrosome reacted spermatozoa (mean \pm SD, median) in native samples and in different groups of short-term stored semen	200
Table 18: Values of proportions of non-capacitated, capacitated and acrosome reacted spermatozoa (mean \pm SD, median) in native samples and in different groups of short-term stored semen after semen incubation in capacitating medium	201

Table 19: Percentage of different categories of spermatozoa (mean ± SD, median) in native samples and in different groups of short-term stored semen	202
Table 20: Values of loss of mitochondrial potential (mean ± SD, median) in native samples and in various groups of short-term stored semen	203
Table 21: Values of different types of DNA fragmentation (mean ± SD, median) in native samples and in various groups of short-term stored semen	204
Table 22: Values of TAC, SOD, TBARS and 8-isoprostane (povprečna vrednost ± SD, median) in native samples and in various groups of short-term stored semen.....	205
Table 23: The numbers of samples (N) for individual parameters sorted according to semen adequacy and results of the test in which the diagnostic utility of SOD, as a predictor of semen quality after 72 hours of storage, were evaluated	206
Table 24: Number of samples (N) for each individual parameter sorted according to semen adequacy and results of the test in which the diagnostic utility of SOD as an indicator of semen quality after storage was evaluated.....	207

SEZNAM OKRAJŠAV

ABTS	2,2'-azinobis-(3-ethylbenzotiazolin-6-sulfonatna kislina)
AEC	3-amino-9-ethylkarbazol
APS	amonijev persulfat
AQN	nizkomolekulski proteini semenske plazme, ki se vežejo na zono <i>pellucido</i> in se začnejo z aminokislinskim zaporedjem (alanin-glutamin-asparгин)
AWN	proteini semenske plazme, ki se vežejo na zono <i>pellucido</i> in se začnejo z aminokislinskim zaporedjem (alanin-triptofan-asparгин)
BHT	butilhidroksitoluen
BTS	(ang. <i>Beltsville Thawing Solution</i>) razredčevalec za merjaščevo seme
cAMP	ciklični adenozin-3', 5'-monofosfat
CAT	katalaza
CCCP	karbonil cianid <i>m</i> -klorofenil-hidrazon
CTC	klortetraciklin
Cu/Zn SOD	superoksid dismutaza, ki vsebuje baker ali cink
CV	koeficient variacije
DABCO	1,4-diazabiciklo (2.2.2) oktan
EC-SOD	zunajcelična tetramerna superoksid dismutaza
EDTA	etilendiamintetraocetna kislina
ERT	L-ergotionin
GH	L-glutation
GSH	glutation peroksidaza
GSSG	glutation peroksid
GST	glutation-S-transferaza
G6PG	glukoza-6-fosfat dehidrogenaza
HEPES	N – 2 – hidroksietylpirazin – N’ – 2 – etansulfonska kislina
H ₂ O ₂	vodikov peroksid
INT	2-(4-jodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-fenil tetrazolijev klorid
LPO	lipidni hidroperoksi
MDA	malondialdehid
Mn-SOD	superoksid dismutaza, ki vsebuje mangan
NADPH	nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
NAD ⁺	oksidirana oblika nikotinamid adenin dinukleotida
O ₂ ^{·-}	superoksidni radikal
·OH	hidroksilni radikal

OH ₂ ·	hidroperoksidni radikal
PBS	fosfatni pufer z dodatkom NaCl
PKA	protein kinaza A
PH-GSH	hidroperoksidaza GSH
PSP	(Porcine seminal plasma protein) protein merjaščeve semenske plazme
RO·	alkoksilni radikal
ROO·	peroksilni radikal
ROS	(<i>Reactive oxygen species</i>) Reaktivne kisikove zvrsti
SDS	natrijev dodecil sulfat
- SH	tiolna skupina
SOD	superoksid dismutaza
TAC	(<i>Total antioxidant capacity</i>) celokupna antioksidantna kapaciteta
TALP	tyrodov albumin laktat piruvat
TBA	tiobarbiturna kislina
TBARS	produkti, ki reagirajo s tiobarbiturno kislino
TI	triozafosfat izomeraza
TEMED	N, N, N', N'- tetrametilendiamin
TRIS	tris hidroksimetil aminometan
XA	ksantin
XO	ksantin oksidaza

1 UVOD

Organske in anorganske snovi, ki sestavljajo semensko plazmo, vplivajo na kakovost semena in oploditveno sposobnost semenčic (Dostálová in sod., 1994). Proteini semenske plazme so vključeni v transport semenčic znotraj ženskih rodil (Waberski in sod., 1997), preprečujejo imunski odgovor samice na antigene semenčic (O'Leary in sod., 2004), sodelujejo pri kapacitaciji in omogočajo vezavo semenčic na *zona pellucido* (Robertson, 2007). Merjaščeve semenčice, ki so zamrznjene ob prisotnosti semenske plazme, imajo manj poškodb DNK (Calvete in sod., 1995) in boljšo gibljivost (Harkema in sod., 2004) po tajanju.

Kljud številnim pozitivnim vlogam semenske plazme lahko nekatere njene sestavine tudi škodljivo vplivajo na lastnosti semenčic. Spermadhezini so proteini z veliko strukturno raznolikostjo, ki jim omogoča vezavo na različne ligande (Dostálová in sod., 1994). Medtem ko spermadhezini, ki niso sposobni vezati heparina, z vezavo na periferno površino semenčic le-te zaščitijo, spermadhezini, ki vežejo heparin, zavirajo njihovo gibljivost (Centurion in sod., 2003). V semenski plazmi merjascev je prisoten tudi protein z molekulsko maso 5,7 kDa, ki zavira gibljivost semenčic (Strzezek in sod., 1992).

Dializa semena pred zamrzovanjem ohrani večji delež gibljivih in živih semenčic ter večji delež semenčic z nepoškodovano plazemsko membrano (Fraser in sod., 2007). Prav tako se z odstranitvijo nizkomolekulskih sestavin semenske plazme izboljša kakovost kratkotrajno hranjenega semena pri temperaturi 16 °C (Mrkun in sod., 2009). Dializa bi lahko zaradi svojih pozitivnih učinkov na kakovost hlajenega in zamrznjenega semena predstavljala dodaten in enostaven korak v postopku shranjevanja merjaščevega semena. Kljud vsem omenjenim izboljšavam predvidevamo, da se z dializo najverjetneje odstranijo tudi neencimski antioksidanti semenske plazme kot so L-glutation (GH), L-ergotionin (ERT), L-askorbat in α-tokoferol, ki skupaj z antioksidantnimi encimi predstavljajo antioksidantni obrambni sistem v semenski plazmi merjascev. GH, ERT, L-askorbat in α-tokoferol imajo skupaj pomembno vlogo pri detoksifikaciji reaktivnih kisikovih zvrsti (ROS) in s tem zaščitijo semenčice pred oksidativnim stresom (Strzezek in sod., 1999). Zato je bil namen našega

dela proučiti, kako vpliva dializa na celokupno antioksidantno kapaciteto (TAC), superoksid dismutazo (SOD) in na lipidno peroksidacijo.

Ohlajanje semena ter možnost aerobne presnove po odvzemu semena povzroči povečano produkcijo reaktivnih kisikovih zvrsti (ROS), kar vodi do lipidne peroksidacije membran semenčic, ki vsebujejo visok delež nenasičenih maščobnih kislin (Kumaresan in sod., 2009). Glede na dejstvo, da merjaščeve seme že v osnovi nima zadostnega antioksidantnega sistema (Strzezek in sod., 1999), se lahko po odstranitvi neencimskih antioksidantov dodatno poveča stopnja lipidne peroksidacije. Proces vodi do povečane prepustnosti membrane repa in glave semenčic, neustrezne kapacitacije in akrosomske reakcije. Ocenjevanje kakovosti hranjenega dializiranega merjaščevega semena z metodami, uporabljenimi v naši raziskavi, omogoča temeljitejšo oceno semena in odkrivanje nepravilnosti semenčic po dializi, ki do sedaj še niso bile raziskane. Z našo raziskavo smo želeli tudi ugotoviti, ali lahko dodatek antioksidanta po dializi izboljša kakovost kratkotrajno hranjenega merjaščevega semena in zmanjša stopnjo lipidne peroksidacije, povzročene z odstranitvijo nizkomolekulskih antioksidantov. Poleg tega smo parametre oksidativnega stresa v sveži semenski plazmi ovrednotili tudi z vidika potencialne diagnostične vrednosti kakovosti kratkotrajno hranjenega merjaščevega semena.

HIPOTEZE

1. Z dializo semenske plazme se deloma odstranijo vodotopni neencimski antioksidanti, kar povzroči znižanje celokupne antioksidantne kapacitete (TAC) semenske plazme in zviša stopnjo lipidne peroksidacije.
2. Aktivnost encimskega antioksidanta superoksid dismutaze (SOD) po dializi ostane nespremenjena.
3. Aktivnost SOD se kot odgovor na oksidativni stres z dnevi hrانjenja semena povišuje tako v dializiranem kot nedializiranem semenu.
4. Dodatek antioksidantov (L-cistein in/ali α -tokoferol) semenu bolje ohrani lastnosti kratkotrajno hranjenega semena.
5. V dializiranem semenu z dodatkom antioksidantov je stopnja spontane kapacitacije semenčic najnižja, delež živih semenčic, ohranjenost plazemskih membran in mitohondrijskega potenciala pa največja.
6. Parametri oksidativnega stresa v semenski plazmi svežega semena so zanesljiv pokazatelj kakovosti kratkotrajno hranjenega merjaščevega semena.

2 PREGLED LITERATURE

2.1 KRATKOTRAJNO HRANJENJE MERJAŠČEVEGA SEMENA

2.1.1 Pomen shranjevanja semena

Umetno osemenjevanje je vse pogostejši način osemenjevanja domačih živali (Bailey in sod., 2000). Prednosti umetnega osemenjevanja so v ohranjanju genetsko dobrih lastnosti plemenjakov in preprečevanju oziroma nadzoru širjenja spolno prenosljivih bolezni med živalmi. Poleg tega lahko ejakulat enega samca uporabimo za oploditev velikega števila samic, seme pa lahko ohlajeno oziroma zamrznjeno transportiramo na daljše razdalje (Bailey in sod., 2000; Guthrie in Welch, 2005). Zamrznjeno seme (genska banka) predstavlja biološko varno rezervo, ki bi zmanjšala posledice nenadnega izbruha kužne bolezni ali naravne katastrofe (Bailey in sod., 2008).

V zadnjih 30 letih se je umetno osemenjevanje z merjaščevim semenom močno razširilo, sprva v Evropi (Johnson in sod., 2000), v zadnjem času pa predvsem v ZDA in drugod po svetu (Didion in sod., 2013). Devetindevetdeset odstotkov vseh umetnih osemenitev pri merjascih se opravi s svežim hlajenim semenom, medtem ko je manj kot en odstotek umetnih osemenitev opravljenih z zamrznjenim merjaščevim semenom (Didion in sod., 2013). Merjaščovo seme namreč izgubi med zamrzovanjem precej svoje kakovosti in ga v tej obliki uporabljam le v primerih, ko se seme transportira na daljše razdalje ali ko želimo ohraniti dober genetski potencial (Grossfeld in sod., 2008). Po svetu se zato najpogosteje uporablja razredčeno sveže merjaščovo seme, ohlajeno na 15–20 °C in tako hranjeno do največ pet dni. Večina (85 %) se ga uporabi že v prvih dveh dneh (Johnson in sod., 2000). Glavna prednost uporabe ohlajenega semena je dober uspeh osemenitev kljub nizkemu številu semenčic v osemenjevalni dozi, saj je dobro ohranjena oploditvena sposobnost semenčic (Didion in sod., 2013).

2.1.2 Značilnosti kratkotrajno hrانjenega semena

Shranjevanje semena pri temperaturi 15–20 °C sicer zmanjšuje presnovo semenčic in s tem porabo energije in produkcijo stranskih produktov v semenu (Huo in sod., 2002),

vendar celična presnova in aktivnost mikrobov, ki so v manjši meri prisotni kljub čistemu odvzemu in dodajanju antibiotikov, nista zmanjšana do te mere, da bi dopuščala dolgotrajno shranjevanje (de Ambrogi in sod., 2006). Pri shranjevanju tekočega merjaščevega semena opažamo tudi številne funkcionalne spremembe, ki so značilne za normalno dozorevanje semenčic in se navadno odvijejo v rodilih samic (npr. hiperaktivacija in kapacitacija semenčic) (Rodriguez – Martinez in sod., 2005).

Hitro ohlajanje merjaščevega semena močno zniža delež preživelih semenčic, saj so te občutljive na zniževanje temperature. Tako direktno hlajenje svežega semena s 35 °C na 15 °C statistično značilno zniža gibljivost semenčic, medtem ko postopno hlajenje semena po korakih po 10 °C okrepi odpornost semenčic na učinke hlajenja in posledično izboljša gibljivost (Watson, 1996) ter zmanjša nastajanje reaktivnih kisikovih zvrsti (ROS) (Kim in sod., 2011). Če seme pred hlajenjem pustimo 4 ure na 22 °C, se delež semenčic z intaktnim akrosomom poveča, izboljšata pa se tudi gibljivost in preživitvena sposobnost hlajenega semena po 72 urah pri 15 °C (Chutia in sod., 2014).

Zaradi velike občutljivosti semenčic na hitre spremembe v temperaturi je izrednega pomena, da se ejakulatu ob razredčitvi doda primerno ogret (izotermičen) razredčevalec, nato pa razredčeno seme postopno ohlaja. Na tak način se izboljša preživitvena sposobnost semenčic, ohrani se encimska aktivnost mitohondrijev in gibljivost semenčic v primerjavi s semenom, kateremu je dodan hipotermičen razredčevalec (Schulze in sod., 2013).

Odziv posamezne celice oziroma njene plazemske membrane na nizke temperature naj bi bil močno odvisen od zgradbe celične membrane, ki je primarno mesto poškodb v času hlajenja (Bailey in sod., 2008). Vrsta maščobnih kislin in fosfolipidov, ki sestavljajo plazemsko membrano, so glavni razlog za občutljivost semena na proces hlajenja. Sestava in delež le-teh sta pri merjascu glavni razlog za občutljivost njegovega semena na zniževanje temperature, medtem ko njihova drugačna sestava bikovemu semenu omogoča dobro odpornost na zniževanje temperatur (Watson, 1996). Merjaščeve semenčice namreč vsebujejo nizek delež fosfatidilholina in visok delež fosfatidiletanolamina in sfingomyelina v plazemski membrani, kar povzroča njeno nestabilnost. Dodatno k temu priomore nižja vsebnost holesterola v plazemski membrani

in njegova asimetrična razporeditev, saj ga je precej več na zunanjem delu dvoslojne membrane, kar pušča notranji sloj še posebej ranljiv (De Leeuw in sod., 1990; Johnson in sod., 2000). Prepustnost plazemske membrane sveže semenčice se med hranjenjem semena povečuje (Buhr in Pettitt, 1996). Delež živih in gibljivih semenčic lahko pri merjascih upade do 50 % po 5 dneh hranjenja in nato za dodatnih 10 % po 7 dneh hranjenja hlajenega semena (Dubé in sod., 2004).

Po začetnih spremembah v strukturi in prepustnosti plazemske membrane te med hranjenjem hlajenega semena naraščajo, s tem pa z daljšim shranjevanjem vedno bolj upadata gibljivost in delež preživelih semenčic. Z daljšanjem obdobja hranjenja hlajenega semena se viša tudi stopnja lipidne peroksidacije (Kumaresan in sod., 2009). Spremembe v prepustnosti plazemske membrane povzročijo izhajanje kationov in encimov iz semenčice ter zmanjšajo aktivnosti encimov, pomembnih za delovanje semenčice in aktivnega transporta (De Leeuw in sod., 1990). S spremenjeno prepustnostjo plazemske membrane se poveča vstop kalcija v semenčico. Poleg tega je pri nizkih temperaturah upočasnjeno normalno delovanje membranske kalcijeve ATP-aze, ki z aktivnim črpanjem kalcija iz celice uravnava znotrajcelični nivo kalcija. Posledično povišana koncentracija kalcija v semenčici poveča tirozinsko fosforilacijo celičnih proteinov in tako povzroči kapacitacijo. Proses sicer ni identičen procesu prave kapacitacije, vendar vodi v podoben rezultat – nestabilno plazemsko membrano, ki je pripravljena za akrosomsko reakcijo (Green in Watson, 2001). V povezavi s kapacitacijo se tako v času hlajenja poveča tudi delež semenčic z akrosomsko reakcijo. Akrosomska reakcija je proces, v katerem pride do zlitja zunanje akrosomske membrane s plazemsko membrano semenčice (Bailey in sod., 2008). Med hranjenjem semena se akrosom semenčice postopoma odleplica, kar je verjetno posledica spontane akrosomske reakcije ob kapacitaciji semenčic (Brezezinska – Slebodzinska in sod., 1995).

Zaradi vpliva, ki ga ima ohlajanje semena na prepustnost membran, so na proces ohlajanja občutljivi tudi mitohondriji. Glede na to, da mitohondriji oskrbujejo semenčice z energijo, lahko povečana prepustnost mitohondrijske membrane in poškodba mitohondrijev privede do nezadostne oskrbe semenčic z energijo, zaradi česar - še posebej v rodilih samice - hitro upada njihova gibljivost (Maxwell in sod., 1998).

2.2 NIZKOMOLEKULSKE SESTAVINE SEMENSKE PLAZME IN NJIHOV VPLIV NA FUNKCIJO SEMENČIC

2.2.1 Semenska plazma

Semenska plazma je sestavljena iz anorganskih komponent, aminokislin, peptidov ter visoko-in nizkomolekulskih snovi (Vadnais in sod., 2005). Pomembna je pri prenosu semenčic in njihovem preživetju, antibakterijski zaščiti semena (Fair in sod., 1973), pospeševanju ovulacije (Waberski in sod., 1997) in pripravi maternice na sprejem zarodka (Robertson, 2007). Ena pomembnejših vlog semenske plazme je zaviranje imunskega odgovora maternice in s tem ohranjanje števila preživelih semenčic v rodilih samic (O'Leary in sod., 2004).

Semenska plazma ima pomembno vlogo pri ohranjanju oploditvene sposobnosti hranjenega semena. Njena prisotnost namreč dokazano izboljša gibljivost hranjenega semena pri kozlu (Ashworth in sod., 1994), merjascu in biku (Vadnais in sod., 2005) ter zmanjša število kapacitiranih semenčic v procesu ohlajevanja pri merjascih (Maxwell in Johnson, 1999). Poleg tega semenska plazma merjasca vsebuje dekapacitacijske faktorje (Maxwell in sod., 1998).

Vzdrževanje optimalne koncentracije Zn^{2+} ionov je naslednja pomembna vloga semenske plazme. Prostata izloča tekočino, bogato s prostimi Zn^{2+} ioni in s Zn^{2+} ioni, vezanimi na nizkomolekulske sestavine semenske plazme (Johnson in sod., 2000). V semenski plazmi je pomembna predvsem količina prostega cinka, saj ta močno poveča stabilnost kromatina v DNK in s tem tudi njegovo rezistenco na ohlajevanje (Björndahl in Kvist, 2010).

Karbonatni ioni v semenski plazmi omogočijo hiperaktivacijo semenčic in sodelujejo v procesu kapacitacije (Rodriguez-Martinez in sod., 2005).

Proteini semenske plazme so pomembna sestavina merjaščevega ejakulata (40-60 g/l) (Rodriguez-Martinez in sod., 2011) in se v veliki meri vežejo na površino semenčice ter s pomočjo prenosalcev prehajajo v njeno notranjost (Metz in sod., 1990), kar povzroči površinske spremembe na semenčicah (Harrison in sod., 1992) in lahko vodi v proces kapacitacije. Po drugi strani proteini semenske plazme delujejo kot protikapacitacijski

faktorji, ki preprečujejo prezgodnjo akrosomsko reakcijo, njihova odstranitev pa lahko sproži kapacitaco (Maxwell in sod., 1998; Maxwell in sod., 1999).

Semenska plazma je pomembna tudi zaradi svojega antioksidacijskega potenciala, ki ščiti semenčice pred reaktivnimi kisikovimi zvrstmi (ROS). Te imajo lahko za semenčice vrsto nezaželenih posledic (Strzezek in sod., 2003). Encimski in ne-encimski antioksidanti v semenski plazmi merjascev predstavljajo glavno zaščito merjaščevih semenčic pred oksidativnim stresom, saj imajo merjaščeve semenčice zelo slabo antioksidacijsko kapaciteto (Koziorowska-Gilun in sod., 2011a). Pred oksidativnim stresom ščitijo tudi proteini semenske plazme skupaj s cinkovimi ioni (Strzezek in sod., 2003).

Navkljub številnim raziskavam, ki potrjujejo pozitivno delovanje semenske plazme pri ohranitvi oploditvene sposobnosti hrانjenega semena, določene raziskave dokazujo nasprotno. Moore in Hibbit (1977) ter Tamuli in Watson (1994) niso našli nobenega pozitivnega učinka semenske plazme na gibljivost merjaščevih semenčic ali zaščito le-teh proti temperaturnemu šoku. Graham (1994) in Iwamoto in sod. (1993) celo poročajo o negativnih učinkih semenske plazme na gibljivost in preživitveno sposobnost merjaščevih semenčic. Zaradi opisanih negativnih učinkov se je nekaj časa priporočalo popolno odstranitev semenske plazme in njeno zamenjavo z razredčevalci (Rodriguez-Martinez in Barth, 2007). V nasprotju s temi priporočili Chutia in sod. (2014) v eni novejših raziskav poročajo, da odstranitev semenske plazme in njena zamenjava z razredčevalci statistično značilno zniža kakovost hlajenega semena po 72 urah hranjenja. Dosedanje ugotovitve torej kažejo, da semenska plazma in njene komponente na seme delujejo zaščitno. Vendar pa določene komponente, zlasti nizkomolekulske proteini, škodljivo delujejo na funkcijo semena (Fraser in sod., 2007).

2.2.2 Nizkomolekulske sestavine semenske plazme

Med najbolj raziskane nizkomolekulske sestavine sodijo spermidhezini. Spermidhezini so proteini z veliko strukturno raznolikostjo, kar jim omogoča vezavo na različne ligande (Dostálová in sod., 1994). Izhajajo iz pomožnih spolnih žlez in predstavljajo 90 % vseh proteinov, prisotnih v semenski plazmi (Calvete in sod., 1995). V semenski plazmi

merjascev je odkritih sedem spermadhezinov, ki jih glede na sposobnost vezave na heparin razdelimo na heparinske (AQN-1, AQN-2, AQN-3, AWN-1, AWN-2, PSP-I) in neheparinske (PSP-II) (Calvete in sod., 1995). Heparinski se med ejakulacijo vežejo na površino semenčic (AQN-3, AWN-1, AWN-2) in skrbijo za njihovo zaščito pred prehitro akrosomsko reakcijo (Waberski in sod., 1997). V procesu kapacitacije se večina spermadhezinov, vezanih na akrosom, odstrani s površine semenčic (Töpfer-Peterson in sod., 2008). AQN-3, AWN-1, AWN-2 so pomembni tudi v različnih fazah oploditve; med drugim se specifično vežejo na *zono pellucido* (Waberski in sod., 1997; Töpfer-Peterson in sod., 2008).

PSP-I in PSP-II sta prisotna v semenski plazmi v enakih količinah in predstavljata kar 50-odstotni delež vseh spermadhezinov (Rutherford in sod., 1992). PSP-I se v semenski plazmi nahaja v obliki, ki je sposobna vezati heparin, in obliki, ki heparina ne veže. PSP-I, ki ne veže heparina, skupaj s PSP-II tvori heterodimerno obliko. PSP-I/PSP-II heterodimer ne veže heparina in se ohlapno veže na akrosom semenčic. Njegova vloga je predvsem v preprečevanju prezgodnje akrosomske rakcije in v interakciji semenčice s *zono pellucido* (Dostálová in sod., 1994).

Medtem ko heparinski spermadhezini škodljivo vplivajo na gibeljivost semenčic (Centurion in sod., 2003), neheparinski spermadhezini stabilizirajo plazemsко membrano ter preprečujejo prehitro kapacitacijo in akrosomsko reakcijo hlajenih semenčic (Caballero in sod., 2004; Centurion in sod., 2003).

Mehanizmi, s katerimi nizkomolekulski proteini delujejo na semenčice, še niso povsem pojasnjeni, verjetno pa je njihovo delovanje povezano s pritrditvijo na plazemsко membrano. Pri kozlih so odkrili, da vezava nizkomolekulskih proteinov na membrano semenčic poškoduje plazemsко membrano (Perez-Pe in sod., 2001), pri merjascih pa so v semenski plazmi odkrili protein z molekulsko maso 5,7 kDa, ki znižuje gibeljivost semena (Strzezek in sod., 1992).

Vrsta raziskav je dokazala, da se po dializi semenske plazme bolje ohrani kakovost semena med hranjenjem (Fraser in sod., 2007; Mrkun in sod., 2009; Koziorowska-Gilun in sod., 2011a). Dializirano merjaščeve seme, pri katerem se odstranijo molekule, manjše od 12 do

14 kDa, ohranja višji delež gibljivih semenčic in semenčic z nepoškodovano plazemsko membrano po zamrzovanju in tajanju (Fraser in sod., 2007). To je lahko posledica pojava med dializo, pri katerem se proteini na površini semenčice reorganizirajo in se tako ustvari zaščitna plast okrog semenčice, ki pomaga pri ohranjanju njene integritete. Takšna semenčica je posledično bolj odporna na škodljive učinke ohlajevanja in zamrzovanja. Reorganizacija plazemskih proteinov na površini semenčic po dializi celo odpravi poškodbe, nastale zaradi nizkih temperatur, saj celice, ki so po hlajenju prepuščale propidijev jodid, ponovno postanejo neprepustne zanj. Dializa pred zamrzovanjem semena omogoči tudi boljšo ohranitev mitohondrijskega potenciala semenčic in posledično zagotavlja višji nivo ATP-ja ter izboljšala gibljivost semenčic v primerjavi z nedializiranim semenom (Fraser in sod., 2007).

Seme, ki je bilo dializirano z uporabo dializnega črevesa, ki prepušča manjše molekule od 14 do 16 kDa, ima bolje ohranjeno gibljivost in progresivno gibljivost semenčic, nižji delež kapacitiranih semenčic in delež semenčic z morfološkimi napakami po tridnevnom hranjenju hlajenega semena (Mrkun in sod, 2009). Podobne pozitivne učinke dialize so ugotovili tudi pri bikovem (Garcia in Graham, 1987) in puranovem semenu (Iaffaldano in Meluzzi, 2003). Dializa semenske plazme puranovega semena je za štirikrat podaljšala oploditveno sposobnost semena (Iaffaldano in Meluzzi, 2003). Z dializo puranovega semena se je zmanjšala tudi aktivnost amidaze in s tem izboljšala integriteta plazemske membrane, hkrati pa dializirano seme ni aktiviralo proakrozin/akrozin sistema (Słowińska in sod., 2013), ki je pomemben pri akrosomski reakciji puranovih (Słowińska in sod., 2013), bikovih (Rosatti in sod., 2004) in merjaščevih semenčic (Puigmulé in sod., 2011).

2.2.3 Dializa

Dializa je biokemijska tehnika ločevanja snovi in temelji na procesu difuzije, ki omogoča prehajanje snovi iz raztopine skozi polprepustno membrano v smeri nižje koncentracije topljenca. Pri dializi uporabljamo tanko membrano, imenovano dializno črevo, ki zadržuje molekule, ki so večje od por, manjše molekule od por pa prepušča (Voet in sod., 2006). Če uporabimo velikost por 12–14 kDa, pomeni, da se bodo v postopku dialize v 90 % v vzorcu zadržale molekule, katerih velikost je 12–14 kDa, večje molekule pa bodo v celoti ostale v

vzorcu. Močno je zmanjšan tudi prehod tistih snovi, katerih molekulska masa je blizu velikosti por. Prehajanje snovi se konča, ko je koncentracija določene snovi na obeh straneh membrane enaka, ko pride torej do osmotskega ravnotežja. Za hiter prehod snovi skozi membrano dializnega črevesa je potreben čim večji koncentracijski gradient in čim večja površina dializnega črevesa z velikim številom por. Koncentracijski gradient dosežemo tako, da majhen volumen vzorca dializiramo proti velikemu volumnu dializata (npr. razmerje 1:50). Čas, ki je potreben za uravnoteženje koncentracije, je odvisen od volumnov vzorca in dializata, mešanja, pufra in temperature, pri kateri dializa poteka. Dializa poteka hitreje pri višjih temperaturah (Haney in sod., 2013; Garcia in Graham, 1987). Ustrezen dializni sistem lahko v 2 do 3 urah doseže 90-odstotno osmotsko ravnotežje (Garcia in Graham, 1987). Z enim samim ciklusom dialize ne moremo popolnoma odstraniti določenegatopljenca, saj je koncentracija snovi, ki je bila sprva samo v dializnem črevesu (in jo želimo iz raztopine izločiti), po enem dializnem postopku enaka znotraj dializnega črevesa in v dializatu. Iz tega razloga proizvajalci priporočajo, da se izvede več zaporednih dializ (prvi dve v trajanju 1–2 uri, tretja lahko tudi do 24 ur) (Haney in sod., 2013).

Dializa se je že uporabila kot metoda za odstranjevanje nizkomolekulskih sestavin semenske plazme, protokoli pa so bili za ta namen prilagojeni. Fraser in sod. (2007) so ugotovili, da se izboljša kakovost merjaščevega semena po tajanju, če so seme pred zamrzovanjem dializirali pri sobni temperaturi 5 ur. Enak protokol so uporabili tudi Strzezek in sod. (2005), ki ugotavljajo, da se z uporabo dialize v merjaščevem semenu spremeni polipeptidni profil semena. Garcia in Graham (1987) poročata, da so z 2-urno dializo proti destilirani vodi odstranili 90 % nizkomolekulskih sestavin semenske plazme bikovega semena in da dodatna ura dialize ni bistveno povečala učinkovitosti. Kljub temu, da je dializa uveljavljena biokemijska tehnika (Voet in sod., 2006) ter uporabljena v literaturi tudi za odstranjevanje nizkomolekulskih snovi iz semenske plazme merjaščevega semena (Garcia in Graham, 1987; Strzezek in sod., 2005; Fraser in sod., 2007), pa ne moremo točno opredeliti deleža nizkomolekulskih sestavin semenske plazme, ki jih odstranimo s prilagojenimi protokoli za dializo semena.

2.3 OKSIDATIVNI STRES IN REAKTIVNE KISIKOVE ZVRSTI

Pojav oksidativnega stresa je neposredno povezan s prisotnostjo kisika v našem ozračju, ki pa je hkrati nujno potreben za naš obstoj. Oksidativni stres vključuje vsa stanja, pri katerih je prisotno neravnovesje med reaktivnimi kisikovimi zvrstmi – ROS (angl. reactive oxygen species) in antioksidantnim obrambnim mehanizmom, odgovornim za njihovo nevtralizacijo in odstranitev. ROS nastajajo neprekinjeno v mitohondrijih, povečana produkcija ROS pa zaradi bližine mitohondrijev pogosto vodi v poškodbe mitohondrijske DNK (mDNK), kasneje pa v mutacije ali poškodbe DNK, RNK ter poškodbe beljakovin in lipidnih komponent (Walczak-Jedrzejowska in sod., 2013).

2.3.1 REAKTIVNE KISIKOVE ZVRSTI (ROS)

Kisik je nujno potreben za življenje in prehaja v telo s procesom dihanja, v telesu pa ob prisotnosti kisika nastajajo mnoge reaktivne kisikove zvrsti. Vsem reaktivnim kisikovim spojinam je skupno, da so visoko reaktivne in lahko oksidirajo katerokoli organsko molekulo v organizmu od ogljikovih hidratov, lipidov, nukleinskih kislin in aminokislin do proteinov (Halliwell in Gutteridge, 1999).

Prosti radikali so atomi, ioni, molekule ali njihovi deli oziroma katerakoli kemična oblika, ki je sposobna obstajati samostojno in ima vsaj na enem od energetskih nivojev en nesparjen elektron (Halliwell in Gutteridge, 1999). Čeprav so radikali sposobni obstajati samostojno, so zaradi primanjkljaja elektronov, ki so odgovorni za kemijsko nestabilnost, večinoma zelo kratkoživi in zato visoko reaktivni. Z namenom, da pridobijo manjkajoči elektron, reagirajo z molekulami v svoji okolini (Apel in Hirt, 2004). V primeru, da ti t.i. primarni ROS (superoksidni radikal ($O_2^{\cdot -}$), hidroksilni radikal ($\cdot OH$), vodikov peroksid (H_2O_2)) reagirajo z makromolekulami (npr. DNK, lipidi, proteini), nastanejo sekundarni ROS, h katerim sodijo hidroperoksidni ($OH_2^{\cdot +}$), alkoksilni ($RO^{\cdot +}$) in peroksilni radikali ($ROO^{\cdot +}$) (Halliwell in Gutteridge, 1999).

2.3.2 ROS V SEMENU

Najpogostejši izvor ROS v semenu so mitohondriji semenčice (Fisher in Aitken, 1997), ki semenčice oskrbujejo z energijo, potrebno za njihovo konstantno gibanje (Henkel, 2011).

Poleg mitohondrijev je izvor nastanka ROS tudi delovanje membranske NADPH oksidaze (tj. encimski kompleks, ki je prisoten v celični membrani), NADH oksidoreduktaze (tj. encim, ki je v tesnem stiku z mitohondrijsko verigo) in ksantin oksidaze, ki je prisotna tako v semenčicah kot tudi v semenski plazmi (Fraczek in Kurpisz, 2005).

Majhne količine ROS v semenčicah nenehno nastajajo in so v procesih diferenciacije in dozorevanja semenčic celo zaželene oz. nujno potrebne. ROS sodelujejo pri procesu kondenzacije kromatina v semenčicah, služijo kot signalne molekule (sekundarni prenašalci) in uravnavajo ustrezeno število zarodnih celic, tako da sprožijo proces apoptoze ali proliferacije spermatogonijev (Guerriero in sod., 2014). V dozorelih semenčicah imajo nizke koncentracije ROS pomembno vlogo pri kapacitaciji (Ford, 2004), hiperaktivaciji semenčic (de Lamirande in sod., 1993) in akrosomski reakciji (Awda in sod., 2009). ROS sodelujejo pri procesu kapacitacije, tako da najprej povišajo nivo cikličnega adenozin monofosfata (cAMP). cAMP pot je ključna pri številnih za življenje potrebnih procesih, saj aktivira posamezne encime in regulira izražanje genov. V procesu kapacitacije sproži aktivacijo protein kinaze A (PKA) in fosforilacijo substratov za PKA (arginin, treonin, serin). To vodi v fosforilacijo proteinov na površini semenčic in sproži hiperaktivacijo semenčic (Kothari in sod., 2010; Tsai in sod., 2013). ROS so pomembni tudi pri združevanju semenčice z jajčno celico, saj povečajo fluidnost plazemske membrane (Aitken in sod., 1995).

Kljud opisanemu koristnemu delovanju reaktivnih kisikovih zvrsti vodi presežek ROS v vrsto strukturnih in funkcijskih poškodb semenčice, kar je še posebej izrazito pri nezadostnem antioksidantnem obrambnem mehanizmu. Nastale poškodbe so lahko epigenetične (poškodbe strukturnih in funkcijskih molekul celice) ali – ob višjih presežkih ROS – genotoksične (posredne ali neposredne poškodbe dedne snovi) (Guthrie in Welch, 2006).

Povečana količina ROS ima za posledico interakcije s številnimi substrati, pri katerih pride do odvzema elektrona, kar vodi do verižne reakcije, vse dokler ne nastane stabilen produkt in je proces tako ustavljen (Droge, 2002). Pri semenčicah so posledica povišanega

nivoja ROS motena gibljivost (Guthrie and Welch, 2006), motnje v združitvi semenčice z jajčno celico in povečano število semenčic z morfološkimi napakami (Walczak-Jedrzejowska in sod., 2013). Kadar je količina ROS občutno višja, nastajajo poškodbe DNK semenčic (Bennetts in Aitken, 2005), poveča pa se tudi število mrtvih semenčic (de Lamirande in sod., 1997). Do poškodbe DNK semenčic pride najpogosteje med nastanjem terciarne strukture v času podaljševanja spermatid. Običajno so to le začasne poškodbe, a če se ne odpravijo, se v zrelih semenčicah ejakulata pojavi povečana DNK fragmentacija (Bizzaro in sod., 2000). Medtem ko se poškodbe DNK lahko popravijo v razvijajočih se semenčicah, so poškodbe po spermiofenezi, ko je funkcija transkripcije in translacije že končana, dokončne (Aitken in sod., 2004). V času shranjevanja semenčic v nadmodku in po ejakulaciji semenčice namreč nimajo mehanizma, s katerim bi popravile poškodovano DNK. Poleg tega so onemogočeni tudi celični mehanizmi apoptoze poškodovanih celic. Različne razvojne oblike semenčic zato ostajajo prisotne v semenu, kljub temu da so huje poškodovane ali celo delno apoptočne (McVicar in sod., 2004). Semenčice, ki imajo veliko DNK poškodb in so sicer normalno gibljive, imajo med shrajevanjem slabšo sposobnost preživetja. Takšne semenčice predstavljajo tudi dodatno mesto za nastajanje večjih količin ROS (Walczak-Jedrzejowska in sod., 2013).

V različnih razvojnih fazah semenčice proizvajajo različno količino ROS, njihovo nastajanje je višje v obdobju diferenciacije semenčic in se zmanjša pri razvitih semenčicah. Producija ROS se občutno poveča v primeru velikega števila semenčic z morfološkimi napakami, še posebej ob velikem številu semenčic s citoplazmatskimi kapljicami. Semenčice s citoplazmatskimi kapljicami domnevno vsebujejo več citoplazmatskega encima glukoza-6-fosfat dehidrogenaze (G6PD), ki stimulira znotrajcelično zadrževanje NADPH, kar vodi v nastajanje ROS preko NADPH oksidaze (Aitken in sod., 1996). Prisotnost levkocitov v ejakulatu močno poveča vsebnost ROS, saj proizvajajo levkociti 1000-krat več ROS kot normalne semenčice. Radikali, proizvedeni v levkocitih, služijo namreč kot obramba proti mikroorganizmom (Plante in sod., 1994).

V primeru, ko količina ROS prevladuje nad zmožnostjo antioksidantnega sistema, da nevtralizira škodljivo delovanje ROS, se zaradi poškodb DNK, ki lahko privedejo do

apoptoze in celične smrti (Agarwal in sod., 2006), zmanjša število živih semenčic (Agarwal in Said, 2003). Oksidanti, kot je hidroksilni radikal (HO^\bullet), lahko povzročijo hidroksilacijo, fragmentacijo, navzkrižno povezovanje med proteini in DNK, agregacijo proteinov ter cepitev DNK, kar vodi v mutacije in smrt celice (Friedberg in sod., 2006).

Polurna izpostavitev merjaščevih semenčic ROS generiranemu sistemu ksantin/ksantin oksidaza (XA/XO) ohrani viabilnost semenčic, vendar zmanjša njihovo gibljivost. V takšnem semenu se poviša tudi koncentracija H_2O_2 in stopnja lipidne peroksidacije (Guthrie in Welch, 2006). Izpostavitev semena XA/XO sistemu poviša tudi s kapacitacijo sproženo akrosomsko reakcijo in skupno tirozinsko fosforilacijo (Awda in sod., 2009).

Med najpogosteje reaktivne kisikove spojine, ki nastajajo v semenčicah, sodijo: superoksidni radikal ($\text{O}_2^{\bullet^-}$), vodikov peroksid (H_2O_2), hidroperoksidni radikal (OH_2^\bullet) in hidroksilni radikal (HO^\bullet) (Buxton in sod., 1988).

2.3.2.1 Superoksidni radikal ($\text{O}_2^{\bullet^-}$)

Superoksidni anion ($\text{O}_2^{\bullet^-}$) nastaja v celičnih procesih s pomočjo NADPH oksidaze, pri kateri se porablja kisik (npr. dihalna veriga). Sam $\text{O}_2^{\bullet^-}$ je slabo reaktiv, vendar lahko direktno inaktivira posamezne encime (npr. NADPH dehidrogenazo, ki se nahaja v mitohondrijski respiratorni verigi) (Bayir, 2005). Po drugi strani $\text{O}_2^{\bullet^-}$ v celicah aktivira adenilat ciklazo in poviša cAMP ter tako sproži proces kapacitacije (Lewis in Aitken, 2001). Bolj kot sam $\text{O}_2^{\bullet^-}$ je aktivna njegova protonirana oblika, ki lahko povzroči peroksidacijo lipidov (Bayir, 2005). Presežek $\text{O}_2^{\bullet^-}$ se v semenčici s pomočjo superoksid dismutaze (SOD) nemudoma pretvorí v vodikov peroksid in kisik (Kowalowka in sod., 2008).



2.3.2.2 Vodikov peroksid (H_2O_2)

H_2O_2 ni pravi radikal, ker ne vsebuje nesparjenih elektronov in je kot tak bolj stabilen. Za razliko od $\text{O}_2^{\bullet^-}$ z lako prehaja skozi celične membrane, saj je njegova struktura zelo podobna strukturi vode. Njegova toksičnost se kaže v tem, da je sposoben inaktivirati encime in da ob prisotnosti sledov ionov železa ali bakra razpade na hidroksilni radikal

(HO^\bullet), ki je zmožen sprožiti kaskado radikalnih reakcij v celici (Halliwell in Gutteridge, 1999).

H_2O_2 sodeluje pri hiperaktivaciji (Ford, 2004) in kapacitacijski semenčic, tako da aktivira tirozin kinazo, zavira delovanje tirozin fosfataze in stimulira tirozinsko fosforilacijo (Lewis in Aitken, 2001). Vendar visoke koncentracije H_2O_2 pri bikovem semenu zavrejo tirozinsko fosforilacijo (Rivlin in sod., 2004). Ugotovili so tudi, da lahko H_2O_2 sproži z ROS povzročeno kapacitacijo merjaščevega semena predvsem z njegovim vplivom na zunajcelično s signali regulirano kinazno družino (Awda in Buhr, 2010).

V merjaščevem semenu najdemo H_2O_2 velikokrat v presežku, saj nastaja kot posledica velike aktivnosti znotrajcelične SOD (Kowalowka in sod., 2008). Tako npr. zamrzovanje merjaščevega semena močno poviša koncentracijo H_2O_2 znotraj celic brez sprememb v koncentraciji $\text{O}_2^{\bullet-}$ (Kim in sod., 2011).

Odstranjevanje H_2O_2 poteka najpogosteje s pomočjo encima katalaza (CAT), ki pretvarja H_2O_2 v vodo in kisik.



H_2O_2 lahko odstrani tudi glutation peroksidaza (GSH), pri čemer nastane voda in glutation peroksid (GSSG).



Zaradi zelo nizke vsebnosti CAT in GSH v semenu merjašca H_2O_2 zastaja v semenu in je glavni razlog za oksidativne poškodbe merjaščevih semenčic. H_2O_2 , ki se z encimi ne odstrani, lahko vodi v nastanek HO^\bullet , ki nastaja v procesu Fentonove reakcije. Pri tej reakciji so pomembni Fe^{2+} ioni, ki povzročijo ceplitev vodikovega peroksidu na hidroksilni radikal in hidroksilni anion (Halliwell in Chirico, 1993).



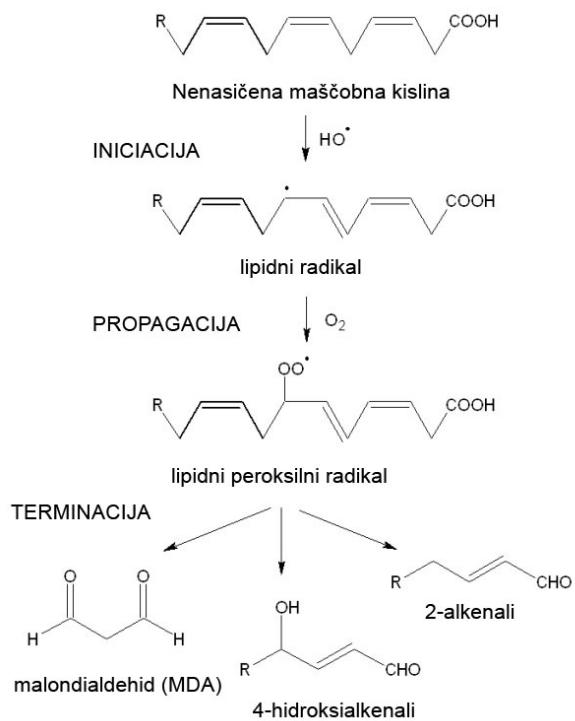
Novonastali hidroksilni radikal ponavadi nadalje reagira tako, da pritegne vodikov proton, pri čemer nastaneta nov radikal in voda. Če ta atom vodika izvira iz molekule maščobne kisline, je to lahko začetek peroksidacije fosfolipidov in nenasičenih maščobnih kislin. Proces imenujemo lipidna peroksidacija (Halliwell in Chirico, 1993).

2.3.3 LIPIDNA PEROXIDACIJA

Lipidna peroksidacija je verižna reakcija prostih radikalov, ki povzroči oksidacijo maščobnih kislin. Čim bolj je maščobna kislina nenasičena, tem bolj je dovzetna za reakcije z radikali. Prisotne dvojne vezi v molekuli namreč zmanjšajo energijo vodikove vezi na ogljiku, zato se vodik lažje odcepi (Halliwell in Chirico, 1993). Merjaščeve semenčice so še posebej občutljive za lipidno peroksidacijo, saj vsebujejo velik delež nenasičenih maščobnih kislin, njihova citoplazma pa ima nizko vsebnost encimskih antioksidantov (Brezezinska-Slebodzinska in sod., 1995).

Stopnje lipidne peroksidacije so (slika 1):

1. Iniciacija oz. začetek nastajanja prostih radikalov.
2. Propagacija, pri kateri prosti radikali vstopajo v reakcije, produkti, ki pri tem nastajajo, pa se cepijo naprej.
3. Terminacija, ki vključuje povezavo dveh radikalov in nastanek stabilnega produkta (Halliwell in Chirico, 1993; Ayala in sod., 2014).



Slika 1: Shematski prikaz lipidne peroksidacije
Figure 1: Schematic diagram of lipid peroxidation

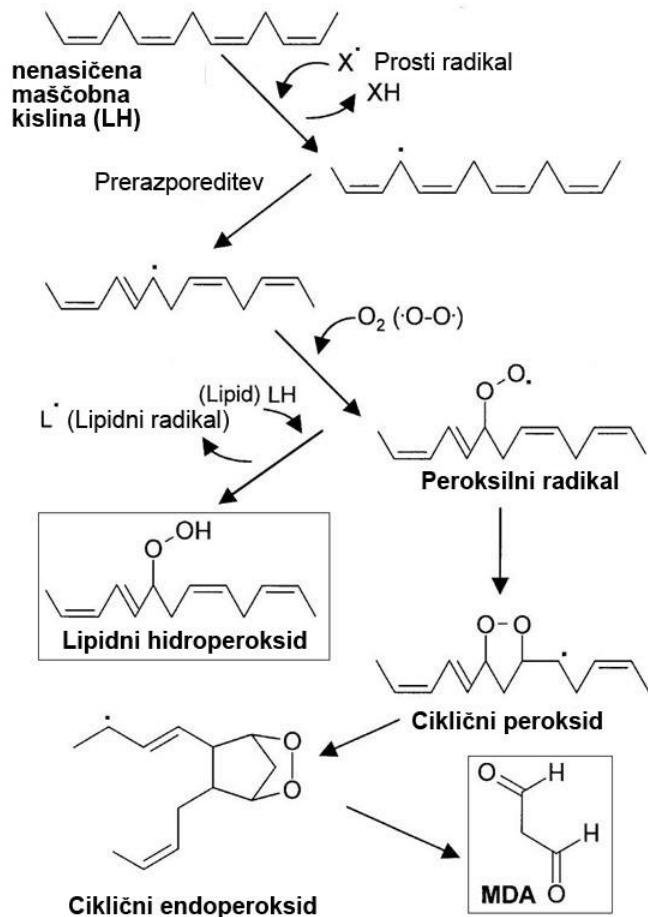
Med procesom lipidne peroksidacije v membrani semenčice oksidira do 60 % maščobnih kislin, kar vodi v izgubo membranske celovitosti (Martin in sod., 2004) in povečano prepustnost membrane repa in glave semenčic (Buhr in Pettitt, 1996). Posledično se spremeni funkcija plazemske membrane, prizadeta pa je tudi aktivnost celičnih encimov. Zunajcelični Ca^{2+} , ki se veže na membranske fosfolipide, še dodatno zmanjša fluidnost lipidnega dvosloja plazemske membrane. To vodi v ločevanje lipidov iz lipidnega dvosloja ali pa v popolno fuzijo membrane, kar še dodatno poškoduje lipidni dvoslojniki ter prizadene njeno barierno funkcijo. Proses prispeva k prenosu ionov skozi plazemskega membrano (Buhr in Pettitt, 1996) in izhajanjenu encimov iz celice (Huo in sod., 2002).

Lipidna peroksidacija vpliva na gibeljivost semenčic, njihovo kapacitacijo in akrosomsko reakcijo (Cerolini in sod., 2000; Awda in sod., 2009). Lipidna peroksidacije je odgovorna tudi za neodzivnost semena na kalcijeve signale in zavira z ionofori sproženo združitev med jajčno celico in semenčico. Vzrok za to še ni docela pojasnjen, najverjetnejša je zmanjšana fluidnost plazemske membrane in neustrezna aktivnost encimov, ki so vezani na membrane, možen pa je tudi direkten vpliv ROS na ionske kanale v plazemski membrani (Aitken in sod., 1989).

STRANSKI PRODUKTI LIPIDNE PEROXSIDACIJE

Med lipidno peroksidacijo nenasičenih maščobnih kislin se tvorijo tudi številni stranski produkti, ki so v primerjavi s prostimi radikali zelo stabilni. Nekateri prehajajo celično membrano in povzročajo poškodbe daleč stran od njihovega izvora. Najpogosteji stranski produkti so aldehydi, med katerimi je najbolj poznan malondialdehid (MDA). MDA je stranski produkt encimske lipidne peroksidacije in končni produkt neencimske tvorbe peroksidnih radikalov (Repetto in sod., 2012).

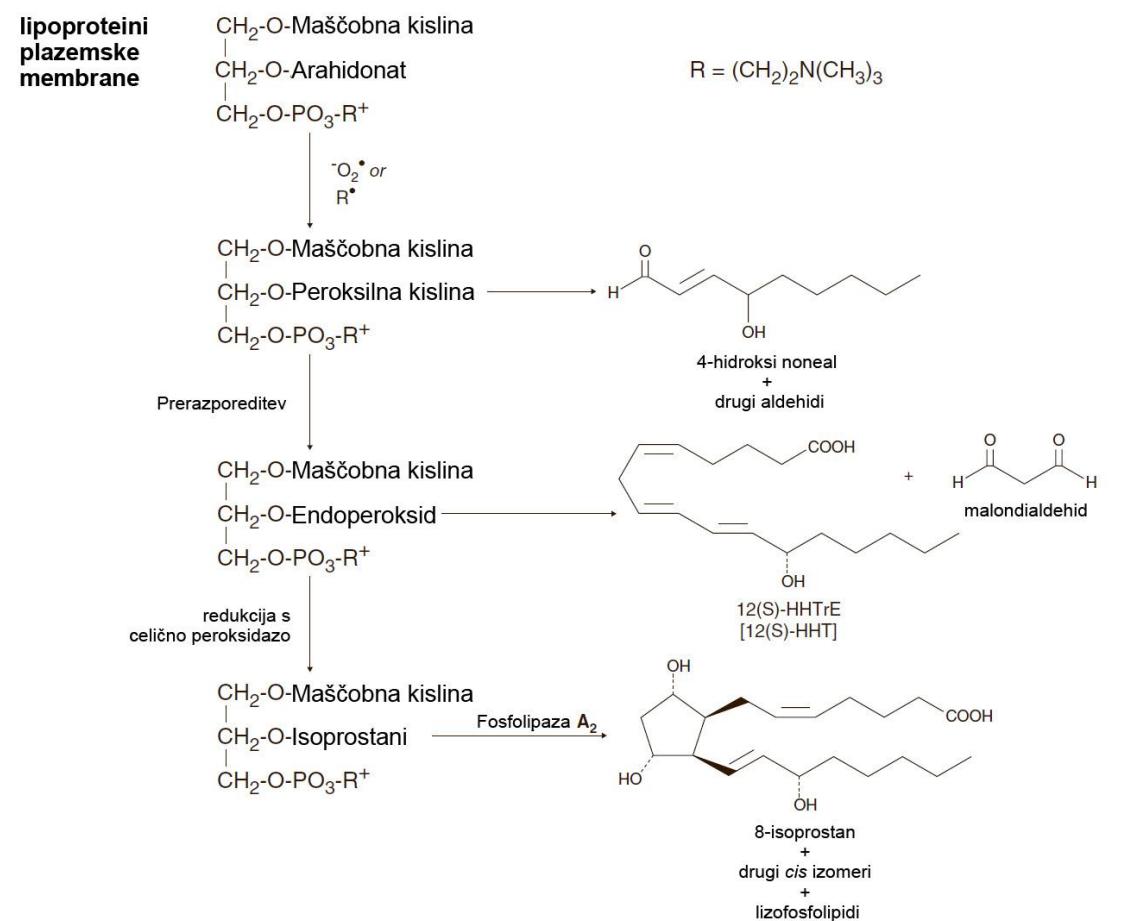
Nastajanje MDA je prikazano na sliki 2 (Grintzalis in sod., 2013).



Slika 2: Shematski prikaz nastanka MDA iz nenasičenih maščobnih kislin
Figure 2: Schematic diagram of MDA formation from polyunsaturated fatty acids

MDA se kot standard uporablja v testu TBARS, v katerem izmerimo stranske produkte, ki reagirajo s tiobarbiturno kislino. Kljub nizki specifičnosti se ta test najpogosteje uporablja

za določanje stopnje lipidne peroksidacije (Repetto, 2008). Novejše študije so se osredotočile na 8-isoprostan kot specifičen pokazatelj lipidne peroksidacije. Isoprostani se namreč tvorijo v celičnih membranah po razpadu arahidonske kisline zaradi ROS (slika 3). So stabilni in specifični produkti reakcij prostih radikalov in morda boljši pokazatelji lipidne peroksidacije kot TBARS. Njihova prisotnost se poveča že ob nizki stopnji oksidativnega stresa, njihovo nastajanje pa ni odvisno od vsebnosti maščob v prehrani živali (Meagher in FitzGerald, 2000). Pozitivna stran testa za določanje 8-isoprostana je tudi dejstvo, da so isoprostani biološko aktivni in zato lahko odgovorni za določene napake na semenčicah (Khosrowbeygi in Zarghami, 2008).



Slika 3: Shematski prikaz nastanka 8-isoprostana
Figure 3: Schematic diagram of 8-isoprostane production

2.4 KLINIČNI POMEN OKSIDATIVNEGA STRESA V SEMENU

Povečan oksidativni stres, prisoten v semenu, povzroči slabšo oploditveno sposobnost, neustrezen razvoj zarodkov in večjo izgubo plodov (Baker in sod., 2005). Večja stopnja lipidne peroksidacije kot posledica ROS je glavni vzrok za zmanjšano gibljivost semenčic in posledično slabšo oploditveno sposobnost (Agarwal in sod., 2007). Semenčice s poškodovano DNK zaradi ROS v primeru naravnega prepusta ali umetne osemenitve ne predstavljajo večje nevarnosti, saj zaradi istočasne lipidne peroksidacije takšne semenčice največkrat niso sposobne oploditve. Vendar pa pri postopku mikroinjiciranja semenčice v jajčno celico omogočimo oploditev jajčne celice s semenčicami, ki lahko imajo hudo poškodovano DNK (Makker in sod., 2009). Od kakovosti jajčne celice je nato odvisno ali lahko popravi poškodovano DNK semenčice pred delitvijo in tako omogoči razvoj normalnega potomca. Pri ljudeh je bilo ugotovljeno, da je kar 80 % kromosomskih aberacij paternalnega izvora (Aitken in Koppers, 2011). Semenčice s poškodovano DNK povezujemo s slabšo oploditveno sposobnostjo semenčic, motnjami v razvoju zarodka pred vgnezditvijo, povečanim številom abortusov in večjo smrtnostjo potomcev (Chen in sod., 2013). Poškodbe DNK semenčic, povzročene z ROS, lahko vodijo tudi v razvoj bolezni pri potomcih, kot so rakasta obolenja (Aitken, 2006), prijedene bolezni (Hazout in sod., 2008) in neplodnost (Aitken in de Iuliis, 2007). Pri govedu so ugotovili slabši razvoj zarodkov v *in vitro* pogojih v primeru oploditve jajčne celice s semenčicami s poškodovano DNK zaradi oksidativnega stresa (Simões in sod., 2013). Podobne ugotovitve so opazili pri opicah, pri katerih so z ROS poškodovane semenčice škodljivo vplivale na razvoj zarodka, saj so zaustavile mitotične delitve (Burruel in sod., 2013).

2.5 ANTIOKSIDANTI V SEMENU

Semenčice se tako kot vse žive celice, ki živijo v aerobnih pogojih, nenehno srečujejo s kisikovim paradoksom: kisik je na eni strani nujno potreben za življenje, vendar pa lahko njegovi presnovki, kot so ROS, vodijo v oksidacijo celičnih struktur (Saleh in Agarwal, 2002).

Antioksidanti so snovi, ki upočasnijo ali preprečijo oksidacijo posameznih celičnih sestavin, tako da reagirajo z reaktivnimi kisikovimi zvrstmi in posledično zaustavijo njihove verižne reakcije. To omogoča njihova struktura, ki vsebuje vsaj en reaktivni vodik, ki se zlahka odcepi in veže na radikal. Pri tem nastane nov radikal, ki je stabilnejši in zato manj škodljiv. Antioksidanti v grobem delujejo na dva načina; lahko preprečujejo nastajanje radikalov in oksidativnih poškodb ali pa odstranjujejo že nastale radikale (Gutteridge, 1994).

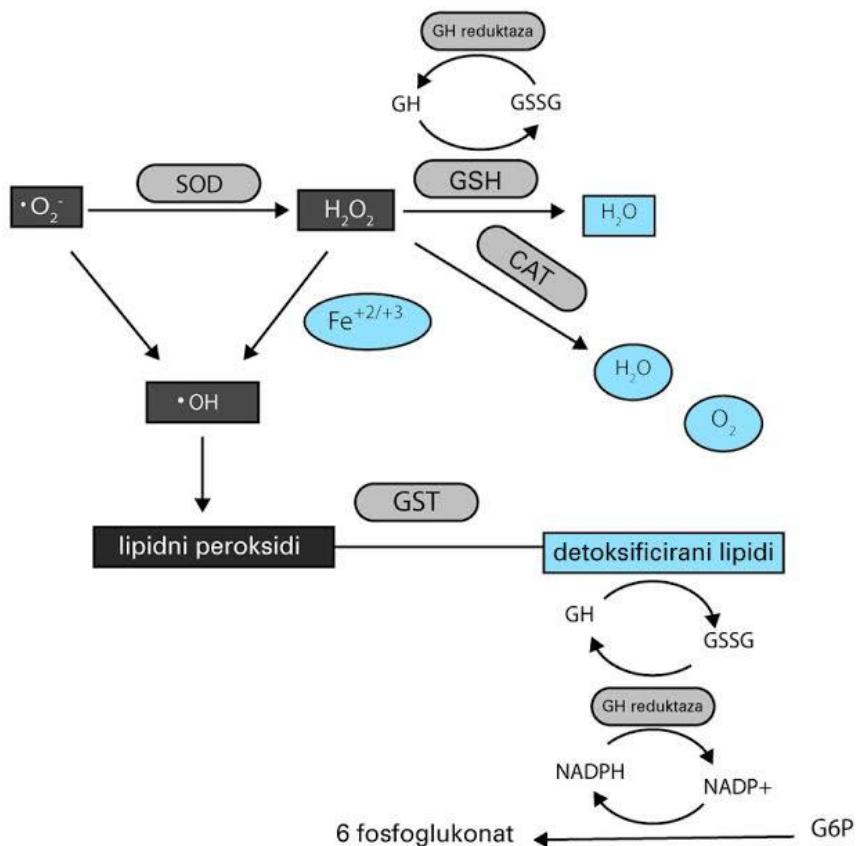
Prisotnost O_2 v semenčicah je omogočila razvoj antioksidantnega obrambnega sistema. Sestavlja ga encimski in neencimski antioksidanti ter nizkomolekulski sestavine semenske plazme, ki imajo antioksidantno zmogljivost. Vsi ti antioksidanti med seboj tesno sodelujejo in s tem nudijo optimalno zaščito pred ROS (Tavilani in sod., 2008). Pomanjkanje kateregakoli izmed teh elementov zmanjša celokupno antioksidantno kapaciteto v semenu (Walczak-Jedrzejowska in sod., 2013).

Prisotnost antioksidantov v semenu se med živalskimi vrstami razlikuje. Seme žrebcev ima v primerjavi z merjaščevim semenom, pri katerem je količina antioksidantov relativno nizka, izredno dobro razvit antioksidantni sistem, kar omogoča ustrezeno zaščito semenčic pred oksidativnim stresom (Strzezek in sod., 2000; Strzezek, 2002a). V semenski plazmi žrebcev je izredno visoka aktivnost encima katalaze, dodatno pa pred oksidanti ščitijo tudi nizkomolekulski antioksidanti kot sta L-glutation in L-ergotionin.

L-glutation in L-ergotionin sta v semenski plazmi merjascev prisotna le v sledovih, v njej pa je nizka tudi aktivnost encima katalaze in glutation peroksidaze (Strzezek, 2002a), vse to pa vpliva na večjo občutljivost merjaščevega semena na ROS (Awda in sod., 2009). Pri merjascih je tako zaščita pred ROS odvisna predvsem od SOD in antioksidantov, prisotnih v semenski plazmi (Strzezek, 2002a). Prisotnost z antioksidanti bogate semenske plazme močno vpliva na boljšo oploditveno sposobnost zamrznjenega merjaščevega semena (Pena in sod., 2006).

2.5.1 ENCIMSKI ANTIOKSIDANTI

Glavni antioksidantni encimski sistem v semenu se imenuje encimska triada in je sestavljen iz encimov: superoksid dismutaza, katalaza in glutation peroksidaza. Njihovo delovanje je prikazano na sliki 4 (Gumulec in sod., 2013).



Slika 4: Shematski prikaz obrambnega delovanja antioksidantnih encimov v semenu
Figure 4: Schematic diagram of the enzymatic antioxidant defence system in semen

Legenda: GSH – glutation peroksidaza; GST - glutation-S-transferaza; GH - reducirana glutation; GSSG – oksidirana glutation; SOD, superoksid dismutaza, CAT – katalaza; G6P – glukoza -6-fosfat

Legend: GSH – glutathione peroxidase; GST - glutathione-S-transferase; GH - reduced glutathione; GSSG – oxidized glutathione; SOD - superoxide dismutase; CAT – catalase; G6P - Glucose-6-phosphate

2.5.1.1 Superoksid dismutaza (SOD)

SOD je metalo encim, ki katalizira reakcijo vezave O_2^- z dvema protonoma v kisik in vodikov peroksid. Poznamo znotrajcelično in zunajcelično obliko SOD. Znotraj semenčic se glavnina SOD nahaja v citoplazmi in ima v aktivnem centru vezan baker ali cink (Cu/Zn SOD). Najdemo pa SOD tudi v matriku mitohondrija, v katerem ima v aktivnem centru vezan mangan (Mn SOD). Celični oblici SOD ne prehajata celičnih membran (Mruck in sod., 2002). Zunajcelična SOD (EC-SOD) se sintetizira v citosolu semenčic in nato prehaja v zunajcelični prostor, kjer se s heparin veznimi domenami veže na proteine matriksa

zunajceličnega prostora ali pa ostane v prosti obliki. EC-SOD je strukturno zelo podobna mitohondrijski SOD, vendar ima v aktivnem centru vezan baker ali cink (Cu/Zn EC-SOD) (Kowalowka in sod., 2008). V semenski plazmi merjascev je prisotna že v obdobju pubertete (8–12 mesecev), njena aktivnost pa z dozorevanjem merjascev narašča (Strzezek in sod., 2000).

SOD je glavni encimski antioksidant v semenčicah in semenski plazmi merjascev. Iz 1 ml frakcije ejakulata, bogate z merjaščevimi semenčicami, izhaja 66 % celotne aktivnosti SOD iz semenčic, ostala aktivnost SOD pa izvira iz semenske plazme. SOD, prisotna v semenski plazmi, izvira iz nadmodka in prostate (Orzołek in sod., 2013). V merjaščevem semenu so izolirali termostabilno SOD z molekulsko maso 67 kDa (Kowalowka in sod., 2008; Orzołek in sod., 2013). Njena aktivnost je najvišja pri temperaturi med 20 in 45 °C in pri alkalnem pH (Orzołek in sod., 2013). Aktivnost SOD se močno zmanjša (za 65 %) (Orzołek in sod., 2013) ali celo zaustavi (Kowalowka in sod., 2008) ob prisotnosti višjih koncentracij H₂O₂ in prisotnosti merkaptoetanola. Domnevajo, da je SOD z molekulsko maso 67 kDa pritrjena na zunanj strani celične membrane (Orzołek in sod., 2013).

Ob izpostavitvi merjaščevega semena hladnemu šoku se močno poveča aktivnost SOD z molekulsko maso 31 kDa, ki v 85–90 % izvira iz semenčic (Mennella in Jones, 1980). Orzołek in sod. (2013) so izolirali SOD z molekulsko maso 30 kDa, ki je bila prisotna v merjaščevem semenu tudi po hranjenju semena pri 16 °C v mediju z dodatkom sečnine, zaradi česar avtor sklepa, da je ta SOD vezana na notranji sloj plazemske membrane, saj se sprosti samo, ko pride do njene denaturacije – npr. ob prisotnosti 3M sečnine (Orzołek in sod., 2013).

Pri ljudeh so odkrili negativno korelacijo med aktivnostjo SOD v semenski plazmi in stopnjo lipidne peroksidacije (Tavilani in sod., 2008). Aktivnost SOD v semenu ljudi močno pada po zamrzovanju semena (Lasso in sod., 1994).

Glavna vloga SOD je zaščita semenčic pred lipidno peroksidacijo (Kowalowka in sod., 2008). Kljub temu prisotnost katerekoli oblike SOD ne prepreči lipidne peroksidacije, povzročene z askorbat/Fe²⁺ reakcijo (Mennella in Jones, 1980). Dodajanje SOD merjaščevemu semenu pred zamrzovanjem izboljša gibljivost in preživitveno sposobnost semenčic po odtajanju. Dodatek SOD-a v kombinaciji s CAT zmanjša produkcijo ROS v

semenčicah, vendar ne zmanjša produkcijske malondialdehida – stranskega produkta lipidne peroksidacije (Roca in sod., 2005).

2.5.1.2 Katalaza (CAT)

Katalaze so hemoproteini, ki pretvarjajo H_2O_2 v molekulske kisik in vodo. Ker odstranjujejo vodikov peroksid, preprečujejo nastajanje hidroksilnega radikala. Aktivnost katalaze je bila dokazana v peroksisomih, mitohondrijih, endoplazmatskem retikulumu in v citosolu številnih celic (Scibior in Czeczot, 2006).

V raziskavi, v kateri so ugotavljali aktivnost katalaze v merjaščevih semenčicah, pridobljenih iz nadmodka, je bila aktivnost katalaze nezaznavna. Kot so ugotovili, je katalaza v semenski plazmi prisotna le v sledovih, njen izvor pa je prostata (Koziorowska-Gilun in sod., 2011a).

Dodajanje CAT (400 IU/ml) samostojno ali v kombinaciji s SOD (200 in 400 IU/ml) merjaščevemu semenu pred zamrzovanjem pripomore k boljši ohranitvi gibljivosti in preživitvene sposobnosti semenčic po tajanju (Roca in sod., 2005).

2.5.1.3 Glutation peroksidaza (GSH)

Glutation peroksidaza (GSH) katalizira redukcijo vodikovega peroksidu ali organskih peroksidov do vode, pri čemer pride do oksidacije glutationa, ki se pri tem pretvori v oksidirano obliko (GSSG). Sledi regeneracija reducirane oblike glutationa, ki jo katalizira glutation reduktaza. Pri tej reakciji kot vir energije služi oksidacija NADPH (Imai in Nakagawa, 2003).

PH-GSH ima ključno vlogo pri zaščiti membrane pred lipidno peroksidacijo (Cejas in sod., 2004), saj neposredno reducira hidroperokside fosfolipidov, maščobnih kislin in holesterola v peroksidiranih membranah in oksidiranih lipoproteinih. GSH sodeluje v procesu kondenzacije kromatina, kar predstavlja zaščito DNK pred oksidativnim stresom.

Pri merjascih naj bi bila peroksidazna aktivnost v semenski plazmi trikrat toljšna, kot je njena aktivnost v semenčicah (Jelezarsky in sod., 2008). GSH v semenski plazmi merjascev izvira predvsem iz tekočine nadmodka (Koziorowska-Gilun in sod., 2011a), vendar pa je

njena aktivnost komaj zaznavna in precej nižja kot pri nekaterih drugih živalskih vrstah (Strzezek, 2002a).

2.5.2 NIZKOMOLEKULSKI ANTIOKSIDANTI

Najpomembnejši nizkomolekulski antioksidanti, prisotni v semenski plazmi, so: L-glutation (GH), L-ergotionin (ERT), α -tokoferol, L-askorbinska kislina in nekateri proteini semenske plazme (predvsem od cinka odvisni proteini) (Strzezek in sod., 1999; Strzezek, 2002a).

2.5.2.1 L-glutation (GH)

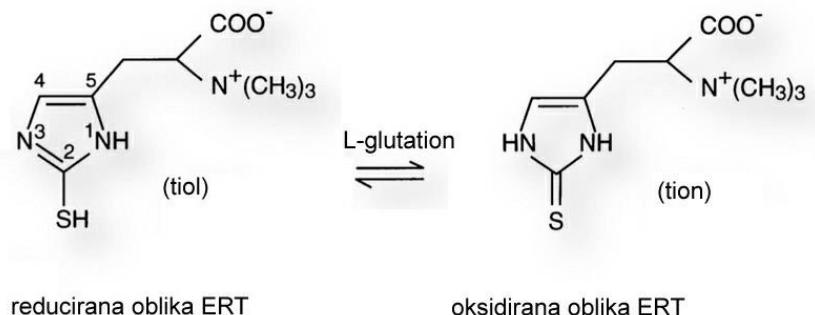
Večina GH nastane v celicah in je sestavljen iz treh aminokislin, in sicer cisteina, glicina in glutamata. Tiolna skupina L-cisteina v GH služi kot donor protona, kar daje GH njegove antioksidacijske lastnosti (Pela in sod., 1999; Piste, 2013). GH je zelo pomemben antioksidant, saj omogoča oksidacijo tiolnih skupin (-SH) v proteinih, ki predstavljajo donorje H^+ (Kowalowka in sod., 2008). GH preprečuje tudi lipidno peroksidacijo in tvorbo prostega kisika. Pomanjkanje GH vodi v zmanjšano gibljivost semenčic in poškodbe veznega dela semenčice (Lenzi in sod., 1994). Poleg tega domnevajo, da lahko GH pretvori oksidirano obliko ERT nazaj v svojo tiol/tion obliko (Strzezek, 2002a). Dodatek GH razredčevalcu izboljša kakovost semena, hrانjenega pri 10 °C (Funahashi in Sano, 2005), podobno se ob dodatku GH bolje ohrani tudi kakovost zamrznjenega merjaščevega semena (Gadea in sod., 2004).

2.5.2.2 L-ergotionin (ERT)

ERT je izredno stabilen antioksidant (Hartman, 1990), ki ne prehaja plazemske membrane in lahko v notranjost semenčice prodre le s pomočjo ustrezne prenašalca (ERT prenašalec) (Gründemann in sod., 2005). Večinoma naj bi bil ERT znotraj celični antioksidant, v merjaščevemu semenu pa ga najdemo predvsem v semenski plazmi (Strzezek in sod., 1999). V semenčicah je prisoten, če sploh, v precej nizkih koncentracijah

in je torej v merjaščevem semenu zunajcelični antioksidant. Glavni vir ERT je vezikularna žleza, ki ima zelo veliko ERT prenašalcev (Nikodemus in sod., 2011).

ERT ima pomembno vlogo pri odstranitvi hidroksilnih radikalov, sodeluje tudi pri transportu kovinskih ionov in regulira delovanje metaloencimov (Akanmu in sod., 1991; Misiti in sod., 2001). GH in ERT skupaj imata pomembno vlogo pri detoksifikaciji ROS. Shematski prikaz ergotionina je viden na sliki 5.

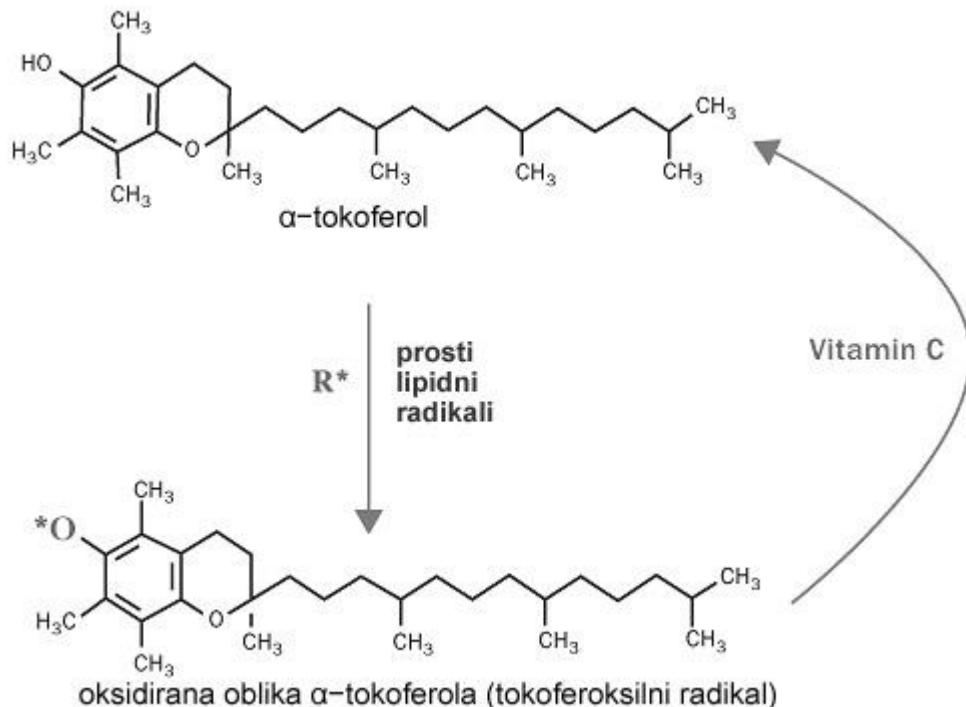


Slika 5: Shematski prikaz pretvorbe ergotionina
Figure 5: Schematic diagram of ergothioneine conversion

2.5.2.3 Vitamin E

Vitamin E je ime za skupino osmih kemijsko zelo podobnih in v maščobah topnih substanc: štirih tokoferolov in štirih tokotrienolov. Za prepečitev lipidne peroksidacije je pomemben predvsem α -tokoferol.

α -tokoferol spada med fenolne antioksidante. Nahaja se predvsem v celičnih membranah, tja pa se zasidra z interakcijo svoje stranske verige z membranskimi lipidi in tako stabilizira membrano ter jo zaščiti pred oksidativnimi poškodbami (Young in McEnemy, 2001). α -tokoferol je eden najmočnejših lovilcev prostih radikalov. Njegova najpomembnejša vloga je reakcija s sekundarnimi peroksilnimi radikali, pri tem pa tvori manj reaktivен tokoferilni radikal. Tak radikal se nato inaktivira, tako da se združi še z enim tokoferilnim radikalom ali pa se reducira s pomočjo askorbinske kisline (Halliwell in Gutteridge, 1999) (slika 6).



Slika 6: Shematski prikaz nastanka oksidirane oblike α -tokoferola
Figure 6: Schematic diagram of oxidized α -tocopherol formation

α -tokoferol reagira tudi s singletnim kisikom, s superoksidom in hidroksilnim radikalom ter reducira baker med oksidacijo lipidov (Halliwell in Gutteridge, 1999). Lipidni peroksilni radikali reagirajo s tokoferolom veliko hitreje kot z lipidi, zato lahko ena molekula α -tokoferola zaščiti kar 10^3 – 10^8 molekul nenasičenih maščobnih kislin (Kamal-Eldin in Appelqvist, 1996).

Glavnina radikalov nastane v lipidnih plasteh, v katerih se nahajajo encimi, potrebni za katalizo radikalnih reakcij, zato predstavlja α -tokoferol kot lipofilni antioksidant v membrani semenčice prvo obrambno črto pred delovanjem ROS (Kamal-Eldin in Appelqvist, 1996).

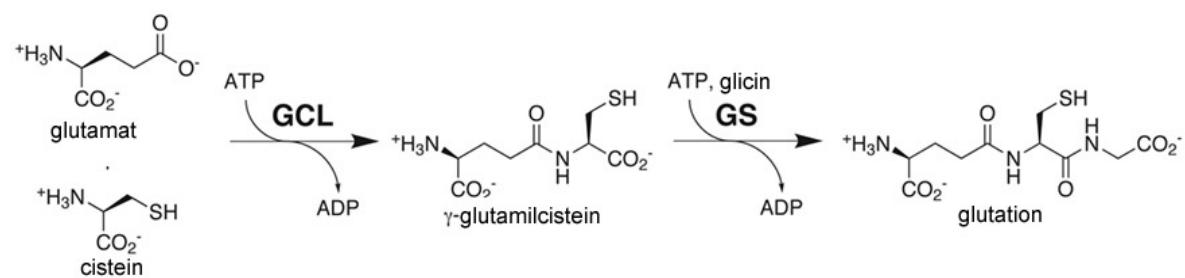
Raziskave *in vitro* so pokazale, da dodajanje α -tokoferola razredčevalcem za zamrzovanje merjaščevega semena izboljša gibljivost semena, zmanjša oksidativni stres (Breininger in sod., 2005; Satorre in sod., 2012; Mendez in sod., 2013), zmanjša kapacitacijo semenčic (Satorre in sod., 2009; Satorre in sod., 2012) in zmanjša izražanje apoptočnih genov, kar vodi v manjšo fragmentacijo DNK po zamrzovanju in tajanju merjaščevih semenčic (Jeong

in sod., 2009). Dodajanje α -tokoferola semenu je po treh dneh hranjenja prav tako zmanjšalo lipidno peroksidacijo hlajenega semena (Mendez in sod., 2013).

Raziskave *in vivo* so pokazale, da je dodajanje α -tokoferola in glutationa v krmi merjascev v obdobju 7 tednov za 62 % zmanjšalo lipidno peroksidacijo semenčic, merjeno s testom TBARS, in da se je povečala koncentracija semenčic v ejakulatu (Brezesinska-Slebodzinska in sod., 1995). Ob dodajanju α -tokoferola in selena merjaščevemu semenu se je ohranilo več gibljivih in morfološko normalnih semenčic. α -tokoferol so dokazali le v semenčicah, ne pa tudi v semenski plazmi, zaradi česar so sklepali, da ta direktno zaščiti semenčice pred morfološkimi spremembami, tako da veže nastajajoče endoperokside (Marin-Guzman in sod., 1997).

2.5.2.4 L-cistein

L-cistein je α -aminokislina in je v majhnih količinah prisotna v večini proteinov. Na stranski verigi cisteina je tiolna skupina (-SH), ki je nepolarne narave in molekulo s tem uvršča med hidrofobne aminokisline. Sodeluje v encimskih reakcijah, pri prenosu elektronov in v procesu oksidacije, pri čemer iz dveh cisteinov nastane disulfidni derivat cistin, ki igra pomembno strukturno vlogo v mnogih proteinih (Pela in sod., 1999; Piste, 2013). L-cistein je tudi pomemben prekurzor antioksidanta L-glutationa (GH) (Galant in sod., 2011) (slika 7).



Slika 7: Shematski prikaz sinteze glutationa
Figure 7: Schematic diagram of glutathione synthesis

Legenda: GS – glutation sintetaza; GCL – glutamat- cistein ligaza
Legend: GS - glutathione synthetase; GCL - glutamate-cysteine ligase

L-cistein zaradi svoje hidrofobne narave z lahkoto prehaja v notranjost celic, kjer se lahko pretvori v taurin. Ta se s pomočjo maščobnih kislin v plazemski membrani pretvori v aciltaurin, ki izboljša površinske lastnosti plazemske membrane in regulacijo osmoze (Vazquez in Roldan, 1997; Esteves in sod., 2007). L-cistein, vezan na plazemsko membrano, igra pomembno vlogo pri preprečevanju lipidne peroksidacije (Chatterjee in sod., 2001).

Dodatek L-cisteina (5 mmol/l) svežemu razredčenemu merjaščevemu semenu je bolje ohranil progresivno gibljivost (Funahashi in Sano, 2005) in preživitveno sposobnost semena (Funahashi in Sano, 2005; Szczesniak-Fabianczyk in sod., 2003) ter bolje ohranil stabilnost kromatina pri merjaščevem semenu, ohlajenem na 15 °C, v primerjavi s semenom brez dodatka L-cisteina (Szczesniak-Fabianczyk in sod., 2003).

Dodatek L-cisteina razredčevalcu z dodatkom laktoze in jajčnega rumenjaka pred zamrzovanjem merjaščevega semena v koncentracijah 5 ali 10 mmol/l izboljša preživitveno sposobnost, progresivno gibljivost in integriteto akrosoma po zamrzovanju in tajanju (Kaeoket in sod., 2010). Izboljša se tudi integriteta plazemske membrane in s tem zmanjša delež apoptotičnih in nekrotičnih semenčic (Tienthai in sod., 2012).

2.5.3 CELOKUPNA ANTIOKSIDANTNA KAPACITETA (TAC)

Celokupna antioksidantna kapaciteta (angl. TAC-total antioxidant capacity) vključuje celokupno delovanje vseh antioksidantov v semenski plazmi (Ghiselli in sod., 2000).

Za določanje TAC je na voljo več različnih testov, vendar ima vsak od njih določene pomanjkljivosti. Rezultati posameznih metod zato navadno med seboj niso primerljivi. Za natančnejšo oceno TAC bi morali zbrati rezultate posameznih metod in jih med seboj celostno primerjati (Ghiselli in sod., 2000).

Celokupna antioksidantna kapaciteta merjaščevega semena se čez leto spreminja in je sezonsko povezana. Najnižja je v poletnem obdobju (Strzezek in sod., 2000; Koziorowska-Gilun in sod., 2011b), najvišja pa jeseni in pozimi (Koziorowska-Gilun in sod., 2011b). Zanimivo je, da je aktivnost samega encima SOD najvišja spomladi in poleti, ko je TAC najnižja (Koziorowska-Gilun in sod., 2011b).

Pri ljudeh so ugotovili, da je seme bolj občutljivo na oksidativni stres in ima več poškodb pri nižjih vrednostih TAC v semenski plazmi (Mahfouz in sod., 2009). Vsebnost ROS in TAC v semenski plazmi ljudi se uporablja kot napovedna vrednost pri oceni kakovosti semena in njihovi oploditveni sposobnosti (Das in sod., 2008;). Kombinacija obeh parametrov naj bi bila idealna, saj zmanjša individualne razlike med posameznimi parametri oksidativnega stresa in vodi v zanesljivejšo napovedno vrednost (Sharma in sod., 1999).

Dializa izboljša kakovost hranjenega merjaščevega semena, vendar pa lahko zaradi verjetne odstranitve vodotopnih nizkomolekulskih antioksidantov vpliva na celokupno antioksidantno kapaciteto in poveča občutljivost merjaščevega semena na oksidativni stres. Namen našega dela je bilo oceniti kakovost hranjenega dializiranega merjaščevega semena z metodami, ki omogočajo temeljito oceno sprememb v semenčicah, in določiti vpliv dialize na posamezne oksidativne parametre semenske plazme. Zanimalo nas je tudi, ali dodatek antioksidantov dializiranemu semenu izboljša kakovost in antioksidantni status hlajenega merjaščevega semena.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 ZASNOVA RAZISKAVE

3.1.1 VZORCI SEMENA

Vzorci semena so bili odvzeti z orokavičeno roko med rednim jutranjim odvzemom semena za potrebe osemenjevalnega centra Ihan ali Ptuj. Vsi merjasci so bili uhlevljeni v samostojnih ogradah, hranjeni z uravnoteženimi obroki pripravljenimi za plemenske merjasce, vodo pa so imeli stalno na voljo. Ejakulati so bili takoj po odvzemu in filtraciji skozi gazo razredčeni z razredčevalcem za merjaščovo seme v razmerju 1:2 (BTS: Beltsville Thawing Solution (Minitübe, Nemčija)). BTS razredčevalec je bil sestavljen iz glukoze, Na citrata, EDTA, Na bikarbonata, K klorida in antibiotika. Tako pridobljeni t. i. nativni vzorci so bili dostavljeni v laboratorij in uporabljeni za nadaljnje analize.

V razsikavo smo vključili seme z ustrezeno oploditveno sposobnostjo, primerno za hranjenje semena, in sicer, če je bila skupna gibljivost semenčic v vzorcu vsaj 75-odstotna, progresivna gibljivost vsaj 35-odstotna, delež semenčic z morfološkimi napakami ni presegel 30 % in od tega ni bilo več kot 20 % protoplazmatskih kapljic (Silva in sod., 2011).

3.1.1.1 DIALIZA

Dializa nativnih vzorcev je potekala pri sobni temperaturi z uporabo polprepustne dializne membrane, ki prepušča molekule, manjše od 12–14 kDa (Visking Dialysis Tubing, Serva Electrophoresis, Heidelberg, Nemčija) (Fraser in sod., 2007). Dializno črevo smo pripravili s spiranjem pod toplo tekočo vodo. Pred dodajanjem vzorca smo dializno črevo dobro preprali z BTS. Kot pufer za dializo smo uporabili razredčevalec BTS v razmerju 1 : 50 glede na volumen semena. Po prvi uri dialize smo pufer zamenjali in dializirali še dodatni dve uri. V času dialize, ki je potekala pri sobni temperaturi, smo nedializiran vzorec prav tako pustili na sobni temperaturi.

3.1.1.2 PRIPRAVA SEMENSKE PLAZME

Za pripravo semenske plazme smo odpipetirali 5 ml vzorca in ga 10 minut centrifugirali pri 818 g pri sobni temperaturi. Dobljeni supernatant smo ponovno centrifugirali pri 13000 g 15 minut pri 4 °C. Pridobljeno semensko plazmo smo razdelili v alikvote po 150 µl in jih zamrznili ter hranili do analiz pri – 80 °C. Vzorce, namenjene za analizo 8-isoprostana, smo shranili v ependorfkah, na katere je bilo vezano 0,005 % butil hidroksi toluena (Cayman Chemical Company, ZDA). Med hranjenjem vzorcev temperatura v zamrzovalniku ni padla pod – 65 °C. Vzorci so bili hranjeni do 6 mesecev.

3.1.2 UGOTAVLJANJE LASTNOSTI KRATKOTRAJNO HRANJENEGA SEMENA PO DIALIZI

V prvem delu raziskave smo uporabili 17 vzorcev semena, pridobljenih od osmih naključno izbranih merjascev s farme Ihan (3 x "landrace" (slovenska deželna pasma), 2 x slovenski veliki beli prašič, 2 x Pietrian in 1 x hibridna linija 54), starih med 12 in 24 mesecev. Vsi vzorci so bili odvzeti v zgodnjih pomladnih mesecih, v poletnih mesecih se namreč zmanjša oploditvena sposobnost semena zaradi povisanih zunanjih temperatur. Ejakulati so bili takoj po odvzemu in filtraciji skozi gazo razredčeni z razredčevalcem za merjaščovo seme v razmerju 1:2 (BTS: Beltsville Thawing Solution (Minitübe, Nemčija)), t.i. nativni vzorci pa v času ene ure v hladilni posodi dostavljeni v laboratorij in uporabljeni za nadaljnje analize. Med transportom temperatura ni bila kontrolirana.

Po opravljeni osnovni analizi semena (koncentracija, gibljivost in progresivna gibljivost) smo vsak nativni vzorec razdelili na dva dela. 45 ml nativnega vzorca smo dializirali (D), drugi del vzorca pa pustili nedializiran (N). Vzorce semena smo do konca trajanja poskusa (3 dni) hranili ob konstantnem rahlem mešanju pri 15–17 °C. Iz vsakega nativnega vzorca smo pridobili 7 vzorcev semena, in sicer:

N0 – nedializiran vzorec, analiziran na dan odvzema semena,

N1 – nedializiran vzorec, analiziran po 24 urah hranjenja,

N2 – nedializiran vzorec, analiziran po 48 urah hranjenja,

N3 – nedializiran vzorec, analiziran po 72 urah hranjenja,

ZAKOŠEK PIPAN M. Vpliv odstranitve nizkomolekulskih ... na oksidativni status in lastnosti ... semena ...

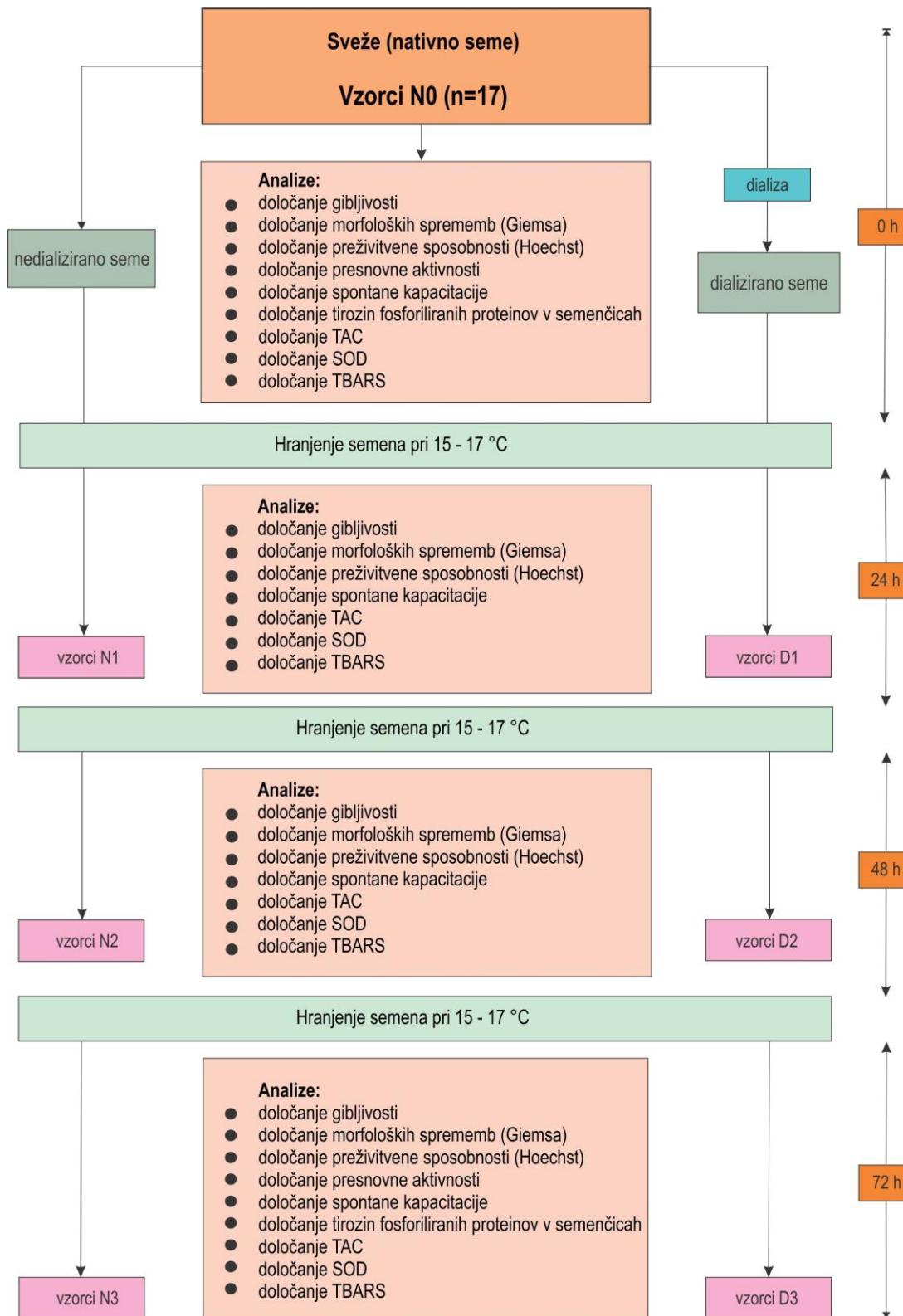
Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2014. Doktorska disertacija

D1 – dializiran vzorec, analiziran po 24 urah hranjenja,

D2 – dializiran vzorec, analiziran po 48 urah hranjenja,

D3 – dializiran vzorec analiziran po 72 urah hranjenja.

Slika 8 prikazuje potek analiz v določenih časovnih intervalih.



Slika 8: Shematski prikaz prvega dela raziskave
Figure 8: Schematic diagram of the first part of the research

3.1.3 OPTIMIZACIJA DODATKA ANTIOKSIDANTOV

Za optimizacijo dodatka antioksidantov nativnemu merjaščevemu semenu smo uporabili 8 vzorcev semena od petih naključno izbranih merjascev s farme Ptuj (1 x "landrace" (slovenska deželna pasma linije 11), 2 x slovenski veliki beli prašič, 1 x Pietrian in 1 x hibridna linija 54), starih med 12 in 30 mesecev. Vzorci so bili odvzeti v jesenskih mesecih. Ejakulati so bili takoj po odvzemuh in filtraciji skozi gazo razredčeni z BTS v razmerju 1:2 (Minitübe, Nemčija). T. i. nativni vzorci so bili ohlajeni in še isti dan v hladilni posodi dostavljeni v laboratorij, kjer smo vzorce hrаниli ob konstantnem rahlem mešanju pri 15–17 °C in zgodaj zjutraj naslednji dan seme analizirali. Med transportom temperatura ni bila kontrolirana. Analize smo opravili v času 24 ur od odvzema, zato smo ta dan analiz označili kot začetni dan (dan 0).

Po opravljeni osnovni analizi semena (koncentracija, gibljivost in progresivna gibljivost) smo vsak nativni vzorec razdelili na enajst volumsko enakih delov. Desetim delom smo dodali razredčevalce BTS z različno količino antioksidantov L-cistein in/ali α -tokoferol (Sigma Chemical Company; ZDA) ter seme razredčili do končne koncentracije 100×10^6 semenčic/ml. α -tokoferol smo dodali do njegove končne koncentracije $100 \mu\text{M}$, $200 \mu\text{M}$ ali $400 \mu\text{M}$. L-cistein smo dodali do njegove končne koncentracije $2,5 \text{ mM}$, 5 mM ali 10 mM . Vzorci s kombinacijo obeh antioksidantov so vsebovali:

- $2,5 \text{ mM}$ L-cisteina in $100 \mu\text{M}$ α -tokoferola,
- $2,5 \text{ mM}$ L-cisteina in $200 \mu\text{M}$ α -tokoferola,
- 5 mM L-cisteina in $100 \mu\text{M}$ α -tokoferola,
- 5 mM L-cisteina in $200 \mu\text{M}$ α -tokoferola.

Zadnji, enajsti del nativnega vzorca je služil za kontrolo in smo mu dodali le BTS razredčevalce do končne koncentracije 100×10^6 semenčic/ml. Vzorce semena smo nato hrаниli 3 dni ob konstantnem rahlem mešanju pri 15–17 °C. Po 72 urah hrjanjenja smo določili skupno gibljivost, progresivno gibljivost, delež morfoloških napak ter delež kapacitiranih semenčic in semenčic z akrosomsko reakcijo.

3.1.4 UGOTAVLJANJE LASTNOSTI KRATKOTRAJNO HRANJENEGA SEMENA PO DIALIZI IN DODATKU ANTIOKSIDANTA

V tem delu raziskave smo pridobili 20 vzorcev semena osmih naključno izbranih merjascev s farme Ptuj (2 x "landrace" slovenska deželna pasma linije 11, 1 x "landrace" slovenska deželna pasma linije 55, 2 x slovenski veliki beli prašič, 2 x Pietrian in 1 x hibridna linija 54) starih med 12 in 30 mesecev. Vzorci so bili odvzeti v jesenko-zimskih mesecih, z izjemo dveh vzorcev, ki smo jih pridobili zgodaj spomlad. Ejakulati so bili takoj po odvzemuhfiltraciji skozi gazo delno razredčeni z BTS (Minitübe, Nemčija). T. i. nativni vzorci so bili ohlajeni in še isti dan v hladilni posodi dostavljeni v laboratorij, kjer smo vzorce hrаниli ob konstantnem rahlem mešanju pri 15–17 °C in zgodaj zjutraj naslednji dan seme analizirali. Med transportom temperatura ni bila kontrolirana. Analize smo opravili v času 24 ur od odvzema, zato smo ta dan analiz označili kot začetni dan (dan 0).

Po opravljeni osnovni analizi semena (koncentracija, gibljivost in progresivna gibljivost) smo vsak vzorec razdelili na dva volumsko enaka dela. Polovico (45 ml) nativnega vzorca smo dializirali (D), drugi del vzorca pa pustili nedializiran (N). Vzorce tako dializiranega kot nedializiranega semena smo ponovno razdelili na dva volumsko enaka dela. En del je služil za kontrolo in smo mu dodali le BTS, drugemu delu nedializiranega in dializiranega vzorca pa smo dodali razredčevalec BTS z dodatkom antioksidanta α -tokoferola (Sigma Chemical Company, ZDA) v njegovi končni koncentraciji 200 μ M, ki smo jo v postopku optimizacije določili za optimalno. Končna koncentracija semenčic v vseh vzorcih je bila 100×10^6 semenčic/ml. Seme smo do konca trajanja poskusa ob konstantnem rahlem mešanju hraniли при 15–17 °C. Iz vsakega nativnega vzorca semena smo tako pridobili 6 različnih vzorcev, in sicer:

N0 – nedializiran vzorec, analiziran na dan nič,

D0 – dializiran vzorec, analiziran na dan nič,

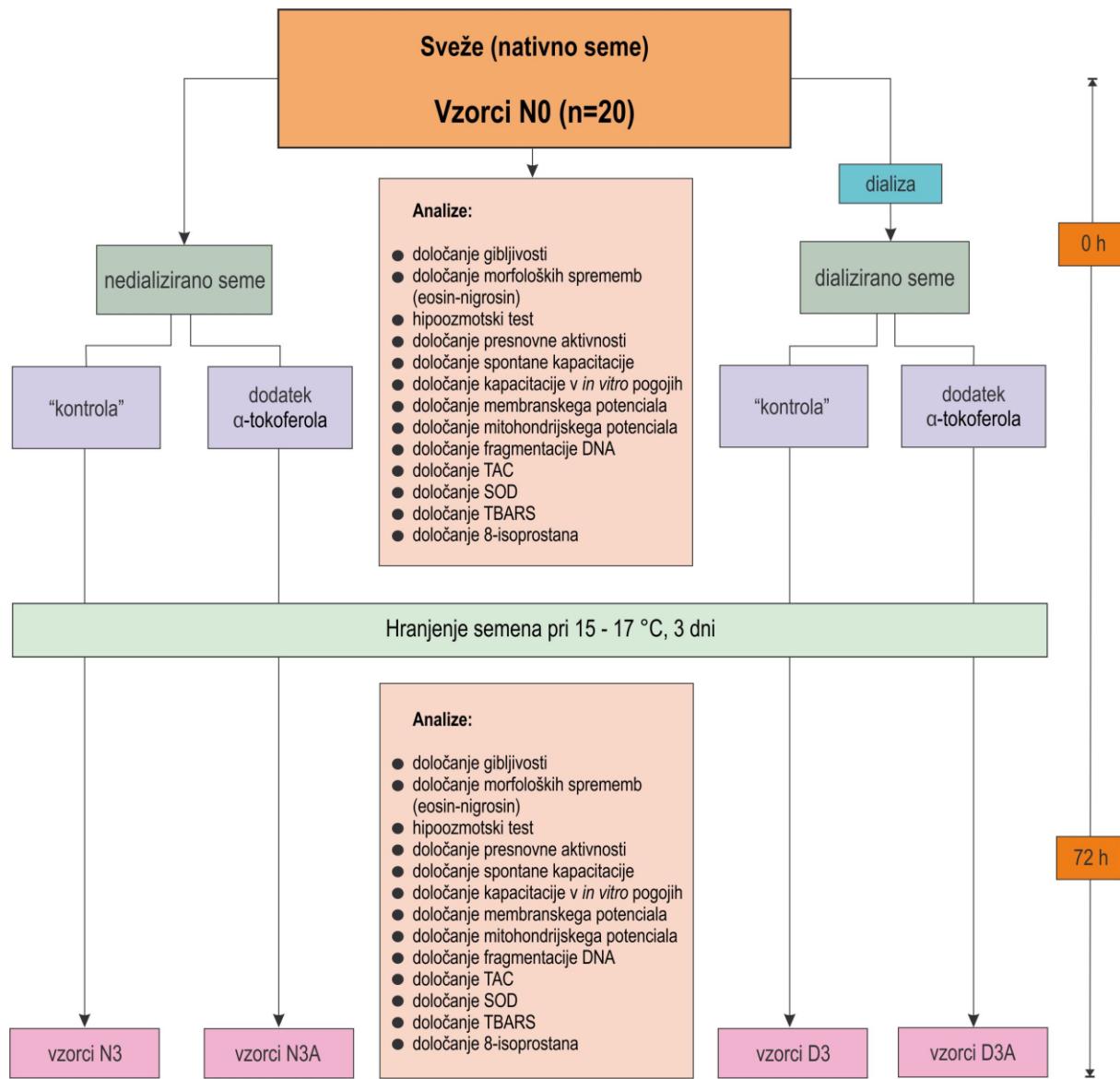
N3 – nedializiran vzorec, analiziran po 72 urah hranjenja,

N3A – nedializiran vzorec z dodatkom α -tokoferola, analiziran po 72 urah hranjenja,

D3 – dializiran vzorec, analiziran po 72 urah hranjenja,

D3A – dializiran vzorec z dodatkom α -tokoferola, analiziran po 72 urah hranjenja.

Slika 9 prikazuje potek preiskav in način hranjenja semena.



Slika 9: Shematski prikaz drugega dela raziskave
Figure 9: Schematic diagram of the second part of the research

3.1.5 UGOTAVLJANJE POTENCIALNIH DIAGNOSTIČNIH POKAZATELJEV KAKOVOSTI KRATKOTRAJNO HRANJENEGA SEMENA

Za ugotavljanje potencialnih diagnostičnih pokazateljev kakovosti kratkotrajno hrانjenega semena smo uporabili vzorce iz poglavja 3.1.2.

Z namenom ugotavljanja kakovosti semena po 72 urah hranjenja s pomočjo oksidativnega parametra na dan odvzema semena smo izračunali korelacije med parametri oksidativnega stresa na dan odvzema semena in ostalimi semenskimi parametri po 72 urah hranjenja. Izračunali smo tudi korelacije med oksidativnimi parametri in ostalimi semenskimi parametri po 72 urah hranjenja semena z namenom ugotavljanja lastnosti semena s pomočjo izmerjenega oksidativnega parametra po 72 urah hranjenja. V primeru korelacij med pokazatelji oksidativnega stresa in lastnostmi semena po hranjenju smo pokazatelje oksidativnega stresa tudi diagnostično ovrednotili.

3.2 METODE ZA UGOTAVLJANJE LASTNOSTI SEMENA

3.2.1 DOLOČANJE KONCENTRACIJE SEMENČIC

Koncentracijo semenčic smo določali fotometrično (Photometer SDM 5, Minitübe, Nemčija). V kiveto smo odpipetirali 3,5 ml fiziološke raztopine in 70 µl nativnega vzorca (redčenega 1:2 BTS). Kiveto smo pokrili s parafilmom in 3-krat premešali, koncentracijo smo izmerili trikrat zapored. Ponovljivost meritev v testu smo določali na osnovi meritev 6 paralelk pri 5 različnih vzorcih. Zaradi visokih koncentracij izmerjenih spektrofotometrično smo naknadno v poskusu koncentracijo 6 ejakulatov in vzorcev redčenih 1:2 v BTS primerjali še s štetjem z Neubauerjevo kamrico. Rezultati so predstavljeni v prilogi 1.

3.2.2 DOLOČANJE GIBLJIVOSTI SEMENČIC

Vzorce semena smo inkubirali 5 minut pri 37 °C. Vsakemu vzorcu smo v paralelkah določili gibljivost semena z računalniško analizo s spermoanalizatorjem Hamilton Thorne Ivos. Uporabili smo računalniški program Hamilton Thorne Research 3, Ivos SN 9745/09746/v12.3H in nastavitev, značilne za merjaščovo seme (meja za minimalno

velikost glave = 10 piksov; spodnja meja praga premočrtnosti analizirane poti = 80 %; minimalna hitrost gibljivih semenčic = 45 µm/s; spodnja meja hitrosti za počasi gibljive semenčice = 15 µm/s; spodnja meja hitrosti za srednje gibljive semenčice = 25 µm/s; upoštevanje počasi gibljivih semenčic za gibljive = NE; premer mirujoče glave semenčic = 0,65–4,90; intenziteta mirujoče glave semenčic = 0,50–2,50; povečava = 1,89; izvor slike = kamera; osvetlitev = 2180; temperatura mizice = 37 °C; tip kamrice = Makler)

Ponovljivost meritev v testu smo določali na osnovi meritev 6 paralelk pri 5 različnih vzorcih.

Vrednotenje:

Gibljivost semenčic smo določili v odstotkih, in sicer v treh kategorijah:

- delež negibljivih semenčic,
- delež moteno gibljivih semenčic,
- delež progresivno gibljivih semenčic.

3.2.3 DOLOČANJE MORFOLOŠKO SPREMENJENIH SEMENČIC

3.2.3.1 BARVANJE Z BARVILOM GIEMSA

Barvilo Giemsa nam omogoča določanje morfoloških sprememb predvsem na področju akrosoma, glave in veznega dela, saj dobro prehaja celično membrano in se v semenčicah zadržuje predvsem na področju glave in veznega dela (Aksoy in sod., 2012). Semenčice smo pobarvali po predhodno opisanem protokolu (Kovács in Foote, 1992) in pod svetlobnim mikroskopom pod 1000-kratno povečavo v paralelkah prešteli 200 semenčic.

Ponovljivost meritev v testu smo določali na osnovi 4 meritev pri 4 različnih vzorcih.

Vrednotenje

Določili smo:

- delež morfološko normalnih semenčic,

- delež semenčic z napakami na akrosomu,
- delež semenčic z napakami na glavi,
- delež semenčic z napakami na vratu,
- delež semenčic z napakami na veznem delu,
- delež semenčic s protoplazmatskimi kapljicami,
- delež semenčic z napakami na repu.

Slika 10 prikazuje semenčice, obarvane z barvilom Giemsa.



Slika 10: Semenčice obarvane z barvilom Giemsa
Figure 10: Spermatozoa stained with the Giemsa stain

Legenda: A: akrosom v odlepljanju; B: morfološko normalna semenčica
Legend: A: acrosom starting to detach; B: morphological normal spermatozoa

3.2.3.2 BARVANJE Z BARVILOM EOSIN - NIGROSIN

Barvilo eosin-nigrosin temno obarva ozadje, semenčice pa ostanejo svetlejše. Zaradi kontrasta, ki nastane pri tem barvili, je mogoče dobro preproznavati morfološke

ZAKOŠEK PIPAN M. Vpliv odstranitve nizkomolekulskih ... na oksidativni status in lastnosti ... semena ...

Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2014. Doktorska disertacija

spremembe na semenčicah (Björndahl in sod., 2003). Semenčice smo pobarvali tako, da smo 10 µl vzorca dodali 10 µl barvila eosin-nigrosin (Morphology stain, Society for Theriogenology) in pod svetlobnim mikroskopom pod 1000-kratno povečavo v paralelkah prešteli 200 semenčic. Ponovljivost meritev v testu smo določali na osnovi 4 meritev pri 4 različnih vzorcih. Vrednotenje je potekalo na enak način kot pri določanju morfoloških napak s pomočjo barvila Giemsa.

Slike 11 in 12 prikazujeta semenčice, obarvane z barvilm eosin-nigrosin. Na sliki 11 je vidna proksimalna protoplazmatska kapljica, na sliki 12 pa distalna protoplazmatska kapljica in zavit rep.

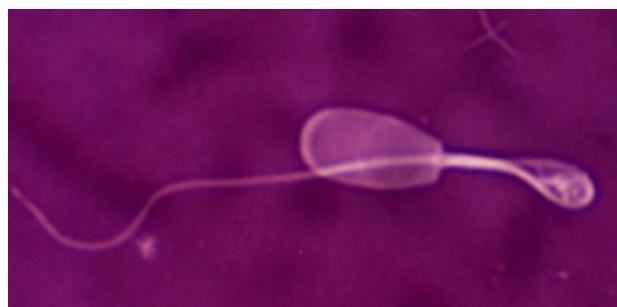


Slika 11: Semenčici, obarvani z barvilm eosin-nigrosin

Figure 11: Spermatozoa stained with eosin-nigrosin stain

Legenda: Puščica kaže proksimalno protoplazmatsko kapljico.

Legend: Arrow is pointing on a proximal protoplasmic droplet.



Slika 12: Semenčica z distalno protoplazmatsko kapljico in zavitim repom

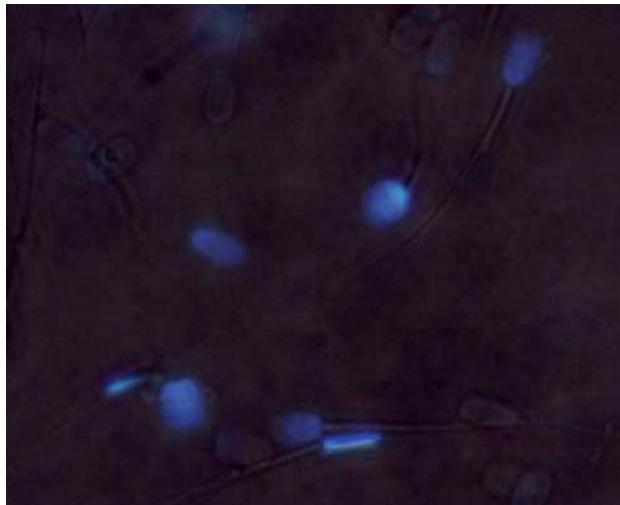
Figure 12: Spermatozoon with distal protoplasmic droplet and bent tail

3.2.4 DOLOČANJE PREŽIVITVENE SPOSOBNOSTI

Barvilo Hoechst 33258 prehaja celično membrano mrtvih semenčic in se veže na adenintimin predele na DNK, zaradi česar se glave mrtvih semenčic obarvajo modro (slika 13) (Gundersen in Shapiro, 1984). Ponovljivost meritev v testu smo določali na osnovi 6 meritev pri 4 različnih vzorcih.

Postopek barvanja in vrednotenje

1. 0,5 ml BTS smo ogreli na sobno temperaturo in dodali 0,5 ml vzorca.
2. V vdolbinico mikrotitrsko ploščice (Golias) smo odpipetirali 100 µl vzorca semena.
3. Dodali smo 5 µl delovne raztopine barvila bis-benzimidina (Hoechst 33258).
4. Inkubirali smo 15 min pri 39 °C in 5 % CO₂ v temi.
5. 5 µl tako pripravljene reakcijske zmesi smo kanili v Maklerjevo kamrico.
6. Deleža mrtvih in živih semenčic smo določili s pomočjo računalniške analize (Hamilton Thorne Research IVOS _Ident), pri kateri smo sprva pod svetlobnim objektivom (modra svetloba) opravili osnovno analizo gibljivosti semena, nato pa ročno prestavili na UV objektiv, kjer smo opravili fluorescenčno preiskavo, s katero smo določili delež mrtvih semenčic.
7. Vsak vzorec smo analizirali v paralelkah.



Slika 13: Semenčice obarvane z bis-benzimidinom (Hoechst 33258)

Figure 13: Spermatozoa stained with bis-benzimidine (Hoechst 33258)

Legenda: Mrtve semenčice modro fluorescirajo.

Legend: Dead spermatozoa show blue fluorescence.

3.2.5 DOLOČANJE INTEGRITETE MEMBRANE SEMENČIC – HIPOOZMOTSKI TEST

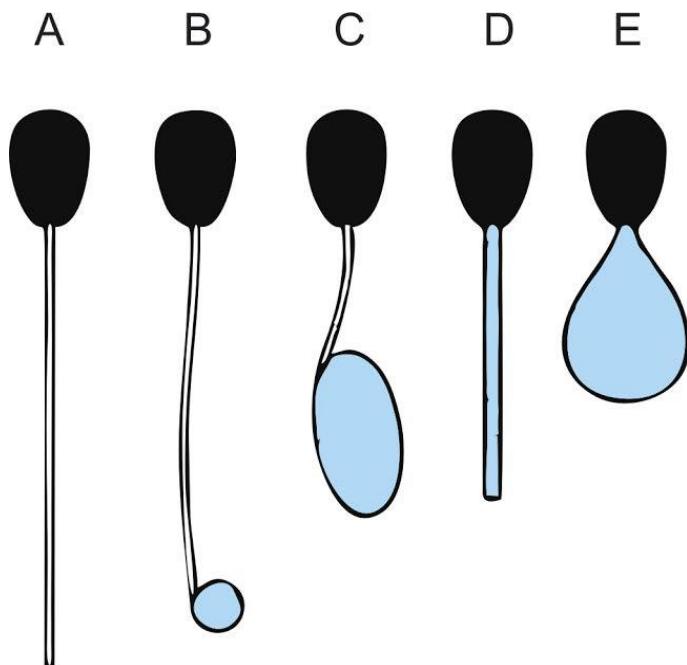
S pomočjo hipoozmotskega testa (HOST) ocenujemo integriteto membrane semenčic. Hipoozmotska raztopina povzroči nabrekanje strukturno in funkcionalno nepoškodovanega repa semenčice (Begona in sod., 2003). Ponovljivost meritev v testu smo določali na osnovi 3 paralelk pri 6 različnih vzorcih.

Postopek:

1. 90 µl hipoozmotske raztopine (sestava: Na citrat x 2H₂O, fruktoza, destilirana H₂O; 150 mOsm/kg), ogrete na sobno temperaturo, smo dodali 10 µl vzorca in eno uro inkubirali v vodni kopeli (GFL 1003, Nemčija) pri 37 °C.
2. Pod svetlobnim mikroskopom (400 x povečave) smo preiskali 200 semenčic.

Vrednotenje:

Za rezultat smo podali povprečja dveh paralelnih vzorcev. Semenčice smo glede na način nabrekanja repov razdelili v pet skupin (podtipov), prikazanih na sliki 14.



Slika 14: Shematski prikaz različnih morfoloških podtipov repov semenčic po izpostavitvi semenčic hipoozmotski raztopini

Figure 14: Schematic representation of different subtypes of spermatozoa tail after incubation in hypoosmotic solution

Legenda: Področje nabrekanja je prikazano z modro barvo (Hishinuma in Sekine, 2003).

A: nenabrekel rep (mrtva semenčica)

B: nabrekla konica repa

C: nabrekla spodnja polovica repa

D: nabrekel rep po celi dolžini

E: močno nabrekel rep po celotni dolžini (vrečast rep)

Legend: Swelling is indicated by the blue region (Hishinuma in Sekine, 2003).

A: no swelling on the tail region (dead spermatozoa)

B: swollen at the tip

C: swelling of the distal half

D: swollen at the entire lenght

E: thick swelling at the entire lenght (sacculated tail)

3.2.6 DOLOČANJE PRESNOVNE AKTIVNOSTI SEMENČIC

Za ugotavljanje presnovne aktivnosti semenčic smo uporabili redukcijski test z resazurinom (Zrimšek in sod., 2004), ki smo ga izvedli v paralelkah. Test temelji na sposobnosti presnovno aktivnih semenčic, da reducirajo barvilo resazurin v resorufin (Reddy Venkata Rami in Bordekar, 1999). Maksimalno absorbanco resazurina izmerimo pri valovni dolžini 610 nm. Ponovljivost v testu smo določili na osnovi treh meritev pri 6 različnih vzorcih.

Vrednotenje:

1. N-butanol nam je služil kot slepi vzorec pri merjenju absorbanc.
2. Za rezultat smo podali povprečja absorbanc dveh paralelnih vzorcev, izmerjenih pri valovni dolžini 610 nm (Smartspec 3000, BioRad).

3.2.7 DOLOČANJE SPONTANE KAPACITACIJE SEMENČIC IN AKROSOMSKE REAKCIJE

Za ugotavljanje kapacitacijskega statusa semenčic smo semenčice obarvali z barvilm kloracetilklinom (CTC), ki omogoča ločevanje nekapacitiranih, kapacitiranih semenčic in semenčic z akrosomsko reakcijo (Vadnais in sod., 2005).

Uporabljene raztopine:

Pufer A:

- 7,5972 g NaCl
- 2,4228 g Tris
- dodatek vode do 1000 ml in uravnavanje pH na 7,8

Raztopina CTC:

- 0,0414 g CTC
- 0,0608 g cisteina

- dopolnitev s pufrom A do 100 ml.

12,5-odstotni glutaraldehid:

- 500 µl 25-odstotnega glutaraldehyda
- 500 µl 1 M Tris-HCl
- uravnavanje pH na 7,8

0,22 M 1,4-diazabiciklo (2.2.2) oktan (DABCO):

- 0,6170 g DABCO
- 2,25 ml H₂O
- 0,25 ml PBS (fosfatni pufer) (10 x koncentriran, Sigma-Aldrich, Anglija)
- 22,5 ml glicerola

Postopek:

1. V ogrete (37 °C) eendorfke smo kanili 12,5 µl raztopine CTC in 25 µl vzorca semena.
2. Vse skupaj smo dobro premešali na mešalniku (Vibromix 114, Slovenija).
3. Po 10 sekundah smo dodali 0,5 µl 12,5-odstotnega glutaraldehyda in ponovno premešali.
4. Dodali smo 10 µl raztopine DABCO (Sigma-Aldrich, Anglija) (preprečuje bledenje fluorescence).
5. Na objektno stekelce smo kanili 3 µl pripravljene reakcijske zmesi in pokrili s pokrovnim stekelcem.
6. S pritiskom na pokrovno stekelce smo odstranili odvečno tekočino in pokrovno stekelce s prozornim lakom zlepili na predmetno steklo.
7. Pripravljene preparate smo hranili v črni škatli v hladilniku pri 4 °C.

8. Mikroskopsko analizo pripravljenih preparatov smo opravili v 12 urah od priprave vzorcev z uporabo fluorescenčnega mikroskopa (Olympus BX40 s fluorescenčnim filtrom U-MWBV2; eksitacijski filter: 400–440 nm in emisijski filter: 475 nm, dikromatsko zrcalo).

9. Za rezultat smo podali povprečja dveh paralelnih vzorcev. Ponovljivost v testu smo določili na osnovi 3 paralelk pri 6 različnih vzorcih.

Vrednotenje:

Pregledali smo 200 semenčic na preparat. Stopnjo kapacitiranosti semenčic smo ovrednotili glede na način fluorescence (slika 15):

- nekapacitirane semenčice (celotna glava semenčice fluorescira, zadnji segment medlo fluorescira, opazen je lahko temen pas v ekvatorialni regiji);
- kapacitirane semenčice (glava semenčice fluorescira, nefluorescirajoč pas v postakrosomalni regiji);
- semenčice z akrosomsko reakcijo (opazna je nizka fluorescence v celotni glavi s pasom žareče fluorescence v ekvatorialnem segmentu).



Slika 15: Semenčice obarvane s CTC
Figure 15: Spermatozoa stained with CTC

Legenda: A: nekapacitirana semenčica; B: kapacitirana semenčica; C: semenčica z akrosomsko reakcijo

Legend: A: non-capacitated spermatozoon; B: capacitated spermatozoon; C: acrosome reacted spermatozoon

3.2.8 DOLOČANJE KAPACITACIJSKE SPOSOBNOSTI SEMENČIC V IN VITRO POGOJIH

Za ugotavljanje kapacitacijske sposobnosti semenčic v *in vitro* pogojih smo vzorce izpostavili mediju za kapacitacijo, ki je vseboval ionofor kalcimicin (Hossain in sod., 2011). Ponovljivost v testu smo določili na osnovi 3 paralelk pri 6 različnih vzorcih.

Postopek in vrednotenje:

1. Za osnovni medij smo uporabili BTS (Minitübe, Nemčija).
2. 10 ml BTS-a smo dodali 31,5 µl 2,25 mM kalcijevega klorida in 60 µl 1,67 mM ionofora kalcimicina A23187 (Sigma, ZDA).
3. 500 µl zgoraj pripravljene raztopine smo dodali 0,5 µl vzorca in inkubirali 30 minut pri 38,5 °C in 0,5-odstoten CO₂.
4. Sledilo je barvanje s CTC po metodi, opisani pod točko 3.2.7 za določanje kapacitacijske sposobnosti semenčic.
5. Vrednotenje stopnje kapacitacije je potekalo na način opisan pod točko 3.2.7.
6. Za rezultat smo podali povprečja dveh paralelnih vzorcev.

3.2.9 LOKALIZACIJA TIROZIN FOSFORILIRANIH PROTEINOV NA SEMENČICAH

Za lokalizacijo tirozin fosforiliranih proteinov smo uporabili predhodno opisano metodo (Tardif in sod., 2001), s katero določamo t. i. pravo kapacitacijo. V procesu kapacitacije se namreč fosforilirajo tirozinski proteini (Green in Watson, 2001).

Priprava semenčic za določanje tirozin fosforiliranih proteinov:

1. 1ml vzorca (s koncentracijo od 1 do 5 milijonov semenčic/ml) smo dodali 10 µl 2 M Na-ortovanadata (končna koncentracija 0,2 mM).
2. Suspenzijo smo centrifugirali 3 minute (13000 x g, sobna temperatura), nato pa zavrgli supernatant.

3. Peletu semenčic smo dodali 1 ml pufra za redčenje vzorcev brez β -merkaptoetanola in segrevali na vreli vodni kopeli (95°C) 3 minute.
4. Suspenzijo smo ponovno centrifugirali 3 minute ($13000 \times g$, sobna temperatura).
5. Odpipetirali smo $900 \mu\text{l}$ supernatanta in dodali $47,3 \mu\text{l}$ β -merkaptoetanola (5-odstotnega).
6. Pripravljene vzorce smo zamrznili v alikvotih pri -80°C do nadaljnje analize.

SDS-PAGE:***Uporabljene raztopine:*****1,5 M Tris-HCl pufer pH 8,8:**

- 27,23 g tris-(hidroksimetil)-aminometana (Tris)
- 2 x destilirana H_2O do 80 ml
- 6 M HCl za uravnavanje pH na 8,8

Raztopino smo hranili v hladilniku največ 4 tedne.

Koncentrirana raztopina SDS:

- 3,0 g natrijevega dodecilsulfata (SDS)
- 30 ml 2 x destilirane H_2O

Raztopino smo hranili pri sobni temperaturi v digestoriju največ 4 tedne.

10-odstoten amonijev persulfat (APS):

- 0,020 g amonijevega persulfata
- 180 μl 2 x destilirane H_2O

Raztopino smo pripravili vsak dan svežo.

0,5 M Tris-HCl pufer pH 6,8:

- 6,0 g Tris
- 60 ml 2 x destilirane H_2O
- uravnavanje pH s 6 M HCl na 6,8
- 2 x destilirana H_2O do 100 ml
- ponovno uravnavanje pH na 6,8

Raztopino smo hranili v hladilniku pri 4°C največ 4 tedne.

0,01 M PBS pufer pH 7,2:

- 1,34 g Na₂HPO₄ x 2 H₂O
- 0,39 g KH₂PO₄ x 2 H₂O
- 8,77 g NaCl
- 2 x destilirana H₂O do 1000 ml

Raztopino smo hranili v hladilniku pri 4 °C največ 4 tedne.

Pufer za redčenje vzorcev:

- 4,8 ml 2 x destilirane H₂O
- 1,2 ml 0,5 M Tris-HCl pH 6,8
- 1,0 ml glicerina
- 2,0 ml 10-odstoten SDS
- 0,5 ml 0,1-odstoten bromfenolmodro

Raztopino smo hranili pri sobni temperaturi največ 4 tedne.

Redukcijska raztopina za redčenje vzorcev:

- 25 µl β-merkaptoetanola
- 475 µl raztopine za redčenje vzorcev

Raztopino smo pripravili vsak dan svežo.

Elektrodni pufer pH 8,3:

- 9,0 g Tris
- 43,2 g glicina
- 3,0 g SDS
- 2 x destilirane H₂O do 600 ml

Raztopino smo hranili v hladilniku pri 4 °C največ 4 tedne.

Priprava proteinskega standarda

1. V digestoriju smo v ependorfko odpipetirali 5 µl SDS-PAGE standarda (BioRad) oziroma 5 µl vzorca.

2. Standardom smo dodali 95 µl redukcijske raztopine za redčenje vzorcev in jih v vreli vodni kopeli inkubirali 5 minut, nato ohladili in zmešali na rotamiksu.
3. Standard smo zamrznili v alikvotih po 30 µl pri – 20 °C. Za vsako analizo smo uporabili nov alikvit zamrznjenega standarda.

Priprava separacijskega poliakrilamidnega gela

1. V erlenmajerico smo odpipetirali
 - 4,5 ml destilirane H₂O
 - 2,50 ml 1,5 M Tris-HCl pufra
 - 100 µl 10-odstotne raztopine SDS
 - 4 ml 30-odstotnega akrilamida
2. Mešanico smo degazirali 5 minut v ultrazvočni kopeli (Pio-Sonis, Iskra, Slovenija).
3. Če se je raztopina v erlenmajerici med degaziranjem segrela, smo pred dodajanjem 50 µl 10-odstotnega APS in 5 µl N, N, N' N'-tetrametilendiamina (TEMED) raztopino ohladili.

Priprava koncentracijskega gela

1. V erlenmajerico smo odpipetirali:
 - 3,18 ml 2 x destilirane H₂O
 - 1,26 ml 0,5 M Tris-HCl pufra
 - 50 µl 10-odstoten NaDS
 - 666 µl 30-odstotnega akrilamida
2. Raztopino smo rahlo premešali in 5 minut degazirali v ultrazvočni kopeli.
3. Če se je gel v erlenmajerici med degaziranjem segrel, smo ga pred dodajanjem 25 µl 10-odstotnega APS in 5 µl TEMED-a ohladili.

Postopek elektroforeze:

1. Po končani polimerizaciji separacijskega gela (vsaj 45 minut) smo koncentracijski gel pustili polimerizirati 30 minut.
2. Za elektroforezo smo uporabili Tris-HCl pufrski sistem, pH 8,3 (pripravili smo ga z redčenjem koncentriranega elektroforeznega pufra v razmerju 1 : 5).

ZAKOŠEK PIPAN M. Vpliv odstranitve nizkomolekulskih ... na oksidativni status in lastnosti ... semena ...

Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2014. Doktorska disertacija

3. V žepke smo nanesli 5 µl vzorca ali standarda in proteine ločili z elektroforezo pri konstantni napetosti 200 V. Elektroforeza je potekala 45 minut.

Prenos proteinov z gela na membrano:

Priprava raztopin:

Pufer za prenos proteinov:

- 3,03 g tris hidroksimetil aminometana
- 14,4 g glicina
- 200 ml metanola
- do 1000 ml 2 x destilirane H₂O

Raztopina za barvanje standarda:

- 200 ml metanola
- 50 ml ocetne kisline
- 250 ml 2 x destilirane H₂O
- 500 mg Coomassie Brilliant Blue (BioRad)

Raztopina za razbarvanje ozadja:

- 400 ml metanola
- 100 ml ocetne kisline
- 500 ml 2 x destilirane H₂O

Postopek prenosa:

1. Membrane (BioRad) smo pred uporabo 5 minut inkubirali v sveže pripravljenem in na 4 °C ohlajenem pufru za prenos proteinov.
2. Po končani elektroforezi smo gele sprali z 2 x destilirano H₂O in nato s pufrom za prenos proteinov.
3. Gel smo rahlo omočili in nanj prenesli membrano ter v ustreznem ogrodju vstavili v elektroforezno celico, celico pa v kadičko, v katero smo postavili tudi rezervoarček z ledom in teflonsko mešalo.
4. Celico smo do vrha napolnili s pufrom za prenos proteinov.

5. Elektroforetski prenos je potekal 45 minut pri konstantni napetosti 100 V ob stalnem mešanju.
6. Po elektroforetskem prenosu smo del membrane s standardom odrezali in jih 30 minut barvali na stresalniku s Coomassie Brilliant Blue barvilom.
7. Ozadje smo razbarvali s spiranjem v pufru za razbarvanje ozadja.

Barvanje membran po prenosu proteinov z gela:

Uporabljene raztopine:

Pufer TBS:

- 25 mM Tris – HCl
- 150 mM NaCl
- uravnava pH s HCl na pH 7,4.

Pufer TTBS:

- 0,5-odstoten Tween₂₀ v TBS

Pufer za blokiranje nezasedenih mest na membrani:

- 2-odstoten Tween₂₀ v TBS

Pufer za barvanje membrane (0,05 M acetatni pufer pH 5,0):

- A: 3,40 g trinatrijevega acetata smo stopili v 500 ml 2 x destilirane H₂O
- B: 1,43 ml ocetne kisline smo dodali 2 x destilirano H₂O do 500 ml
- A-ju smo dodali B za uravnavo pH na pH 5,0

Raztopina 3-amino-9-etilkarbazol (AEC):

V epruveto smo zatehtali 50 mg AEC in dodali 7,14 ml dimetilformamida in dobro premešali na mešalniku (Vibromix 114, Slovenija).

AEC substrat:

- 2,5 ml raztopine AEC
- 47,5 ml 0,05M acetatnega pufra pH 5,0
- 25 µl H₂O₂

Postopek barvanja:

1. Membrane smo spirali v pufru za blokiranje nezasedenih mest na membrani (50 ml 2-odstotnega Tweena₂₀ v TBS) in jih tako pustili čez noč v hladilniku in na stresalniku.
2. Naslednji dan smo membrane trikrat sprali v 50 ml TTBS pufra (5 minut, sobna temperatura, stresalnik).
3. Za vezavo protiteles smo membrane inkubirali v raztopini specifičnih antitirozinskih protiteles klena 4G10 (Millipore) v razmerju 1 : 5000 v TTBS (60 minut, sobna temperatura).
4. Membrano smo sprali v 50 ml TTBS pufra (trikrat po 5 minut, sobna temperatura, stresalnik).
5. Dodali smo sveže pripravljen konjugat (mišji IgG proti kozjim IgG, konjugirani s peroksidazo v razmerju 1 : 5000 v TTBS; Sigma) in inkubirali eno uro pri sobni temperaturi.
6. Membrano smo sprali v 50 ml TTBS pufra (trikrat po 5 minut, sobna temperatura, stresalnik).
7. Komplekse protein–protitelo smo določali z inkubacijo v 50 ml substrata AEC do pojava rdečih lis, nato pa razvijanje prekinili s prenosom membrane v destilirano vodo.
8. Membrano smo po 10 minutah posušili in obarvane komplekse protein–protitelo vrstično preslikali.

3.2.10 DOLOČANJE SPREMemb V PREPUSTNOSTI PLAZEMSKE MEMBRANE SEMENČIC

Za določanje sprememb v prepustnosti plazemske membrane semenčic s pretočno citometrijo smo uporabili barvili Yo-Pro-1 in PI (Vybrant Apoptosis Assay Kit). Kombinacija teh dveh barvil predstavlja učinkovito metodo za ugotavljanje živih, mrtvih, apoptočnih in nekrotičnih celic. Medtem ko so apoptočne celice prepustne za barvilo Yo-Pro-1 in neprepustne za barvilo PI, so nekrotične celice propustne za obe barvili, saj se barvilo PI veže na DNK (Idziorek in sod., 1995). Ponovljivost testa (ponovljivost meritev v testu) smo določili na osnovi meritev 6 paralelk pri 6 različnih vzorcih.

Izhodne raztopine:

- komponenta A: delovna raztopina barvila Yo-Pro-1
- komponenta B: delovna raztopina barvila PI

Postopek:

1. V polipropilensko epruveto smo odpipetirali 1ml vzorca semena s koncentracijo 1×10^6 semenčic/ml in 4 ml PBS (Sigma-Aldrich, Anglija) in centrifugirali pri 400 x g 30 minut.
2. Supernatant smo odstranili, peletu pa dodali 4 ml PBS in centrifugirali pri 400 x g 30 minut.
3. Supernatant smo odstranili, peletu pa dodali 1 ml PBS in vsebino rahlo premešali.
4. Dodali smo 1 μl delovne raztopine barvila Yo-Pro-1 (100 μM), rahlo premešali in inkubirali 20 minut pri sobni temperaturi.
5. Po inkubaciji smo dodali še 6 μl delovne raztopine barvila PI (1 mg/ml), rahlo premešali in epruvete z vzorci postavili na led za 20–30 minut.
6. V roku 30 minut po končani reakciji smo vzorce analizirali s pretočno citometrijo (pretočni citometer FACSCalibur, BD Bioscience, CA, ZDA). Fluorescenco smo izmerili s fluorescenčnim detektorjem FL1, ki nam omogoča izmeriti signal, ki ga oddaja barvilo Yo-Pro-1, in s fluorescenčnim detektorjem FL3, s katerim smo izmerili signal, ki ga oddaja barvilo PI. Uporabili smo počasen pretok skozi citometer 6–24 $\mu\text{l}/\text{min}$ in ovrednotili 20.000 celic.
7. Vsak vzorec smo analizirali v paralelkah.

Vrednotenje:

Vsaka semenčica je lahko pozitivna ali negativna glede na barvanje z barvilom Yo-Pro-1 (Yo-Pro-1 + ali Yo-Pro-1 -) in pozitivna ali negativna glede na barvanje z barvilom PI (PI + ali PI -).

ZAKOŠEK PIPAN M. Vpliv odstranitve nizkomolekulskih ... na oksidativni status in lastnosti ... semena ...

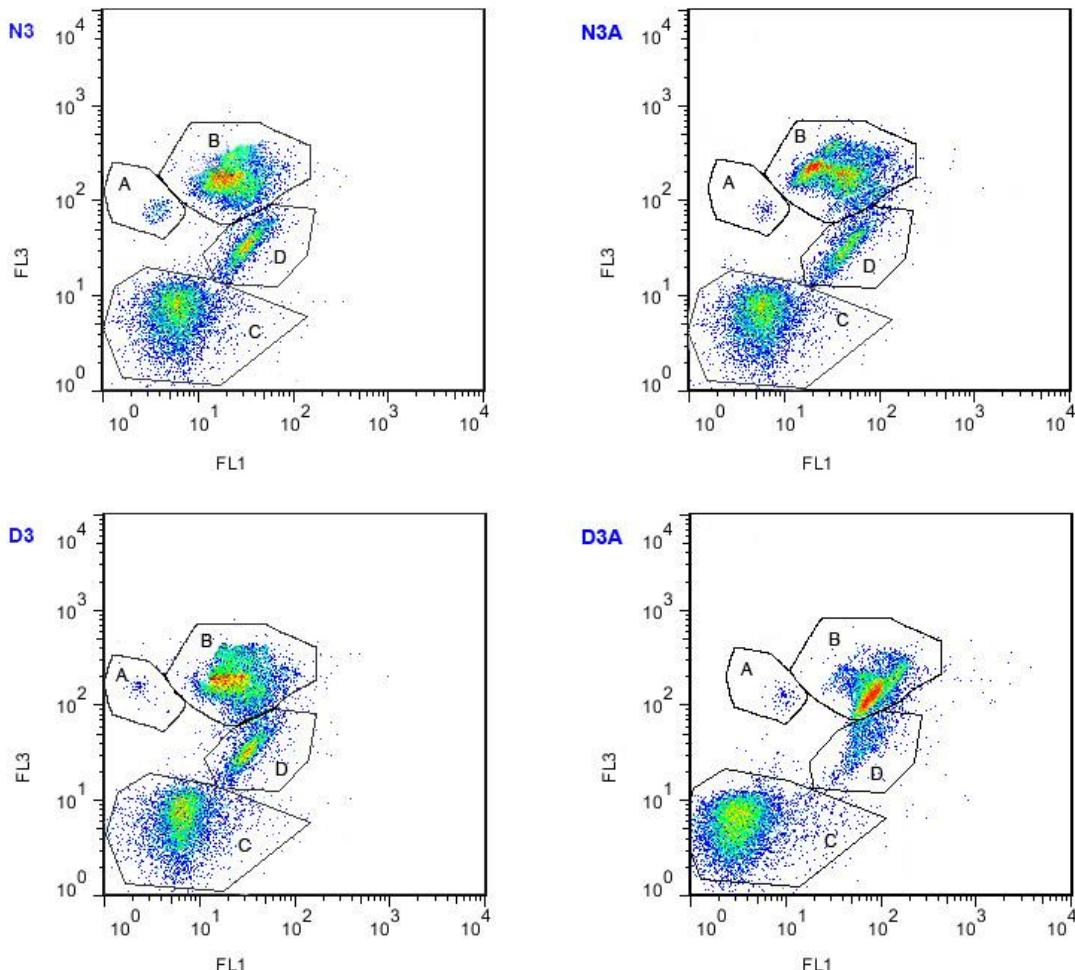
Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2014. Doktorska disertacija

Na osnovi kontrolnih vzorcev, pri kateri nismo uporabili barvanja oziroma smo izvedli enojno barvanje, smo postavili meje za zajetje štirih subpopulacij merjaščevih semenčic:

- mrtve semenčice (Yo-Pro-1 -/PI +),
- apoptotične semenčice (Yo-Pro-1 +/PI -),
- nekrotične semenčice (Yo-Pro-1 +/PI +),
- žive semenčice (Yo-Pro-1 -/PI -).

Svetlobne signale, ki jih fotodetektorji pretvorijo v električne in jih izmerimo, smo ovrednotili z računalniškim programom (Flow Jo, Ashland, ZDA) in jih prikazali matematično in v obliki točkovnih grafov. Glede na to, da smo posamezne subpopulacije semenčic zajeli po skupinah in ne po kvadrantih, smo podali tudi delež zajetih celic v vseh štirih skupinah.

Analiza membranskega potenciala semenčic s pretočnim citometrom z uporabo barvil YoPro-1 in PI je grafično prikazana na sliki 16.



Slika 16: Grafični prikaz subpopulacij semenčic v različnih skupinah kratkotrajno hrjanjenega semena, določenih s pretočnim citometrom

Figure 16: Graphic diagram of spermatozoa subpopulations in different groups of short-term stored semen as defined with flow cytometry

Legenda: FL1 – fluorescenčni detektor FL1, ki omogoča detekcijo semenčic označenih z YoPro-1; FL3 - fluorescenčni detektor FL3, ki omogoča detekcijo semenčic, označenih s PI; A – nekrotične semenčice (YoPro-1-/PI +); B – mrtve semenčice (YoPro-1 +/PI +); C – žive semenčice (YoPro-1 -/PI -); D – apoptotične semenčice (YoPro-1 +/PI -); zajetih je vsaj 85 % celic.

Legend: FL1 – fluorescence detector FL1 that detects spermatozoa stained with YoPro-1; FL3 - fluorescence detector FL3 that detects spermatozoa stained with PI; A – necrotic spermatozoa (YoPro-1-/PI +); B – dead spermatozoa (YoPro-1 +/PI +); C – live spermatozoa (YoPro-1 -/PI -); D – apoptotic spermatozoa (YoPro-1 +/PI); at least 85 % gated cells.

3.2.11 DOLOČANJE MITOHONDRIJSKEGA MEMBRANSKEGA POTENCIALA

Za ocenjevanje mitohondrijskega potenciala smo uporabili barvilo MitoTracker® Red (Invitrogen, ZDA), ki obarva notranjo membrano mitohondrija. Pri mitohondrijih z depolarizirano membrano se membrana obarva svetleje kot pri aktivnih mitohondrijih, kar omogoča prepoznavanje semenčic s porušenim mitohondrijskim potencialom (Silva in Gadella, 2006). Ponovljivost testa (ponovljivost meritev v testu) smo določili na osnovi meritev 6 paralelk pri 6 različnih vzorcih.

Uporabljene raztopine:

Liofiliziranemu MitoTracker® Red (Invitrogen) smo dodali DMSO (Sigma-Aldrich, Anglija) do končne koncentracije 1mM. Raztopino smo shranili pri – 20 °C do uporabe.

Delovna raztopina barvila:

Osnovni raztopini smo dodali PBS do končne koncentracije 500 nM.

Postopek:

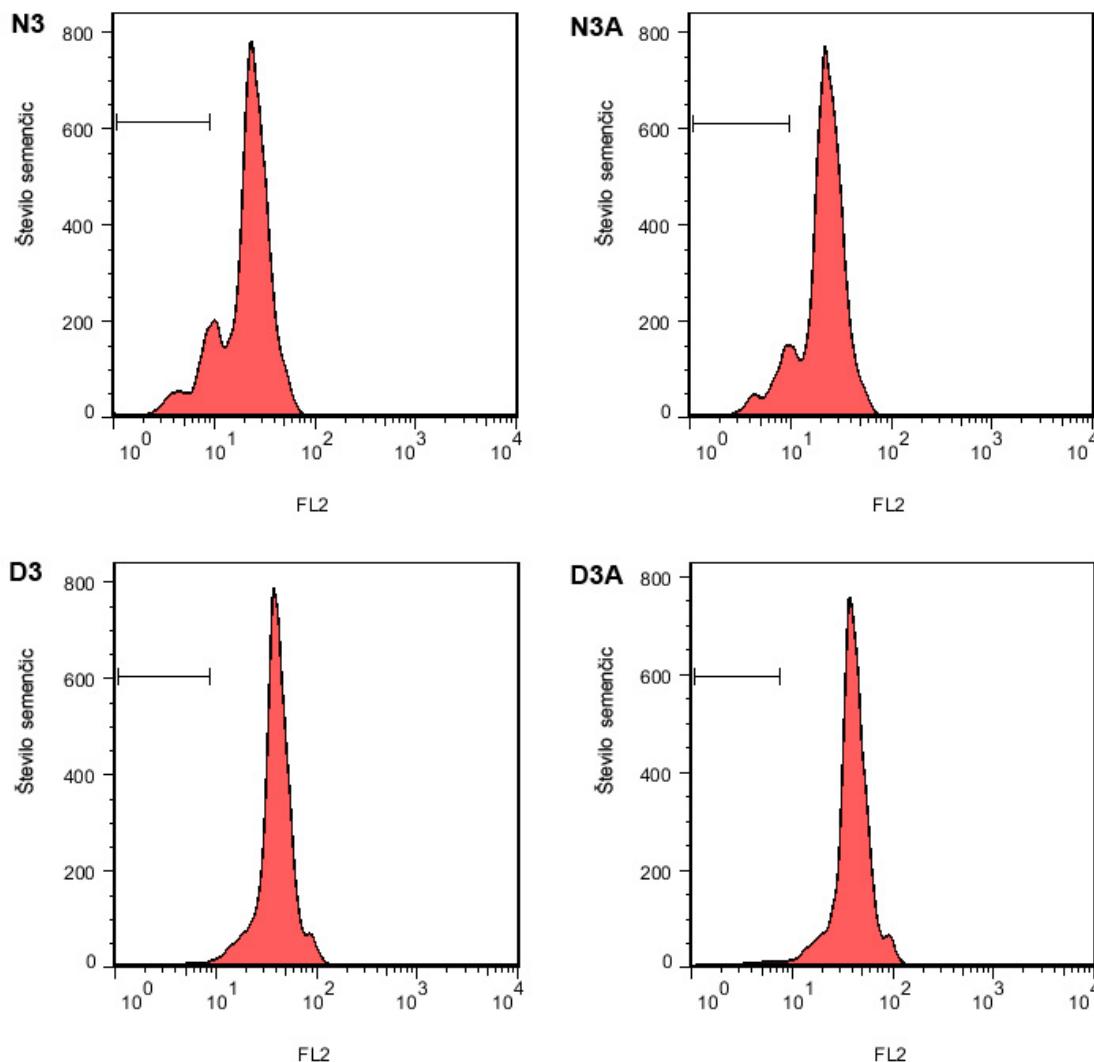
1. V polipropilensko epruveto smo odpipetirali 1 ml vzorca semena s koncentracijo 10×10^6 semenčic/ml in 4 ml fosfatnega pufra (PBS) (Sigma-Aldrich, Anglija) ter centrifugirali pri $400 \times g$ 30 minut.
2. Odstranili smo supernatant in peletu dodali 4 ml PBS ter centrifugirali pri $400 \times g$ 30 minut.
3. Supernatant smo odstranili, peletu pa dodali 1 ml PBS in vsebino rahlo premešali.
4. Dodali smo $10 \mu\text{l}$ barvila Mitotracker Red (500 nM), rahlo premešali in inkubirali 30 minut v temi pri 37°C .
5. Vsak vzorec smo analizirali v paralelkah.
6. Znotraj 30 minut po končani reakciji smo vzorce analizirali s pretočno citometrijo (pretočni citometer FACSCalibur, BD Bioscience, San Jose, CA, ZDA). Fluorescenco smo izmerili s fluorescenčnim detektorjem FL2, ki nam omogoča izmeriti signal, ki ga oddaja barvilo MitoTracker Red. Uporabili smo počasen pretok skozi citometer $6\text{--}24 \mu\text{l}/\text{min}$ in ovrednotili 20000 celic.

Vrednotenje:

Svetlobne signale, ki jih fotodetektorji pretvorijo v električne in jih izmerimo, smo ovrednotili z računalniškim programom (Flow Jo software, Ashland, ZDA). Rezultati testa so podani kot delež semenčic s porušenim mitohondrijskim potencialom.

- Kontrola: porušen mitohondrijski potencial smo določili s pomočjo inkubacije semenčic v prisotnosti 50 µM karbonil cianid *m*-klorofenil-hidrazona (CCCP).
- Semenčice z ohranjenim notranjim mitohondrijskim membranskim potencialom se močno rdeče obarvajo in oddajajo močnejši signal.
- Semenčice s porušenim notranjim mitohondrijskim membranskim potencialom so svetlo rdeče in oddajajo šibkejši signal.
- Premik vrha fluorescenčnega spektra v levo (delež celic s porušenim mitohondrijskim potencialom).

Slika 17 prikazuje fluorescenčni emisijski profil semenčic obarvanih z barvilom MitoTracker Red, v različnih skupinah hranjenega semena.



Slika 17: Grafični prikaz mitohondrijskega potenciala v različnih skupinah kratkotrajno hranjenega semena
Figure 17: Graph showing mitochondrial potential in different groups of short-term stored semen

Legenda: N3 – nedializirani vzorci po 72h; N3A – nedializirani vzorci z dodatkom antioksidanta po 72h; D3 – dializirani vzorci po 72h; D3A – dializirani vzorci z dodatkom antioksidanta po 72h; FL2 – fluorescenčni detektor, ki omogoča detekcijo semenčic, obarvanih z barvilom MitoTracker Red.

Ob porušenju mitohondrijskega potenciala se vrh na grafu premakne v levo, ker je odziv v semenčicah, barvanih z MitoTracker Red barvilm višji pri semenčicah z normalnim mitohondrijskim potencialom.

Legend: N3 – non-dialysed samples after 72h; N3A – non-dialysed samples with antioxidant after 72h; D3 – dialysed samples after 72h; D3A – dialysed samples with antioxidant after 72h; FL2 – fluorescent detector that detects spermatozoa stained with MitoTracker Red.

Reduced mitochondrial potential causes graph to shift to the left, because spermatozoa stained with MitoTracker Red have higher response in case of normal mitochondrial potential.

3.2.12 DOLOČANJE FRAGMENTACIJE DNK SEMENČIC

Fragmentacijo DNK smo po navodilih proizvajalca ugotavljali s testom SPERM SUS HALOMAX (HALOTECH DNA, Halomax® Sui, Španija), ki temelji na metodi SCD (Sperm Chromatin Dispersion).

Pri tej metodi pripravimo imerzijo intaktnih, nefiksiranih semenčic v inertnem agaroznem mikrogelu na predmetnem steklu iz kompleta. S kislo raztopino denaturiramo DNK in odstranimo večino jedrnih proteinov. Preparate fiksiramo z etanolom in jih pobarvamo s fluoresenčnim barvilom. Fragmentirano DNA določamo pod mikroskopom. Ponovljivost testa (ponovljivost meritev v testu) smo določili na osnovi meritev 3 paralelk pri 4 različnih vzorcih.

Postopek določanja fragmentacije DNA z uporabo fluorescenčnega barvila (Flourescence microscopy staining kit (green), Halotech DNA, Madrid, Španija):

1. Za vsak vzorec posebej smo pripravili raztopino za mikroskopiranje:

2 µl reagenta A (fluorescenčno barvilo) + 2 µl reagenta B (raztopina za vezavo).

2. Na označeno mesto na steklu, na katerem smo predhodno pripravili vzorce, smo kanili 3 µl pripravljeni raztopine in pokrili s pokrovnim stekelcem.

3. DNA fragmentacijo smo določali s pomočjo fluorescenčnega mikroskopa (Olympus BX40) z ustreznim filtrom (Olympus U-MNIBA3; eksitacija: 497 nm in emisija: 520 nm).

4. Vsak vzorec smo analizirali v paralelkah, v vsakem vzorcu pa prešteli 300 semenčic.

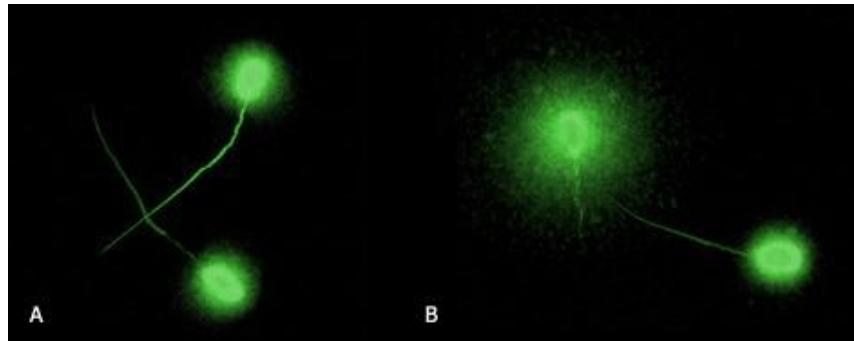
Vrednotenje:

Pri semenčicah s fragmentirano DNA smo opazili obarvane nukleotide kot DNA zanke v obliki velikega "halo" efekta, ki se je širil od centralnega jedra. Pri semenčicah brez lomov v DNA tega pojava nismo opazili; okrog jedra semenčic je bil le minimalen ali t. i. normalen halo efekt:

- velik "halo" efekt: širok pas fragmentirane DNA okrog glave semenčice (pozitvno),
- mali "halo" efekt: ozek pas fragmentirane DNA okrog glave semenčice (negativno),

- nični "halo" efekt: okrog glave semenčice ni fragmentirane DNK (negativno).

Slika 18 prikazuje semenčice z normalnim "halo" efektom in semenčico z močno fragmentirano DNK.



Slika 18: Semenčice po testu Halomax
Figure 18: Spermatozoa after Halomax test

Legenda: A – semenčice z normalnim "halo" efektom; B – semenčica z močno fragmentirano DNK
Legend: A – spermatozoa with normal "halo" effect; B – spermatozoa with intense DNA fragmentation

3.2.13 DOLOČANJE CELOKUPNE ANTIOKSIDANTNE KAPACITETE (TAC)

Celokupno antioksidantno kapaciteto (TAC) smo določali z reagenčnim kompletom TAS proizvajalca Cayman Chemical Company. Uporabili smo avtomatski biokemijski analizator RX Daytona (RANDOX, Crumlin, Velika Britanija).

Metoda določanja je posredna, saj temelji na ugotavljanju sposobnosti v vzorcu prisotnih antioksidantov, da preprečijo oksidacijo ABTS. V reakciji nastali prosti radikali (ABTS^{•+}-2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonat)) se reducirajo s pomočjo v vzorcu prisotnih antioksidantov, kar merimo z znižanjem absorbance pri 600 nm po treh minutah. Rezultate smo izrazili kot $\mu\text{mol/l}$ Trolox-ovih ekvivalentov; Trolox smo uporabili kot standard.

Vsak vzorec smo analizirali v paralelkah. Ponovljivost meritev v testu smo določili na osnovi meritev 6 paralelk pri 6 različnih vzorcih. Ponovljivost meritev med testi pa smo določali na osnovi meritev 6 paralelk pri 2 različnih vzorcih.

3.2.14 DOLOČANJE AKTIVNOSTI SUPEROKSID DISMUTAZE (SOD)

Aktivnost SOD v semenski plazmi smo določali z reagenčnim kompletom RANSOD (RANDOX, Crumlin, Velika Britanija) na avtomatskem biokemijskem analizatorju RX Daytona (RANDOX, Crumlin, Velika Britanija). Metoda temelji na sposobnosti SOD, da pretvori superoksidni radikal ($O_2^{•-}$) v molekularni kisik (O_2) in vodikov peroksid (H_2O_2). Superoksidni radikali nastanejo kot produkt reakcije med ksantinom in ksantinom oksidazo, detekcijo pa omogoča vzporedna pretvorba tetrazolinijeve soli (2-(4-jodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-fenil tetrazolijev klorid (INT)) v barvilo formazan. Aktivnost SOD je merilo inhibicije te reakcije.

Ponovljivost meritev v testu smo določili na osnovi meritev 6 paralelk pri treh različnih vzorcih. Ponovljivost meritev med testi pa smo določali na osnovi meritev 6 paralelk pri dveh različnih vzorcih.

3.2.15 DOLOČANJE LIPIDNE PEROKSIDACIJE

Lipidno peroksidacijo smo določali s pomočjo produktov lipidne peroksidacije (TBARS in 8-isoprostan), ki nastanejo ob oksidaciji maščobnih kislin (Suleiman in sod., 1996).

3.2.15.1 DOLOČANJE PRODUKTOV, KI REAGIRajo S TIOBARBITURNO KISLINO (TBARS)

Za določanje TBARS smo uporabili reagenčni TBARS komplet (Cayman Chemical Company, ZDA). TBARS, ki se sprostijo po oksidaciji, se vežejo na tiobarbiturno kislino in omogoča nastanek kompleksov TBARS-TBA, ki smo jih izmerili z absorbanco pri 532 nm. Ponovljivost testa (ponovljivost meritev v testu in ponovljivost meritev med testi) smo določili na osnovi meritev 4 paralelk pri 6 različnih vzorcih.

Uporabljene raztopine:

Izhodne raztopine:

- Komponenta A: Tiobarbiturna kislina
- Komponenta B: ocetna kislina
- Komponenta C: 10 x koncentrirana delovna raztopina natrijevega hidroksida
- Komponenta D: standard malondialdehid (500 μ M)

- Komponenta E: SDS raztopina

Priprava barvnega reagenta:

- 530 mg komponente A
- 50 ml z 2 x destilirano H_2O razredčene komponente B (1 : 5)
- 50 ml z 2 x destilirano H_2O razredčene komponente C (1 : 10)
- na mešalniku smo mešali toliko časa, da se je komponenta A popolnoma raztopila

Postopek:

1. S pomočjo komponente D in 2 x destilirane H_2O smo pripravili 8 standardnih raztopin z različno koncentracijo malondialdehida (MDA) (0; 0,625; 1,25; 2,5; 5; 10 in 25 μM).
2. V propilenske centrifugirke smo odpipetirali 50 μl standardne raztopine oziroma vzorca in dodali 50 μl komponente E ter premešali na mešalniku (Vibromix 114, Slovenija).
3. Dodali smo 2 ml barvnega reagenta in inkubirali v vreli vodni kopeli 1 uro.
4. Epruvete smo iz vrele vodne kopeli takoj prestavili na led za 10 min in tako blokirali reakcijo.
5. Centrifugirali smo 10 min pri 1600 x g pri 4 °C, nato pa 150 μl supernatanta odpipetirali v vdolbinico mikrotitrsko plošče v paralelkah.
6. Absorbanco smo izmerili na spektrofotometru pri 532 nm (Automatic microplate reader, Safire2, Tecan, Švica) v 30 minutah po končani reakciji.
7. Iz umiritvene krivulje standardnih raztopin smo določili koncentracijo TBARS v vzorcu ($\mu M/ml$).
8. Vsak vzorec smo analizirali v paralelkah.

3.2.15.2. DOLOČANJE 8-ISOPROSTANA

8-isoprostan smo določali s testom ELISA po navodilih proizvajalca (Cayman Chemical Company, ZDA). Metoda temelji na tekmovanju za prosta mesta med 8-isoprostanom in 8-isoprostan acetilholinesteraznim konjugatom. Ker je koncentracija konjugata konstantna, koncentracija prostega 8-isoprostana pa se spreminja, je količina na kunčja protitelesa vezanega konjugata obratno sorazmerna količini na kunčja protitelesa vezanega 8-

isoprostana. Ponovljivost testa (ponovljivost meritev v testu in ponovljivost meritev med testi) smo določili na osnovi meritev 4 paralelk pri 6 različnih vzorcih.

Uporabljene raztopine:

Izhodne raztopine:

- 10 x koncentriran EIA pufer
- koncentrat pufra za spiranje (400 x)
- polisorbat 20
- Ellmanov reagent (substrat)
- 8-isporostan konjugat
- 8-isporostan specifičnih protiteles

Pri šestih vzorcih smo izmerili 8-isoprostan v paralelkah pri treh razredčitvah (2^n), ki so pokrivali linearno območje testa. Na osnovi razredčitvenega testa smo določili optimalno redčitev za vzorce, ki je bila 1 : 4. Ta redčitev nam je omogočala, da so bile vse izmerjene meritve znotraj linearnega območja testa.

V vsaki mikrotitrski plošči smo v meritve vključili dve meritvi slepega preizkusa, dve meritvi za nespecifično vezavo (NV), tri meritve za maksimalno vezavo (MV), meritev za skupno aktivnost (SA) in 8 standardnih raztopin v paralelkah.

Vrednotenje:

1. Absorbanco smo izmerili na spektrofotometru pri 412 nm (Automatic microplate reader, Safire2, Tecan, Švica) proti slepemu preizkusu.
2. Vsak vzorec smo analizirali v paralelkah.

3. Izračun korigiranih vrednosti absorbanc:

$$A_{\overline{M}} = \text{povprečna absorbanca maksimalne vezave}$$

$$A_{\overline{N}} = \text{povprečna absorbanca nespecifične vezave}$$

$$A_{vz} = \text{absorbanca vzorca}$$

$$\text{a) korigirana absorbanca vrednosti maksimalne vezave (} A_{Mv.})$$

$$A_{MV_0} = A_{\overline{MV}} - A_{\overline{NV}}$$

b) korigirana vrednost absorbance standardov in vzorcev (A_{vz_0})

$$A_{vz_0} = \frac{A_{vz} - A_{\overline{NV}}}{A_{MV_0}}$$

c) S pomočjo logit/log modela smo linearizirali podatke in narisali umiritveno krivuljo:

$$\text{Logit}(A_{vz_0}) = \ln(A_{vz}/1 - A_{vz_0})$$

4. Iz umiritvene krivulje standardnih raztopin smo določili koncentracijo 8-isoprostana v vzorcu (pg/ml).

3.2.16 STATISTIČNO VREDNOTENJE REZULTATOV

3.2.16.1 Določanje ponovljivosti rezultatov

Ponovljivost metod smo določali z izračunom koeficiente za ponovljivost meritev po formuli:

$$CV_x = \frac{SD}{\bar{X}} \times 100$$

- CV_x : CV posameznega vzorca
- \bar{X} : povprečje meritev paralelk vzorca
- CV : koeficient variacije

$$CV = \bar{CV}_x \pm SD$$

- \bar{CV}_x : povprečen koeficient variacije
- SD: standardna deviacija

3.2.16.2 Statistično vrednotenje rezultatov lastnosti kratkotrajno hrانjenega semena po dializi

Normalno porazdelitev rezultatov različnih semenskih parametrov v posamezni skupini smo preverili s Kolmogorov–Smirnovim testom. Če je bila porazdelitev rezultatov normalna, smo v nadaljevanju uporabili parametrične statistične analize in teste, pri nenormalni porazdelitvi pa neparametrične.

Pri normalni porazdelitvi rezultatov smo razlike med skupinami nedializiranih oziroma dializiranih vzorcev, dobljenih v različnih dnevih analiz semena, ovrednotili z analizo variance za ponavljajoče meritve (One way repeated measures analysis of variances), pri nenormalni porazdeliti pa s Friedmanovo analizo variance za ponavljajoče meritve na rangiranih podatkih (Friedman repeated measures analysis of variance of ranks). V primeru statistično značilne razlike med skupinami dializiranih oziroma nedializiranih vzorcev smo pare skupin med seboj primerjali na osnovi parametrične Holm–Sidakove metode oziroma neparametričnega Tukeyevega testa.

Razlike med skupinama dializiranega in nedializiranega semena glede na različne semenske parametre, analizirane prvi, drugi in tretji dan hrانjenja semena, smo ovrednotili s parametričnim t-testom oziroma neparametričnim Wilcoxonovim testom.

Korelacijske med različnimi semenskimi parametri smo izračunali z neparametričnim Spearmanovim koeficientom korelacije ranga oziroma s parametričnim Pearsonovim korelacijskim koeficientom.

Omenjene statistične metode smo izvedli s pomočjo računalniškega programa Sigma Stat 3,5. $P < 0,05$ je bilo merilo za statistično značilnost pri vseh testih.

3.2.16.3 Statistično vrednotenje rezultatov optimizacije dodatka antioksidantov

Ob normalni porazdelitvi rezultatov smo vse skupine na tretji dan hrانjenja semena, glede na različne semenske parametre, ovrednotili z analizo variance (One way analysis of variance), ob nenormalni porazdelitvi pa s Kruskal-Wallisovo analizo variance (Kruskal-Wallis one way analysis of variance on ranks).

3.2.16.4 Statistično vrednotenje rezultatov lastnosti kratkotrajno hrانjenega semena po dializi in dodatku antioksidanta

Normalno porazdelitev rezultatov različnih semenskih parametrov v posamezni skupini smo preverili s Kolmogorov–Smirnov testom. Ob normalni porazdelitvi rezultatov smo v nadaljevanju uporabili parametrične statistične analize in teste, ob nenormalni porazdelitvi pa neparametrične.

Razlike med skupinama nedializiranega in dializiranega semena na dan 0, glede na različne semenske parametre, smo ovrednotili s parametričnim t-testom ozziroma neparametričnim Mann–Whitneyjevim testom.

Vse vzorce na tretji dan hrانjenja semena (N3, N3A, D3 in D3A) smo primerjali s kontrolnim vzorcem N0 in med seboj. Ob normalni porazdelitvi rezultatov smo razlike med kontrolnim vzorcem in ostalimi vzorci ovrednotili z analizo variance (One way analysis of variances), ob nenormalni porazdelitvi pa s Kruskal-Wallisovo analizo variance na rangiranih podatkih (Kruskal-Wallis one way analysis of variance on ranks). V primeru razlike med skupinami vzorcev N3, N3A, D3, D3A in N0 smo pare skupin (N0 z vsemi ostalimi vzorci) primerjali z neparametričnim Dunnovim testom ozziroma s parametrično Holm-Sidakovo metodo. Pri statistično značilni razliki med skupinami vzorcev na tretji dan hrانjenja semena (N3, N3A, D3 in D3A) smo pare skupin med seboj primerjali na osnovi parametrične Holm–Sidakove metode ozziroma neparametričnega Tukeyjevega testa.

3.2.16.5 Diagnostično vrednotenje parametrov oksidativnega stresa

Parametre oksidativnega stresa (TBARS in SOD), merjene v semenski plazmi svežega merjaščevega semena, smo diagnostično ovrednotili z vidika napovedi kakovosti merjaščevega semena po kratkotrajnem hrانjenju.

Vsak posamezni vzorec semena smo uvrstili v skupino ustreznih (U) ali skupino neustreznih (NU) vzorcev. Kriteriji za uvrstitev vzorca v skupino ustreznih vzorcev po 72 urah hrانjenja so bili:

- preživitvena sposobnost: > 85 %,

- delež gibljivih semenčic: > 70 %,
- delež progresivno gibljivih semenčic: > 25 %,
- delež morfološko normalnih semenčic: > 50 %.

Izvedli smo različna vrednotenja:

1. Vrednotenje glede na posamezen parameter:

- preživitvena sposobnost: vzorci U: > 85 %; vzorci NU: ≤ 85 %,
- delež gibljivih semenčic: vzorci U: > 70 %; vzorci NU ≤ 70 %,
- delež progresivno gibljivih semenčic: vzorci U: > 25 %; vzorci NU ≤ 25 %,
- delež morfološko normalnih semenčic: vzorci U: > 50 %; vzorci NU ≤ 50 %.

2. Vrednotenje glede na vse parametre:

- vzorci U: so izpolnjevali kriterije za vse parametre (preživitvena sposobnost: > 85 %; delež gibljivih semenčic: > 70 %; delež progresivno gibljivih semenčic: > 25 %; delež morfološko normalnih semenčic: > 50 %);
- vzorci NU: vsi ostali vzorci, ki niso izpolnjevali vsaj enega izmed zgoraj navedenih kriterijev

Za pozitivni rezultat testa (T+) smo označili rezultat, pri katerem je bila aktivnost SOD oziroma vrednost TBARS višja od mejne vrednosti. Negativni rezultat testa (T-) pa so predstavljali rezultati testa z vrednostmi, nižjimi od mejne vrednosti.

Optimalne mejne vrednosti za ločevanje med ustreznimi in neustreznimi vzorci semena smo določili na osnovi analize ROC (ang. Receiver operating characteristic, karakteristika sprejemnika). V analizi ROC za vsako mejno vrednost razdelimo rezultate v štiri kategorije, ki smo jih v našem primeru dobili z razvrstitevijo rezultatov glede na ustreznost semena (U in NU) in rezultat testa (T + in T -):

- DP: dejansko pozitivni (neustrezni vzorci (NU) s pozitivnim rezultatom testa (T +)),
- DN: dejansko negativni (ustrezni vzorci (U) z negativnim rezultatom testa (T -)),
- LN: lažno negativni (neustrezni vzorci (NU) z negativnim rezultatom testa (T -)),
- LP: lažno pozitivni (ustrezni vzorci (U) s pozitivnim rezultatom testa (T +)).

Tabela 1: Kompletna tabela 2 x 2 za izračun diagnostičnih parametrov testa**Table 1:** 2 x 2 Contingency Table for measures of diagnostic parameters

		Ustreznost vzorca	
		NU	U
Rezultat testa			
Pozitivni (T+)		DP	LP
Negativni (T-)		LN	DN
		DP + LN	LP + DN

Legenda: U – ustrezen vzorec; NU – neustrezen vzorec; DP – dejansko pozitiven rezultata; LP – lažno pozitiven rezultat; LN – lažno negativen rezultat; DN – dejansko negativni rezultat

Legend: U – satisfactory sample; NU – unsatisfactory sample; DP – true positive result; DN – true negative result; LP – false positive result; LN – false negative result

S pomočjo analize ROC smo določili specifičnost in občutljivost testa pri vseh možnih mejnih vrednostih.

Občutljivost nam pove, kolikšen delež vzorcev semena je bil po 72 urah hranjenja prepoznan kot neustrezen na osnovi vrednosti oksidativnega parametra v semenski plazmi svežega semena. Izračunamo jo kot razmerje med neustreznimi vzorci s pozitivnim rezultatom testa (DP) in vsemi neustreznimi vzorci (DP + LN).

$$\text{Občutljivost} = \frac{\text{DP}}{\text{DP} + \text{LN}}$$

Specifičnost nam pove, kolikšen delež vzorcev semena je po 72 urah hranjenja prepoznan kot ustrezen na osnovi vrednosti oksidativnega parametra v semenski plazmi svežega

semena. Izračunamo jo kot razmerje med ustreznimi vzorci z negativnim rezultatom testa (DN) in vsemi ustreznimi vzorci (DN + LP).

$$\text{Specifičnost} = \frac{\text{DN}}{\text{DN} + \text{LP}}$$

Pozitivna napovedna vrednost (PPV) nam pove, kolikšna je verjetnost, da bo vzorec semena, ki ima v sveži semenski plazmi pozitiven rezultat (T +) oksidativnega parametra, neustrezen po 72 urah hranjenja. Izračunamo jo kot razmerje med neustreznimi vzorci s pozitivnim rezultatom testa (DP) in vsemi pozitivnimi vzorci (DP + LP).

$$\text{PPV} = \frac{\text{DP}}{\text{DP} + \text{LP}}$$

Negativna napovedna vrednost (NPV) nam pove, kolikšna je verjetnost, da bo vzorec semena, ki ima v sveži semenski plazmi negativen rezultat (T -) oksidativnega parametra, ustrezan po 72 urah hranjenja. Izračunamo jo kot razmerje med ustreznimi vzorci z negativnim rezultatom testa (DN) in vsemi negativnimi vzorci (DN + LN).

$$\text{NPV} = \frac{\text{DN}}{\text{DN} + \text{LN}}$$

Zanesljivost testa je definirana kot povprečje med občutljivostjo in specifičnostjo testa. Krivulja ROC je graf občutljivosti (dejansko pozitivne vrednosti testa) v odvisnosti od lažno pozitivne vrednosti testa ($1 - \text{specifičnost}$) pri različnih mejnih vrednostih. Diagonala na grafu prikazuje naključno razvrstitev rezultatov v pozitivne in negativne. Dober diagnostični test ima visoko občutljivost in specifičnost, kar pomeni, da vrednosti ležijo blizu levega zgornjega kota krivulje ROC. Površina pod krivuljo (AUC, ang. area under the curve) je namreč merilo za diagnostično vrednost testa ob upoštevanju statistične značilnosti ($P < 0,05$). Optimalno mejno vrednost določimo na osnovi najboljše kombinacije specifičnosti in občutljivosti (Greiner in sod., 2000).

4 REZULTATI

4.1 UGOTAVLJANJE LASTNOSTI KRATKOTRAJNO HRANJENEGA SEMENA PO DIALIZI

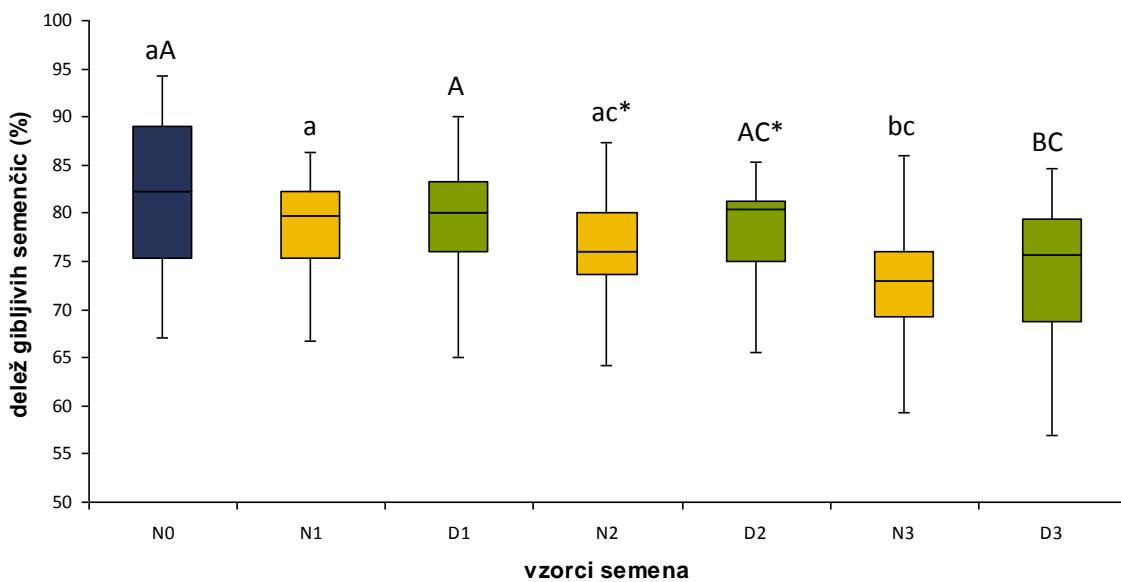
V prilogi 2 so prikazani koeficienti variacij za ponovitve v testu za vsako posamezno metodo. V tabelah, ki se nahajajo v prilogah, so prikazane povprečne vrednosti, standardne deviacije nativnih vzorcev in mediane na dan odvzema semena in nedializiranih ter dializiranih vzorcev v času tri dnevnega hranjenja. Če so se rezultati med nedializiranim in dializiranim semenom na posamezen dan hranjenja statistično značilno razlikovali, smo jih prikazali grafično. Stolpci v grafih predstavljajo mediano, srednjih 50 % vrednosti ter spodnjo in zgornjo četrtino rezultatov.

4.1.1 OSNOVNI PARAMETRI

Povprečen volumen ejakulatov je bil $187,6 \pm 56,9$ ml, povprečna koncentracija semenčic v vzorcih pa $279,0 \pm 68,1 \times 10^6$ /ml. Pregled vrednosti osnovnih parametrov dializiranega in nedializiranega semena v času hranjenja je prikazan v prilogi 3.

Skupna gibljivost semenčic

Skupna gibljivost semenčic se po 24 urah hranjenja semena pri dializiranem in nedializiranem semenu ni statistično značilno razlikovala od nativnega semena ($P > 0,05$). Po 48 in 72 urah se je gibljivost v primerjavi z nativnim semenom statistično značilno zmanjšala tako pri nedializiranem kot pri dializiranem semenu ($P < 0,05$). Statistično značilna razlika med dializiranim in nedializiranim semenom se je pokazala le po 48 urah hranjenja, kjer je bila gibljivost dializiranega semena višja od nedializiranega ($P < 0,05$). Po 24 in 72 urah hranjenja ni bilo statistično značilnih razlik med dializiranim in nedializiranim semenom ($P > 0,05$) (slika 19).



Slika 19: Grafični prikaz deleža gibljivih semenčic v vzorcih nedializiranega in dializiranega semena med kratkotrajnim hranjenjem

Figure 19: Graphic demonstration of the proportions of motile spermatozoa in dialysed and non-dialysed semen samples during short storage

Legenda: N0 – nativni vzorci; N1 – nedializirani vzorci po 24h; D1 – dializirani vzorci po 24h; N2 – nedializirani vzorci po 48h; D2 – dializirani vzorci po 48h; N3 – nedializirani vzorci po 72h; D3 – dializirani vzorci po 72h

Vrednosti parametrov vzorcev N0, N1, N2, N3, ki so se statistično značilno razlikovali ($P < 0,05$), so označene z različnimi malimi črkami. Vrednosti parametrov vzorcev N0, D1, D2, D3, ki so se statistično značilno razlikovali ($P < 0,05$), so označene z različnimi velikimi črkami. Vrednosti parametrov dializiranega in nedializiranega semena na isti dan hranjenja, ki sta označeni z *, sta se statistično značilno razlikovali ($P < 0,05$).

Legend: N0 – native samples; N1 – non-dialysed samples after 24h; D1 – dialysed samples after 24h; N2 – non-dialysed samples after 48h; D2 – dialysed samples after 48h; N3 – non-dialysed samples after 72h; D3 – dialysed samples after 72h

Values of N0, N1, N2, N3 marked by different lowercase letters for each parameter differ significantly ($P < 0.05$). Values of N0, D1, D2, D3 marked by different uppercase letters for each parameter differ significantly ($P < 0.05$). Values for dialysed and non-dialysed semen parameter measured on the same day, marked by *, are significantly different ($P < 0.05$).

Progresivna gibljivost semenčic

Progresivna gibljivost se je statistično značilno zmanjšala v dializiranih in nedializiranih vzorcih po 24 urah hranjenja v primerjavi z nativnimi vzorci ($P < 0,05$). Sprememba v deležu progresivno gibljivih semenčic od 24 do 48 ur ter od 48 do 72 ur ni bila statistično značilna ne pri dializiranem kot tudi ne pri nedializiranem semenu ($P > 0,05$).

Delež progresivno gibljivih semenčic pri nedializiranih in dializiranih vzorcih se med seboj v času hranjenja semena nista statistično značilno razlikovala ($P > 0,05$), čeprav je bila razlika po 72 urah na meji statistične značilnosti ($P = 0,057$) (priloga 3).

Preživitvena sposobnost semenčic

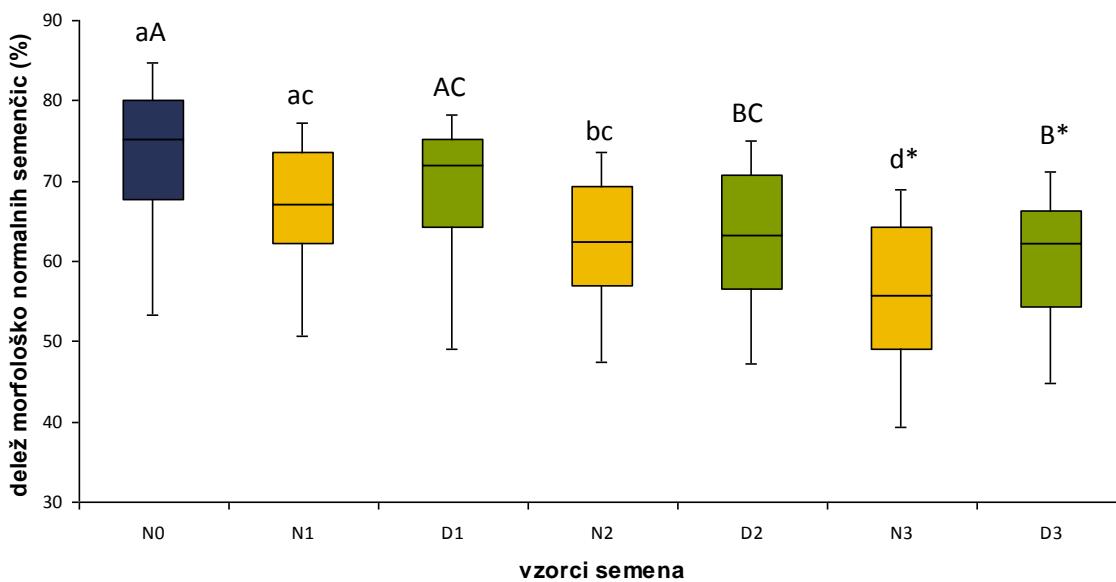
Preživitvena sposobnost semenčic se je statistično značilno po 24 urah hranjenja zmanjšala pri obeh skupinah semena v primerjavi z nativnimi vzorci ($P < 0,05$), pri čemer pa ni bilo statistično značilne razlike med nedializiranimi in dializiranimi vzorci ($P > 0,05$). Po 24 in 48 urah ter 48 in 72 urah ni bilo statistično značilne razlike ne pri dializiranem kot tudi ne pri nedializiranem semenu ($P > 0,05$). Med dializiranim in nedializiranim semenom ni bilo statistično značilne razlike v nobenem obdobju hranjenja ($P > 0,05$) (priloga 3).

4.1.2 MORFOLOŠKE NAPAKE SEMENČIC

Med hranjenjem semena smo zaznali razlike v deležu morfoloških napak le pri deležu napak na akrosому in deležu morfološko normalnih semenčic. Deleži ostalih morfoloških napak se v vzorcih dializiranega in nedializiranega semena med seboj niso razlikovali ($P > 0,05$). Delež morfoloških napak med hranjenjem semena pri dializiranem in nedializiranem semenu je prikazan v prilogi 4.

Morfološko normalne semenčice

Delež morfološko normalnih semenčic se je po 48 urah hranjenja semena statistično značilno zmanjšal v primerjavi z nativnim vzorcem tako v nedializiranem kot v dializiranem semenu ($P < 0,05$). Delež morfološko normalnih semenčic se je med hranjenjem semena zmanjševal, pri čemer je bil po 72 urah hranjenja semena pri nedializiranem semenu statistično značilno manjši kot pri dializiranem semenu ($P < 0,05$). Rezultati so prikazani na sliki 20.



Slika 20: Grafični prikaz deleža morfološko normalnih semenčic v vzorcih nedializiranega in dializiranega semena med kratkotrajnim hranjenjem

Figure 20: Graphic demonstration of the proportion of morphologically normal spermatozoa in dialysed and non-dialysed semen samples during short storage

Legenda: N0 – nativni vzorci; N1 – nedializirani vzorci po 24h; D1 – dializirani vzorci po 24h; N2 – nedializirani vzorci po 48h; D2 – dializirani vzorci po 48h; N3 – nedializirani vzorci po 72h; D3 – dializirani vzorci po 72h

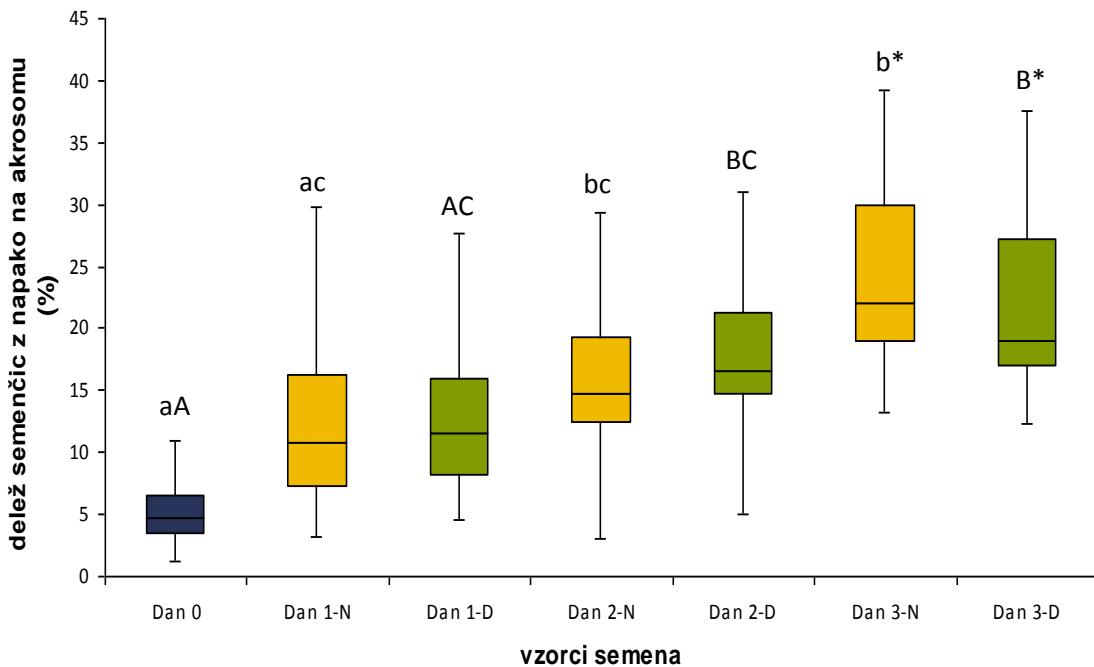
Vrednosti parametrov vzorcev N0, N1, N2, N3, ki so se statistično značilno razlikovali ($P < 0,05$), so označene z različnimi malimi črkami. Vrednosti parametrov vzorcev N0, D1, D2, D3, ki so se statistično značilno razlikovali ($P < 0,05$), so označene z različnimi velikimi črkami. Vrednosti parametrov dializiranega in nedializiranega semena na isti dan hranjenja, ki sta označeni z *, sta se statistično značilno razlikovali ($P < 0,05$).

Legend: N0 – native samples; N1 – non-dialysed samples after 24h; D1 – dialysed samples after 24h; N2 – non-dialysed samples after 48h; D2 – dialysed samples after 48h; N3 – non-dialysed samples after 72h; D3 – dialysed samples after 72h

Values of N0, N1, N2, N3 marked by different lowercase letters for each parameter differ significantly ($P < 0.05$). Values of N0, D1, D2, D3 marked by different uppercase letters for each parameter are significantly different ($P < 0.05$). Values for dialysed and non-dialysed semen parameter on the same day, marked by *, differ significantly ($P < 0.05$).

Semenčice z napako na akrosomu

Med hranjenjem semena se je delež semenčic z napako na akrosomu statistično značilno povečeval tako pri dializiranem kot nedializiranem semenu, in sicer od odvzema semena do 48 ur hranjenja ter od 48 do 72 ur hranjenja ($P < 0,05$). V dializiranem semenu je bil delež semenčic z napako na akrosomu po 72 urah hranjenja statistično značilno manjši v primerjavi z nedializiranim semenom ($P < 0,05$). Rezultati so prikazani na sliki 21.



Slika 21: Grafični prikaz deleža semenčic z napakami na akrosomu v vzorcih nedializiranega in dializiranega semena med kratkotrajnim hranjenjem

Figure 21: Graphic demonstration of the proportion of spermatozoa with damaged acrosomes in dialysed and non-dialysed semen samples during short storage

Legenda: N0 – nativni vzorci; N1 – nedializirani vzorci po 24h; D1 – dializirani vzorci po 24h; N2 – nedializirani vzorci po 48h; D2 – dializirani vzorci po 48h; N3 – nedializirani vzorci po 72h; D3 – dializirani vzorci po 72h

Vrednosti parametrov vzorcev N0, N1, N2, N3, ki so se statistično značilno razlikovali ($P < 0,05$), so označene z različnimi malimi črkami. Vrednosti parametrov vzorcev N0, D1, D2, D3, ki so se statistično značilno razlikovali ($P < 0,05$), so označene z različnimi velikimi črkami. Vrednosti parametrov dializiranega in nedializiranega semena na isti dan hranjenja, ki sta označeni z *, sta se statistično značilno razlikovali ($P < 0,05$).

Legend: N0 – native samples; N1 – non-dialysed samples after 24h; D1 – dialysed samples after 24h; N2 – non-dialysed samples after 48h; D2 – dialysed samples after 48h; N3 – non-dialysed samples after 72h; D3 – dialysed samples after 72h

Values of N0, N1, N2, N3 marked by different lowercase letters for each parameter differ significantly ($P < 0,05$). Values of N0, D1, D2, D3 marked by different uppercase letters for each parameter are significantly different ($P < 0,05$). Values for dialysed and non-dialysed semen parameter on the same day, marked by *, differ significantly ($P < 0,05$).

4.1.3 PRESNOVNA AKTIVNOST SEMENČIC

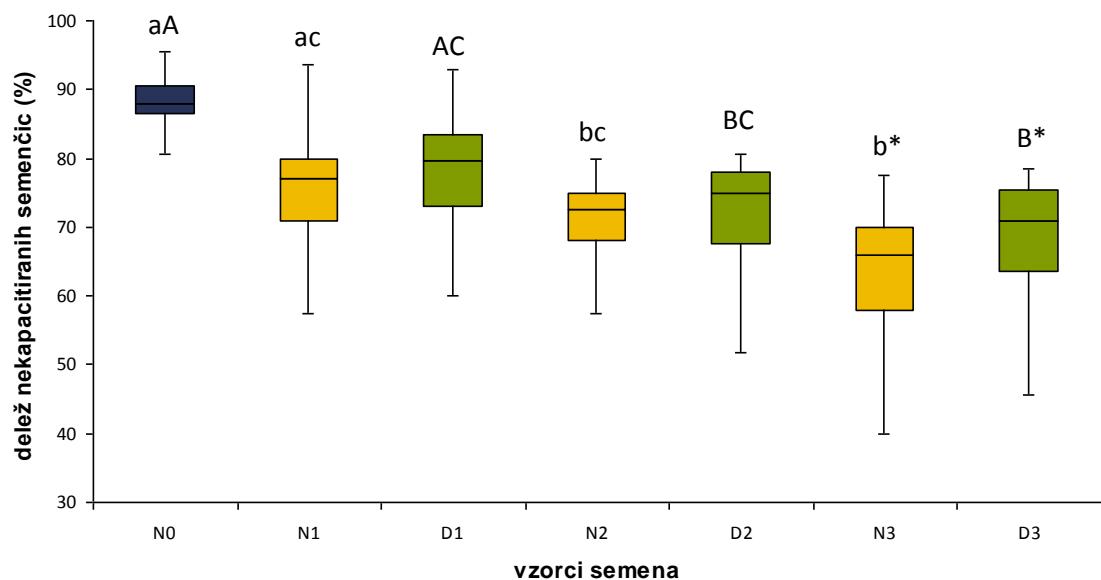
Presnovno aktivnost semenčic smo določili na dan odvzema semena in po 72 urah hranjenja. Ta se je statistično značilno znižala glede na nativno seme ($A_{610} = 0,037 \pm 0,026$) samo pri dializiranem semenu ($A_{610} = 0,075 \pm 0,049$) ($P < 0,05$). Absorbanca pri 610 nm kot

rezultat redukcijskega testa z resazurinom je namreč obratno sorazmerna presnovni aktivnosti semenčic. Po 72 urah hranjenja semena med dializiranim in nedializiranim semenom ni bila ugotovljena statistično značilna razlika ($P > 0,05$).

4.1.4 KAPACITACIJA SEMENČIC

Deleži (povprečne vrednosti \pm SD) kapacitiranih, nekapacitiranih semenčic in semenčic z akrosomsko reakcijo v nativnem in hlajenem semenu so prikazani v prilogi 5.

Delež nekapacitiranih semenčic se je statistično značilno znižal od odvzema semena do 48 ur hranjenja ter od 48 do 72 ur hranjenja pri dializiranem in nedializiranem semenu ($P < 0,05$). Dializirano seme je imelo po 72 urah hranjenja statistično značilno večji delež nekapacitiranih semenčic kot nedializirano seme ($P < 0,05$) (slika 22).



Slika 22: Grafični prikaz deleža nekapacitiranih semenčic v vzorcih nedializiranega in dializiranega semena med kratkotrajnim hranjenjem

Figure 22: Graphic demonstration of the proportion of non-capacitated spermatozoa in dialysed and non-dialysed semen samples during short storage

Legenda: N0 – nativni vzorci; N1 – nedializirani vzorci po 24h; D1 – dializirani vzorci po 24h; N2 – nedializirani vzorci po 48h; D2 – dializirani vzorci po 48h; N3 – nedializirani vzorci po 72h; D3 – dializirani vzorci po 72h. Vrednosti parametrov vzorcev N0, N1, N2, N3, ki so se statistično značilno razlikovali ($P < 0,05$), so označene z različnimi malimi črkami. Vrednosti parametrov vzorcev N0, D1, D2, D3, ki so se

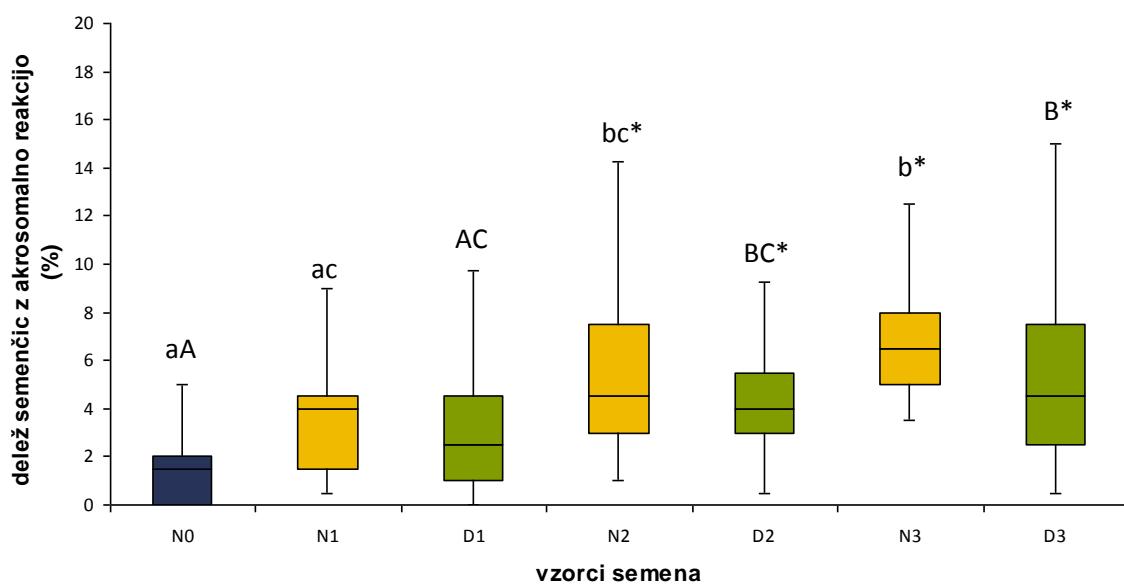
statistično značilno razlikovali ($P < 0,05$), so označene z različnimi velikimi črkami. Vrednosti parametrov dializiranega in nedializiranega semena na isti dan hranjenja, ki sta označeni z *, sta se statistično značilno razlikovali ($P < 0,05$).

Legend: N0 – native samples; N1 – non-dialysed samples after 24h; D1 – dialysed samples after 24h; N2 – non-dialysed samples after 48h; D2 – dialysed samples after 48h; N3 – non-dialysed samples after 72h; D3 – dialysed samples after 72h

Values of N0, N1, N2, N3 marked by different lowercase letters for each parameter differ significantly ($P < 0.05$). Values of N0, D1, D2, D3 marked by different uppercase letters for each parameter are significantly different ($P < 0.05$). Values for dialysed and non-dialysed semen parameter on the same day, marked by *, differ significantly ($P < 0.05$).

Delež kapacitiranih semenčic in delež semenčic z akrosomsko reakcijo sta se statistično značilno povečala od odvzema semena do 48 ur hranjenja ter od 24 do 72 ur hranjenja pri dializiranem in nedializiranem semenu ($P < 0,05$). Med dializiranim in nedializiranim semenom ni bilo ugotovljenih statistično značilnih razlik v deležu kapacitiranih semenčic v nobenem obdobju hranjenja ($P > 0,05$) (priloga 5).

Analiza deleža semenčic z akrosomsko reakcijo je pokazala statistično značilno razliko med dializiranim in nedializiranim semenom po 48 in 72 urah hranjenja ($P < 0,05$). Delež semenčic z akrosomsko reakcijo je bil pri vzorcih dializiranega semena statistično značilno manjši kot pri vzorcih nedializiranega semena ($P < 0,05$). Rezultati so prikazani na sliki 23.



Slika 23: Grafični prikaz deleža semenčic z akrosomsko reakcijo v vzorcih nedializiranega in dializiranega semena med kratkotrajnim hranjenjem

Figure 23: Graphic demonstration of the proportion of acrosome reacted spermatozoa in dialysed and non-dialysed semen samples during short storage

Legenda: N0 – nativni vzorci; N1 – nedializirani vzorci po 24h; D1 – dializirani vzorci po 24h; N2 – nedializirani vzorci po 48h; D2 – dializirani vzorci po 48h; N3 – nedializirani vzorci po 72h; D3 – dializirani vzorci po 72h

Vrednosti parametrov vzorcev N0, N1, N2, N3, ki so se statistično značilno razlikovali ($P < 0,05$), so označene z različnimi malimi črkami. Vrednosti parametrov vzorcev N0, D1, D2, D3, ki so se statistično značilno razlikovali ($P < 0,05$), so označene z različnimi velikimi črkami. Vrednosti parametrov dializiranega in nedializiranega semena na isti dan hrانjenja, ki sta označeni z *, sta se statistično značilno razlikovali ($P < 0,05$).

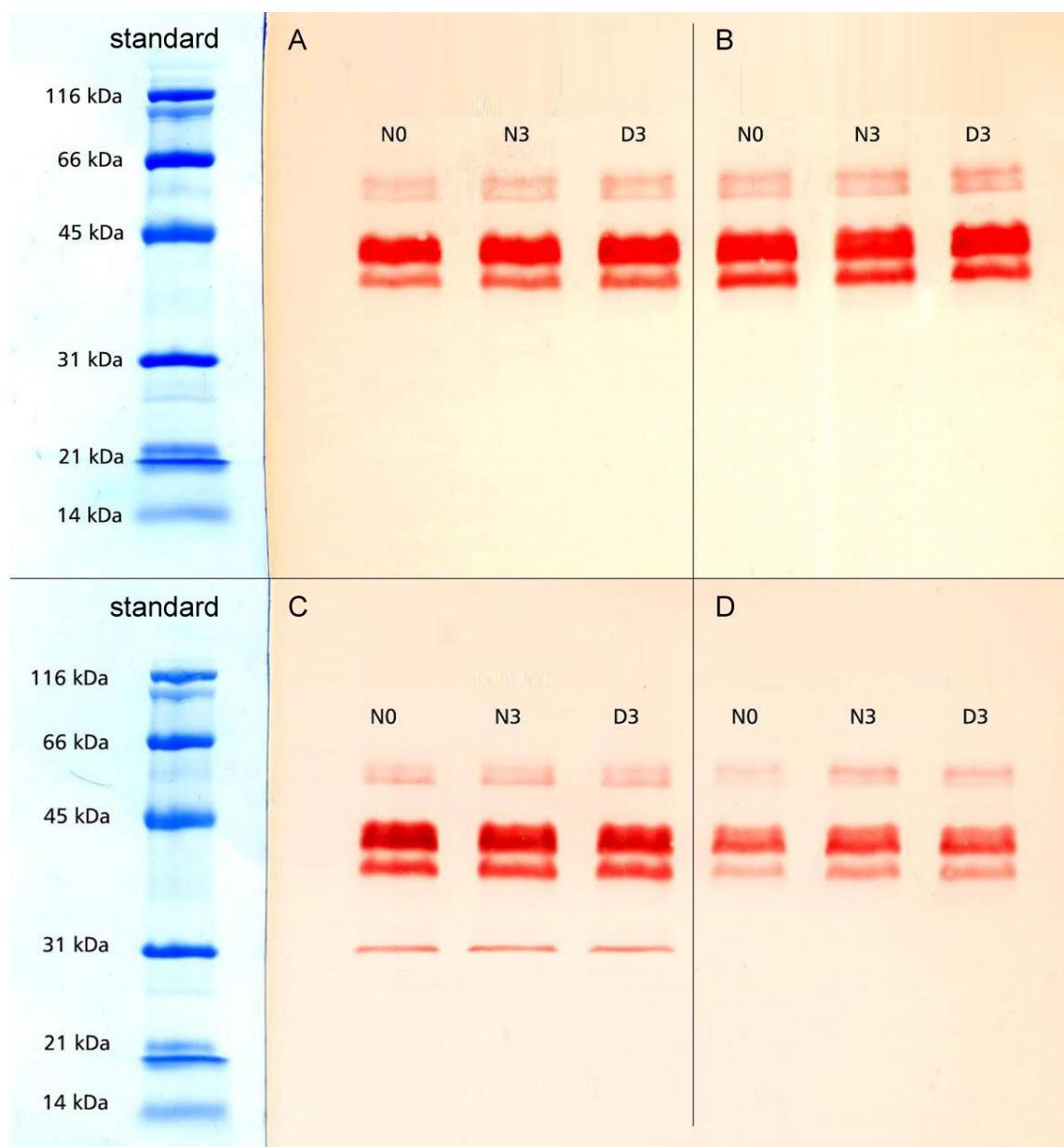
Legend: N0 – native samples; N1 – non-dialysed samples after 24h; D1 – dialysed samples after 24h; N2 – non-dialysed samples after 48h; D2 – dialysed samples after 48h; N3 – non-dialysed samples after 72h; D3 – dialysed samples after 72h

Values of N0, N1, N2, N3 marked by different lowercase letters for each parameter differ significantly ($P < 0.05$). Values of N0, D1, D2, D3 marked by different uppercase letters for each parameter are significantly different ($P < 0.05$). Values for dialysed and non-dialysed semen parameter on the same day, marked by *, differ significantly ($P < 0.05$).

4.1.5 DOLOČANJE TIROZIN FOSFORILIRANIH PROTEINOV V SEMENČICAH

Imunogene lise smo opazili pri molskih masah 40 kDa, 42 kDa, 50 kDa in 60 kDa. V intenziteti med njimi ni bilo razlik na dan odvzema in po 72 urah hrانjenja prav tako ni prišlo do vidnih sprememb pri izražanju tirozin fosforiliranih proteinov v dializiranem in nedializiranem semenu.

Tirozin fosforiliran protein p32, ki je specifičen za kapacitacijo merjačevih semenčic, smo določili le pri enem vzorcu, pri katerem je bila opazna visoka stopnja kapacitacije že v nativnem vzorcu (slika 24C). Na sliki 24 (A, B in D) so predstavljeni tudi imunobloti treh vzorcev, iz katerih je razvidno, da med hrانjenjem semena ni prišlo do sprememb pri izražanju tirozin fosforiliranih proteinov, in to ne pri nedializiranem in ne pri dializiranem semenu.

**Slika 24:** Imunoblot štirih vzorcev za ugotavljanje tirozin fosforiliranih proteinov**Figure 24:** Immunoblot of four samples for detecting tyrosine phosphorylated proteins

Legenda: Prikazani so standardi z molekulskimi masami od 14 do 116 kDa in imnuboloti štirih vzorcev (A B,C in D). Imunoblot C prikazuje tirozin fosforiliran protein z molsko maso 32 kDa; N0 – nativni vzorec; N3 – nedializirani vzorci po 72h; D3 – dializirani vzorci po 72h

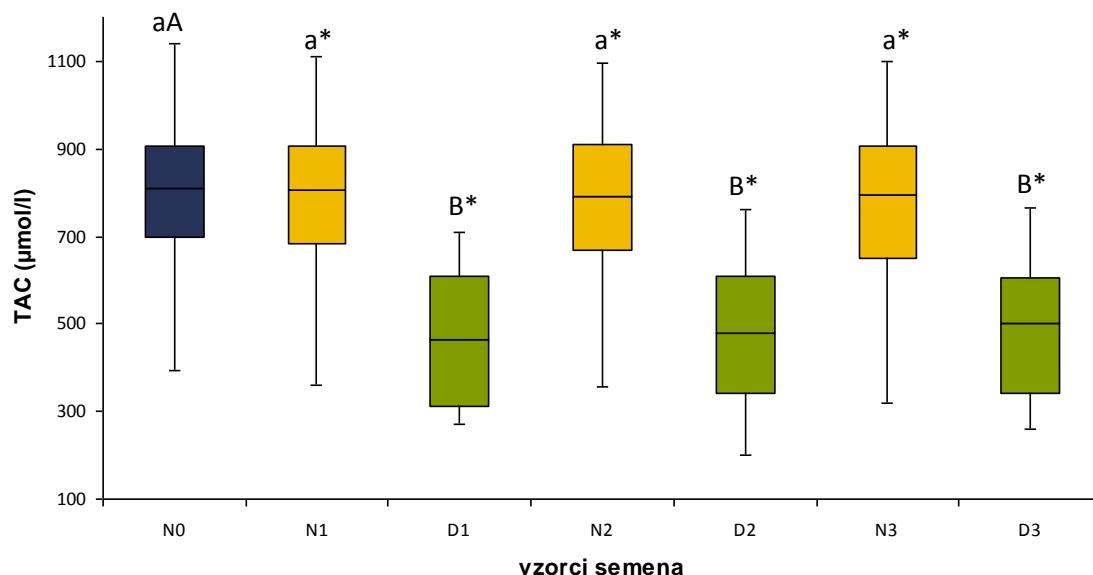
Legend: Standards with molecular weights from 14 to 116 kDa and immunoblots of four samples (A, B, C in D) are shown. Immunoblot C shows tyrosine phosphorylated protein with molecular weight 32 kDa; N0 – native samples; N3 –non-dialysed samples after 72h ; D3 – dialysed samples after 72h

4.1.6 PARAMETRI OKSIDATIVNEGA STRESA

Vrednosti parametrov oksidativnega stresa so prikazane v prilogi 6.

4.1.6.1 CELOKUPNA ANTIOKSIDANTNA KAPACITETA (TAC)

Celokupna antioksidantna kapaciteta je ostala med hranjenjem semena nespremenjena v nedializiranem semenu ($P > 0,05$). V semenski plazmi dializiranega semena se je celokupna antioksidantna kapaciteta po 24 urah hranjenja semena statistično značilno znižala v primerjavi z nativnim semenom ($P < 0,05$), nato pa med nadaljnjjim hranjenjem semena ostala nespremenjena. Dializirano seme je imelo po 24, 48 in 72 urah hranjenja v primerjavi z nedializiranim statistično značilno nižje vrednosti TAC ($P < 0,05$) (slika 25).



Slika 25: Grafični prikaz vrednosti TAC v semenski plazmi nedializiranega in dializiranega semena med kratkotrajnim hranjenjem

Figure 25: Graphic demonstration of TAC values in seminal plasma of dialysed and non-dialysed semen samples during short storage

Legenda: N0 – nativni vzorci; N1 – nedializirani vzorci po 24h; D1 – dializirani vzorci po 24h; N2 – nedializirani vzorci po 48h; D2 – dializirani vzorci po 48h; N3 – nedializirani vzorci po 72h; D3 – dializirani vzorci po 72h

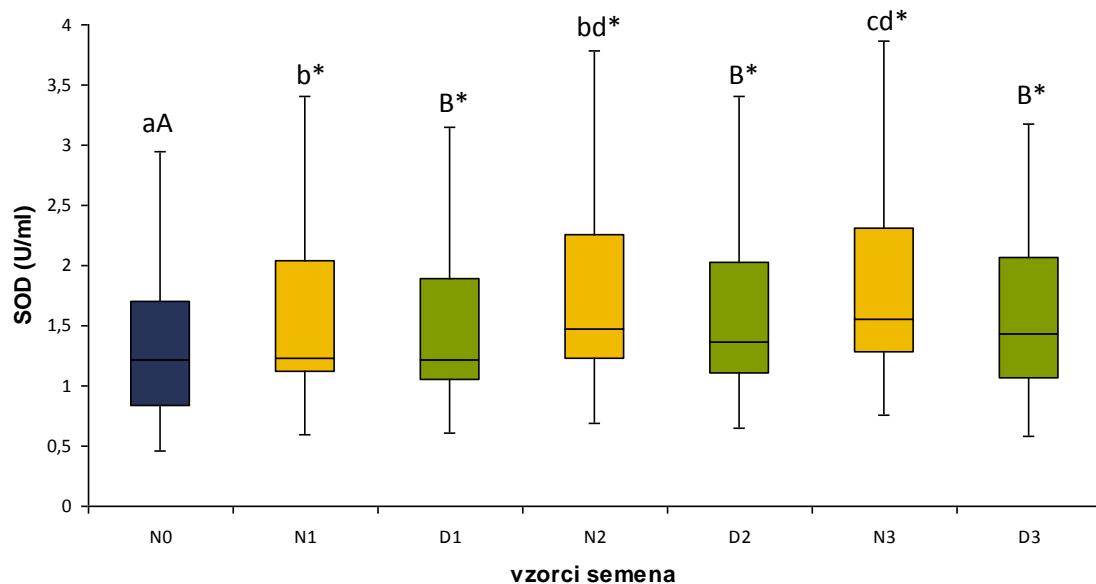
Vrednosti parametrov vzorcev N0, N1, N2, N3, ki so se statistično značilno razlikovali ($P < 0,05$), so označene z različnimi malimi črkami. Vrednosti parametrov vzorcev N0, D1, D2, D3, ki so se statistično značilno razlikovali ($P < 0,05$), so označene z različnimi velikimi črkami. Vrednosti parametrov dializiranega in nedializiranega semena na isti dan hranjenja, ki sta označeni z *, sta se statistično značilno razlikovali ($P < 0,05$).

Legend: N0 – native samples; N1 – non-dialysed samples after 24h; D1 – dialysed samples after 24h; N2 – non-dialysed samples after 48h; D2 – dialysed samples after 48h; N3 – non-dialysed samples after 72h; D3 – dialysed samples after 72h

Values of N0, N1, N2, N3 marked by different lowercase letters for each parameter differ significantly ($P < 0.05$). Values of N0, D1, D2, D3 marked by different uppercase letters for each parameter differ significantly ($P < 0.05$). Values for dialysed and non-dialysed semen parameter on the same day, marked by *, differ significantly ($P < 0.05$).

4.1.6.2 SUPEROKSID DISMUTAZA (SOD)

Aktivnost encima SOD se je v primerjavi z nativnim semenom po 24 urah hranjenja statistično značilno povečala tako v dializiranem kot v nedializiranem semenu ($P < 0,05$). Njegova aktivnost se je v času nadaljnega hranjenja semena še povečevala, vendar je statistično značilni porast dosegla le med 24 in 72 urami hranjenja nedializiranega semena ($P < 0,05$). Statistično značilna razlika v aktivnosti encima SOD je bila prisotna med nedializiranimi in dializiranimi vzorci semena po 24, 48 in 72 urah hranjenja. Nedializirani vzorci so imeli višjo aktivnost encima SOD kot dializirani vzorci ($P < 0,05$) (slika 26).



Slika 26: Grafični prikaz aktivnosti SOD v semenski plazmi nedializiranega in dializiranega semena med kratkotrajnim hranjenjem

Figure 26: Graphic demonstration of SOD activity in seminal plasma of dialysed and non-dialysed semen samples during short storage

Legenda: N0 – nativni vzorci; N1 – nedializirani vzorci po 24h; D1 – dializirani vzorci po 24h; N2 – nedializirani vzorci po 48h; D2 – dializirani vzorci po 48h; N3 – nedializirani vzorci po 72h; D3 – dializirani vzorci po 72h

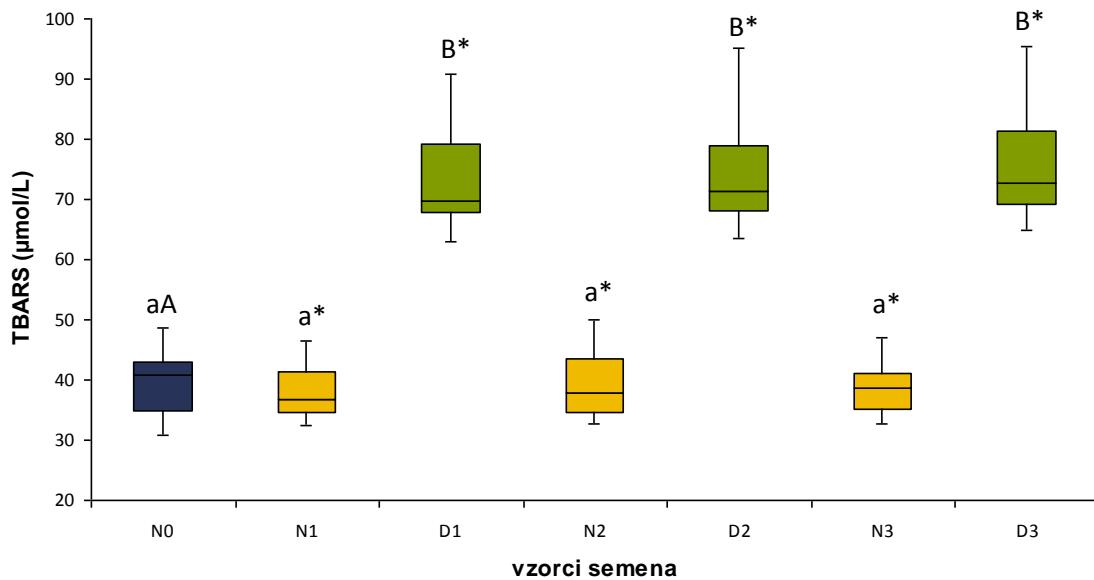
Vrednosti parametrov vzorcev N0, N1, N2, N3, ki so se statistično značilno razlikovali ($P < 0,05$), so označene z različnimi malimi črkami. Vrednosti parametrov vzorcev N0, D1, D2, D3, ki so se statistično značilno razlikovali ($P < 0,05$), so označene z različnimi velikimi črkami. Vrednosti parametrov dializiranega in nedializiranega semena na isti dan hranjenja, ki sta označeni z *, sta se statistično značilno razlikovali ($P < 0,05$).

Legend: N0 – native samples; N1 – non-dialysed samples after 24h; D1 – dialysed samples after 24h; N2 – non-dialysed samples after 48h; D2 – dialysed samples after 48h; N3 – non-dialysed samples after 72h; D3 – dialysed samples after 72h

Values of N0, N1, N2, N3 marked by different lowercase letters for each parameter differ significantly ($P < 0,05$). Values of N0, D1, D2, D3 marked by different uppercase letters for each parameter differ significantly ($P < 0,05$). Values for dialysed and non-dialysed semen parameter on the same day, marked by *, differ significantly ($P < 0,05$).

4.1.6.3 LIPIDNA PEROKSIDACIJA (TBARS)

Lipidna peroksidacija se v nedializiranem semenu med hranjenjem ni statistično značilno spremenila ($P > 0,05$). Nasprotno pa se je v dializiranem semenu stopnja lipidne peroksidacije po 24 urah hranjenja v primerjavi z nativnim semenom statistično značilno povišala ($P < 0,05$), nato pa ostala nespremenjena po 48 in 72 urah hranjenja v primerjavi s semenom hranjenim 24 ur ($P > 0,05$). Dializirano seme je imelo po 24, 48 in 72 urah hranjenja v primerjavi z nedializiranim statistično značilno višjo stopnjo lipidne peroksidacije ($P < 0,05$) (slika 27).



Slika 27: Grafični prikaz lipidne peroksidacije merjene s TBARS v semenski plazmi nedializiranega in dializiranega semena med kratkotrajnim hranjenjem

Figure 27: Graphic demonstration of lipid peroxidation measured with TBARS in seminal plasma of dialysed and non-dialysed semen samples during short storage

Legenda: N0 – nativni vzorci; N1 – nedializirani vzorci po 24h; D1 – dializirani vzorci po 24h; N2 – nedializirani vzorci po 48h; D2 – dializirani vzorci po 48h; N3 – nedializirani vzorci po 72h; D3 – dializirani vzorci po 72h

Vrednosti parametrov vzorcev N0, N1, N2, N3, ki so se statistično značilno razlikovali ($P < 0,05$), so označene z različnimi malimi črkami. Vrednosti parametrov vzorcev N0, D1, D2, D3, ki so se statistično značilno razlikovali ($P < 0,05$), so označene z različnimi velikimi črkami. Vrednosti parametrov dializiranega in nedializiranega semena na isti dan hrانjenja, ki sta označeni z *, sta se statistično značilno razlikovali ($P < 0,05$).

Legend: N0 – native samples; N1 – non-dialysed samples after 24h; D1 – dialysed samples after 24h; N2 – non-dialysed samples after 48h; D2 – dialysed samples after 48h; N3 – non-dialysed samples after 72h; D3 – dialysed samples after 72h

Values of N0, N1, N2, N3 marked by different lowercase letters for each parameter differ significantly ($P < 0.05$). Values of N0, D1, D2, D3 marked by different uppercase letters for each parameter differ significantly ($P < 0.05$). Values for dialysed and non-dialysed semen parameter on the same day, marked by *, differ significantly ($P < 0.05$).

4.2 OPTIMIZACIJA DODATKA ANTIOKSIDANTOV

Vrednosti osnovnih semenskih parametrov po 72 urah hrانjenja z različno koncentracijo antioksidantov L-cistein in/ali α -tokoferol so prikazane v prilogi 7.

Seme z dodatkom antioksidanta α -tokoferola v koncentraciji 200 μM je izkazoval najboljšo kakovost semena glede na vse testirane parametre, čeprav razlike med skupinami niso bile statistično značilne ($P > 0,05$) (priloga 7).

4.3 UGOTAVLJANJE LASTNOSTI KRATKOTRAJNO HRANJENEGA SEMENA PO DIALIZI IN DODATKU ANTIOKSIDANTA

V prilogi 8 so prikazani koeficienti variacij za ponovitve v testu za vsako posamezno uporabljeno metodo. V prilogah so prikazane povprečne vrednosti, standardne deviacije in mediane parametrov semena nativnih vzorcev in nedializiranih ter dializiranih vzorcev z dodatkom antioksidanta ali brez njega po tridnevnom hrانjenju. Če so se rezultati med različnimi skupinami po hrانjenju med seboj razlikovali, smo jih prikazali grafično. Stolpci v grafih predstavljajo mediano, srednjih 50 % vrednosti ter spodnjo in zgornjo četrtino rezultatov. Vrednosti dializiranih vzorcev na dan 0 so služile za kontrolo. Nedializirani in dializirani vzorci se na dan 0 niso statistično značilno razlikovali ($P > 0,05$), razen pri TAC.

4.3.1 GIBLJIVOST SEMENČIC

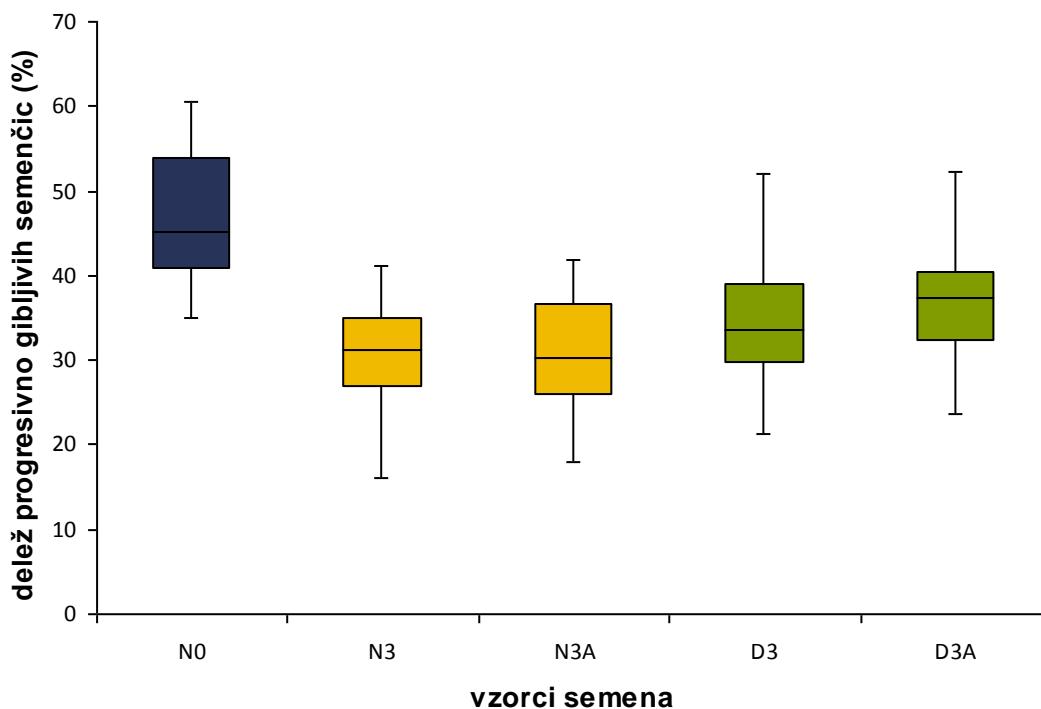
Povprečen volumen ejakulatov je bil $221,3 \pm 66,8$, povprečna koncentracija semenčic v nativnih vzorcih pa $319,5 \pm 116,1 \times 10^6/\text{ml}$. Rezultati gibljivosti semenčic pri nativnih vzorcih in različnih skupinah po kratkotrajnem hranjenju so razvidni v prilogi 9.

Skupna gibljivost semenčic

Skupna gibljivost semenčic se je po 72 urah hranjenja semena statistično značilno znižala v vseh štirih skupinah v primerjavi z nativnim vzorcem ($P < 0,05$). Po 72 urah hranjenja ni bilo razlik v gibljivosti med posameznimi skupinami ($P > 0,05$) (priloga 9).

Progresivna gibljivost semenčic

Progresivna gibljivost semenčic se je po 72 urah hranjenja semena statistično značilno znižala v vseh štirih skupinah v primerjavi z nativnim vzorcem ($P < 0,05$). Progresivna gibljivost je bila nižja pri nedializiranem kot pri dializiranem semenu. Statistično značilna razlika po 72 urah hranjenja je bila med skupino nedializiranega semena brez dodatka antioksidanta (N3) in dializirano skupino z dodatkom antioksidanta (D3A) ($P < 0,05$) (slika 28).



Slika 28: Grafični prikaz deleža progresivno gibljivih semenčic v nativnih vzorcih in različnih skupinah kratkotrajno hranjenega semena

Figure 28: Graphic demonstration of proportion of progressively motile spermatozoa in native samples and in different groups of short-term stored semen

Legenda: N0 – nativni vzorci; N3 – nedializirani vzorci po 72h; N3A – nedializirani vzorci z dodatkom antioksidanta po 72h; D3 – dializirani vzorci po 72h; D3A – dializirani vzorci z dodatkom antioksidanta po 72h

Vrednosti parametra vzorcev N0, ki so se statistično značilno razlikovale ($P < 0,05$) od vzorcev N3, N3A, D3, D3A, so označene z različnimi malimi črkami. Vrednosti parametrov vzorcev N3, N3A, D3, D3A, ki so se med seboj statistično značilno razlikovale ($P < 0,05$), so označene z različnimi velikimi črkami.

Legend: N0 – native samples; N3 – non-dialysed samples after 72h; N3A – non-dialysed samples with antioxidant after 72h; D3 – dialysed samples after 72h; D3A – dialysed samples with antioxidant after 72h

Values of N0 and N3, N3A, D3, D3A, marked by different lowercase letters, differ significantly ($P < 0.05$). Values of N3, N3A, D3, D3A marked by different uppercase letters for each parameter differ significantly ($P < 0.05$).

4.3.2 MORFOLOŠKE NAPAKE SEMENČIC

Rezultati analiz morfoloških napak pri nativnih vzorcih in med različnimi skupinami semena po kratkotrajanem hranjenju so razvidni v prilogi 10. Med nativnimi vzorci in posameznimi skupinami kratkotrajno hranjenega semena smo zaznali razlike v deležu morfoloških napak le pri deležu napak na akrosomu in deležu morfološko normalnih

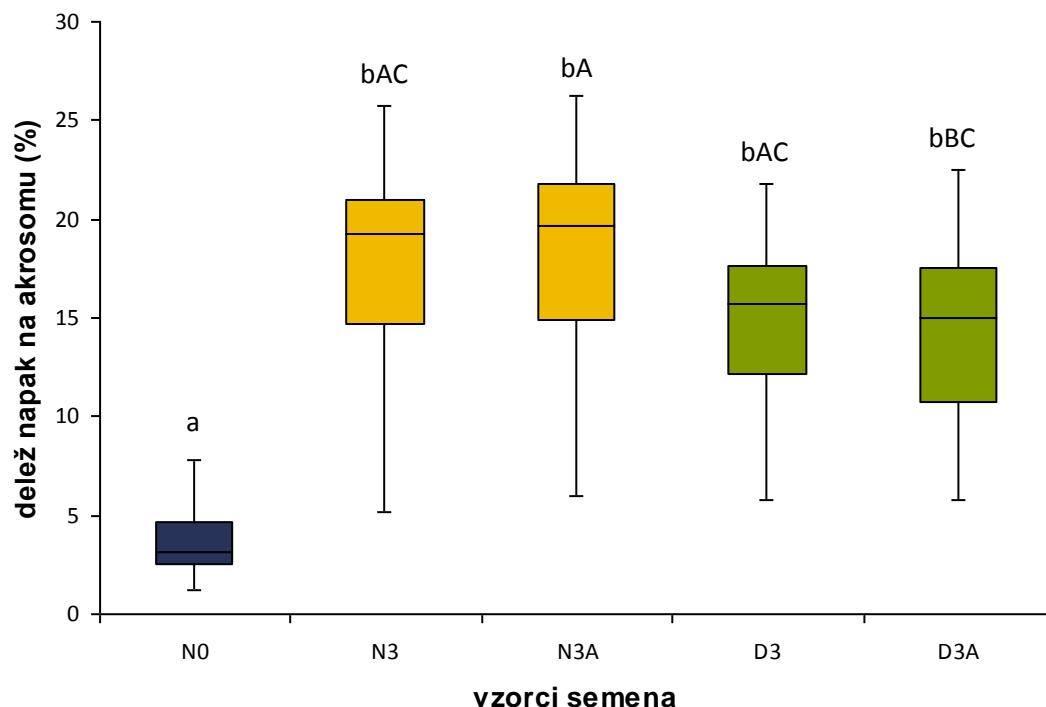
semenčic. Različne skupine semena se med seboj niso statistično značilno razlikovale glede na vse ostale morfološke napake ($P > 0,05$) (priloga 10).

Morfološko normalne semenčice

Delež morfološko normalnih semenčic se je po kratkotrajnem hranjenju semena statistično značilno zmanjšal v vseh štirih skupinah v primerjavi z nativnim vzorcem ($P < 0,05$). Po kratkotrajnem hranjenju je bil delež morfološko normalnih semenčic pri nedializiranih skupinah (N3 in N3A) manjši kot pri dializiranih skupinah (D3, D3A), vendar med skupinami ni bilo statistično značilnih razlik ($P > 0,05$) (priloga 10).

Semenčice z napako na akrosomu

Delež semenčic z napako na akrosomu se je po kratkotrajnem hranjenju semena statistično značilno povečal v vseh štirih skupinah v primerjavi z nativnim vzorcem ($P < 0,05$). Po 72 urah hranjenja semena sta imeli obe nedializirani skupini (N3 in N3A) večji delež semenčic z napakami na akrosomu v primerjavi z obema dializiranimi skupinama (D3 in D3A), statistično značilna razlika pa je bila samo med skupinama semena z dodanim antioksidantom (N3A in D3A) ($P < 0,05$) (slika 29).



Slika 29: Grafični prikaz deleža semenčic z napako na akrosomu v nativnih vzorcih in različnih skupinah kratkotrajno hranjenega semena

Figure 29: Graphic demonstration of proportion spermatozoa with acrosomal damage in native samples and in different groups of short-term stored semen

Legenda: N0 – nativni vzorci; N3 – nedializirani vzorci po 72h; N3A – nedializirani vzorci z dodatkom antioksidanta po 72h; D3 – dializirani vzorci po 72h; D3A – dializirani vzorci z dodatkom antioksidanta po 72h

Vrednosti parametra vzorcev N0, ki so se statistično značilno razlikovale ($P < 0,05$) od vzorcev N3, N3A, D3, D3A, so označene z različnimi malimi črkami. Vrednosti parametrov vzorcev N3, N3A, D3, D3A, ki so se med seboj statistično značilno razlikovale ($P < 0,05$), so označene z različnimi velikimi črkami.

Legend: N0 – native samples; N3 – non-dialysed samples after 72h; N3A – non-dialysed samples with antioxidant after 72h; D3 – dialysed samples after 72h; D3A – dialysed samples with antioxidant after 72h
Values of N0 and N3, N3A, D3, D3A, marked by different lowercase letters, differ significantly ($P < 0.05$). Values of N3, N3A, D3, D3A marked by different uppercase letters for each parameter differ significantly ($P < 0.05$).

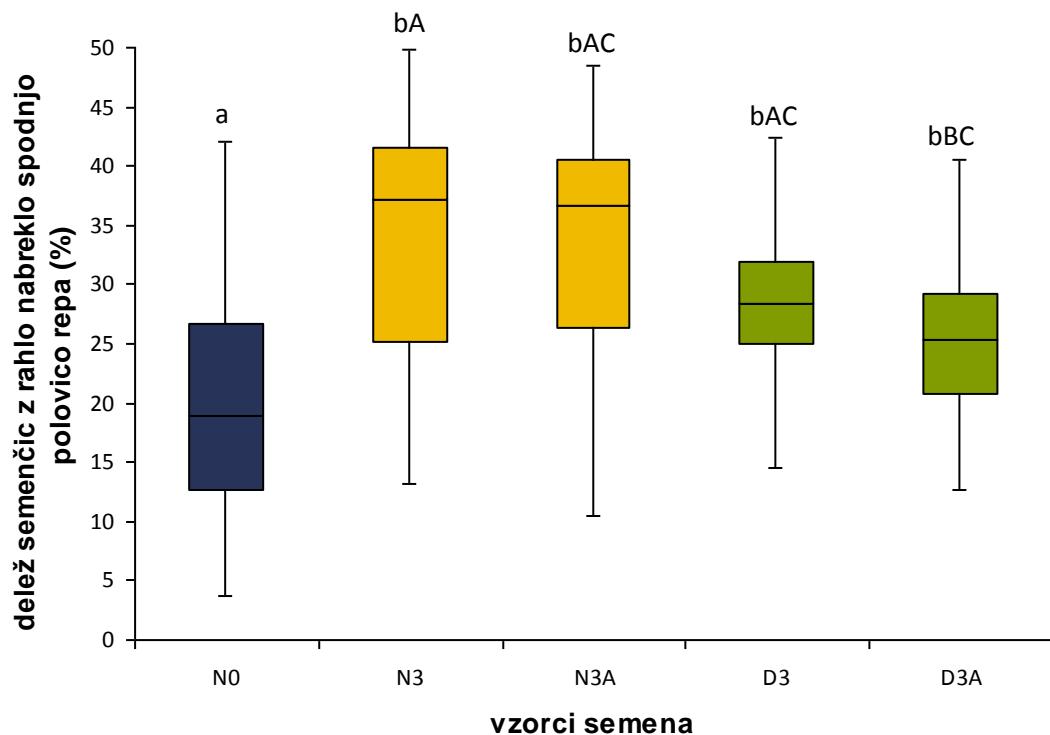
4.3.3 INTEGRITETA PLAZEMSKE MEMBRANE SEMENČIC

Rezultati analiz hipoozmotskega testa v nativnih vzorcih in pri različnih skupinah kratkotrajno hranjenega semena so prikazani v prilogi 11.

Delež semenčic z nenabreklimi repi (A) in z nabreklo konico repa (B) se je statistično značilno povečal v vseh skupinah hranjenega semena v primerjavi z nativnim vzorcem ($P <$

0,05). Med posameznimi skupinami hrjanenega semena v kategoriji nenabreklih repov (A) ni bilo statistično značilnih razlik ($P > 0,05$) (priloga 11).

Delež semenčic z rahlo nabreklo konico repa (B) je bil višji v obeh skupinah nedializiranega semena (N3 in N3A) v primerjavi z obema skupinama dializiranega semena (D3 in D3A), vendar je bila statistično značilna razlika le med skupinama nedializiranega semena brez dodatka antioksidanta (N3) in dializiranega semena z dodatkom antioksidanta (D3A) ($P < 0,05$) (slika 30).



Slika 30: Grafični prikaz deleža semenčic z rahlo nabreklo spodnjo polovico repa v nativnih vzorcih in različnih skupinah kratkotrajno hrjanenega semena

Figure 30: Graphic demonstration of the proportions of spermatozoa with a tail swollen at the tip in native samples and in different groups of short-term stored semen

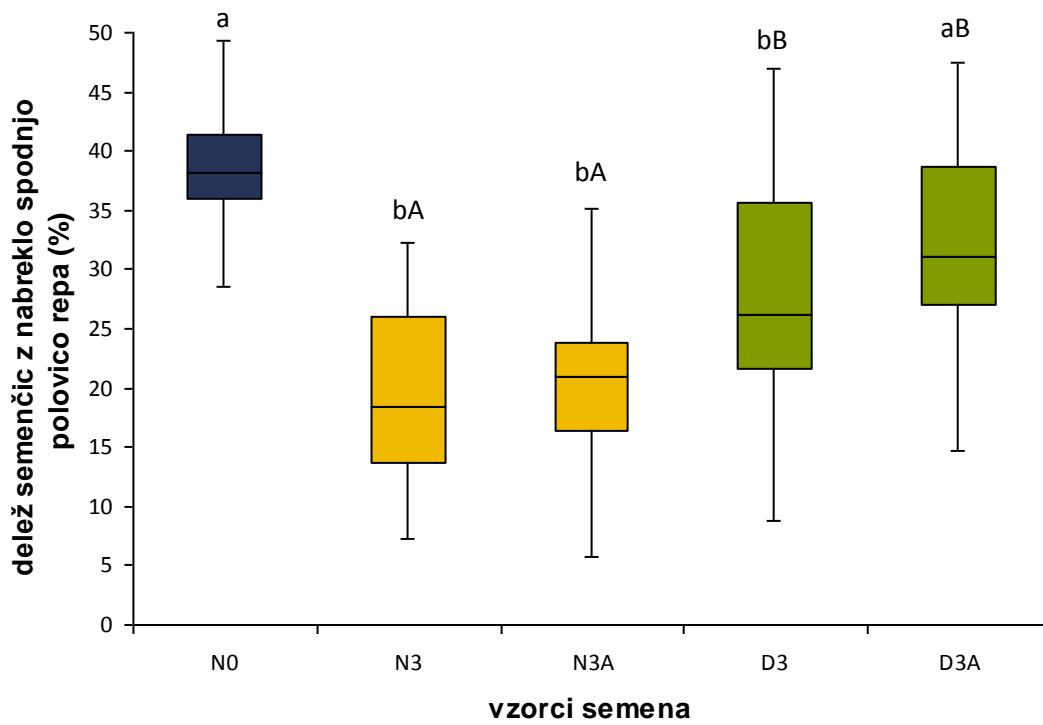
Legenda: N0 – nativni vzorci; N3 – nedializirani vzorci po 72h; N3A – nedializirani vzorci z dodatkom antioksidanta po 72h; D3 – dializirani vzorci po 72h; D3A – dializirani vzorci z dodatkom antioksidanta po 72h

Vrednosti parametra vzorcev N0, ki so se statistično značilno razlikovale ($P < 0,05$) od vzorcev N3, N3A, D3, D3A, so označene z različnimi malimi črkami. Vrednosti parametrov vzorcev N3, N3A, D3, D3A, ki so se med seboj statistično značilno razlikovale ($P < 0,05$), so označene z različnimi velikimi črkami.

Legend: N0 – native samples; N3 – non-dialysed samples after 72h; N3A – non-dialysed samples with antioxidant after 72h; D3 – dialysed samples after 72h; D3A – dialysed samples with antioxidant after 72h

Values of N0 and N3, N3A, D3, D3A, marked by different lowercase letters, differ significantly ($P < 0.05$). Values of N3, N3A, D3, D3A marked by different uppercase letters for each parameter differ significantly ($P < 0.05$).

Delež semenčic z nabreklo spodnjo polovico repa (C) se je statistično značilno zmanjšal glede na nativno seme v vseh skupinah kratkotrajno hranjenega semena ($P < 0,05$), razen v skupini dializiranega semena z dodatkom antioksidanta (D3A), pri katerem razlika ni bila statistično značilna ($P > 0,05$). Po 72 urah hranjenja sta imeli obe skupini dializiranega semena (D3 in D3A) statistično značilno večji delež semenčic z nabreklo spodnjo polovico repa (C) v primerjavi z obema skupinama nedializiranega semena (N in N3A) ($P < 0,05$). Med obema nedializiranim skupinama (N3 in N3A) in obema dializiranim skupinama (D3 in D3A) ni bilo statistično značilnih razlik ($P > 0,05$) (slika 31).



Slika 31: Grafični prikaz deleža semenčic z nabreklo spodnjo polovico repa v nativnih vzorcih in v različnih skupinah kratkotrajno hranjenega semena

Figure 31: Graphic demonstration of proportion of spermatozoa with swelling of the tail's distal half in native samples and in different groups of short-term stored semen

Legenda: N0 – nativni vzorci; N3 – nedializirani vzorci po 72h; N3A – nedializirani vzorci z dodatkom antioksidanta po 72h; D3 – dializirani vzorci po 72h; D3A – dializirani vzorci z dodatkom antioksidanta po 72h

Vrednosti parametra vzorcev N0, ki so se statistično značilno razlikovale ($P < 0,05$) od vzorcev N3, N3A, D3, D3A, so označene z različnimi malimi črkami. Vrednosti parametrov vzorcev N3, N3A, D3, D3A, ki so se med seboj statistično značilno razlikovale ($P < 0,05$), so označene z različnimi velikimi črkami.

Legend: N0 – native samples; N3 – non-dialysed samples after 72h; N3A – non-dialysed samples with antioxidant after 72h; D3 – dialysed samples after 72h; D3A – dialysed samples with antioxidant after 72h

Values of N0 and N3, N3A, D3, D3A, marked by different lowercase letters, differ significantly ($P < 0.05$).

Values of N3, N3A, D3, D3A marked by different uppercase letters for each parameter differ significantly ($P < 0.05$).

Delež semenčic, nabreklih po celotni dolžini repa (D), se je statistično značilno zmanjšal v vseh skupinah kratkotrajno hranjenega semena v primerjavi z nativnim semenom ($P < 0,05$). Med posameznimi skupinami hranjenega semena ni bilo statistično značilnih razlik ($P > 0,05$) (priloga 11).

Delež semenčic z vrečastimi repi (E) je ostal nespremenjen; med nativnim semenom in vsemi skupinami hranjenega semena ni bilo statistično značilnih razlik ($P < 0,05$) (priloga 11).

4.3.4 PRESNOVNA AKTIVNOST SEMENČIC

Presnovna aktivnost semenčic se je v primerjavi z nativnim semenom ($A_{610} = 0,021 \pm 0,024$) po 72 urah hranjenja znižala v vseh skupinah semena, vendar razlika ni bila statistično značilna ($P > 0,05$). Presnovna aktivnost semenčic se med skupinami kratkotrajno hranjenega semena ni statistično značilno razlikovala ($P > 0,05$).

4.3.5 KAPACITACIJA SEMENČIC

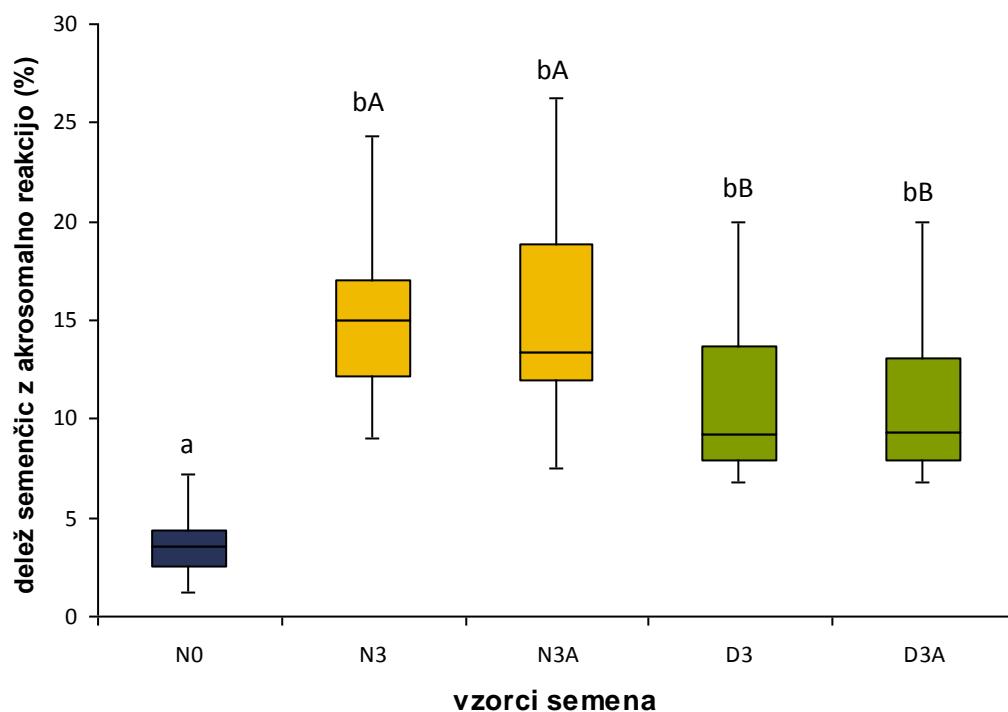
Deleži kapacitiranih, nekapacitiranih semenčic in semenčic z akrosomsko reakcijo v nativnih vzorcih in pri različnih skupinah kratkotrajno hranjenega semena so prikazani v prilogi 12.

Delež nekapacitiranih semenčic se je po kratkotrajnem hranjenju statistično značilno zmanjšal v vseh štirih skupinah v primerjavi z nativnim vzorcem ($P < 0,05$). Razlika v deležu

nekapacitiranih in kapacitiranih semenčic med različnimi skupinami po hranjenju ni bila statistično značilna ($P > 0,05$).

Delež kapacitiranih semenčic in delež semenčic z akrosomsko reakcijo se je po kratkotrajnem hranjenju statistično značilno povečal v vseh štirih skupinah v primerjavi z nativnim vzorcem ($P < 0,05$).

Iz grafa (slika 32) je razvidno, da sta imeli obe skupini nedializiranega semena (N3 in N3A) statistično značilno večji delež semenčic z akrosomsko reakcijo v primerjavi z obema skupinama dializiranega semena (D3 in D3A) ($P < 0,05$). Statistično značilnih razlik nismo opazili med skupinama dializiranega semena (D3 in D3A) ter med skupinama nedializiranega semena (N3 in N3A) ($P > 0,05$).



Slika 32: Grafični prikaz deleža semenčic z akrosomsko reakcijo v nativnih vzorcih in različnih skupinah kratkotrajno hranjenega semena

Figure 32: Graphic demonstration of proportion of acrosome reacted spermatozoa in native samples and in different groups of short-term stored semen

Legenda: N0 – nativni vzorci; N3 – nedializirani vzorci po 72h; N3A – nedializirani vzorci z dodatkom antioksidanta po 72h; D3 – dializirani vzorci po 72h; D3A – dializirani vzorci z dodatkom antioksidanta po 72h

Vrednosti parametra vzorcev N0, ki so se statistično značilno razlikovale ($P < 0,05$) od vzorcev N3, N3A, D3, D3A, so označene z različnimi malimi črkami. Vrednosti parametrov vzorcev N3, N3A, D3, D3A, ki so se med seboj statistično značilno razlikovale ($P < 0,05$), so označene z različnimi velikimi črkami.

Legend: N0 – native samples; N3 – non-dialysed samples after 72h; N3A – non-dialysed samples with antioxidant after 72h; D3 – dialysed samples after 72h; D3A – dialysed samples with antioxidant after 72h
Values of N0 and N3, N3A, D3, D3A, marked by different lowercase letters, differ significantly ($P < 0.05$).
Values of N3, N3A, D3, D3A marked by different uppercase letters for each parameter differ significantly ($P < 0.05$).

4.3.6 KAPACITACIJA SEMENČIC PO IZPOSTAVITVI SEMENA MEDIJU ZA KAPACITACIJO

Deleži kapacitiranih, nekapacitiranih semenčic in semenčic z akrosomsko reakcijo (po izpostavitvi semenčic mediju za kapacitacijo) v nativnih vzorcih in pri različnih skupinah kratkotrajno hranjenega semena so prikazani v prilogi 13.

Delež nekapacitiranih semenčic je bil po izpostavitvi kratkotrajno hranjenega semena mediju za kapacitacijo enak deležu omenjenih semenčic v nativnem semenu ($P > 0,05$).

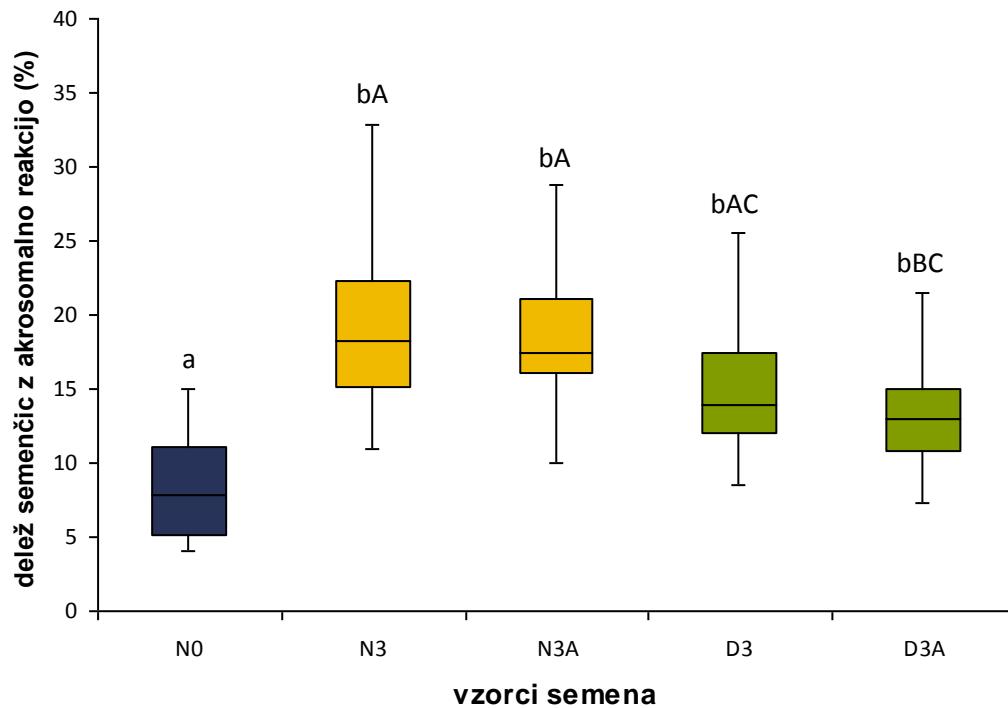
Razlika v deležu nekapacitiranih semenčic med različnimi skupinami kratkotrajno hranjenega semena ni bila statistično značilna ($P > 0,05$).

Delež kapacitiranih semenčic v vseh skupinah semena po hranjenju se je v testu po izpostavitvi kratkotrajno hranjenega semena mediju za kapacitacijo statistično značilno zmanjšal pri obeh skupinah kratkotrajno hranjenega nedializiranega semena (N3 in N3A) v primerjavi z nativnim vzorcem ($P < 0,05$), medtem ko med obema skupinama dializiranega semena (D3 in D3A) in nativnim vzorcem ni bilo statistično značilnih razlik ($P > 0,05$). Med različnimi skupinami kratkotrajno hranjenega semena ni bilo statistično značilnih razlik v deležu kapacitiranih semenčic ($P > 0,05$).

Delež semenčic z akrosomsko reakcijo se je statistično značilno povečal v vseh štirih skupinah kratkotrajno hranjenega semena v primerjavi z nativnim vzorcem tudi v testu po izpostavitvi vzorcev mediju za kapacitacijo ($P < 0,05$).

Iz grafa (slika 33) je razvidno, da sta imeli obe skupini nedializiranega semena (N3 in N3A) večji delež semenčic z akrosomsko reakcijo v primerjavi z obema skupinama dializiranega semena (D3 in D3A). Dializirano seme z dodatkom antioksidantov (D3A) je imelo statistično značilno manjši delež semenčic z akrosomsko reakcijo v primerjavi z obema

skupinama nedializiranega semena ($P < 0,05$). Med ostalimi skupinami ni bilo statistično značilnih razlik ($P > 0,05$).



Slika 33: Grafični prikaz deleža semenčic z akrosomsko reakcijo v nativnih vzorcih in različnih skupinah kratkotrajno hranjenega semena po izpostavitvi semena mediju za kapacitacijo

Figure 33: Graphic demonstration of proportions of acrosome reacted spermatozoa in native samples and in different groups of short-term stored semen after semen incubation in capacitating medium

Legenda: N0 – nativni vzorci; N3 – nedializirani vzorci po 72h; N3A – nedializirani vzorci z dodatkom antioksidanta po 72h; D3 – dializirani vzorci po 72h; D3A – dializirani vzorci z dodatkom antioksidanta po 72h

Vrednosti parametra vzorcev N0, ki so se statistično značilno razlikovale ($P < 0,05$) od vzorcev N3, N3A, D3, D3A, so označene z različnimi malimi črkami. Vrednosti parametrov vzorcev N3, N3A, D3, D3A, ki so se med seboj statistično značilno razlikovale ($P < 0,05$), so označene z različnimi velikimi črkami.

Legend: N0 – native samples; N3 – non-dialysed samples after 72h; N3A – non-dialysed samples with antioxidant after 72h; D3 – dialysed samples after 72h; D3A – dialysed samples with antioxidant after 72h

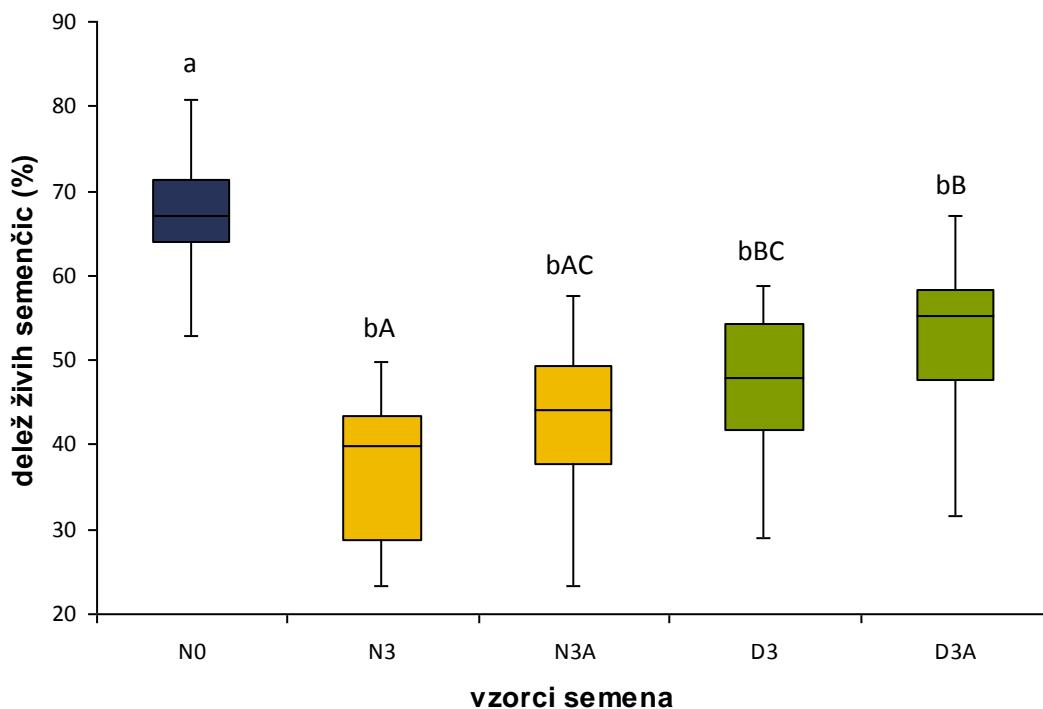
Values of N0 and N3, N3A, D3, D3A, marked by different lowercase letters, differ significantly ($P < 0.05$). Values of N3, N3A, D3, D3A marked by different uppercase letters for each parameter differ significantly ($P < 0.05$).

4.3.7 MEMBRANSKI POTENCIAL SEMENČIC

V prilogi 14 so prikazani rezultati kategorij semenčic, dobljenih v testu membranskega potenciala v nativnih vzorcih in pri različnih skupinah kratkotrajno hranjenega semena.

Delež živih in mrtvih semenčic

Delež živih semenčic se je v primerjavi z nativnimi vzorci statistično značilno zmanjšal, mrtvih pa povečal v vseh skupinah kratkotrajno hranjenega semena ($P < 0,05$). Prav tako je bila statistično značilna razlika ugotovljena med posameznimi skupinami semena po 72 urah hranjenja. Obe skupini dializiranega semena (D3 in D3A) sta imeli statistično značilno večji delež živih in manjši delež mrtvih semenčic v primerjavi s skupino nedializiranega semena brez dodatka antioksidanta (N3) ($P < 0,05$). Dializirano seme z dodatkom antioksidanta (D3A) je imelo po 72 urah hranjenja v primerjavi z obema nedializiranim skupinama statistično značilno večji delež živih in manjši delež mrtvih semenčic ($P < 0,05$). Med dializiranim (D3 in D3A) in nedializiranim skupinama semena (N3 in N3A) ni bilo statistično značilnih razlik ($P > 0,05$). Prikazana grafa (Sliki 34 in 35) prikazujeta delež živih in mrtvih semenčic v nativnih vzorcih in pri različnih skupinah kratkotrajno hranjenega semena.



Slika 34: Grafični prikaz deleža živih semenčic (YoPro-1-/PI-) v nativnih vzorcih in različnih skupinah kratkotrajno hranjenega semena

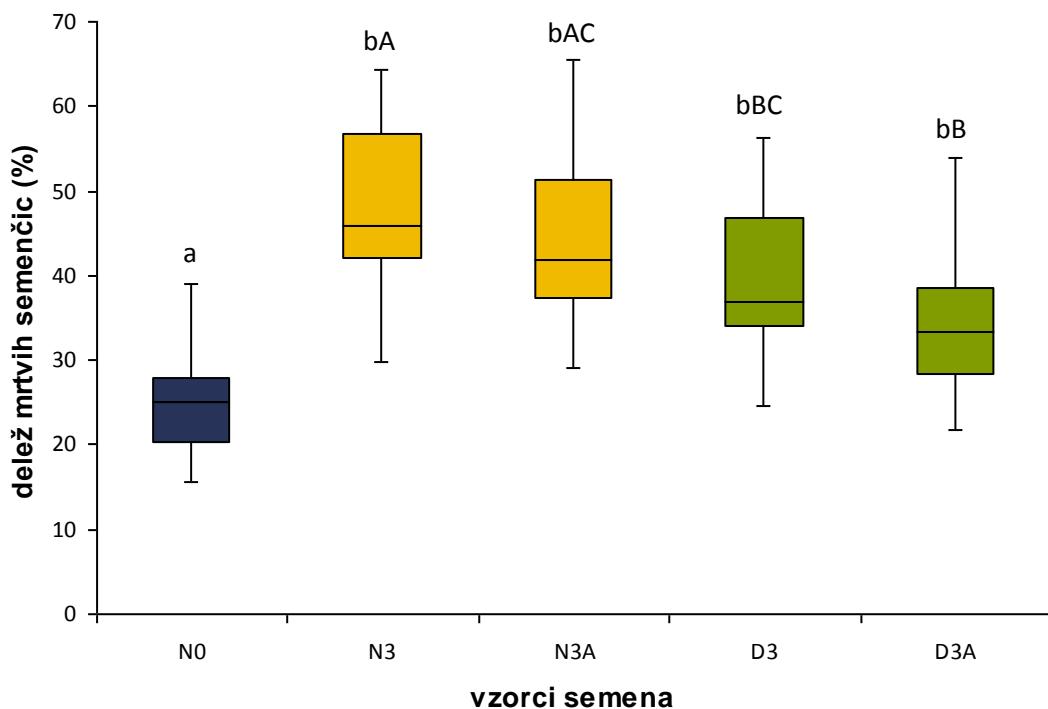
Figure 34: Graphic demonstrations of proportion of live spermatozoa (YoPro-1-/PI-) in native samples and in different groups of short-term stored semen

Legenda: N0 – nativni vzorci; N3 – nedializirani vzorci po 72h; N3A – nedializirani vzorci z dodatkom antioksidanta po 72h; D3 – dializirani vzorci po 72h; D3A – dializirani vzorci z dodatkom antioksidanta po 72h

Vrednosti parametrov vzorcev N0, ki so se statistično značilno razlikovale ($P < 0,05$) od vzorcev N3, N3A, D3, D3A, so označene z različnimi malimi črkami. Vrednosti parametrov vzorcev N3, N3A, D3, D3A, ki so se med seboj statistično značilno razlikovale ($P < 0,05$), so označene z različnimi velikimi črkami.

Legend: N0 – native samples; N3 – non-dialysed samples after 72h; N3A – non-dialysed samples with antioxidant after 72h; D3 – dialysed samples after 72h; D3A – dialysed samples with antioxidant after 72h

Values of N0 and N3, N3A, D3, D3A, marked by different lowercase letters, differ significantly ($P < 0.05$). Values of N3, N3A, D3, D3A marked by different uppercase letters for each parameter differ significantly ($P < 0.05$).



Slika 35: Grafični prikaz deleža mrtvih semenčic (YoPro-1 +/PI +) v nativnih vzorcih in različnih skupinah kratkotrajno hranjenega semena

Figure 35: Graphic demonstration of the proportion of dead spermatozoa (YoPro-1 +/PI +) in native samples and those in different groups of short-term stored semen

Legenda: N0 – native samples; N3 – non-dialysed samples after 72h; N3A – non-dialysed samples with antioxidant after 72h; D3 – dialysed samples after 72h; D3A – dialysed samples with antioxidant after 72h

Vrednosti parametrov vzorcev N0, ki so se statistično značilno razlikovale ($P < 0,05$) od vzorcev N3, N3A, D3, D3A, so označene z različnimi malimi črkami. Vrednosti parametrov vzorcev N3, N3A, D3, D3A, ki so se med seboj statistično značilno razlikovale ($P < 0,05$), so označene z različnimi velikimi črkami.

Legend: N0 – native samples; N3 – non-dialysed samples after 72h; N3A – non-dialysed samples with antioxidant after 72h; D3 – dialysed samples after 72h; D3A – dialysed samples with antioxidant after 72h

Values of N0 and N3, N3A, D3, D3A, marked by different lowercase letters, differ significantly ($P < 0.05$). Values of N3, N3A, D3, D3A marked by different uppercase letters for each parameter differ significantly ($P < 0.05$).

Delež nekrotičnih semenčic in semenčic z znaki zgodnje apoptoze

Delež nekrotičnih semenčic se med nativnim vzorcem in skupinami semena po kratkotrajanem hranjenju ni razlikoval ($P > 0,05$) (priloga 14).

Delež semenčic z znaki zgodnje apoptoze je bil statistično značilno večji v vseh skupinah kratkotrajno hranjenega semena v primerjavi z nativnim vzorcem ($P < 0,05$). Med skupinami kratkotrajno hranjenega semena ni bilo statistično značilnih razlik (priloga 14).

4.3.8 MITOHONDRIJSKI POTENCIAL SEMENČIC

Priloga 15 prikazuje delež semenčic s porušenim notranjim mitohondrijskim potencialom (MP) v nativnih vzorcih in pri različnih skupinah kratkotrajno hranjenega semena.

Vzorci semena so imeli po kratkotrajanem hranjenju pri večini skupin statistično značilno večji delež semenčic s porušenim mitohondrijskim potencialom v primerjavi z nativnim vzorcem ($P < 0,05$). Izjema so bili le vzorci skupine dializiranega semena z dodatkom antioksidanta (D3A), pri katerih ni prišlo do statistično značilnega povečanja deleža semenčic z izgubljenim mitohondrijskim potencialom v primerjavi z nativnimi vzorci ($P > 0,05$). Razlika v porušenem mitohondrijskem potencialu med različnimi skupinami po 72 urah hranjenja ni bila statistično značilna ($P > 0,05$).

4.3.9 DNK FRAGMENTACIJA

Priloga 16 prikazuje fragmentacijo DNK v nativnih vzorcih in pri različnih skupinah kratkotrajno hranjenega semena.

Vzorci semena so imeli po kratkotrajanem hranjenju večji delež semenčic s fragmentirano DNK v primerjavi z nativnimi vzorci. Delež semenčic z ničnim oz. malim "halo" efektom je bil statistično značilno večji pri vseh skupinah hranjenega semena v primerjavi z nativnim vzorcem ($P < 0,05$). Statistično značilno večji delež velikega "halo" efekta smo zaznali tudi med večino skupin hranjenega semena v primerjavi z nativnim vzorcem ($P < 0,05$). Izjema je bil le vzorec iz skupine dializiranega semena z dodatkom antioksidanta (D3A), kjer razlika ni bila statistično značilna ($P > 0,05$). V nasprotju s tem je bil normalen "halo" efekt statistično značilno večji v nativnem vzorcu v primerjavi z vsemi skupinami hranjenega semena ($P < 0,05$) z izjemo skupine dializiranega semena z dodatkom antioksidanta (D3A), kjer razlika ni bila statistično značilna ($P > 0,05$). Med posameznimi skupinami kratkotrajno hranjenega semena ni bilo statistično značilnih razlik v DNK fragmentaciji ($P > 0,05$).

4.3.10 PARAMETRI OKSIDATIVNEGA STRESA

Vrednosti parametrov oksidativnega stresa v nativnih vzorcih in pri različnih skupinah kratkotrajno hranjenega semena so prikazane v prilogi 17.

4.3.10.1 CELOKUPNA ANTIOKSIDANTNA KAPACITETA (TAC)

Tako po dializi semena se je TAC v semenski plazmi statistično značilno znižala iz začetnih $901,8 \pm 142,2 \mu\text{mol/l}$ v nativnih vzorcih na $749,5 \pm 103,8 \mu\text{mol/l}$ v dializiranih vzorcih na dan odvzema ($P < 0,05$). Po 72 urah hranjenja semena se je TAC v semenski plazmi pri vseh skupinah sicer znižala v primerjavi z nativnim vzorcem, vendar razlika ni bila statistično značilna ($P > 0,05$). Med posameznimi skupinami kratkotrajno hranjenega semena ni bilo statistično značilnih razlik ($P > 0,05$).

4.3.10.2 SUPEROKSID DISMUTAZA (SOD)

Aktivnost encima SOD se je v primerjavi z nativnim semenom statistično značilno povečala pri vseh skupinah kratkotrajno hranjenega semena ($P < 0,05$). Aktivnost SOD je bila najnižja pri dializiranih vzorcih z dodatkom antioksidanta (D3A), vendar med skupinami kratkotrajno hranjenega semena ni bilo statistično značilnih razlik ($P > 0,05$). Razlika na meji statistične značilnosti ($P = 0,07$) je bila opazna med dializiranim semenom z dodatkom antioksidanta (D3A) in nedializiranim semenom brez dodatka antioksidanta (N3).

4.3.10.3 TBARS

V primerjavi z nativnim vzorcem se je stopnja lipidne peroksidacije, merjena s TBARS, statistično značilno povečala v vseh skupinah hranjenega semena ($P < 0,05$), z izjemo skupine dializiranega semena z dodatkom antioksidanta (D3A), kjer razlika ni bila statistično značilna ($P > 0,05$). Med posameznimi skupinami kratkotrajno hranjenega semena ni bilo statistično značilnih razlik v stopnji lipidne peroksidacije ($P > 0,05$). Stopnja lipidne peroksidacije med skupinama dializiranega semena (D3 in D3A) ni bila statistično značilna ($P = 0,081$).

4.3.10.4 8-ISOPROSTAN

Koncentracija 8-isoprostana se je povečala v večini skupin kratkotrajno hranjenega semena v primerjavi z nativnim vzorcem ($P < 0,05$), izjema je bila le skupina dializiranega semena z dodatkom antioksidanta (D3A), kjer ni bilo statistično značilne razlike ($P > 0,05$). Statistično značilnih razlik v koncentraciji 8-isoprostana med posameznimi skupinami kratkotrajno hranjenega semena ni bilo ($P > 0,05$). Dializirano seme brez dodatka antioksidanta (D3) je imelo najvišjo stopnjo lipidne peroksidacije, dializirano seme z dodatkom antioksidanta (D3A) pa najnižjo. Statistično značilnih razlik med skupinama ni bilo ($P = 0,08$).

Posamezni parametri semena so zbrani v skupni shemi. Vzorci so glede na povprečne vrednosti parametrov semena razvrščeni od najboljše kakovosti (številka 1) do najslabše kakovosti (številka 5). Vzorci, ki se statistično značilno ne razlikujejo od nativnega vzorca, so obrobljeni s črno barvo (slika 36).

Parameter	Razvrstitev vzorcev				
	1	2	3	4	5
Gibljivost (%)	N0	D3A	D3	N3A	N3
Progresivna gibljivost (%)	N0	D3A	D3	N3A	N3
Morfološko norm. semenčice (%)	N0	D3A	D3	N3	N3A
Nekapacitirane semenčice (%)	N0	D3	D3A	N3A	N3
Kapacitirane semenčice (%)	N0	D3A	D3	N3A	N3
Semenčice z AR (%)	N0	D3A	D3	N3A	N3
Žive semenčice (%)	N0	D3A	D3	N3A	N3
Porušen MP (%)	N0	D3A	D3	N3A	N3
DNK fragmentacija (normalen "halo") (%)	N0	D3A	N3	N3A	D3
TAC ($\mu\text{mol/l}$)	N0	N3A	N3	D3A	D3
SOD (U/ml)	N0	D3A	N3A	D3	N3
TBARS ($\mu\text{mol/l}$)	N0	D3A	N3A	N3	D3
8-isoprostan (ng/ml)	N0	D3A	N3A	N3	D3

Slika 36: Razvrstitev vzorcev glede na posamezen parameter
Figure 36: Clasification of semen samples according to semen parameter

Legenda: N0 – nedializirani vzorci na dan 0; N3 – nedializirani vzorci po 72h; N3A – nedializirani vzorci z dodatkom antioksidanta po 72h; D3 – dializirani vzorci po 72h; D3A – dializirani vzorci z dodatkom antioksidanta po 72h; Semenčice z AR – semenčice z akrosomsko reakcijo; Porušen MP – porušen

ZAKOŠEK PIPAN M. Vpliv odstranitve nizkomolekulskih ... na oksidativni status in lastnosti ... semena ...

Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2014. Doktorska disertacija

mitochondrijski potencial; TAC – skupna antioksidantna kapaciteta; SOD – superoksid dismutaza; TBARS – lipidna peroksidacija določena s testom TBARS

Legend: N0 – non- dialysed samples on day 0; N3 – non-dialysed samples after 72h; N3A – non-dialysed samples with antioxidant after 72h; D3 – dialysed samples after 72h; D3A – dialysed samples with antioxidant after 72h; Semenčice z AR – acrosome reacted spermatozoa; Porušen MP – loss of mitochondrial potential; TAC – total antioxidant capacity; SOD – superoxide dismutase; TBARS – lipid peroxidation measured with TBARS assay

Posamezni parametri semena po 72 urah hranjenja so zbrani v skupni shemi. Vzorci so glede na povprečne vrednosti parametrov semena razvrščeni od najboljše kakovosti (številka 1) do najslabše kakovosti (številka 4).

V primeru, da se vzorec statistično značilno razlikuje od dializiranega vzorca z dodatkom antioksidantna (D3A) je obrobljen s črno barvo (slika 37).

Parameter	Razvrstitev vzorcev			
	1	2	3	4
Gibljivost (%)	D3A	D3	N3A	N3
Progresivna gibljivost (%)	D3A	D3	N3A	N3
Morfološko norm. semenčice (%)	D3A	D3	N3	N3A
Nekapacitirane semenčice (%)	D3	D3A	N3A	N3
Kapacitirane semenčice (%)	D3A	D3	N3A	N3
Semenčice z AR (%)	D3A	D3	N3A	N3
Žive semenčice (%)	D3A	D3	N3A	N3
Porušen MP (%)	D3A	D3	N3A	N3
DNK fragmentacija (normalen "halo") (%)	D3A	N3	N3A	D3
TAC ($\mu\text{mol/l}$)	N3A	N3	D3A	D3
SOD (U/ml)	D3A	N3A	D3	N3
TBARS ($\mu\text{mol/l}$)	D3A	N3A	N3	D3
8-isoprostan (ng/ml)	D3A	N3A	N3	D3

Slika 37: Razvrstitev vzorcev glede na posamezen parameter.

Figure 37: Clasification of semen samples according to semen parameter

Legenda: N3 – nedializirani vzorci po 72h; N3A – nedializirani vzorci z dodatkom antioksidanta po 72h; D3 – dializirani vzorci po 72h; D3A – dializirani vzorci z dodatkom antioksidanta po 72h; Semenčice z AR – semenčice z akrosomsko reakcijo; Porušen MP – porušen mitohondriski potencial; TAC – skupna

ZAKOŠEK PIPAN M. Vpliv odstranitve nizkomolekulskih ... na oksidativni status in lastnosti ... semena ...

Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2014. Doktorska disertacija

antioksidantna kapaciteta; SOD – superoksid dismutaza; TBARS –lipidna peroksidacija določena s testom TBARS

Legend: N3 – non-dialysed samples after 72h; N3A – non-dialysed samples with antioxidant after 72h; D3 – dialysed samples after 72h; D3A – dialysed samples with antioxidant after 72h; Semenčice z AR – acrosome reacted spermatozoa; Porušen MP – loss of mitochondrial potential; TAC – total antioxidant capacity; SOD – superoxide dismutase; TBARS – lipid peroxidation measured with TBARS assay

4.4 POTENCIJALNI DIAGNOSTIČNI POKAZATELJI KAKOVOSTI KRATOKTRAJNO HRANJENEGA SEMENA

Spermanov koeficient korelacije rangov med pokazatelji oksidativnega stresa in osnovnimi semenskimi parametri na dan odvzema semena in po 72 urah hranjenja je prikazan v tabeli 2.

Tabela 2: Korelacje med pokazatelji oksidativnega stresa in osnovnimi semenskimi parametri**Table 2:** Correlations between oxidative stress markers and basic semen parameters

Semenski parametri 3. dan	Semenski parametri – dan odvzema semena							
	Gibljivost	PG	MN	Žive	K + AR	TAC	TBARS	SOD
Gibljivost	0,502*	0,162	0,161	0,438^a	-0,324	-0,135	-0,480*	-0,187
PG	0,211	0,493*	0,559*	0,148	0,017	-0,120	0,123	-0,686*
MN	0,265	0,421^a	0,819**	0,189	-0,168	-0,365	0,020	-0,423^a
Žive	0,330	0,298	0,374	0,319	-0,172	0,154	-0,309	-0,513*
K + AR	0,005	-0,377	-0,093	0,046	0,009	0,282	0,135	0,346
TAC	-0,041	0,092	-0,205	0,141	0,141	0,918**	-0,473^a	0,223
TBARS	0,113	-0,182	0,189	-0,288	-0,270	0,220	0,463^a	-0,186
SOD	0,020	-0,494*	-0,424^a	0,001	0,001	-0,192	-0,250	0,407

Legenda: PG – progresivna gibljivost; MN – morfološko normalne; Žive – žive semenčice; K + AR – kapacitirane semenčice in semenčice z akrosomsko reakcijo; TAC – celokupna antioksidantna kapaciteta; SOD – superoksid dismutaza; TBARS – produkti, ki reagirajo s tiobarbiturno kislino; *P < 0,05; **P < 0,001; ^a: 0,05 < P < 0,1

Legend: PG – progressive motility; MN – morphologically normal spermatozoa; TAC- total antioxidant capacity; SOD- superoxide dismutase; TBARS - thiobarbituric acid reactive substances; *P < 0.05; **P < 0.001; ^a: 0.05 < P < 0.1

Delež gibljivih semenčic in delež živih semenčic je na dan odvzema semena pozitivno koreliral le z deležem gibljivih semenčic po 72 urah hranjenja ($r = 0,502$; $P < 0,005$, $r = 0,438$; $0,05 < P < 0,1$). Delež progresivno gibljivih semenčic je na dan odvzema semena pozitivno koreliral z deležem progresivno gibljivih semenčic ($r = 0,493$; $P < 0,05$) ter negativno koreliral z aktivnostjo SOD ($r = -0,494$; $P < 0,05$) po 72 urah hranjenja. Delež morfološko normalnih semenčic na dan odvzema semena je močno pozitivno koreliral z deležem morfološko normalnih semenčic ($r = 0,819$; $P < 0,05$) in deležem progresivno gibljivih semenčic ($r = 0,559$; $P < 0,05$) po 72 urah hranjenja semena. Delež kapacitiranih semenčic in semenčic z akrosomsko reakcijo na dan odvzema semena ni statistično značilno koreliral z nobenim od parametrov po 72 urah hranjenja semena ($P > 0,05$).

Aktivnost SOD v semenski plazmi, izmerjena na dan odvzema semena, je statistično značilno negativno korelirala s progresivno gibljivostjo ($r = -0,686$; $P < 0,05$) in z deležem živih semenčic ($r = -0,513$; $P < 0,05$) po 72 urah hranjenja.

TBARS na dan odvzema semena je negativno koreliral z deležem skupno gibljivih semenčic po 72 urah hranjenja ($r = -0,480$; $P < 0,05$). Med TAC na dan odvzema semena in posameznimi semenskimi parametri po 72 urah hranjenja semena ni bilo prisotnih statistično značilnih korelacij ($P > 0,05$).

V tabeli 2 so prikazane korelacje med parametri oksidativnega stresa na dan odvzema in po 72 urah hranjenja semena. TAC, izmerjen v sveži semenski plazmi, je močno pozitivno koreliral s TAC v hranjenem semenu ($r = 0,918$, $P < 0,05$), negativna korelacija s TBARS v hranjenem semenu pa je bila nad mejo statistične značilnosti ($r = -0,473$; $0,05 < P < 0,1$). TBARS in SOD na dan odvzema semena nista statistično značilno korelirala z ostalimi parametri oksidativnega stresa ($P > 0,05$).

4.4.1 KORELACIJE MED PARAMETRI OKSIDATIVNEGA STRESA IN KAKOVOSTJO SEMENA PO 72 URAH HRANJENJA

Spermanov koeficient korelacije rangov med pokazatelji oksidativnega stresa in osnovnimi semenskimi parametri po 72 urah hranjenja je prikazan v tabeli 3.

Tabela 3: Korelacje med pokazatelji oksidativnega stresa v semenski plazmi in med osnovnimi semenskimi parametri po treh dneh hranjanje semena

Table 3: Correlations between oxidative stress markers in seminal plasma and basic semen parameters after 3 days of storage

Pokazatelji oksidativnega stresa 3. dan	Semenski parametri 3. dan				
	G	PG	MN	Žive	K + AR
TAC	- 0,264	- 0,183	- 0,348	0,236	0,205
TBARS	0,217	- 0,123	0,094	- 0,378	0,032
SOD	- 0,429^a	- 0,775**	- 0,620*	- 0,188	0,544*

Legenda: PG – progresivna gibljivost; MN – morfološko normalne; Žive – žive semenčice; K + AR – kapacitirane semenčice in semenčice z akrosomsko reakcijo; TAC – celokupna antioksidantna kapaciteta; SOD – superoksid dismutaza; TBARS – produkti, ki reagirajo s tiobarbiturno kislino; *P < 0,05; **P < 0,001; ^a: 0,05 < P < 0,1

Legend: PG – progressive motility; MN – morphologically normal spermatozoa; Žive – live spermatozoa; K + AR – capacitated and acrosome reacted spermatozoa; TAC – total antioxidant capacity; SOD – superoxide dismutase; TBARS – thiobarbituric acid reactive substances; *P < 0.05; **P < 0.001; ^a: 0.05 < P < 0.1

TAC in TBARS, izmerjena v semenski plazmi po 72 urah hranjenja semena, nista statistično značilno korelirala z nobenim od navedenih semenskih parametrov (P > 0,05).

Aktivnost SOD, izmerjena v semenski plazmi po 72 urah hranjenja, je statistično značilno negativno korelirala s progresivno gibljivostjo ($r = -0,775$; $P < 0,05$) in deležem morfološko normalnih semenčic ($r = -0,620$; $P < 0,05$) po 72 urah hranjenja. Aktivnost SOD je močno pozitivno korelirala z deležem kapacitiranih semenčic in semenčic z akrosomsko reakcijo ($r = 0,544$; $P < 0,05$).

ZAKOŠEK PIPAN M. Vpliv odstranitve nizkomolekulskih ... na oksidativni status in lastnosti ... semena ...

Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2014. Doktorska disertacija

**4.4.2 DIAGNOSTIČNO VREDNOTENJE SOD IN TBARS V SEMENSKI PLAZMI NA DAN
ODVZEMA SEMENA Z VIDIKA NAPOVEDI KAKOVOSTI KRATKOTRAJNO HRANJENEGA
MERJAŠČEVEGA SEMENA**

Tabela 4 prikazuje diagnostične parametre za SOD in TBARS v semenski plazmi na dan odvzema semena glede na tiste semenske parametre, pri katerih smo ugotovili statistično značilne korelacije z omenjenima parametromi oksidativnega stresa. Priloga 18 prikazuje število vzorcev glede na ustreznost semena in rezultat testa, v katerem smo diagnostično vrednotili SOD z vidika napovedi kakovosti semena po 72 urah hranjenja.

Tabela 4: Mejne vrednosti in diagnostični parametri za SOD in TBARS**Table 4:** Cut-off values (breaking points) and diagnostic parameters for SOD and TBARS

Semenški parameter 3. dan	Mejna vrednost	AUC (P)	Občut. (%)	Spec. (%)	PPV (%)	NPV (%)
SOD (U/ml) – dan 0						
PG	1,22	0,86 (<0,05)	87,5	88,9	87,5	88,9
MN	1,26	0,70 (>0,05)	80,0	75,0	57,1	90,0
Žive	1,26	0,85 (<0,05)	100	76,9	57,1	100
Ustreznost (4 parametri)	1,05	0,97 (<0,05)	90,0	100	100	87,5
SOD ($U/10^6$ semenčic) – dan 0						
PG	$4,05 \times 10^{-3}$	0,74 (<0,05)	77,8	75,0	77,8	75,0
MN	$4,05 \times 10^{-3}$	0,67 (>0,05)	66,7	80,0	88,9	50,0
Žive	$4,05 \times 10^{-3}$	0,87 (<0,05)	69,2	100	100	50,0
Ustreznost (4 parametri)	$4,05 \times 10^{-3}$	0,89 (<0,05)	100	80,0	77,8	100
TBARS ($\mu\text{mol/l}$) – dan 0						
Gibljivost	40,73	0,68 (>0,05)	60,0	66,7	42,9	80,0

Legenda: AUC (ROC) – površina pod krivuljo ROC (karakteristika sprejemnika); P – statistična značilnost; Občut. – občutljivost; Spec. – specifičnost; PPV – pozitivna napovedna vrednost; NPV – negativna napovedna vrednost; PG – progresivna gibljivost; MN – morfološko normalne semenčice; Žive – žive semenčice; ustreznost (4 parametri) – kriterij za ustreznost vzorca po treh dneh hranjenja: preživitvena sposobnost: > 85 %; delež gibljivih semenčic: > 70 %; delež progresivno gibljivih semenčic: > 25 %; delež morfološko normalnih semenčic: > 50 %

Legend: AUC (ROC) – area under the curve (receiver operating characteristics); P – statistical significance; Občut. – sensitivity; Spec. – specificity; PPV – positive predictive value; NPV – negative predictive value; PG – progressive motility; MN – morphologically normal spermatozoa; Žive – live spermatozoa; ustreznost (4 parametri) – criteria for satisfactory samples after three days of storage: viability: > 85 %; percentage of motile spermatozoa: > 70 %; percentage of progressively motile spermatozoa: > 25 %; percentage of morphologically normal spermatozoa: > 50 %

Aktivnost SOD, izmerjena v nativnem semenu, je bila dober pokazatelj progresivne gibljivosti in preživitvene sposobnosti semena po 72 urah hranjenja (AUC 0,86 in 0,85; $P < 0,05$) (tabela 4), enako tudi aktivnost SOD v $U/10^6$ semenčic (AUC 0,74 in 0,87; $P < 0,05$). Mejni vrednosti za SOD pri ločevanju hranjenega semena glede na progresivno gibljivost in preživitveno sposobnost sta bili blizu skupaj (1,22 in 1,26 U/ml), v primeru vrednotenja glede na SOD v $U/10^6$ semenčic pa enaki ($4,05 \times 10^{-3} U/10^6$ semenčic). Aktivnost SOD v nativnem semenu je imela najvišjo pozitivno napovedno vrednost za progresivno gibljivost po 72 urah hranjenja. Verjetnost, da bo imel vzorec z vrednostjo $SOD \geq 1,22$ U/ml manj kot 25 % progresivno gibljivih semenčic po 72 urah hranjenja je bila 87,5-odstotna. Z 88,9-odstotno verjetnostjo lahko napovemo, da bo imel vzorec z aktivnostjo SOD nižjo od 1,22 U/ml ustrezan delež progresivno gibljivih semenčic po 72 urah hranjenja. Za vzorce z nižjo SOD od 1,26 U/ml lahko s 100-odstotno verjetnostjo napovemo, da bodo po 72 urah hranjenja imeli več kot 85 % živih semenčic.

Aktivnost SOD ($U/10^6$ semenčic) v nativnem semenu je imela najvišjo pozitivno napovedno vrednost za preživitveno sposobnost semenčic po 72 urah hranjenja. Verjetnost, da bo imel vzorec z vrednostjo $SOD \geq 4,05 \times 10^{-3} U/10^6$ semenčic manj kot 85 % živih semenčic po 72 urah hranjenja je bila 100-odstotna. S samo 50-odstotno verjetnostjo pa lahko napovemo, da bo imel vzorec z aktivnostjo SOD nižjo od $4,05 \times 10^{-3} U/10^6$ semenčic ustrezan delež živih semenčic po 72 urah hranjenja. Za vzorce s SOD nižjo od $4,05 \times 10^{-3}$ $U/10^6$ semenčic lahko s 75,0-odstotno verjetnostjo napovemo, da bodo po 72 urah hranjenja imeli več kot 25 % progresivno gibljivih semenčic.

Iz tabele 4 je razvidno tudi, da aktivnost SOD v nativnem semenu nima statistično značilne diagnostične vrednosti pri ugotavljanju morfološko normalnih semenčic po hranjenju tako pri vrednotenju SOD v U/ml (AUC 0,70; $P > 0,05$) semenske plazme kot pri vrednotenju SOD v $U/10^6$ semenčic (AUC 0,67; $P > 0,05$).

Univerzalen statistični kriterij diagnostične zanesljivosti (AUC) v primeru TBARS kaže, da ta nima statistično značilne diagnostične vrednosti (AUC 0,68; $P > 0,05$) v primeru ločevanja

vzorcev semena v ustrezone in neustrezne glede na gibljivost po 72 urah hranjenja (tabela 4).

Po razvrstitvi vzorcev semena v ustrezone in neustrezne glede na 4 parametre ($> 85\%$; delež gibljivih semenčic: $> 70\%$; delež progresivno gibljivih semenčic: $> 25\%$; delež morfološko normalnih semenčic: $> 50\%$) smo dobili novo mejno vrednost za aktivnost SOD (U/ml) v nativnem semenu (1,05 U/ml), medtem ko je bila mejna vrednost za aktivnost SOD v $U/10^6$ semenčic nespremenjena (tabela 4). Občutljivost testa je pokazala, da je bilo 90-odstotkov vzorcev semena, ki so imeli aktivnost SOD na dan odvzema $\geq 1,05$ U/ml, prepoznanih kot neustreznih po 72 urah hranjenja, medtem ko so bili kot taki prepoznani vsi vzorci, ki so imeli aktivnost SOD na dan odvzema $\geq 4,05 \times 10^{-3}$ U/ 10^6 semenčic. S 87,5-odstotno verjetnostjo lahko napovemo (NPV), da bo vzorec z aktivnostjo SOD v semenski plazmi na dan odvzema semena pod 1,05 U/ml, po 72 urah hranjenja ustrezen, glede na 4 zgoraj definirane semenske parametre (tabela 4), medtem ko bo ustreznih 80-odstotkov vzorcev z aktivnostjo SOD v semenski plazmi na dan odvzema semena pod $4,05 \times 10^{-3}$ U/ 10^6 semenčic (tabela 4).

Krivilja ROC za aktivnost SOD (U/ml), izmerjeno na dan odvzema semena z namenom ločevanja med ustreznimi in neustreznimi vzorci semena glede na vse štiri parametre po 72 urah hranjenja, je prikazana na sliki 38.

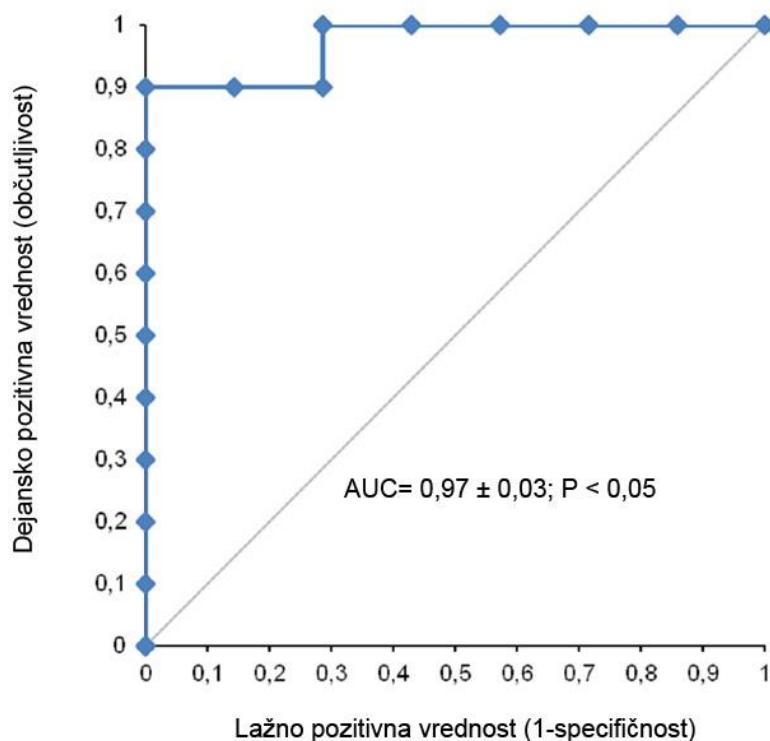
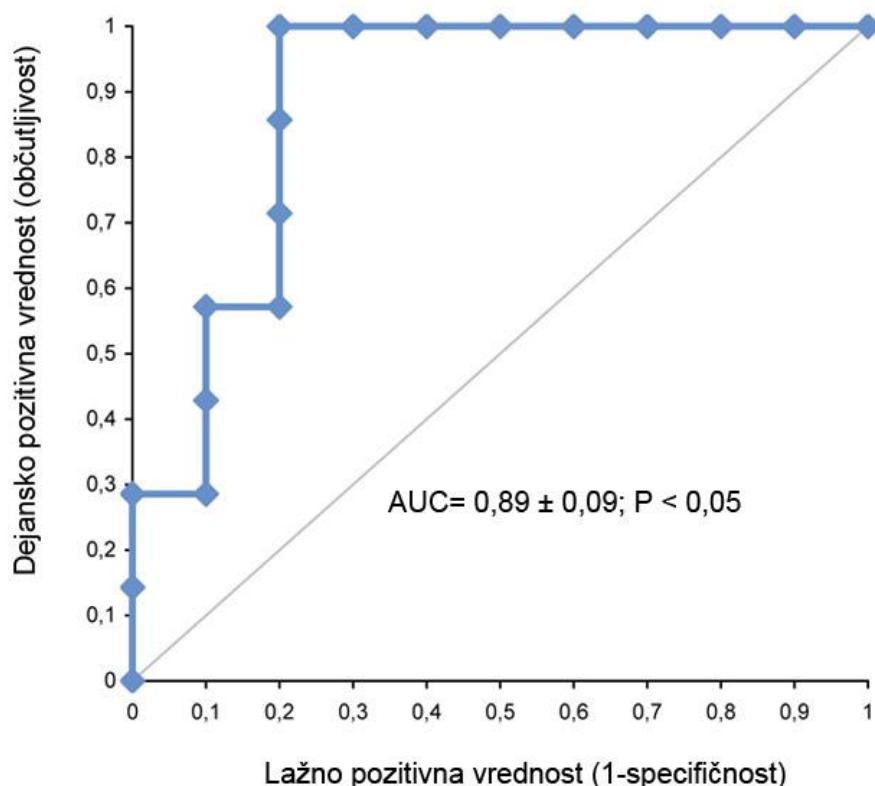
**Slika 38:** Krivulja ROC za SOD na dan 0 glede na razdelitev vzorcev med ustrezne in neustrezne

Figure 38: ROC curve for SOD on day 0 according to sample distribution between satisfactory and unsatisfactory

Krivulja ROC za aktivnost SOD ($\text{U}/10^6$ semenčic), izmerjeno na dan odvzema semena, z namenom ločevanja med ustreznimi in neustreznimi vzorci semena glede na vse štiri parametre po 72 urah hranjenja, je prikazana na sliki 39.



Slika 39: Krivulja ROC za SOD ($\text{U}/10^6$ semenčic) na dan 0 glede na razdelitev vzorcev med ustrezne in neustrezne

Figure 39: ROC curve for SOD ($\text{U}/10^6$ spermatozoa) on day 0 according to sample distribution between satisfactory and unsatisfactory

4.5 DIAGNOSTIČNO VREDNOTENJE SOD IN TBARS V SEMENSKI PLAZMI Z VIDIKA POTENCIALNEGA POKAZATELJA KAKOVOSTI SEMENA

Tabela 5 prikazuje diagnostične vrednosti SOD v semenski plazmi po 72 urah hranjenja glede na tiste semenske parametre, pri katerih smo ugotovili statistično značilne korelacije z omenjenim parametrom oksidativnega stresa. Priloga 19 prikazuje število vzorcev glede na ustreznost semena in rezultat testa, v katerem smo diagnostično vrednotili SOD kot pokazatelja kakovosti semena po 72 urah hranjenja.

Tabela 5: Mejne vrednosti in diagnostični parametri za SOD v semenski plazmi po kratkotrajnem hranjenju
Table 5: Cut-off values (breaking points) and diagnostic parameters for SOD in seminal plasma after short storage

Semenski parameteri – 3. dan	Mejna vrednost	AUC (P)	Občut. (%)	Spec. (%)	PPV (%)	NPV (%)
SOD (U/ml) - 3. dan						
Gibljivost	2,80	0,65 (<0,05)	80	75	57,1	90
PG	2,40	0,93 (<0,05)	100	88,9	88,9	100
MN	2,45	0,87 (<0,05)	100	75	62,5	100
Ustreznost (4 parametri)	2,40	0,85 (<0,05)	80	85,7	88,9	75
SOD (U/ 10^6 semenčic) - 3. dan						
PG	$8,26 \times 10^{-3}$	0,75 (<0,05)	77,8	62,5	70	71,4
MN	$9,50 \times 10^{-3}$	0,68 (>0,05)	83,3	60,0	83,3	60,0
Žive	$9,50 \times 10^{-3}$	0,77 (<0,05)	84,6	75,0	91,7	60,0
Ustreznost (4 parametri)	$9,50 \times 10^{-3}$	0,71 (=0,05)	100	50,0	58,3	100

Legenda: AUC (ROC) – površina ploskve pod krivuljo ROC (karakteristika sprejemnika); P – statistična značilnost; Občut. – občutljivost; Spec. – specifičnost; PPV – pozitivna napovedna vrednost; NPV – negativna napovedna vrednost; PG – progresivna gibljivost; MN – morfološko normalne semenčice; ustreznost (4 parametri) – kriterij za ustreznost vzorca po treh dneh hranjenja: preživitvena sposobnost: > 85 %; delež gibljivih semenčic: > 70 %; delež progresivno gibljivih semenčic: > 25 %; delež morfološko normalnih semenčic: > 50 %

Legend: AUC (ROC) – area under the curve (receiver operating characteristics); P – statistical significance; Občut. – sensitivity; Spec. – specificity; PPV – positive predictive value; NPV – negative predictive value; PG – progressive motility; MN – morphologically normal spermatozoa; ustreznost (4 parametri) – criteria for satisfactory samples after three days of storage: viability: > 85 %; percentage of motile spermatozoa: > 70 %; percentage of progressively motile spermatozoa: > 25 %; percentage of morphologically normal spermatozoa: > 50 %

Aktivnost SOD (U/ml), izmerjena v semenski plazmi po 72 urah hranjenja, je po izračunih analize ROC zanesljiv pokazatelj kakovosti semena po 72 urah hranjenja. Zanesljivo namreč napove ustrezeno skupno gibljivost (NPV 90 %), progresivno gibljivost (NPV 100 %) in delež semenčic z normalno morfologijo (NPV 100 %) po 72 urah hranjenja semena. Aktivnost SOD v semenski plazmi po 72 urah je imela najvišjo pozitivno napovedno vrednost (PPV) za progresivno gibljivost. Z 88,9-odstotno verjetnostjo lahko napovemo, da bo imel vzorec z aktivnostjo SOD $\geq 2,40$ U/ml manj kot 25 % progresivno gibljivih semenčic po 72 urah hranjenja, medtem ko le z 62,5-odstotno verjetnostjo lahko napovemo, da bo imel vzorec z aktivnostjo SOD $\geq 2,45$ U/ml neustrezen delež morfoloških napak po 72 urah hranjenja.

V primeru določanja SOD v $U/10^6$ semenčic lahko s 70,0-odstotno zanesljivostjo napovemo neustrezno progresivno gibljivost in z 91,7-odstotno zanesljivostjo neustrezno preživitveno sposobnost semenčic po 72 urah hranjenja semena. Aktivnost SOD ($U/10^6$ semenčic) v semenski plazmi po 72 urah je imela najvišjo negativno napovedno vrednost (NPV) za progresivno gibljivost. Z 71,4-odstotno verjetnostjo lahko napovemo, da bo imel vzorec z aktivnostjo SOD $< 9,50 \times 10^{-3}$ U/ 10^6 semenčic več kot 25 % progresivno gibljivih semenčic po 72 urah hranjenja, medtem ko le s 60,0-odstotno verjetnostjo lahko napovemo, da bo imel vzorec z aktivnostjo SOD $< 9,50 \times 10^{-3}$ U/ 10^6 semenčic ustrezni delež živih semenčic po 72 urah hranjenja.

Po razvrstitvi vzorcev semena v ustrezne in neustrezne glede na 4 parametre po 72 urah hranjenja (preživitvena sposobnost: > 85 %; delež gibljivih semenčic: > 70 %; delež progresivno gibljivih semenčic: > 25 %; delež morfološko normalnih semenčic: > 50 %) smo dobili enako oziroma primerljivo mejno vrednost za aktivnost SOD za ločevanje vzorcev semena v ustrezne in neustrezne po 72 urah hranjenja ($2,40$ U/ml; $9,50 \times 10^{-3}$ U/ 10^6 semenčic) (tabela 5).

Občutljivost testa je pokazala, da je bilo 80 % vzorcev z aktivnostjo SOD $\geq 2,40$ U/ml prepoznavanih kot neustreznih po 72 urah hranjenja, medtem ko je bilo 85,7 % vzorcev z aktivnostjo SOD $< 2,40$ U/ml prepoznavanih kot ustreznih (specifičnost testa). Z 88,9-

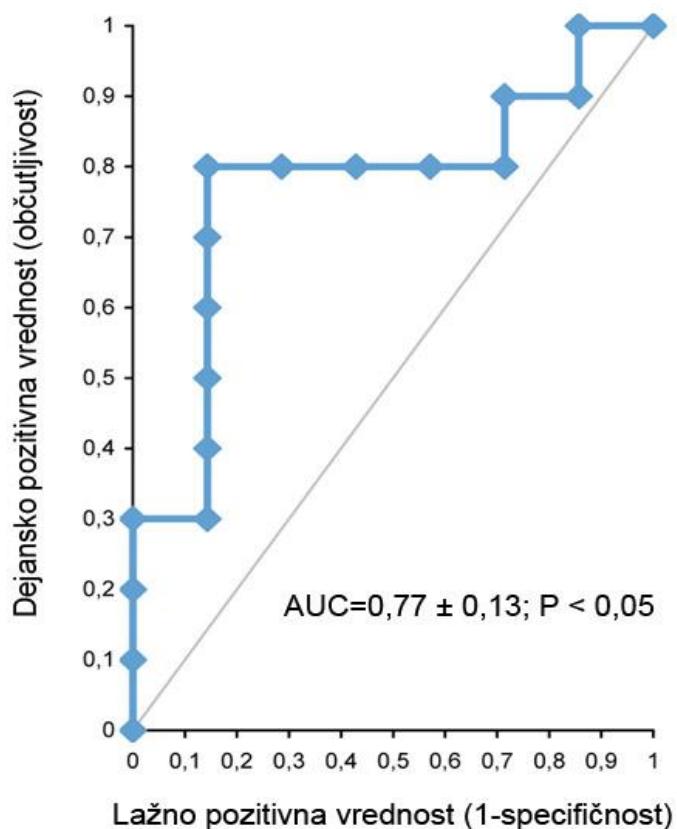
ZAKOŠEK PIPAN M. Vpliv odstranitve nizkomolekulskih ... na oksidativni status in lastnosti ... semena ...

Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2014. Doktorska disertacija

odstotno verjetnostjo (PPV) lahko napovemo, da vzorec z aktivnostjo SOD $\geq 2,40 \text{ U/ml}$ ne bo ustrezal predpisanim kriterijem za vrednosti semenskih parametrov. Verjetnost, da bo vzorec z aktivnostjo SOD pod $2,40 \text{ U/ml}$ ustrezen, pa je 75,0-odstotna (NPV) (tabela 5).

Občutljivost testa je pokazala, da so bili vsi vzorci z aktivnostjo SOD $\geq 9,50 \times 10^{-3} \text{ U}/10^6$ semenčic prepoznani kot neustrezni po 72 urah hranjenja, medtem ko je bilo samo 50,0-odstotkov vzorcev, z aktivnostjo SOD $< 9,50 \times 10^{-3} \text{ U}/10^6$ semenčic, prepoznanih kot ustreznih (specifičnost testa). Z 58,3-odstotno verjetnostjo (PPV) lahko napovemo, da vzorec z aktivnostjo SOD $\geq 9,50 \times 10^{-3} \text{ U}/10^6$ semenčic ne bo ustrezal predpisanim kriterijem za vrednosti semenskih parametrov. Verjetnost, da bo vzorec z aktivnostjo SOD pod $9,50 \times 10^{-3} \text{ U}/10^6$ semenčic ustrezen, pa je 100,0-odstotna (NPV) (tabela 5).

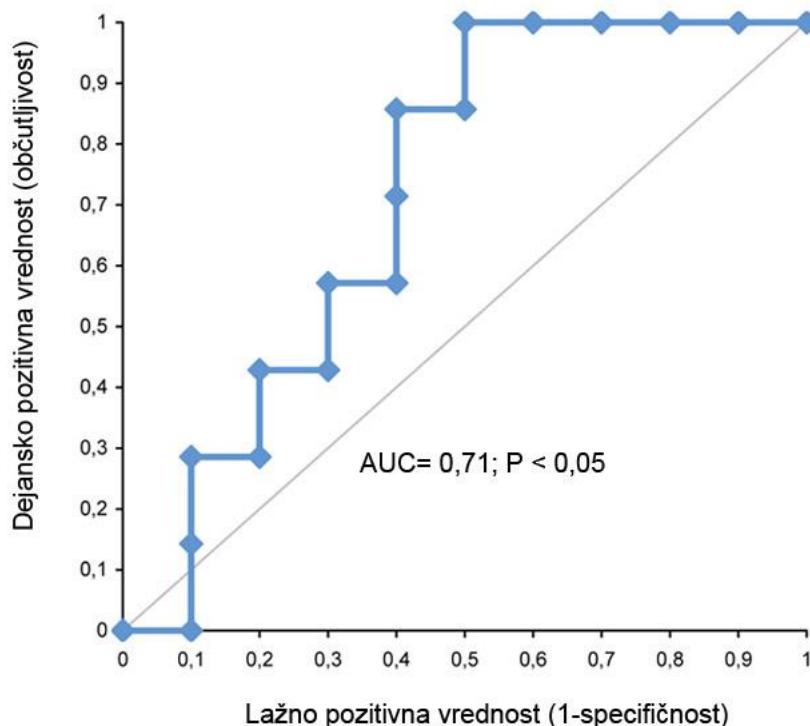
Krivulja ROC za aktivnost SOD, izmerjeno v semenski plazmi po 72 urah hranjenja, z namenom ločevanja med ustreznimi in neustreznimi vzorci glede na vse štiri parametre, je prikazana na sliki 40.



Slika 40: Krivulja ROC za SOD, izmerjen v semenski plazmi po treh dneh hranjenja, glede na razdelitev vzorcev med ustrezne in neustrezne

Figure 40: ROC curve for SOD measured in seminal plasma after three days of storage according to sample distribution between satisfactory and unsatisfactory

Krivulja ROC za aktivnost SOD ($\text{U}/10^6 \text{ semenčic}$), izmerjeno v semenski plazmi po 72 urah hranjenja, z namenom ločevanja med ustreznimi in neustreznimi vzorci glede na vse štiri parametre, je prikazana na sliki 41.



Slika 41: Krivulja ROC za SOD ($U/10^6$ semenčic), izmerjen v semenski plazmi po treh dneh hranjenja, glede na razdelitev vzorcev med ustrezne in neustrezne

Figure 41: ROC curve for SOD ($U/10^6$ spermatozoa) measured in seminal plasma after three days of storage according to sample distribution between satisfactory and unsatisfactory

5 RAZPRAVA

Semenska plazma ima pomembno vlogo pri zaščiti in prenosu semenčic skozi rodila samice, poleg tega pa nekatere v njej raztopljene snovi predstavljajo tudi vir energije za preživetje semenčic. V semenski plazmi se nahajajo tudi nizkomolekulske sestavine, ki imajo negativen učinek na funkcijo semenčic. Medtem ko spermadhezini, ki niso sposobni vezati heparina, z vezavo na periferno površino semenčic le-te zaščitijo, tisti spermadhezini, ki vežejo heparin, zavirajo njihovo gibljivost (Centurion in sod., 2003). V semenski plazmi merjascev je prisoten tudi protein z molekulsko maso 5,7 kDa, ki zavira gibljivost semenčic (Strzezek in sod., 1992). Namen naših raziskav je bil opredeliti vpliv dialize na lastnosti semena, lipidno peroksidacijo in antioksidantni status tekoče hranjenega merjaščevega semena. Ohlajanje semena ter možnost aerobne presnove po odvzemu semena povzroči povečano produkcijo reaktivnih kisikovih zvrsti (ROS), kar vodi do lipidne peroksidacije membran semenčic, ki vsebujejo visok delež nenasičenih maščobnih kislin (Kumaresan in sod., 2009). Z dializo se najverjetneje odstranijo tudi neencimski antioksidanti semenske plazme, kot so L-glutation (GH), L-ergotionin (ERT), L-askorbat in α -tokoferol, ki skupaj z antioksidantnimi encimi predstavljajo antioksidantni obrambni sistem v semenski plazmi merjascev in imajo skupaj pomembno vlogo pri detoksifikaciji ROS in s tem zaščiti semenčic pred oksidativnim stresom (Strzezek in sod., 1999; Strzezek, 2002a). Glede na dejstvo, da merjaščovo seme že v osnovi nima zadostnega antioksidantnega sistema (Strzezek in sod., 1999), se lahko po odstranitvi neencimskih antioksidantov dodatno poveča stopnja lipidne peroksidacije. Z našo raziskavo smo zato želeli ugotoviti, ali lahko dodatek antioksidanta po dializi izboljša kakovost kratkotrajno hranjenega merjaščevega semena in zmanjša stopnjo lipidne peroksidacije, najverjetneje povzročene z odstranitvijo nizkomolekulskih antioksidantov. Poleg tega smo parametre oksidativnega stresa v semenski plazmi ovrednotili tudi z vidika potencialne diagnostične vrednosti za ugotavljanje kakovosti kratkotrajno hranjenega merjaščevega semena.

Dodajanje antioksidantov merjaščevemu semenu z namenom boljše ohranitve njegovih lastnosti po kratkotrajnem hranjenju ali zamrzovanju se je v preteklosti že izkazalo za

uspešno. V naši raziskavi smo na ta način skušali z dodatkom antioksidanta dializiranemu semenu izboljšati antioksidantno kapaciteto semena. Čeprav poročajo o nasprotujočih si učinkih dodatka L-cisteina na kakovost hranjenega merjaščevega semena, pa smo se zanj (v kombinaciji z α -tokoferolom) v postopku optimizacije odločili predvsem zaradi ugotovljene izboljšane progresivne gibljivosti in manjšega deleža napak na akrosomu v primeru hranjenja merjaščevega semena v prisotnosti L-cisteina (Funahashi in Sano, 2005). Poleg tega poročajo tudi o izboljšani preživitveni sposobnosti semena (Funahashi in Sano, 2005; Szczesniak-Fabianczyk in sod., 2003) ter bolje ohranjeni stabilnosti kromatina na 15 °C ohlajenega merjaščevega semena po 15 dneh hranjenja v primerjavi s semenom brez dodatka L-cisteina (Szczesniak-Fabianczyk in sod., 2003). Medtem ko drugi avtorji ugotavljajo, da nizke koncentracije L-cisteina v BTS (0,1; 0,5 in 1 mM) niso vplivale na preživitveno sposobnost semenčic, je višja koncentracija L-cisteina (10 in 20 mM) vodila celo do zmanjšanega deleža živih semenčic po treh dneh hranjenja (Severo in sod., 2011). Zato smo se pri optimizaciji odločili za srednje koncentracije L-cisteina (2,5; 5 in 10 mM).

V naši raziskavi ni bilo statistično značilnih razlik v kakovosti kratkotrajno hranjenega semena med skupinami z dodatkom L-cisteina in/ali α -tokoferola ali brez njega, vendar se je α -tokoferol v koncentraciji 200 μ M v vseh določanih semenskih parametrih izkazal za najboljšega. Pri optimizaciji smo testirali samo osnovne semenske parametre, pričakovali pa smo, da se pozitivni učinki lahko pokažejo tudi pri drugih parametrih, kar smo v skladu z ostalimi avtorji potrdili v nadaljevanju raziskave. Dodajanje α -tokoferola semenu ni imelo vpliva na gibljivost semenčic in poškodbe akrosoma, vendar je zmanjšalo lipidno peroksidacijo hlajenega semena po treh dneh hranjenja pri 15 °C (Mendez in sod., 2013). Pred hranjenjem semena pri 15 °C so semenu dodali vitamin E, po hranjenju semena pa insulinu podoben rastni faktor tipa I (IGF-I). IGF-I je aktivator celične presnove, saj poveča presnovo ogljikovih hidratov in tako izboljšajo gibljivost hranjenega semena (Selvaraju in sod., 2009), vendar pa lahko zaradi tega vpliva na večje nastajanje ROS (Minelli in sod., 2011). Predvidevajo, da je IGF-I dejansko povečal presnovno aktivnost merjaščevih semenčic, vendar se je skupaj s tem povečal tudi oksidativni stres, ki pa so ga ob dodajanju vitamina E pred hranjenjem semena uspeli zmanjšati (Mendez in sod., 2013).

Seme z dodatkom α -tokoferola je imelo po treh urah hranjenja pri 18 °C sicer več preživelih semenčic v primerjavi s skupino brez dodatka α -tokoferola, vendar pa med skupinama ni bilo statistično značilnih sprememb po enem dnevu hranjenja semena (Merkies in sod., 2003). Glede na to, da smo naše vzorce poleg dodatka antioksidantov tudi dializirali in jih hranili 72 ur, smo pričakovali, da bo učinek obeh dodatnih postopkov pozitivno vplival na kakovost semena po hranjenju, kar smo tudi potrdili v nadaljevanju raziskave.

Koncentracija semenčic, izmerjena spektrofotometrično, je bila v naši raziskavi kljub majhnemu koeficientu variacije, višja kot je značilno za merjaščovo seme (Strzezek, 1995). Kljub temu, da v osemenjevalnih centrih najpogosteje uporablajo spektrofotometre za določanje koncentracije semenčic v ejakulatih, pa so lahko vrednosti, ki nam jih spektrofotometer poda previsoke. Slabost te metode je namreč v tem, da spektrofotometer ne loči med semenčicami in ostalimi snovmi podobne velikosti, ki so prav tako prisotne v ejakulatu. Večje število citoplazmatskih kapljic ali debrisa prisotnega v ejakulatu lahko torej močno vpliva na izmerjeno koncentracijo (Evenson in sod., 1993). Pri primerjavi metod za določanje koncentracije semenčic (spektrofotometrična, računalniška analiza in hemocitometrična), pa smo ugotovili, da so si metode med seboj primerljive (Mrkun in sod., 2007) in zato spektrofotometrično metodo uporabili v naši raziskavi. Kljub razvoju novih, hitrejših metod za določanje koncentracije semenčic se kot zlati standard še vedno uporablja določanje koncentracije semenčic s pomočjo kamric, med katerimi dobimo najbolj natančne rezultate z izboljšano Neubauerjevo kamrico (Ahmed in Mahmoud, 1997). V naši raziskavi so bili rezultati koncentracij visoki, zato smo naknadno v poskusu koncentracijo semenčic izmerjeno spektrofotometrično primerjali s štetjem semenčic z uporabo Neubauerjeve kamrice. Spektrofotometer je omirjen za določanje koncentracije semenčic v ejakulatih, posledično je bila razlika v koncentraciji med spektrofotometrom in Neubauerjevo kamrico najnižja v ejakulatih in se višala z redčenjem vzorca. Razlika v koncentraciji v vzorcih redčenih 1:2 v BTS (vzorci uporabljeni v naši raziskavi) je bila 54,4-odstotna. S tem smo potrdili domnevo, da je višja koncentracija v naših vzorcih izmerjena spektrofotometrično najverjetneje posledica previsokih meritev,

ki jih lahko dobimo s spektrofotometrom. Ugotovili smo tudi, da se z večjimi razredčitvami večajo napake v merjenju koncentracije semenčic, izmerjene spektrofotometrično.

Hranjenje semena pri temperaturah od 15–20 °C zaradi velike občutljivosti semenčic na temperaturne in mehanske spremembe zmanjša preživitveno sposobnost semenčic, njihovo gibljivost in progresivno gibljivost (Cerolini in sod., 2000). Mrkun in sod. (2009) so ugotovili, da se z dializo svežega merjaščevega semena bolje ohrani gibljivost in progresivna gibljivost hlajenega semena. Enake ugotovitve opisuje tudi Fraser in sod. (2007) po zamrzovanju in tajanju merjaščevega semena. V naši raziskavi dializa nativnega semena ni vplivala na progresivno gibljivost semenčic po 72 urah hranjenja semena v primerjavi z nedializiranim semenom. V vzorcih semena z dodatkom α -tokoferola dializiranemu semenu se je statistično značilno ohranil večji delež progresivno gibljivih semenčic in živih semenčic v primerjavi s skupino nedializiranega semena z dodatkom antioksidanta ($P < 0,05$). Večjo ohranitev gibljivosti pri dializiranem kot nedializiranem semenu pripisujemo verjetni odstranitvi nizkomolekulskega proteina semenske plazme z molsko maso 5,7 kDa, ki negativno vpliva na gibljivost merjaščevih semenčic (Strzezek in sod., 1992; Kordan in sod., 1998). Poleg tega se z dializo verjetno odstranijo tudi druge snovi, ki lahko prav tako negativno vplivajo na funkcionalnost semenčic. Med te snovi spadajo Zn^{2+} ioni (Strzezek, 2002a), presnovki (npr. različni peroksidi) ter proste aminokislne (Garcia in Graham, 1987). Dializa semenske plazme pred zamrzovanjem semena je izboljšala gibljivost bikovih (Tibary in sod., 1990) in ovnovih semenčic (Schmehl in sod., 1986). Boljša gibljivost dializiranega semena po tridnevnom hranjenju pri 4–5 °C je bila potrjena tudi pri puranu (Iaffaldano in Meluzzi, 2003; Słowińska in sod., 2013). Puranovo seme namreč ohrani ustrezne lastnosti semena pri 5 °C največ šest ur; daljše hranjenje ali zamrzovanje semena praktično ni uspešno. Po dializi, pri kateri so uporabili dializno črevo s porami velikosti 12–14 kDa, pa so opazili ustrezno gibljivost in večjo preživitveno sposobnost puranovih semenčic še po 24 in 48 urah hranjenja semena (Iaffaldano in Meluzzi, 2003).

V naši raziskavi smo opazili pozitiven vpliv dialize na delež morfološko normalnih semenčic v semenu. Nedializirano seme je imelo namreč statistično značilno večji delež semenčic z morfološkimi napakami po 72 urah hranjenja semena v primerjavi z dializiranim semenom ($P < 0,05$), kar je v skladu s predhodno raziskavo (Mrkun in sod., 2009). Poleg tega smo ugotovili, da je vzrok za večji delež morfoloških napak v skupini nedializiranega semena po 72 urah hranjenja v statistično značilnem porastu napak na akrosomu ($P < 0,05$). Ugotovljeno je, da je akrosom merjascev izredno občutljiv na spremembe med hranjenjem semena, saj membrane merjaščevih semenčic vsebujejo nizek delež holesterola (De Leeuw in sod., 1990). V primerjavi s semenčicami ljudi, pri katerih je ta delež precej višji tako v membranah semenčic kot v semenski plazmi in posledično zaščita akrosoma pred akrosomske reakcije visoka (Cross, 1996), je poškodba akrosoma in akrosomska reakcija v času hranjenja semena pri merjascih pogostejša. Spremembe v akrosому so najpogosteje posledica poškodovane membrane in akrosomske reakcije (Kommisrud in sod., 2002). V postopku dialize se spremeni polipeptidni profil semenske plazme merjaščevega semena (Strzezek in sod., 2005), ki je posledica reorganizacije proteinov na površini semenčic, kar vodi v večjo stabilnost plazemske membrane (Fraser in sod., 2007) in posledično v manjši delež napak na akrosomu, kar je razvidno iz naših rezultatov. Med vsemi skupinami hranjenega semena je bil delež semenčic z napakami na akrosomu najmanjši v skupini dializiranega semena z dodatkom antioksidanta. Glede na to, da se α -tokoferol s svojo stransko verigo vpne med membranske lipide celične membrane in jo tako stabilizira ter zaščiti pred oksidativnimi poškodbami (Young in McEnemy, 2001), menimo, da je dodatek α -tokoferola po dializi pripomogel k stabilizaciji plazemske membrane, kar je posledično izboljšalo gibljivost ter zmanjšalo delež napak na akrosomu v dializiranem semenu.

Med hranjenjem semena se poveča delež kapacitiranih ali navidezno kapacitiranih semenčic ter semenčic z akrosomske reakcijo (Green in Watson, 2001; Huo in sod., 2002; Bailey in sod., 2005; Bravo in sod., 2005; Vallorani in sod., 2010), kar potrjujejo tudi rezultati naše raziskave tako pri dializiranem kot pri nedializiranem semenu. Pri hranjenju hlajenega semena se v semenčicah odvijajo spremembe, podobne kapacitaciji (npr. večja prepustnost plazemske membrane in povišana znotrajcelična raven kalcija), kar vodi v

večjo občutljivost semenčic na dejavnike okolja. Zaradi povečane prepustnosti membrane pride do vdora zunajceličnega kalcija v semenčico, kar lahko vodi v akrosomsko reakcijo (Green in Watson, 2001). Merjaščeve seme, hlajeno na 5 °C, se ob ponovnem ogrevanju na 39 °C spremeni in se obarva s CTC na enak način kot kapacitirano seme (Maxwell in Johnson, 1999; Green in Watson, 2001). Membranske spremembe so zelo podobne spremembam, ki nastanejo pri fiziološki kapacitaciji, zato rezultati testa CTC ne ločijo med pravo fiziološko kapacitacijo in navidezno kapacitacijo (Green in Watson, 2001). Poleg tega omenjena avtorja domnevata, da med ohlajanjem pravzaprav ne pride niti do navidezne kapacitacije, ampak jo semenčice nekako zaobidejo. Spremembe, ki se pojavijo na semenčicah med hlajenjem, so namreč bolj podobne procesu akrosomske reakcije (Green in Watson, 2001).

Čeprav se je v naši raziskavi delež semenčic z akrosomsko reakcijo med hranjenjem semena povečeval tako v nedializiranih kot dializiranih vzorcih, je bil le-ta statistično značilno manjši pri dializiranih vzorcih v primerjavi z nedializiranimi po 48 in 72 urah hranjenja ($P < 0,05$). Dodatek antioksidanta ni prispeval k zmanjšanju deleža semenčic z akrosomsko reakcijo. V semenski plazmi so prisotni proteini, ki zavirajo kapacitacijo semenčic in s tem akrosomsko reakcijo (Maxwell in Johnson, 1999), zato prisotnost semenske plazme ob zamrzovanju in tajanju merjaščevega semena zaščiti semenčice pred navidezno kapacitacijo in posledično zmanjša delež semenčic z akrosomsko reakcijo (Vadnais in sod., 2005). Vendar so v semenski plazmi prisotni tudi nizkomolekulske proteini semenske plazme, ki lahko zaradi svoje vezave na semenčice zasedejo mesta, na katera se sicer vežejo dekapacitacijski faktorji (Strzezek in sod., 2003). Z dializo najverjetneje odstranimo nizkomolekulske sestavine semenske plazme, s tem pa domnevno povzročimo reorganizacijo proteinov na notranji površini plazemske membrane; ti oblikujejo zaščitno plast okrog semenčic in tako pripomorejo k ohranjanju integritete plazemske membrane. Omenjen proces bi lahko bil odgovoren za boljšo odpornost dializiranega semena med hranjenjem (Fraser in sod., 2007). Možno je, da se zato zmanjša kapacitacija semenčic in s tem delež semenčic z akrosomsko reakcijo, ki nastane spontano med hranjenjem hlajenega semena (Petrunkina in sod., 2005).

V naši raziskavi se je med hranjenjem semena povečal delež kapacitiranih semenčic in semenčic z akrosomsko reakcijo, vendar sprememb v izražanju tirozin fosforiliranih proteinov, ki so odgovorni za proces kapacitacije merjaščevega semena, nismo ugotovili. Tirozin fosforiliran protein p32, specifičen za kapacitacijo merjaščevih semenčic (Tardif in sod., 2001), smo ugotovili le v enem vzorcu, ki je imel visoko stopnjo kapacitacije, določene s testom CTC, že na dan odvzema semena. Vendar se tudi pri tem vzorcu izražanje tirozin fosforiliranega proteina p32 med hranjenjem semena ni spremenjalo ne v nedializiranem in ne v dializiranem semenu. Ta rezultat je v skladu z raziskavo, v kateri so ugotovili, da so rezultati CTC testa hlajenega semena podobni rezultatom CTC testa v kapacitacijskem mediju, vendar pa pride do izražanja tirozin fosforiliranega proteina p32 le, če semenčice prehodno izpostavimo mediju za kapacitacijo (Bravo in sod., 2005). Dokazano je tudi, da se spremembe v izražanju tirozin fosforiliranih proteinov v hlajenemu merjaščevemu semenu pojavijo šele po desetih dneh hranjenja (Dubé in sod., 2004). Naši rezultati so torej v skladu z dosedanjimi ugotovitvami, saj v prvih 72 urah hranjenja hlajenega semena ni prišlo do sprememb v izražanju tirozin fosforiliranih proteinov. Vadnais in sod. (2005) so podali zaključek, da je proces t. i. kriokapacitacije podoben kapacitaciji, vendar se število in razporeditev s tirozinom fosforiliranih proteinov plazemske membrane razlikuje od tistega pri pravi kapacitaciji.

Statistično značilen upad v deležu preživelih semenčic smo zaznali od dneva odvzema do prvega dneva hranjenja semena pri nedializiranih in dializiranih vzorcih ($P < 0,05$), med nadaljnjjim hranjenjem pa je preživitvena sposobnost ostala na enaki ravni. Prav tako ni bilo razlik med nedializiranimi in dializiranimi vzorci ($P > 0,05$). Drugi avtorji so s pomočjo dialize pred zamrzovanjem merjaščevega (Fraser in sod., 2007) in bikovega semena (Garcia in Graham, 1987) uspeli povečati delež preživelih semenčic po tajanju. Zamrznjeno seme ima slabšo preživitveno sposobnost kot kratkotrajno hranjeno seme, zaradi česar se lahko določene razlike med skupinami hitreje pokažejo. Na preživitveno sposobnost semenčic hlajenega in zamrznjenega semena v veliki meri vpliva predvsem sestava razredčevalca (de Ambrogi in sod., 2006; Pinho in sod., 2014). Razredčevalec BTS, ki smo ga uporabili v naši raziskavi, se uporablja za hranjenje hlajenega semena do 3 dni in

omogoča v tem obdobju dobro preživetje semenčic (Johnson in sod., 2000; Dubé in sod., 2004), kar potrjujejo tudi naši rezultati, saj je bil delež preživelih semenčic v obeh skupinah zelo dobro ohranjen. Dodatek antioksidanta dializiranemu semenu je prispeval k ohranitvi statistično značilno večjega deleža živih semenčic v primerjavi z obema skupinama nedializiranega semena ($P < 0,05$). Dializa z dodatkom antioksidanta α -tokoferola je torej izboljšala preživitveno sposobnost semenčic. α -tokoferol ima pomembno vlogo pri preprečevanju membranskih poškodb, ki nastanejo kot posledica ROS, saj je med vsemi antioksidanti edini, ki je sposoben pretrgati vezi, ki nastanejo zaradi ROS med verigami maščobnih kislin in membranskimi lipidi v plazemski membrani (Jeong in sod., 2009). Jeong in sod. (2009) so ugotovili, da dodatek α -tokoferola semenu pred zamrzovanjem in tajanjem zmanjša izražanje genov, odgovornih za apoptozo, kar lahko povežemo z našimi rezultati, v katerih smo ugotovili najmanjši delež apoptotičnih celic v skupini hranjenega dializiranega semena z dodatkom α -tokoferola.

Ohranjanje mitohondrijskega potenciala (tj. akumulacija zadostnega števila protonov med zunanjo in notranjo mitohondrijsko membrano) je nujno potrebno za nastajanje ATP v somatskih celicah (Halliwell in Gutteridge, 1999). Dokazano je, da je vsebnost ATP nižja po izpostavitvi semenčic ksantin/ksantin oksidaznemu sistemu (Armstrong in sod., 1999). Delež semenčic s porušenim mitohondrijskim potencialom se je med hranjenjem semena v naši raziskavi povečal v vseh skupinah hranjenega semena ($P < 0,05$) z izjemo skupine dializiranega semena z dodatkom antioksidanta. To je v skladu z rezultati Huo in sod. (2002), po katerih se je delež semenčic z ohranjenim mitohondrijskim potencialom med hranjenjem semena pri 17 °C znižal. Fraser in sod. (2007) so ugotovili, da dializa semenske plazme pred zamrzovanjem merjaščevega semena izboljša funkcijo mitohondrijev po tajanju. Dializa sama po sebi v naši raziskavi ni prispevala k ohranitvi mitohondrijskega potenciala. Z dodatkom α -tokoferola dializiranemu semenu smo dosegli, da se je membranski mitohondrijski potencial ohranil na enaki ravni, kot je bil v nativnih semenčicah. Predvidevamo, da je antioksidantna vloga α -tokoferola pripomogla k ohranitvi funkcije mitohondrijev, kar se kaže tudi v višji progresivni gibljivosti semenčic v primerjavi z nedializiranim semenom.

Na osnovi integritete plazemske membrane semenčic, ki predstavlja bariero med zunajceličnim in znotrajceličnim prostorom, smo ocenili različne morfološke podtipe repov. V zadnjem času raziskave potrjujejo veliko uporabnost ocenjevanja različnih morfoloških podtipov repov za ugotavljanje živih in nepoškodovanih semenčic (Bassiri in sod., 2013).

Nižja stopnja membranske integritete repov semenčic v vseh skupinah hranjenega semena v primerjavi z nativnim semenom v naši raziskavi je v skladu z raziskavo Gaczarzewicz in sod. (2010). Vendar pa sta imeli v naši raziskavi po 72 urah hranjenja obe skupini dializiranega semena v testu ugotavljanja integritete plazemske membrane statistično značilno večji delež semenčic z nabreklo spodnjo polovico repa v primerjavi z obema skupinama nedializiranega semena ($P < 0,05$). Pri ljudeh so ugotovili, da so najbolj primerne za oploditev z metodo ICSI (mikroinjiciranje semenčice v jajčno celico) semenčice, pri katerih pride v testu do nabrekle konice repa (Bassiri in sod., 2012), oziroma semenčice z nabreklo spodnjo polovico repa (Stanger in sod., 2010). Prav tako je bil opazen najmanjši delež morfoloških napak in napak na akrosому pri semenčicah z nabreklo spodnjo polovico repa (Bassiri in sod., 2013). Ob upoštevanju ugotovitev pri ljudeh predvidevamo, da bi večji delež semenčic z nabreklo spodnjo polovico repa v obeh skupinah dializiranega semena v naši raziskavi lahko pomenil boljšo ohranitev integritete plazemske membrane repov semenčic v primerjavi z nedializiranim semenom.

V vseh preiskovanih skupinah je bil delež semenčic s fragmentirano DNK manjši od 3 %, kar je v skladu z nekaterimi drugimi raziskavami, ki navajajo nizek delež semenčic s fragmentirano DNK v merjaščevem semenu (Waberski in sod., 2002; Boe-Hansen in sod., 2005). Med hranjenjem semena se delež semenčic s fragmentirano DNK poveča (Boe-Hansen in sod., 2008; Fraser in Strzezek, 2004), kar smo potrdili tudi v naši študiji, hkrati pa ugotovili, da je dodatek antioksidanta dializiranemu semenu preprečil statistično značilno povečanje fragmentacije DNK glede na nativno seme. Medtem ko je pri ljudeh ugotovljeno, da je delež semenčic s fragmentirano DNK boljši pokazatelj uspešnosti *in vitro* oploditve kot delež progresivno gibljivih semenčic (Simon in Lewis, 2011), pri merjascih podatek o DNK fragmentaciji zaenkrat ne prispeva veliko k oceni kakovosti

semena, saj korelacij med DNK fragmentacijo in ostalimi parametri semena še ne poznamo. Čeprav je delež DNK fragmentacije načeloma zelo nizek, pa pri posameznih merjaščevih ejakulatih močno naraste brez vidnih sprememb v ostalih semenskih parametrih (Waberski in sod., 2011).

V naši raziskavi se je v vseh skupinah hranjenega semena pri določanju fragmentacije DNK statistično značilno povečal delež semenčic z ničnim oziroma z malim "halo" efektom ($P < 0,05$). Delež je bil sicer najmanjši v skupini dializiranega semena z dodatkom antioksidanta, vendar pa statistično značilnih razlik med skupinami hranjenega semena ni bilo. V novejši raziskavi, v kateri so merjaščevo seme po zamrzovanju in tajanju inkubirali pri 37°C 168 ur, je ostal delež semenčic z velikim "halo" efektom izredno nizek (pod 5 %), močno pa se je povečal delež semenčic z ničnim oz. z malim "halo" efektom. Domnevajo, da pravzaprav le semenčice z normalnim "halo" efektom predstavljajo semenčice brez poškodb DNK, vse ostale oblike pa kažejo na določeno stopnjo poškodb v DNK. Mali "halo" efekt naj bi predstavljal semenčice z začetnimi poškodbami DNK, kar se kaže kot porušenje stabilne strukture kromatina (Alkmin in sod., 2013). To lahko dodatno podpre dejstvo, da je citoskelet (perinuklearna theca), ki obdaja jedro semenčic pri sesalcih in mu hkrati daje stabilnost, pri merjascih izredno občutljiv na poškodbe zaradi nizkih temperatur (Gutiérrez-Pérez in sod., 2011). Nizke temperature povzročijo spremembe v strukturi jedrnih proteinov, preden je opazna DNK fragmentacija (Flores in sod., 2011). Poleg tega ob osmotskih spremembah, še zlasti nenadnih, pride do razrahljanja ali prekinitev disulfidnih vezi med jedrnimi proteini (Flores in sod., 2011), kar se lahko pokaže v testu DNK fragmentacije kot mali "halo" efekt okrog glave semenčice (Alkmin in sod., 2013). Populacija semenčic z velikim "halo" efektom naj bi predstavljala naslednjo, obsežnejšo poškodbo v DNK. Vendar je ta oblika po mnenju Alkmina in sod. (2013) vedno nizka, saj so Pérez-Llano in sod. (2010) dokazali, da veliki "halo" efekti okrog glave semenčice niso opazni, ko pride do masivne DNK fragmentacije in DNK razpade na zelo majhne delce. Velik "halo" efekt okrog glave semenčice v določenem časovnem intervalu izgine, kar je domnevno odvisno od tega, kako hitro pride do masivne DNK fragmentacije (Zee in sod., 2009). Pri merjascih domnevajo, da je ta proces zelo hiter (Alkim in sod., 2013), kar bi lahko tudi pojasnilo nizek delež merjaščevih semenčic z velikim "halo"

efektom in večji delež semenčic z ničnim oziroma malim "halo" efektom v naši raziskavi. Tudi ob upoštevanju vseh tipov DNK fragmentacije (nični, mali in veliki "halo" efekt) je ta ostala v kratkotrajno hranjenem merjaščevem semenu relativno nizka in ni pri nobenem vzorcu presegla 20 %.

Medtem ko je imelo prav dializirano seme brez dodatka antioksidanta v naši raziskavi najmanjši delež semenčic z normalnim "halo" efektom, je bil ta največji v skupini dializiranega semena z dodatkom antioksidanta in se ni statistično značilno razlikoval v primerjavi z nativnim semenom. Na osnovi naših rezultatov lahko sklepamo, da dodatek antioksidanta α -tokoferola dializiranemu semenu zaščiti semenčice pred fragmentacijo DNK in prepreči vpliv shranjevanja semena na najpomembnejši del semenčice – njeno jedro. Poškodovana DNK namreč vpliva na oploditveno sposobnost semenčič ter na zgodnji razvoj in kakovost zarodkov (Simões in sod., 2013).

Po dializi merjaščevega semena smo v delu študije, v katerem smo proučevali vpliv dialize med hranjenjem semena, ugotovili statistično značilno znižanje celokupne antioksidantne kapacitete ($P < 0,05$) in povišanje ravni lipidne peroksidacije (TBARS) glede na nativni vzorec ($P < 0,05$). Velik padec TAC po dializi v naši raziskavi je najverjetneje posledica odstranitve vodotopnih nizkomolekulskih neencimskih antioksidantov (GSH, ERT, L-askorbat, α -tokoferol) iz semenske plazme merjascev. Njihova koncentracija v semenski plazmi merjascev sicer ni visoka, imajo pa skupaj z antioksidantnimi encimi izredno pomembno vlogo pri detoksifikaciji ROS in s tem zaščiti merjaščevih semenčic pred oksidativnim stresom (Strzezek in sod. 1999; Strzezek, 2002a). Dokazano je, da višja TAC semenske plazme izboljša sposobnost zamrzovanja merjaščevega semena in zmanjša poškodbe DNK, povzročene s procesom zamrzovanja (Fraser in Strzezek, 2007). Sklepamo lahko, da nižji raven TAC najverjetneje ne nudi ustrezne zaščite semenčic pred oksidativnim stresom, kar vodi v poškodbe semenčic. Zaradi nižje TAC v dializiranem semenu smo domnevali, da se je posledično povečala občutljivost semenčic na ROS, s tem pa tudi stopnja lipidne peroksidacije. Ta se je namreč po dializi v naši raziskavi statistično značilno povišala v primerjavi z nedializiranimi vzorci ($P < 0,05$). Kljub temu pa v delu študije, v katerem smo proučevali vpliv dialize in dodatka antioksidanta, statistično

značilnega padca v TAC po dializi nismo dobili. Koziorowska-Gilun in sod. (2011a) so v svoji raziskavi celo zaključili, da je dializa povišala raven celokupne antioksidantne kapacitete v semenski plazmi merjascev, čeprav niso potrdili statistično značilne razlike v ravni TAC med dializirano in nedializirano skupino. Te nasprotuječe si rezultate je težko razložiti in bille potrebne dodatne raziskave, ki bi vključevale večjo število vzorcev. Težava je morda tudi v sami metodi, saj so pogoji reakcije nefiziološki (Serafini in Del Rio, 2004), inhibicijo kopičenja ABTS^{•+} pa določamo v omejenem času (3 minutah), v katerem ni nujno, da vsi antioksidanti že reagirajo (Cao in Prior, 1998). Vzorci so bili v delu študije, v katerem smo proučevali vpliv dialize in dodatka antioksidanta, razredčeni na 100×10^6 semenčic. Večja razredčitev vzorcev bi lahko vplivala na razlike v TAC med skupinami in izničila razlike, ki so se pojavile med dializiranimi in nedializiranimi vzorci v delu študije, kjer smo proučevali vpliv dialize na oksidativni status semena.

Zanimivo je, da se v naši raziskavi TAC kljub dodatku α -tokoferola ni statistično značilno povečala v primerjavi s skupinami semena brez dodatka α -tokoferola. Sohrabipour in sod. (2013), ki so dodajali vitamin E v prehrano podgan, so ugotovili, da kljub manjšemu oksidativnemu stresu v semenu statistično značilnih razlik v TAC ni bilo. Glede na to, da TAC zavzema vse antioksidante, prisotne v semenski plazmi, je možno, da dodatek α -tokoferola predstavlja le majhen delež TAC, zato razlik z metodo ne uspemo zaznati. Možno je tudi, da se je α -tokoferol kot najpomembnejši antioksidant v plazemski membrani takoj po dodajanju vgradil v plazemsko membrano semenčic in ga v semenski plazmi, v kateri smo TAC merili, po 72 urah hranjenja ni bilo več mogoče zaznati.

Lipidna peroksidacija, ki smo jo vrednotili s testom TBARS, se med hranjenjem semena ni statistično značilno spremenjala ne v nedializiranem in ne dializiranem semenu. V nasprotju s tem sta se TBARS in 8-isoprostan v delu študije, v katerem smo določali vpliv dialize in dodatka antioksidanta, statistično značilno povišala v vseh skupinah hranjenega semena ($P < 0,05$) z izjemo skupine dializiranega semena z dodatkom antioksidanta. To je v skladu z ugotovitvijo Kumaresana in sod. (2009), po kateri je stopnja lipidne peroksidacije v semenski plazmi, merjena s TBARS, naraščala s časom hranjenja semena.

Guthrie in Welch (2012) sta ugotovila, da je bazalna produkcija ROS in stopnja lipidne peroksidacije, merjena v živih semenčicah, nizka v svežem in zamrznjenem merjaščevem semenu in prizadene le 4 % semenčic. Ti nasprotujoči si rezultati so lahko posledica dejstva, da TBARS test ne loči med živimi in mrtvimi semenčicami za razliko od BODIPY barvila, s katerim se izmeri stopnjo lipidne peroksidacije le v živih semenčicah (Guthrie in Welch, 2012). Izvor ROS in posledična lipidna peroksidacija sta zatorej lahko posledica nastajanja ROS v majhni skupini semenčic, morda tistih s prisotnostjo protoplazmatskih kapljic ali v skupini mrtvih semenčic (Guthrie in Welch, 2012). Glede na to, da se v prvem delu naše raziskave v času od 24 do 72 ur hranjenja semena delež živih semenčic ni statistično značilno spremenjal, je morda to razlog, da ni prišlo do statistično značilnih sprememb v stopnji lipidne peroksidacije med hranjenjem semena. V drugem delu raziskave smo imeli precej večji delež mrtvih semenčic, kar bi bil lahko razlog za nastajanje večjih količin ROS in posledično višjo lipidno peroksidacijo. Podobno so ugotovili tudi Martinez-Alborcia in sod. (2012), pri katerih je imelo merjaščeve seme, ki je pred zamrzovanjem vsebovalo več nefunkcionalnih semenčic, več ROS in višjo stopnjo lipidne peroksidacije po tajanju. V poškodovanih semenčicah pride do strukturnih sprememb v sestavi plazemske membrane, ki vodijo v izhajanje proteinov, prehajanje fosfolipidov med zunanjim in notranjim stranom lipidnega dvošlojnika, odlepljanje akrosoma in kopiranje ROS (Martinez-Alborcia in sod., 2012). Višja stopnja lipidne peroksidacije med hranjenjem semena je bila lahko poleg večje produkcije ROS tudi posledica večjega razredčenja semena, do katerega je prišlo zaradi dodajanja antioksidantov in namena priprave osemenjevalnih doz. Radomil in sod. (2011) so namreč ugotovili, da je stopnja lipidne peroksidacije višja v bolj razredčenem semenu, verjetno zaradi zmanjšane vsebnosti antioksidantov, ki so sicer prisotni v semenski plazmi.

Dinamika spremjanja stopnje lipidne peroksidacije je bila v naši raziskavi enaka ne glede na to, ali smo jo določali s testom TBARS ali pa smo določali 8-isoprostan. Z dializo se je povečala stopnja lipidne peroksidacije, kar kaže na neustrezno zaščito semenčic pred oksidativnim stresom po dializi, vendar smo uspeli z dodatkom antioksidanta dializiranemu semenu znižati stopnjo lipidne peroksidacije do te mere, da se ta skupina ni več razlikovala od skupine nativnega semena. Glede na to, da SOD pretvarja O_2^- v H_2O_2 , se

ta v merjaščevem semenu pogosto nahaja v presežku zaradi majhnih količin encima katalaze, ki bi H_2O_2 odstranjevala (Kowalowka in sod., 2008). Ugotavljamo, da je dodatek α -tokoferola, ki reagira s peroksilnimi radikali, zadostoval za zaščito semenčic pred povečano stopnjo lipidne peroksidacije. Tudi po dodatku 200 μM α -tokoferola pred zamrzovanjem merjaščevega semena so ugotovili zmanjšanje lipidne peroksidacije po tajanju (Breininger in sod., 2005; Jeong in sod., 2009).

Aktivnost encima SOD se je v primerjavi z nativnim semenom prvi dan hranjenja statistično značilno povečala tako v dializiranem kot nedializiranem semenu ($P < 0,05$) in bila vsak dan hranjenja statistično značilno višja v nedializiranih vzorcih v primerjavi z dializiranimi ($P < 0,05$). Tudi Strzezek in sod. (2004) so ugotovili, da se med hranjenjem semena zaradi povečane fluidnosti membrane poveča stopnja lipidne peroksidacije in aktivnost encima SOD. Kljub nizki antioksidantni kapaciteti merjaščevega semena (Sanocka in Kurpisz, 2004) predstavlja ravno SOD najpomembnejši antioksidantni encim, ki ščiti semenčice pred oksidativnim stresom; domnevajo, da je višja aktivnost SOD posledica kompenzacije pomanjkanja nizkomolekulskih encimov semenske plazme (Kowalowka in sod., 2008). Hlajenje merjaščevega semena s 15 na 5 °C povzroči nestabilnost plazemske membrane, čeprav se znotraj celic raven O_2 in H_2O_2 celo zniža (Kim in sod., 2011). Višja aktivnost SOD v naših hranjenih vzorcih je lahko posledica izhajanja znotrajcelične SOD iz semenčic zaradi nestabilne plazemske membrane kot posledica kratkotrajno hranjenega semena brez vzoredne lipidne peroksidacije, izmerjene s testom TBARS. Pri bikovem (Nair in sod., 2006) in fazanovem semenu (Partyka in sod., 2012) so namreč ugotovili, da se je aktivnost SOD med hranjenjem semena sicer znižala v semenčicah, vendar narasla v semenski plazmi.

Vpliv dialize in dodatka antioksidanta na kakovost in oksidativni status hranjenega merjaščevega semena do sedaj še ni bil raziskan. Z dializo in dodatkom antioksidanta smo bolje ohranili kakovost hranjenega semena, kar bi lahko izboljšalo oploditveno sposobnost semenčic. Skozi rodila samice namreč lažje prehajajo progresivno gibljive semenčice z normalno morfologijo (Suarez in Pacey, 2006).

Iz sprememb, ki smo jih opazili v stopnji lipidne peroksidacije, TAC in SOD, lahko sklepamo, da je kratkotrajno hranjeno merjaščeve seme bolj občutljivo na oksidativni stres, vendar ga z dodatkom antioksidanta dializiranemu semenu uspešno zmanjšamo. Posledično se bolje ohrani kakovost semena, preprečijo pa se tudi poškodbe DNK. Semenčice s poškodovano DNA povezujemo s slabšo oploditveno sposobnostjo, motnjami v razvoju zarodka pred vgnezditvijo, povečanim številom abortusov in večjo smrtnostjo potomcev (Chen in sod., 2013). Poškodovano DNA imajo lahko tudi morfološko normalne in gibljive semenčice, slab genetski material, ki ga nosijo, pa tako prenesejo na svoje potomce (Avendano in sod., 2009). Verjetnost oploditve jajčne celice s semenčico, ki ima poškodovano DNA, je sicer pri merjascih zelo majhna, saj se semenčice s poškodovano DNA težje vežejo na steno jajcevoda in težje prehajajo skozi rodila samice, manjša pa je tudi verjetnost združitve z jajčno celico (Ardon in sod., 2008). Zgoraj navedeni vplivi kažejo na zmanjšano oploditveno sposobnost omenjenega semena. Glede na rezultate naše raziskave bi bilo zatorej merjaščeve seme pred hranjenjem smiselno dializirati in mu dodati antioksidant. Predvidevamo, da bi se s takšnim postopkom izboljšala oploditvena sposobnost semenčic in kakovost zarodkov, posledično pa povečalo število živorojenih pujskov. V prihodnje bi bilo zanimivo proučiti vpliv dialize in dodatek antioksidanta merjaščevemu semenu slabše kakovosti, saj bi učinek dialize ob dodajanju antioksidanta lahko povečal uporabnost semena s slabšo kakovostjo pri plemensko pomembnih merjascih.

Zaradi vpliva oksidativnega stresa na kakovost semena nas je zanimalo, ali lahko s pomočjo vrednotenja TAC, SOD in TBARS, izmerjenih v sveži semenski plazmi, predvidimo kakovost kratkotrajno hranjenega merjaščevega semena. Pri tem smo primerjali nativne vzorce semena na dan odvzema in po 72 urah hranjenja. Osnovni semenski parametri, s katerimi ocenujemo kakovost semena, niso dovolj zanesljivi za ugotavljanje oploditvene sposobnosti semenčic. Medtem ko je slaba kakovost semena dober pokazatelj neustrezne oploditvene sposobnosti semenčic, pa nam njihova dobra kakovost še ne zagotavlja, da bo imelo seme tudi dobro oploditveno sposobnost (Brahmkshtri in sod., 1999). Zaradi tega se v zadnjih letih namenja veliko pozornosti odkrivanju novih, zanesljivejših pokazateljev

oploditvene sposobnosti semena (Strzezek in sod., 2002b; Mrkun in sod., 2013; Vilagran in sod., 2013).

Lipidna peroksidacija nativnih semenčic, ki smo jo ugotavljali s testom TBARS, je negativno korelirala z gibljivostjo semenčic po 72 urah hranjenja ($r = -0,480$; $P < 0,05$). Ball (2008) sklepa, da je gibljivost semenčic občutljiv pokazatelj oksidativnega stresa in hkrati ena prvih prizadetih lastnosti semenčic. Domnevno naj bi ROS zmanjšale mitohondrijski potencial in produkcijo ATP (Armstrong in sod., 1999; Guthrie in Welch, 2006), kar prizadene gibljivost semenčic. Novejše raziskave kažejo, da izpostavitev merjaščevega semena H_2O_2 zmanjša delež gibljivih semenčic brez zaznavnih sprememb v mitohondrijskemu potencialu ali v vsebnosti ATP (Guthrie in sod., 2008). Podobno izpostavitev svežega ali zamrznjenega semena menadionu (generator superoksida v mitohondrijih) ali H_2O_2 povzroči nenaden padec gibljivosti, ni pa zaznaven padec ATP ali pa do njega pride kasneje (Guthrie in Welch, 2012). Zato predvidevajo, da H_2O_2 pravzaprav ne vpliva na mitohondrije, ampak direktno vpliva na gibalni mehanizem semenčic in morda onemogoči ustrezno izkoriščanje ATP (Guthrie in sod., 2008, Guthrie in Welch, 2012).

TBARS, izmerjen v semenski plazmi na dan odvzema semena, je sicer negativno koreliral z gibljivostjo semenčic po 72 urah hranjenja, vendar pa se TBARS ni izkazal za ustrezni diagnostični pokazatelj kakovosti semena po 72 urah hranjenja.

Korelacije med TAC v semenski plazmi svežega semena in osnovnimi semenskimi parametri hranjenega semena niso bile statistično značilne, čeprav smo jih glede na pomanjkanje antioksidativne zaščite merjaščevega semena pričakovali. Pri ljudeh so ugotovili pozitivno korelacijo med TAC in gibljivostjo semenčic (Khosrowbeygi in Zarghami, 2007). TAC skupaj z ROS se pri ljudeh uporablja za ugotavljanje kakovosti semena in napovedovanje uspešne oploditve (Das in sod., 2008). Različna vsebnost antioksidantov v semenu med različnimi živalskimi vrstami in pri ljudeh je lahko odgovorna za razlike v odgovoru semena na ROS in posledično za razlike v korelacijah med lastnostmi semena in oksidativnimi parametri.

Najvišje negativne korelacije med parametri oksidativnega stresa v sveži semenski plazmi in semenskimi parametri hranjenega semena smo ugotovili pri aktivnosti SOD. V humani medicini so merjenje aktivnost SOD v semenu predlagali za parameter, s katerim bi lahko napovedali kakovost semena. Opazili so namreč linearno korelacijo med spontano lipidno peroksidacijo in aktivnostjo SOD (Alvarez in sod., 1987). Prav tako so pri ljudeh opazili pozitivno korelacijo med gibljivostjo semenčic po tajanju ter vsebnostjo SOD v semenčicah. Zanimivo je, da so v isti raziskavi opazili statistično značilno negativno korelacijo med gibljivostjo semenčic po tajanju ter aktivnostjo SOD v semenu, iz katerega niso odstranili semenske plazme (Buffone in sod., 2012).

Na osnovi ugotovljenih korelacij smo SOD, izmerjen v semenski plazmi na dan odvzema semena, diagnostično ovrednotili z vidika napovedi progresivne gibljivosti, morfologije, preživitvene sposobnosti in ustreznosti kakovosti semena po 72 urah hranjenja. S pomočjo aktivnosti SOD, določene v ml semenske plazme, izmerjene v semenski plazmi preiskovanih vzorcev na dan odvzema semena, lahko z 88,9-odstotno verjetnostjo napovemo, da bo imelo seme več kot 25 % progresivno gibljivih semenčic po 72 urah hranjenja in s 100-odstotno verjetnostjo, da bo imelo seme več kot 85 % živih semenčic po 72 urah hranjenja. Deleža morfoloških napak v hranjenem semenu ne moremo zanesljivo napovedati, kar nam potruje površina pod krivuljo ROC ($AUC = 0,70$; $P > 0,05$), ki je merilo diagnostične vrednosti testa.

V semenčicah se poleg SOD, ki je tesno vezana na membrano semenčice in se sprosti le ob hudih poškodbah membrane, nahaja tudi SOD, ki že ob majhnih poškodbah membrane prehaja iz semenčic v semensko plazmo (Orzošek in sod., 2013). Višja koncentracija poškodovanih semenčic v vzorcu bi tako lahko vplivala na izmerjeno aktivnost SOD v semenski plazmi. Zaradi tega smo aktivnost SOD diagnostično ovrednotili tudi z upoštevanjem koncentracije semenčic v vzorcih; aktivnost SOD v $U/10^6$ semenčic, izmerjena v sveži semenski plazmi, se je prav tako izkazala za dober prognostični pokazatelj progresivne gibljivosti in preživitvene sposobnosti semenčic po 72 urah hranjenja ter ustreznosti vzorcev glede na zgoraj določene kriterije. Zanesljiv pokazatelj preživitvene sposobnosti merjaščevih

semenčic po 72 urah hranjenja je tudi koncentracija TNF- α v sveži semenski plazmi, s katero lahko z več kot 90-odstotno zanesljivostjo napovemo, kolikšen delež semenčic bo preživel (Mrkun in sod., 2013). Tudi kakovost semena po zamrzovanju je mogoče napovedati z različnimi pokazatelji. Dobra pokazatelja progresivne gibljivosti in preživitvene sposobnosti zamrznjenega merjaščevega semena naj bi bila vsebnost akrozin veznega protein (p32), ki je pomemben pri kapacitaciji merjaščevih semenčic in je specifično vezan na akrosom semenčice (Dubé in sod., 2005), ter vsebnost triozafosfat izomeraze (TI), ki je ključna v procesu presnove semenčic (Vilagran in sod., 2013). Vilagran in sod. (2013) so sicer opazili korelacije med vsebnostjo p32 in TI v svežem semenu s progresivno gibljivostjo in deležem živih semenčic po zamrzovanju semena, vendar metode niso diagnostično ovrednotili.

SOD smo diagnostično ovrednotili tudi z vidika napovedi ustreznosti vzorcev merjaščevega semena po hranjenju, pri čemer smo postavili meje pri več kot 85 % preživelih semenčic, deležu gibljivih semenčic nad 70 % in progresivno gibljivih nad 25 % ter deležu morfološko normalnih semenčic nad 50 %. Ob upoštevanju zgornjih kriterijev lahko pri preiskovanih vzorcih z aktivnostjo SOD, izmerjeno v sveži semenski plazmi, s 100-odstotno verjetnostjo napovemo, da bo seme prepoznano za neustrezno in z 87,5-odstotno verjetnostjo, da bo seme prepoznano za ustrezno po 72 urah hranjenja. Z aktivnostjo SOD izmerjeno v U/ 10^6 semenčic, pa lahko s 77,8-odstotno verjetnostjo napovemo, da bo seme prepoznano za neustrezno in s 100-odstotno verjetnostjo, da bo seme prepoznano za ustrezno po 72 urah hranjenja. Mrkun in sod. (2013) so ugotavliali napovedno vrednost semena po treh dneh hranjenja na osnovi osnovnih semenskih parametrov na dan odvzema semena. Ugotovili so, da lahko na osnovi progresivne gibljivosti, deleža morfološko normalnih semenčic in deleža napak na akrosому z vsaj 80-odstotno zanesljivostjo napovemo ustreznost hranjenega semena glede na progresivno gibljivost. Obetajoče rezultate so predstavili Flores in sod. (2009), ki so s pomočjo ocenjevanja različnih tipov gibanja semenčic pred postopkom zamrzovanja napovedali uspešnost zamrzovanja merjaščevega semena. Podobno so tudi Casas in sod. (2009) ocenjevali različne tipe gibanja semenčic in s tem napovedali kakovost hlajenega semena pri 5 °C.

Aktivnost SOD v semenski plazmi hranjenih vzorcev se je tudi pokazala za zanesljiv pokazatelj kakovosti semena, čeprav lahko na osnovi aktivnosti SOD v sveži semenski plazmi z večjo zanesljivostjo napovemo ustreznost hranjenih vzorcev kot z aktivnostjo SOD v hranjenih vzorcih. Aktivnost SOD v semenski plazmi, izmerjena po 72 urah hranjenja, nam namreč s 75-odstotno verjetnostjo napove, da bo seme ustrezovalo vsem predpisanim kriterijem, in z 88,9-odstotno verjetnostjo, da seme ne bo ustrezovalo predpisanim kriterijem za vrednosti semenskih parametrov po treh dneh hranjenja. Ob upoštevanju koncentracije semenčic in diagnostičnem vrednotenju SOD v $U/10^6$ semenčic, po 72 urah hranjenja, lahko sicer zanesljivo napovemo ustreznost hranjenih vzorcev (100-odstotno), vendar s tem testom le v 50-odstotkih odkrijemo vzorce, ki ne ustrezajo predpisanim kriterijem po 72 urah hranjenja.

Ob razvoju enostavnih testov bi lahko aktivnost SOD v svežem semenu torej uporabljali za napovedovanje ustreznosti hranjenega semena. Glede na to, da smo v naši raziskavi vse diagnostične parametre ovrednotili na svežih vzorcih semena (parametri oksidativnega stresa TBARS, SOD in TAC so bili določeni v sveži semenski plazmi) ugotovljenih napovednih vrednosti ne moremo uporabljati pri vzorcih, pri katerih je od odvzema semena preteklo več kot le nekaj ur. V praksi je namreč možno, da v laboratorij prispejo tudi vzorci, pri katerih je od odvzema preteklo dalj časa. Za zanesljivo podajanje diagnostičnih parametrov zgoraj omenjenih vzorcev bi bilo potrebno izvesti dodatno diagnostično vrednotenje na večjem številu vzorcev, kar je lahko predmet nadalnjih raziskav. Z dodatnimi raziskavami bi kazalo aktivnost SOD tudi klinično ovrednotiti z vidika napovedi uspešnosti oploditve in številom živorojenih pujskov.

6 SKLEPI

- ❖ Dializirano seme je imelo bolje ohranjeno progresivno gibljivost semenčic, manjši delež semenčic z napakami na akrosomu in delež semenčic z akrosomsko reakcijo ter nižjo presnovno aktivnost semenčic po 72 urah hranjenja semena.
- ❖ Kljub povečanju deleža kapacitiranih semenčic med hranjenjem semena v skupini nedializiranega in dializiranega semena nismo ugotovili sprememb v izražanju tirozin fosforiliranih proteinov. Med hranjenjem nedializiranega in dializiranega semena semenčice samo navidezno kapacitirajo.
- ❖ Z dializo semenske plazme najverjetneje odstranimo vodotopne nizkomolekulske neencimske antioksidante, saj se je po dializi znižala celokupna antioksidantna kapaciteta (TAC) semenske plazme in povisala stopnja lipidne peroksidacije.
- ❖ Večja razredčitev vzorcev v delu študije, kjer smo proučevali vpliv dialize in dodatka antioksidanta na oksidativni status semena, lahko vpliva na razlike v TAC med različnimi skupinami vzorcev po treh dneh hranjenja in izniči razlike, ki so se pojavile med dializiranimi in nedializiranimi vzorci v delu študije, kjer smo proučevali vpliv dialize na oksidativni status semena.
- ❖ Aktivnost SOD se je kot odgovor na oksidativni stres z dnevi hranjenja semena povisevala tako v dializiranem kot nedializiranem semenu, kar je verjetno posledica njenega izhajanja iz semenčic skozi poškodovano plazemske membrano v semensko plazmo.
- ❖ V dializiranem semenu z dodatkom antioksidanta je stopnja spontane kapacitacije semenčic najnižja, delež živih semenčic, ohranjenost integritete plazemskih membran in mitohondrijskega potenciala pa največja. S pomočjo dialize in dodatkom antioksidanta izboljšamo tudi delež progresivno gibljivih in živih semenčic v primerjavi z nedializiranimi vzorci.
- ❖ Med kratkotrajnim hranjenjem semena se poveča stopnja DNK fragmentacije, kar kaže nato, da hranjenje semena pri 15–17°C vpliva na najpomembnejšo strukturo semenčice – na njeno jedro. Dodatek antioksidanta α-tokoferola

dializiranemu semenu zaščiti semenčice pred fragmentacijo DNK, ki sicer nastane med hranjenjem semena.

- ❖ Kratkotrajno hranjeno merjaščeve seme je zaradi dialize bolj občutljivo na oksidativni stres.
- ❖ Dodatek α -tokoferola dializiranemu semenu zadostuje za zaščito semenčic pred povečano stopnjo lipidne peroksidacije.
- ❖ Aktivnost SOD, izmerjena v sveži semenski plazmi, se je izkazala kot dober pokazatelj kakovosti semena po treh dneh hranjenja pri 15–17 °C in bi zato lahko predstavljala enostaven dodaten korak pri določanju primernosti semena za shranjevanje.

7 POVZETEK

Ocenjevanje oploditvene sposobnosti semena je pri vzreji živali ekonomskega pomena. Moderna prašičjerejska industrija po svetu temelji na umetnem osemenjevanju svinj s hlajenim semenom, vendar pa kakovost merjaščevega semena po kratkotrajnem hranjenju upade. Nizkomolekulske sestavine semenske plazme, ki negativno vplivajo na funkcijo semenčic, lahko odstranimo z dializo. S tem zmanjšamo škodljive učinke, ki nastanejo pri razredčevanju in shranjevanju merjaščevega semena, hkrati pa z odstranitvijo nizkomolekulskih antioksidantov v semenski plazmi vplivamo tudi na skupno antioksidantno kapaciteto semenske plazme. Merjaščovo seme je zaradi visoke vsebnosti nenasičenih maščobnih kislin v plazemski membrani in relativno nizke antioksidantne kapacitete semenske plazme zelo občutljivo na oksidativni stres. Namen dela je bil zato ugotoviti, kakšen je vpliv dialize pred shranjevanjem semena na njegovo kakovost, lipidno peroksidacijo in antioksidantni status semenske plazme ter ugotoviti, ali lahko dodatek antioksidanta dializiranemu semenu zaščiti semenčice pred oksidativnim stresom in posledično izboljša kakovost tekoče hranjenega merjaščevega semena. Namen raziskav je bil tudi ugotoviti, ali lahko spremembe v kakovosti merjaščevega semena po treh dneh hranjenja pri 15–17 °C predvidimo s pomočjo pokazateljev oksidativnega stresa, izmerjenih v semenski plazmi.

Značilnosti semena smo določali z metodami mikroskopije, računalniške analize semena, pretočne citometrije ter biokemijskih in imunokemijskih testov.

Dializirano seme je imelo po treh dneh hranjenja statistično značilno večji delež morfološko normalnih in nekapacitiranih semenčic ($P < 0,05$) in manjši delež semenčic z akrosomsko rekacijo kot nedializirano seme ($P < 0,05$). Določanje tirozin fosforiliranih proteinov v semenčicah nam je potrdilo, da je bila kapacitacija hranjenih semenčic navidezna. Aktivnost SOD se je med hranjenjem semena poviševala v dializiranem in nedializiranem semenu, pri tem pa je bila njena aktivnost statistično značilno višja v nedializiranih vzorcih ($P < 0,05$). Po dializi se je statistično značilno znižala TAC in povišala stopnja lipidne peroksidacije, določena s testom TBARS ($P < 0,05$), kar pripisujemo odstranitvi nizkomolekulskih antioksidantov semenske plazme in posledično povečani

občutljivosti semenčic na oksidativni stres. V delu študije, kjer smo proučevali vpliv dialize in dodatka antioksidantov na oksidativni status semena, razlik v TAC med skupinami ni bilo, predvidevamo da zaradi vpliva razredčitve. Dodatek 200 µM α-tokoferola dializiranemu semenu je omogočil ohranitev lipidne peroksidacije, merjene s TBARS in 8-isoprostanom, na enaki ravni, kot je bila ta določena v nativnih vzorcih. Pri vseh ostalih skupinah hrjanjenega semena se je lipidna peroksidacija glede na nativno seme statistično značilno povečala ($P < 0,05$). V dializiranem semenu z dodatkom 200 µM α-tokoferola se po treh dneh hrjanjenja semena DNK fragmentacija in mitohondrijski potencial nista statistično značilno razlikovala od nativnih vzorcev ($P > 0,05$), pri ostalih skupinah hrjanjenega semena pa je bilo povečanje DNK fragmentacije in porušenje mitohondrijskega potenciala statistično značilno glede na nativno seme ($P < 0,05$). Hranjeno dializirano seme z dodatkom 200 µM α-tokoferola je imelo boljšo progresivno gibljivost in bolje ohranjeno integriteto plazemske membrane v primerjavi s hrjenim nedializiranim semenom ($P < 0,05$).

Dializa semena in dodatek antioksidanta pred kratkotrajnim hrjanjem semena bolje ohrani kakovost semena in bi zato lahko predstavljala enostaven dodaten korak pred shranjevanjem merjaščevega semena.

Pokazatelje oksidativnega stresa v semenski plazmi, pri katerih smo ugotovili statistično značilne korelacije s parametri hrjanjenega semena, smo diagnostično ovrednotili z vidika napovedi kakovosti merjaščevega semena po treh dneh hrjanja. Na osnovi analize ROC smo ugotovili, da je aktivnost SOD v sveži semenski plazmi zanesljiv pokazatelj progresivne gibljivosti ($AUC = 0,86$; $P < 0,01$) in preživitvene sposobnosti ($AUC = 0,85$; $P < 0,01$) hrjenih semenčic. Prav tako smo na osnovi aktivnosti SOD v sveži semenski plazmi lahko zanesljivo ločevali med neustreznimi in ustreznnimi vzorci semena, ki so imeli po treh dneh hrjanja več kot 85 % živih semenčic, več kot 70 % gibljivih in več kot 25 % progresivno gibljivih ter več kot 50 % morfološko normalnih semenčic. S 87,5-odstotno verjetnostjo namreč lahko napovemo, da bo vzorec z aktivnostjo SOD v sveži semenski plazmi pod 1,05 U/ml po treh dneh hrjanja ustrezan, in s 100-odstotno verjetnostjo, da sveže seme, ki ima aktivnost SOD višjo od 1,05 U/ml, ne bo ustrezno glede na zgoraj navedene kriterije za

ZAKOŠEK PIPAN M. Vpliv odstranitve nizkomolekulskih ... na oksidativni status in lastnosti ... semena ...

Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2014. Doktorska disertacija

kakovost hrانjenega semena. Rezultati naše raziskave torej kažejo na to, da je aktivnost SOD, izmerjena v sveži semenski plazmi, dober pokazatelj kakovosti semena po treh dneh hrانjenja.

8 SUMMARY

Evaluating the fertility of sperm is economically important in breeding management. The modern boar industry worldwide is based on artificial insemination of sows mostly with cooled semen. However, after short term storage the quality of boar semen is diminished. Low-molecular weight components in the seminal plasma, that can have a negative effect on spermatozoa function, can be removed by dialysis. Harmful effects associated with dilution and storage of boar semen can thus be minimized. On the other hand, removal of low molecular weight antioxidants in seminal plasma could influence its total antioxidant status. Additionally, porcine semen is very sensitive to oxidative stress due to the high content of unsaturated fatty acids in the plasma membrane and the relatively low antioxidant capacity of boar seminal plasma. The aim of our study was therefore to determine the effect of seminal plasma dialysis on semen quality, lipid peroxidation and antioxidant status in seminal plasma and to determine whether adding antioxidants to dialysed semen could protect sperm against oxidative damage, thereby improving the quality of liquid stored boar semen. We also investigated whether changes in boar semen quality after 3 days of storage at 15 to 17 °C could be predicted with oxidative stress markers measured in seminal plasma.

Semen characteristics were determined with assessment by microscopy, computer semen analyses, flow cytometry analyses and by biochemical and immunochemical assays.

Dialysed semen contained a significantly higher percentage of morphologically normal and non-capacitated spermatozoa ($P < 0.05$) and significantly lower level of acrosomally reacted spermatozoa than non-dialysed semen ($P < 0.05$). Determination of tyrosine phosphorylated proteins in spermatozoa confirmed capacitation-like modifications in stored spermatozoa. SOD activity increased with storage time in dialysed and non-dialysed semen with SOD levels being significantly higher in non-dialysed semen samples ($P < 0.05$). After dialysis a significant decrease in TAC and increase in the level of lipid peroxidation, measured with TBARS ($P < 0.05$), was observed, which could be due to the removal of low-molecular antioxidants from seminal plasma and the consequently

increased sensitivity of spermatozoa to oxidative stress. There were no changes among semen groups in TAC in the part of research where we evaluated the impact of semen dialysis and addition of antioxidant on semen oxidative status, probably due to the dilution of semen samples. Addition of 200 µM α-tocopherol to dialysed semen maintained lipid peroxidation, measured with TBARS and 8-isoprostanate, on the same level as in native samples, in contrast to all the other groups of stored semen where the level was significantly higher than in native samples. After three days of storage, dialysed semen with 200 µM α-tocopherol did not differ significantly from native samples with respect to DNA fragmentation and mitochondrial potential. All other groups of stored semen showed a significant increase of DNA fragmentation and a decrease in mitochondrial potential when compared to native samples ($P < 0.05$). Stored dialysed semen, with 200 µM α-tocopherol, retained higher progressive motility and preserved membrane integrity better than non-dialysed semen samples ($P < 0.05$).

Dialysing semen and adding antioxidant prior to short term preservation is effective in improving the quality of liquid stored boar semen and could therefore be a simple additional step for preserving it.

The oxidative stress markers in seminal plasma that correlated significantly with parameters in stored semen were diagnostically evaluated as predictors of semen quality after 3 days of storage. Based on ROC analysis, SOD activity in fresh boar semen was found to be a reliable predictor of the progressive motility ($AUC = 0.86$; $P < 0.01$) and viability ($AUC = 0.85$; $P < 0.01$) of stored spermatozoa. Measurement of SOD activity in seminal plasma enables between unsatisfactory and satisfactory semen samples to be differentiated. The latter had, after three days of storage, more than 85 % of viable spermatozoa, more than 70 % of motile spermatozoa, more than 25 % of progressive motile spermatozoa and more than 50 % of morphologically normal spermatozoa. Thus, SOD levels of less than 1.05 U/ml lead to the prediction, with 87.5 % accuracy, that the semen will meet the requirements for satisfactory semen characteristics after storage, while semen with SOD levels higher than 1.05 U/ml will not exhibit, with 100 % accuracy, all the required semen parameters after storage. The results of our study indicate that

ZAKOŠEK PIPAN M. Vpliv odstranitve nizkomolekulskih ... na oksidativni status in lastnosti ... semena ...

Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2014. Doktorska disertacija

measurement of SOD in fresh boar seminal plasma can be used as a valuable predictor of semen quality after 3 days of storage.

9 ZAHVALA

Na začetku bi se rada zahvalila *prof. dr. Marjanu Koscu*, ki me je izbral izmed vseh možnih kandidatov, me usmeril ter mi omogočil pot v raziskovanje, zaradi njegove vere vame in izkazanega zaupanja. Upam, da sem izpolnila njegova pričakovanja.

Iskrena hvala mentorici *izr. prof. dr. Petri Zrimšek*, za podporo, koristne napotke pri organiziraju raziskave, statistični obdelavi podatkov, hitrem popravljanju osnutkov naloge in njenem raziskovalnem zanosu. Hvala za vso spodbudo in pomoč pri delu. S svojimi idejami in konkretnimi nasveti mi je dajala zagon in močno pripomogla h končnemu izdelku. Hvala za zaupanje, skrb in neizmerno vero vame.

Somentorju *izr. prof. dr. Janku Mrkunu*, za pomoč pri številnih težavah, s katerimi sem se srečevala med raziskavo, za hitro popravljanje osnutka naloge, reševanje tehničnih vprašanj, za vse nasvete, številne pogovore in spodbude. Brez njegove podpore bi bilo vse veliko težje.

Lepa hvala *doc. dr. Primožu Klincu* za argumentirane pripombe in nasvete, ki so pripomogli k izboljšavi doktorata. In zato, ker mi je nedvoumno pokazal, da je pot do cilja, čeprav trnova ter polna prerek in presoje, vendar z veliko volje in vztrajnosti na koncu izvedljiva.

Spoštovanemu predsedniku komisije *prof. dr. Robertu Frangežu* za hitro oceno doktorske disertacije, veliko vloženega truda in časa, za koristne in dobre nasvete, skrb, optimizem in spodbudo. Iskrena hvala tudi *izr. prof. dr. Irmi Virant Klun* in *doc. dr. Branku Zornu* za njuno zanimanje, pripombe in nasvete, ki so pripomogli k izboljšanju doktorske disertacije. Najlepša hvala, ker sta se kljub časovni stiski vedno hitro odzvala.

Hvala *izr. prof. dr. Alenki Nemeč Svete* za analize SOD in TAC. Zahvaljujem se ji tudi za čas, ki mi ga je posvetila, za čudovito življenjsko energijo, ki jo izžareva. Tvoja pripravljenost, da pomagaš, in tvoja ljubezen do dela sta občudovanja vredni.

Posebna zahvala velja *prof. dr. Janku Kosu* s Fakultete za farmacijo Univerze v Ljubljani, ker mi je omogočil, da sem lahko uporabljala njihove aparature, ter *asist. dr. Anji Pišlar*, prav tako s Fakultete za farmacijo, za obdelavo podatkov in pomoč pri analizah, ki smo jih izvajali na pretočnem citometru. S svojimi idejami in nasveti mi je precej olajšala pot skozi neznano.

Mateji Bogataj za pomoč pri analizah, pomoč pri iskanju tehničnih ali logističnih rešitev, za vedno hitro opravljeno delo in zato, ker sem se lahko nanjo vedno zanesla. Hvala za prijetno vzdušje v laboratoriju in številne prijateljske pogovore. Hvala tudi *Matjažu Petroviču* za njegovo pomoč, dobro voljo in iskanje rešitev.

Lepa hvala *Mag. Brigit Greč Smole* za pomoč pri pregledu literature, *Alenki Šalej, prof. slo.*, za natančno lektoriranje obsežne vsebine, in *prof. dr. Rogerju Painu* za lektoriranje angleškega besedila.

I would like to thank prof. dr. Margaret Casal for her constant encouragement and her invaluable guidance in clinical work, which enabled me to grow as a veterinarian and become a better person. Working with you at Penn was one of the best times in my veterinary career.

Marku, zame najboljšemu sopotniku, za vso twojo ljubezen, potrpežljivost, spodbudo, nasvete, podporo in strokovne pripombe. Hvala, ker si verjel vame v trenutkih, ko sem sama nad sabo že obupala, ker s svojo pozitivnostjo in humorjem vedno najdeš besede, s katerimi se razjasni nebo, in ker te tempo življenja ni odvrnil od tega, da bi videl lepoto, ki nam jo ponuja. *Najini Taji in Nuši*, ker mi s svojo neizmerno ljubeznijo, neverjetno življenjsko energijo in dobro voljo uspeta v še tako težkih trenutkih pričarati nasmeh na obraz. Rada vas imam.

Še posebej bi se rada zahvalila moji *mami in očiju*, izredno delovnima človekoma, ki sta svoji življenji žrtvovala zame in za mojega brata. Za vso ljubezen, spodbudo ter trdno in stalno podporo iz ozadja, še posebej v času, ko sem to najbolj potrebovala. Zelo vaju imam rada in brez vaju bi bil vsak korak precej težji. Hvala tudi mojemu bratu, ki mi kadarkoli je potrebno, stoji ob strani in nesebično pomaga.

Hvala moji drugi družini – tastu Jožku in tašči Bruni, ker se vedno tako iskreno veselita z mano vseh mojih uspehov, hvala za vse male in velike pozornosti in hvala, da ste me vzeli za svojo.

Zahvaljujem se tudi Javni agenciji za raziskovalno dejavnost RS za sofinanciranje podiplomskega študija in Veterinarski fakulteti, kjer sem bila v času podiplomskega študija zaposlena.

Na koncu bi se rada zahvalila še vsem ostalim sodelavcem in vsem drugim, ki so mi pomagali, me spodbujali in s svojo dobro voljo olajšali nastanek tega dela.

10 LITERATURA

- Agarwal A, Said TM. Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility. *Hum Reprod* 2003; 9: 331–45.
- Agarwal A, Prabakaran S, Allamaneni S. Relationship between oxidative stress, varicocele and infertility: a meta-analysis. *Reprod Biomed* 2006; 12(5): 630–3.
- Ahmed MA, Mahmoud MD. The performance of 10 different methods for the estimation of sperm concentration. *Fertil Steril* 1997; 68(2): 340-5.
- Aitken RJ, Clarkson JS, Fishel S. Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation and human sperm function. *Biol Reprod* 1989; 41: 183–97.
- Aitken RJ, Paterson M, Fisher H, Buckingham DW, van Duin M. Redox regulation of tyrosine phosphorylation in human spermatozoa and its role in the control of human sperm function. *J Cell Sci* 1995; 105(5): 2017–25.
- Aitken RJ, Buckingham DW, Carreras A, Irvine DS. Superoxide dismutase in human sperm suspension: relationship with cellular composition, oxidative stress, and sperm function. *Free Radic Biol Med* 1996; 21: 495–504.
- Aitken RJ, Koopman P, Lewis SE. Seeds of concern. *Nature* 2004; 432: 48–52.
- Aitken RJ. Sperm function tests and fertility. *Int J Androl* 2006; 29: 69–75.
- Aitken RJ, De Iuliis GN. Value of DNA integrity assays for fertility evaluation. *Soc Reprod Fertil Suppl* 2007; 65: 81–92.
- Aitken RJ, Koppers AJ. Apoptosis and DNA damage in human spermatozoa. *Asian J Androl* 2011; 13: 36–42.
- Akanmu D, Cecchini R, Aruoma OI, Halliwell B. The antioxidant action of ergothioneine. *Arch Biochem Biophys* 1991; 288(1): 10–6.
- Aksoy E, Aktan TM, Duman S, Cuce G. Assessment of spermatozoa morphology under light microscopy with different histologic stains and comparison of morphometric measurements. *Int J Morphol* 2012; 30(4): 1544–50.
- Alkmin DV, Martinez-Alborcia MJ, Parrilla I, Vazquez JM, Martinez EA, Roca J. The nuclear DNA longevity in cryopreserved boar spermatozoa assessed using the Sperm-Sus-Halomax. *Theriogenology* 2013; 79: 1294–300.

ZAKOŠEK PIPAN M. Vpliv odstranitve nizkomolekulskih ... na oksidativni status in lastnosti ... semena ...

Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2014. Doktorska disertacija

Alvarez JG, Touchstone JC, Blasco L, Storey BT. Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogene peroxide and superoxide in human spermatozoa. Superoxide dismutase as major enzyme protectant against oxygen toxicity.

J Androl 1987; 8(5): 338–48.

Apel K, Hirt H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. Annu Rev Plant Biol 2004; 55: 373–99.

Ardon F, Helms D, Sahin E, Bollwein H, Topfer-Petersen E, Waberski D. Chromatin-unstable boar spermatozoa have little chance of reaching oocytes in vivo. Reproduction 2008; 135(4): 461–70.

Armstrong JS, Rajasekaran M, Chamulirat W, Gatti P, Hellstrom WJ, Sikka SC. Characterization of reactive oxygen speciesinduced effects on human spermatozoa movement and energy metabolism. Free Radic Biol Med 1999; 26: 869–80.

Ashworth PJC, Harrison RAP, Miller NG, Plummer JM, Watson PJ. Survival of ram spermatozoa at high dilutions: protective effect of simple constituents of culture media as compared with seminal plasma. Reprod Fertil Dev 1994; 6: 173–80.

Awda BJ, Mackenzie-Bell M, Buhr MM. Reactive oxygen species and boar sperm function. Biol Reprod 2009; 81: 553–61.

Awda BJ, Buhr MM. Extracellularsignal-regulated kinases (ERKs) pathway and reactive oxygen species regulate tyrosine phosphorylation in capacitating boar spermatozoa. Biol Reprod 2010; 83: 750–8.

Ayala A, Muñoz MF, Argüelles S. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. Oxid Med Cell Longev 2014; e360438 (31 str.)
<http://www.hindawi.com/journals/omcl/2014/360438> (8. maj 2014)

Bailey JL, Bilodeau JF, Cormier N. Semen cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomemenon. J Androl 2000; 21: 1–7.

Bailey JL, Tardif S, Dube C, et al. Use of phophoproteomics to study tyrosine kinase activity in capacitating boar sperm: kinase activity and capacitation. Theriogenology 2005; 63: 599–614.

Bailey JL, Lessard C, Jacques J, et al. Cryopreservation of boar semen and its future importance to the industry. Theriogenology 2008; 70: 1251–9.

ZAKOŠEK PIPAN M. Vpliv odstranitve nizkomolekulskih ... na oksidativni status in lastnosti ... semena ...

Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2014. Doktorska disertacija

Baker MA, Aitken RJ. Reactive oxygen species in spermatozoa: methods for monitoring and significance for the origins of genetic disease and infertility.

Reprod Biol Endocrinol 2005; 3: e67 (9 str.)

<http://www.rbej.com/content/3/1/67> (29. november 2005)

Ball BA. Oxidative stress, osmotic stress and apoptosis: Impacts on sperm function and preservation in the horse. Anim Reprod Sci 2008; 107: 257–67.

Bassiri F, Tavalaee M, Shiravi AH, Mansouri S, Nasr-Esfahani MH. Is there an association between HOST grades and sperm quality? Hum Reprod 2012; 27(8): 2277–84.

Bassiri F, Tavalaee M, Nasr-Esfahani MH. Correlation between different patterns of hypoosmotic swelling and sperm functional tests. Int J Fertil Steril 2013; 7(3): 193–8.

Baumber J, Ball BA, Gravance CG, Medina V, Davis-Morel MCG. The effect of reactive oxygen species on equine sperm motility, viability, acrosomal integrity, mitochondrial membrane potential and membrane lipid peroxidation. J Androl 2000; 23: 259–69.

Bayir H. Reactive oxygen species. Crit Care Med 2005; 33(12 Suppl): S498–501.

Begona PL, Pedro YG, Pedro GC. Four subpopulations of boar spermatozoa defined according to their response to the short hypoosmotic swelling test and acrosome status during incubation at 37 °C. Theriogenology 2003; 60: 1401–7.

Bennetts LE, Aitken RJ. A comparative study of oxidative DNA damage in mammalian spermatozoa. Mol Reprod Dev 2005; 71: 77–87.

Bizzaro D, Manicardi G, Bianchi PG, Sakkas D. Sperm decondensation during fertilisation in the mouse. Presence of DNase I hypersensitive sites in situ and a putative role for topoisomerase II. Zygote 2000; 8: 197–202.

Björndahl L, Söderlund I, Kvist U. Evaluation of the one-step eosin-nigrosin staining technique for human sperm vitality assessment. Hum Reprod 2003; 18(4): 813–6.

Björndahl L, Kvist U. Human sperm chromatin stabilization: a proposed model including zinc bridges. Mol Human Reprod 2010; 16: 23–9.

Boe-Hansen GB, Ersbøll AK, Greve T, Christensen P. Increasing storage time of extended boar semen reduces sperm DNA integrity. Theriogenology 2005; 63: 2006–19.

Boe-Hansen GB, Christensen P, Vibjerg D, Nielsen MBF, Hedeboe AM. Sperm chromatin structure integrity in liquid stored boar semen and its relationships with field fertility. Theriogenology 2008; 69: 728–36.

ZAKOŠEK PIPAN M. Vpliv odstranitve nizkomolekulskih ... na oksidativni status in lastnosti ... semena ...

Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2014. Doktorska disertacija

Brahmkshtri BP, Edwin MJ, John MC, Nainar AM, Krishnan Ar. Relative efficacy of conventional sperm parameters and sperm penetration bioassay to assess bull fertility *in vitro*. *Anim Reprod Sci* 1999; 54: 159–68.

Bravo MM, Aparicio IM, Garcia-Herreros M, Gil MC, Peña FJ, Garcia-Marin LJ. Changes in tyrosine phosphorylation associated with true capacitation and capacitation-like state in boar spermatozoa. *Mol Reprod Dev* 2005; 71(1): 88–96.

Breininger E, Beorlegui NB, O'Flaherty CM, Beconi MT. Alpha-tocopherol improves biochemical and dynamic parameters in cryopreserved boar semen. *Theriogenology* 2005; 63: 2126–35.

Brezezinska-Slebodzinska E, Slebodzinski AB, Pietras B, Wieczorek G. Antioxidant effect of vitamin E and glutathione on lipid peroxidation in boar semen plasma. *Biol Trace Elem Res* 1995; 47: 69–74.

Buffone MG, Calamera JC, Brugo-Olmedo S, et al. Superoxide dismutase content in sperm correlates with motility recovery after thawing of cryopreserved human spermatozoa. *Fertil Steril* 2012; 97(2): 293–8.

Buhr MM, Pettitt MJ. Frozen-thawed boar sperm: isolation of membranes and fluidity measurements. In: Rath D, Johnson LA, Weitze KF, eds. Boar semen preservation III. *Reprod Domest Anim* 1996; 31: 147–52.

Burruel V, Klooster KL, Chitwood J, Ross PJ, Meyers SA. Oxidative damage to rhesus macaque spermatozoa results in mitotic arrest and transcript abundance changes in early embryos. *Biol Reprod* 2013; 89(3): e72 (11 str.)
<http://www.biolreprod.org/content/89/3/72.long> (31. julij 2013)

Buxton GV, Greenstock CL, Helman WP, Ross AB. Critical review of rate constants of hydrated electrons, hydrogen atoms and hydroxyl radicals. *J Phys Chem Ref Data* 1988; 17: 513–7.

Caballero I, Vasquez JM, Gil M et al. Does seminal plasma PSP-I/PSPII spermidhezins modulate the ability of boar spermatozoa to penetrate homologous oocytes *in vitro*? *J Androl* 2004; 25: 1004–12.

Calvete JJ, Reinert M, Sanz L, Topfer-Pettersen E. Effect of glycosylation on the heparin-binding capability of boar and stallion seminal plasma proteins. *J Chromatogr* 1995; 711: 167–73.

Cao G, Prior RL. Comparison of different analytical methods for assessing total antioxidant capacity of human serum. *Clin Chem* 1998; 44(6): 1309–15.

ZAKOŠEK PIPAN M. Vpliv odstranitve nizkomolekulskih ... na oksidativni status in lastnosti ... semena ...

Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2014. Doktorska disertacija

Casas I, Sancho S, Briz M, Pinart E, Bussalleu E, Yeste M, et al. Freezability prediction of boar ejaculates by functional sperm parameters and sperm proteins. *Theriogenology* 2009; 72: 930–48.

Chatterjee SE, de Lamirande E, Gagnon C. Cryopreservation alters membrane sulfhydryl status of bull spermatozoa: protection by oxidized glutathione. *Mol Reprod Dev* 2001; 60: 498–506.

Chen SJ, Allam JP, Duan YG, Haidl G. Influence of reactive oxygen species on human sperm functions and fertilizing capacity including therapeutical approaches. *Arch Gynecol Obstet* 2013; 288: 191–9.

Cejas P, Casado E, Belda-Iniesta C, et al. Implications of oxidative stress and cell membrane lipid peroxidation in human cancer (Spain). *Cancer Causes Control* 2004; 15(7): 707–19.

Centurion F, Vasquez JM, Calvette JJ, et al. Influence of porcine spremadhezins on the susceptibility of boar spermatozoa to high dilution. *Biol Reprod* 2003; 69: 640–6.

Cerolini S, Maldjian A, Surai P, Noble R. Viability, susceptibility to peroxidation and fatty acid composition of boar semen during liquid storage. *Anim Reprod Sci* 2000; 58: 99–111.

Chutia T, Biswas RK, Tamuli MK et al. Effect of holding of semen and washing of seminal plasma on quality and fertility of Hampshire boar semen preserved at liquid state. *Anim Reprod Sci* 2014; 145: 141–9.

Cross NL. Human seminal plasma prevents sperm from becoming acrosomally responsive to the agonist, progesterone: cholesterol is the major inhibitor. *Biol Reprod* 1996; 54: 138–45.

Das S, Chattopadhyay R, Jana SK, et al. Cut-off value of oxygen species for predicting semen quality and fertilization outcome. *Syst Biol Reprod Med* 2008; 54(1): 47–54.

Didion BA, Braun GD, Duggan MV. Field fertility of frozen boar semen: a retrospective report comprising over 2600 AI services spanning a four year period. *Anim Reprod Sci* 2013; 137(3-4): 189–96.

de Ambrogi M, Ballester J, Saravia F, et al. Effect of storage in short- and long-term commercial semen extenders on the motility, plasma membrane and chromatin integrity of boar spermatozoa. *Int J Androl* 2006; 29(5): 543–52.

de Lamirande E, Gagnon C. A positive role of the superoxide anion in triggering hyperactivation and capacitation of human spermatozoa. *Int J Androl* 1993; 16: 21–5.

ZAKOŠEK PIPAN M. Vpliv odstranitve nizkomolekulskih ... na oksidativni status in lastnosti ... semena ...

Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2014. Doktorska disertacija

de Lamirande E, Jiang H, Zini A, Kodama H, Gagnon C. Reactive oxygen species and sperm physiology. *Rev Reprod* 1997; 2: 48–54.

De Leeuw FEE, Colenbrander B, Verkleij AJ. The role membrane damage plays in cold shock and freezing injury. *Reprod Domest Anim* 1990; 1: 95–104.

Dostálová Z, Calvete JJ, Sanz L, Topfer-Petersen E. Quantitation of boar spermadhesins in accessory sex gland fluids and on the surface of epididymal, ejaculated and capacitated spermatozoa. *Biochim Biophys Acta* 1994; 1200(1): 48–54.

Droge W. Free radicals in the control of cell function. *Physiol Rev* 2002; 82: 47–95.

Dubé C, Beaulieu M, Reyes-Moreno C, Guillemette C, Bailey JL. Boar sperm storage capacity of BTS and Androhep Plus: viability, capacitation and tyrosine phosphorylation. *Theriogenology* 2004; 62: 874–86.

Dubé C, Lecrec P, Baba T, Reyes-Moreno C, Bailey J. The proacrosin binding protein, sp32, is tyrosine phosphorylated during capacitation of pig sperm. *J Androl* 2005; 26: 519–28.

Esteves SC, Sharma RK, Thomas Jr AJ, Agarwal A. Evaluation of acrosomal status and sperm viability in fresh and cryopreserved specimens by the use of fluorescent of peanut agglutinin lectin in conjunction with hypo-osmotic swelling test.

Int Braz J Urol 2007; 33: 364–76.

Evenson D, Parks J, Kaproth M, Jost K. Rapid determination of sperm cell concentration in bovine semen by flow cytometry. *J Dairy Sci* 1993; 76: 86–94.

Fair WR, Couch J, Welner N. The purification and assay of the prostate antibacterial factor (PAF). *Biochem Med* 1973; 8: 329–39.

Fisher HM, Aitken RJ. Comparative analysis of the ability of precursor germ cells and epididymal spermatozoa to generate reactive oxygen metabolites. *J Exp Zool* 1997; 277: 390–400.

Flores E, Fernández-Novell JM, Peña A, Rodríguez-Gil JE. The degree of resistance to freezing-thawing is related to specific changes in the structures of motile sperm subpopulations and mitochondrial activity in boar spermatozoa. *Theriogenology* 2009; 72: 784–97.

Flores E, Ramió-Lluch L, Bucci D, Fernández-Novell JM, Peña A, Rodríguez-Gil JE. Freezing-thawing induces alterations in histone H1-DNA binding and the breaking of protein-DNA disulfide bonds in boar sperm. *Theriogenology* 2011; 76: 1450–64.

Ford WC. Regulation of sperm functions by reactive oxygen species. *Hum Reprod* 2004; 10: 387–99.

ZAKOŠEK PIPAN M. Vpliv odstranitve nizkomolekulskih ... na oksidativni status in lastnosti ... semena ...

Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2014. Doktorska disertacija

Fraczek M, Kurpisz M. System redoks w nasieniu męskim i peroksydacyjne uszkodzenia plemników. Postepy Hig Med Dosw (online) 2005; 59: e523–34.
<http://phmd.pl/fulltexthtml.php?ICID=430272> (30.julij 2013)

Fraser L, Strzezek J. The use of comet assay to assess DNA integrity of boar spermatozoa following liquid preservation at 5 and 16 °C. Fol Histochem Cytobiol 2004; 42: 49–55.

Fraser L, Dziekonska A, Strzezek R, Strzezek J. Dialysis of boar semen prior to freezing – thawing: its effects on post – thaw sperm characteristics. Theriogenology 2007; 67: 994–1003.

Fraser L, Strzezek J. Is there a relationship between the chromatin status and DNA fragmentation of boar spermatozoa following freezing–thawing? Theriogenology 2007; 68: 248–57.

Friedberg EC, Walker GC, Siede W, Wood RD, Schultz AR, Ellenberger T. DNA damage. Washington: ASM Press, 2006; 6–96.

Funahashi H, Sano T. Selected antioxidants improve the function of extended boar semen stored at 10°C. Theriogenology 2005; 63: 1605–16.

Gaczarzewicz D, Piasecka M, Udała J, Błaszczyk B, Stankiewicz T, Laszczyńska M. Plasma membrane changes during the liquid storage of boar spermatozoa: a comparison of methods. Acta Vet Hung 2010; 58(1): 105–16.

Gadea J, Selles E, Marco MA, et al. Decrease in glutathione content in boar sperm after cryopreservation. Effect of the addition of reduced glutathione to the freezing and thawing extenders. Theriogenology 2004; 62: 690–701.

Galant A, Preuss M, Cameron JC, Jez JM. Plant glutathione biosynthesis: diversity in biochemical regulation and reaction products. Front Plant Sci 2011; 2: e45 (7 str.)
<http://journal.frontiersin.org/Journal/10.3389/fpls.2011.00045/full> (5. september 2011)

Garcia MA, Graham JK. Dialysis of boar semen and its effect on fresh and freeze-thawed spermatozoa. Cryobiology 1987; 24: 446–54.

Ghiselli A, Serafini M, Natella F, Scaccini C. Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: critical view and experimental data. Free Radic Biol Med 2000; 29(11): 1106–14.

Graham JK. Effect of seminal plasma on the motility of the epi-didymal and ejaculated spermatozoa of the ram and bull during the cryopreservation process. Theriogenology 1994; 41: 1151–62.

ZAKOŠEK PIPAN M. Vpliv odstranitve nizkomolekulskih ... na oksidativni status in lastnosti ... semena ...

Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2014. Doktorska disertacija

Green CE, Watson PF. Comparison of capacitation – like state of cooled boar spermatozoa with true capacitation. *Reproduction* 2001; 122: 889–98.

Greiner M, Pfeiffer D, Smith RD. Principles and practical application of the receiver-operating characteristic analysis for diagnostic tests. *Prev Vet Med* 2000; 54: 23–41.

Grintzalis K, Zisimopoulos D, Grune T, Weber D, Georgiou CD. Method for the simultaneous determination of free/protein malondialdehyde and lipid/protein hydroperoxides. *Free Radic Biol Med* 2013; 59: 27–35.

Grossfeld R, Sieg B, Struckmann C, Frenzel A, Maxwell WM, Rath D. New aspects of boar semen freezing strategies. *Theriogenology* 2008; 70: 1225–33.

Guerriero G, Trocchia S, Abdel-Gawad FK, Ciarcia G. Roles of reactive oxygen species in the spermatogenesis regulation. *Front Endocrinol* 2014; 5: e56 (4 str.)
<http://journal.frontiersin.org/Journal/10.3389/fendo.2014.00056/full> (22. april 2014)

Gumulec J, Raudenska M, Hlavna M, Stracina, et al. Determination of oxidative stress and activities of antioxidant enzymes in guinea pigs treated with haloperidol. *Exp Ther Med* 2013; 5(2): e479–84.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3570091/> (20. november 2013)

Gundersen GG, Shapiro BM. Sperm surface proteins persist after fertilization. *J Cell Biol* 1984; 99: 1343–53.

Guthrie, HD, Welch, GR. Impact of storage prior to cryopreservation on plasma membrane function and fertility of boar sperm. *Theriogenology* 2005; 63: 396–410.

Guthrie HD, Welch GR. Determination of intracellular reactive oxygen species and high mitochondrial potential in percoll-treated viable boar sperm using fluorescence-activated flow cytometry. *J Anim Sci* 2006; 84: 2089–100.

Guthrie HD, Welch GR, Long JA. Mitochondrial function and reactive oxygen species action in relation to boar motility. *Theriogenology* 2008; 70: 1209–15.

Guthrie HD, Welch GR. Effects of reactive oxygen species on sperm function. *Theriogenology* 2012; 78: 1700–8.

Gutteridge JMC. Biological origin of free radicals, and mechanism of antioxidant protection. *Chem Biol Interact* 1994; 91: 133–40.

Gutiérrez-Pérez O, Juárez-Mosqueda ML, Mota D, Trujillo ME. The disruption in actin-perinuclear theca interactions are related with changes induced by cryopreservation observed on sperm chromatin nuclear decondensation of boar semen. *Cryobiology* 2011; 62: 32–9.

ZAKOŠEK PIPAN M. Vpliv odstranitve nizkomolekulskih ... na oksidativni status in lastnosti ... semena ...

Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2014. Doktorska disertacija

Gründemann D, Harlfinger S, Golz S, et al. Discovery of the ergothioneine transporter. Proc Natl Acad Sci USA 2005; 102: 5256–61.

Halliwell B, Chirico S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement and significance. Am J Clin Nutr 1993; 57: 715–25.

Halliwell B, Gutteridge JMC. Free radicals in biology and medicine. 3rd ed. Oxford: Oxford University Press, 1999: 1–35.

Haney P, Herting K, Smith S. Separation characteristics of dialysis membranes. Molecular weight cut-off (MWCO) specifications and rates of buffer exchange with slide-A-lyzer dialysis devices and snakeskin dialysis tubing. Rockford: Thermo Scientific, 2013.
<http://www.piercenet.com/previews/2013-articles/separation-characteristics-dialysis-membranes/> (18. april 2013)

Harkema W, Colenbrander B, Engel B, Woelders H. Effects of exposure of epididymal boar spermatozoa to seminal plasma on the binding of zona pellucida proteins during in vitro capacitation. Theriogenology 2004; 61: 215–26.

Hartman PE. Ergothioneine as antioxidant. Methods Enzymol 1990; 186: 310–8.

Harrison RAP, Jacques ML, Minguez MLP, Miller NGA. Behaviour of ejaculated spermatozoa from bull, boar and ram during thin-layer countercurrent partition in aqueous 2-phase systems. J Cell Sci 1992; 102: 123–32.

Hazout A, Menezo Y, Madelenat P, Yazbeck C, Selva J, Cohen-Bacrie P. Causes and clinical implications of sperm DNA damages. Gynecol Obstet Fertil 2008; 36: 1109–17.

Henkel RR. Leukocytes and oxidative stress: dilemma for sperm function and male fertility. Asian J Androl 2011; 13: 43–52.

Hishinuma M, Sekine J. Evaluation of membrane integrity of canine epididymal spermatozoa by short hypoosmotic swelling test with ultrapure water. J Vet Med Sci 2003; 65(7): 817–20.

Hossain S, Johannsson A, Siqueira AP, Wallgren M, Rodriguez-Martinez H. Spermatozoa in the sperm-peak-fraction of the boar ejaculate show a lower flow of Ca²⁺ under capacitation conditions post-thaw which might account for their higher membrane stability after cryopreservation. Anim Reprod Sci 2011; 37–44.

Huo LJ, Xing-Hong MA, Yang ZM. Assessment of sperm viability, mitochondrial activity, capacitation and acrosome intactness in extended boar semen during long-term storage. Theriogenology 2002; 58: 1349–60.

ZAKOŠEK PIPAN M. Vpliv odstranitve nizkomolekulskih ... na oksidativni status in lastnosti ... semena ...

Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2014. Doktorska disertacija

Iaffaldano N, Meluzzi A. Effect of dialysis on quality characteristics of turkey semen during liquid storage. *Theriogenology* 2003; 60: 421–7.

Idziorek T, Estaquier J, De-Bels F, Ameisen JC. YOPRO-1 permits cytofluorometric analysis of programmed cell death (apoptosis) without interfering with cell viability. *J Immunol Methods* 1995; 185: 249–58.

Imai H, Nakagawa Y. Biological significance of phospholipids hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx, GPx4) in mammalian cells. *Free Radic Biol Med* 2003; 34: 145–69.

Iwamoto T, Tanaka H, Osada T, Shinagawa T, Osamura Y, Gagnon C. Origin of a sperm motility inhibitor from boar seminal plasma. *Mol Reprod Dev* 1993; 36: 475–81.

Jelezarsky L, Vaisberg C, Chaushev T, Sapundjiev E. Localization and characterization of glutathione peroxidase (GPx) in boar accessory sex glands, seminal plasma, and spermatozoa and activity of GPx in boar semen. *Theriogenology* 2008; 69(2): 139–45.

Jeong YJ, Kim MK, Song HJ et al. Effect of alpha-tocopherol supplementation during boar semen cryopreservation on sperm characteristics and expression of apoptosis related genes. *Cryobiology* 2009; 58: 181–9.

Johnson LA, Weitze KF, Fiser P, Maxwell WMC. Storage of boar semen. *Anim Reprod Sci* 2000; 62: 143–72.

Kamal-Eldin A, Appelqvist LÄ. The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols. *Lipids* 1996; 31(7): 671–701.

Kaeoket K, Chanapiwat P, Tummaruk P, Techakumphu M. Supplemental effect of varying L-cysteine concentrations on the quality of cryopreserved boar semen. *Asian J Androl* 2010; 12: 760–5.

Khosrowbeygi A, Zarghami N. Levels of oxidative stress biomarkers in seminal plasma and their relationship with seminal parameters. *BMC Clinic Pathol* 2007; 7: e6 (6 str.) <http://www.biomedcentral.com/1472-6890/7/6> (1. junij 2007)

Khosrowbeygi A, Zarghami N. Seminal plasma levels of free 8-isoprostanate and its relationship with sperm quality parameters. *Indian J Clin Biochem* 2008; 23(1): 49–52.

Kim S, Lee YJ, Kim YJ. Changes in sperm membrane and ROS following cryopreservation of liquid boar semen stored at 15 °C. *Anim Reprod Sci* 2011; 124: 118–24.

Kommisrud E, Paulenz H, Sehested E, Grevle IS. Influence of boar and semen parameters on motility and acrosome integrity in liquid boar semen stored for five days. *Acta Vet Scand* 2002; 43: 49–55.

ZAKOŠEK PIPAN M. Vpliv odstranitve nizkomolekulskih ... na oksidativni status in lastnosti ... semena ...

Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2014. Doktorska disertacija

Kordan W, Holody D, Ericsson B, Fraser L, Rodriguez - Martinez H, Strzezek J. Sperm motility inhibiting factor (SMIF) – a plasmatic peptide with multifunctional biochemical effect on boar spermatozoa. *Reprod Dom Anim* 1998; 33: 347–54.

Kothari S, Thompson A, Agarwal A, du Plessis SS. Free radicals: their beneficial and detrimental effects on sperm function. *Indian J Exp Biol* 2010; 48: 425–35.

Kovács A, Foote RH. Viability and acrosome staining of bull, boar and rabbit spermatozoa. *Biotech Histochem* 1992; 67(3): 119–24.

Koziorowska-Gilun, Koziorowski M, Fraser L, Strzezek J. Antioxidant defence system of boar cauda epididymidal spermatozoa and reproductive tract fluids. *Reprod Domest Anim* 2011a; 46(3): 527–33.

Koziorowska-Gilun, Koziorowski M, Strzezek J, Fraser L. Seasonal changes in antioxidant defence system in seminal plasma and fluids of the boar reproductive tract. *Reprod Biol* 2011b; 11(1): 37–47.

Kowalowka M, Wysocki P, Fraser L, Strzezek J. Extracellular superoxid dismutase of boar seminal plasma. *Reprod Dom Anim* 2008; 43: 490–6.

Kumaresan A, Kadirvel G, Bujarbarua KM, et al. Preservation of boar semen at 18°C induces lipid peroxidation and apoptosis like changes in spermatozoa. *Anim Reprod Sci* 2009; 110: 162–71.

Lasso JL, Noiles EE, Alvarez JG, Storey BT. Mechanism of superoxide dismutase loss from human sperm cells during cryopreservation. *J Androl* 1994; 15: 255–65.

Lenzi A, Picardo M, Gandini, et al. Gluthatione treatment of dyspermia: effect on the lipoperoxidation process. *Hum Reprod* 1994; 9: 2044–50.

Lewis B, Aitken RJ. A redox-regulated tyrosine phosphorylation cascade in rat spermatozoa. *J Androl* 2001; 22: 611–22.

Mahfouz R, Sharma R, Sharma D, Sabanegh E, Agarwal A. Diagnostic value of the total antioxidant capacity (TAC) in human seminal plasma. *Fertil Steril* 2009; 91: 805–11.

Makker K, Agarwal A, Sharma R. Oxidative stress & male infertility. *Indian J Med Res* 2009; 129: 357–67.

Marin-Guzman J, Mahan DC, Chung YK, Pate JL, Pope WF. Effects of dietary selenium and vitamin E on boar performance and tissue responses, semen quality, and subsequent fertilization rates in mature gilts. *J Anim Sci* 1997; 75(11): 2994–3003.

ZAKOŠEK PIPAN M. Vpliv odstranitve nizkomolekulskih ... na oksidativni status in lastnosti ... semena ...

Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2014. Doktorska disertacija

Martin G, Sabido O, Durand P, Levy R. Cryopreservation induces an apoptosis like mechanism in bull sperm. *Biol Reprod* 2004; 71: 28–37.

Martinez-Alborcia MJ, Valverde A, Parrilla I, Vazquez JM, Martinez EA. Detrimental effects of non-functional spermatozoa on the freezability of functional spermatozoa from boar ejaculate. *PLoS ONE* 2012; 7(5): e36550 (9 str.)
<http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0036550> (2. maj 2012)

Maxwell WMC, Long CR, Johnson LA, Dobrinsky JR, Welch RG. The relationship between membrane status and fertility of boar spermatozoa after flow cytometric sorting in the presence or absence of seminal plasma. *Reprod Fertil Dev* 1998; 10: 433–40.

Maxwell WMC, Johnson LA. Physiology of spermatozoa at high dilution rates: the influence of seminal plasma. *Theriogenology* 1999; 52(8): 1353–62.

McVicar CM, McClure N, Williamson K, Dalzell LH, Lewis SE. Incidence of Fas positivity and deoxyribonucleic acid double-stranded breaks in human ejaculated sperm. *Fertil Steril* 2004; 81(1): 767–74.

Meagher EA, FitzGerald GA. Indices of lipid peroxidation in vivo: strengths and limitations. *Free Radic Biol Med* 2000; 28: 1745–50.

Mendez MF, Zangeronimo MG, Rocha LG, et al. Effect of the addition of IGF-I and vitamin E to stored boar semen. *Animal* 2013; 7(5): 793–8.

Mennella M, Jones R. Properties of spermatozoal superoxide dismutase and lack of involvement of superoxides in metal-ion-catalysed lipid peroxidation reactions in semen. *Biochem J* 1980; 191: 289–97.

Merkies K, Bean LD, Boehnke K, Buhr MM. Effect of select lipids and vitamin E on motility and viability of liquid and cryopreserved boar spermatozoa. *Can J Anim Sci* 2003; 83: 81–8.

Metz KW, Berger T, Clegg ED. Adsorption of seminal plasmaproteins by boar spermatozoa. *Theriogenology* 1990; 34: 691–700.

Minelli A, Liguori L, Collodel G, Lattaiolo P, Castellini C. Effects of the purified IGF-I complex on the capacitation and acrosome reaction of rabbit spermatozoa. *J Exp Zool* 2011; 209: 311–7.

Misiti F, Castagnola M, Zuppi C, Giardina B, Messana I. Role of ergothioneine on S-nitrosoglutathione catabolism. *Biochem J* 2001; 356(3): 799–804.

ZAKOŠEK PIPAN M. Vpliv odstranitve nizkomolekulskih ... na oksidativni status in lastnosti ... semena ...

Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2014. Doktorska disertacija

Moore HDM, Hibbit KG. Fertility of boar spermatozoa after freez-ing in the absence of seminal vesicular proteins. *J Reprod Fertil* 1977; 50: 349–52.

Mrkun J, Kosec M, Zakošek M, Zrimšek P. Method agreement between measuring of boar sperm concentration using makler chamber and photometer.
Acta Vet Beograd 2007; 57(5/6): 563–72.

Mrkun J, Potočnik K, Kosec M, Zrimšek P. Improvement of biotechnological process for conservation of liquid-stored boar semen using dialysis prior to cooling.
Acta Vet Bulgaria 2009; 62: 849–54.

Mrkun J, Kosec M, Zrimšek P. Value of semen parameters, with special reference to TNF- α , in predicting the quality of boar semen after short-term storage.
Acta Vet Hung 2013; 61(2): 209–19.

Mruk DD, Silvestrini B, Mo MY, Cheng CY. Antioxidant superoxid dismutase – a review: its function, regulation in the testis, and role in male fertility.
Contraception 2002; 65: 305–11.

Nair SJ, Brar AS, Ahuja CS, Sangha SPS, Chaudhary KC. A comparative study on lipid peroxidation, activities of antioxidant enzymes and viability of cattle and buffalo bull spermatozoa during storage at refrigeration temperature. *Anim Reprod Sci* 2006; 96: 21–9.

Nikodemus D, Lazic D, Bauer T, et al. Paramount levels of ergothioneine transporter SLC22A4 mRNA in boar seminal vesicles and cross-species analysis of ergothioneine and glutathione in seminal plasma. *J Physiol Pharmacol* 2011; 62(4): 411–9.

O'Leary S, Jasper MJ, Warnes GM, Armstrong DT, Robertson SA. Seminal plasma regulates endometrial cytokine expression, leucocyte recruitment and embryo development in the pig. *Reproduction* 2004; 128: 237–47.

Orzołek A, Wysocki P, Strzeżek J, Kordan W. Superoxide dismutase (SOD) in boar spermatozoa: Purification, biochemical properties and changes in activity during semen storage (16 °C) in different extenders. *Reprod Biol* 2013; 13: 34–40.

Partyka A, Lukaszewicz E, Niżański W. Effect of cryopreservation on sperm parameters, lipid peroxidation and antioxidant enzymes activity in fowl semen.
Theriogenology 2012; 77(8): 1497–504.

Pela R, Calcagni AM, Subiaco S. N-acetyl cysteine overview information.
J Am Coll Cardiol 1999; 66: 495–500.

Pena FJ, Saravia F, Nunez-Martinez I, Johannisson A, Wallgren M, Rodriguez-Martinez H. Do different portions of the boar ejaculate vary in their ability to sustain cryopreservation? *Anim Reprod Sci* 2006; 93: 101–13.

ZAKOŠEK PIPAN M. Vpliv odstranitve nizkomolekulskih ... na oksidativni status in lastnosti ... semena ...

Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2014. Doktorska disertacija

Pérez-Llano B, López-Fernández C, García-Casado P, et al. Dynamics of sperm DNA fragmentation in the swine: ejaculate and temperature effects. Anim Reprod Sci 2010; 119: 235–43.

Perez-Pe R, Muino-Blanco T, Cebrian-Perez JA. Sperm washing method alters the ability of seminal plasma to revert the cold-shock damage on ram sperm membrane. Int J Androl 2001; 24: 352–9.

Petrunkina AM, Volker G, Weitze KF, Beyerbach M, Töpfer-Petrsen E, Waberski D. Detection of cooling – induced membrane changes in the response of boar sperm to capacitating conditions. Theriogenology 2005; 63: 2278–99.

Pinho RO, Lima DM, Shiomi HH, et al. Effect of different cryo-protectants on the viability of frozen/thawed semen from boars of the Piau breed. Anim Reprod Sci 2014; 146(3-4): 187–92.

Piste P. Cysteine – master antioxidant. Int J pharm Chem Biol Sci 2013; 3(1): 143–9.

Puigmulé M, Fàbrega A, Yeste M, Bonet S, Pinart E. Study of the proacrosin-acrosin system in epididymal, ejaculated and in vitro capacitated boar spermatozoa. Reprod Fertil Dev 2011; 23(7): 837–45.

Plante M, de Lamirande E, Gagnon C. Reactive oxygen species released by activated neutrophils, but not by deficient spermatozoa, are sufficient to affect normal sperm motility. Fertil Steril 1994; 62: 387–93.

Radomil L, Pettitt MJ, Merkies KM, Hickey KD, Buhr MM. Stress and dietary factors modify boar sperm for processing. Reprod Domest Anim 2011; 46(2): 39–44.

Reddy KV, Bordekar AD. Spectrophotometric analysis of resazurin reduction test and semen quality in men. Indian J Exp Biol 1999; 37: 782–6.

Repetto MG. Clinical use of chemiluminescence assays for the determination of systemic oxidative stress. In: Popov I, Lewin G, eds. Handbook of chemiluminescent methods in oxidative stress assessment. Kerala, India: Transworld Research Network, 2008: 163–94.

Repetto M, Semprine J, Boveris A. Lipid peroxidation: chemical mechanism, biological implications and analytical determination. In: Catala A, ed. Lipid Peroxidation. Rijeka: INTECH 2012; chapter, e3–30.

<http://www.intechopen.com/books/lipid-peroxidation/lipid-peroxidation-chemical-mechanism-biological-implications-and-analytical-determination> (29. avgust 2012)

Rivlin J, Mendel J, Rubinstein S, Ektovitz N, Breitbart H. Role of hydrogen peroxide in sperm capacitation and acrosome reaction. Biol Reprod 2004; 70: 518–22.

ZAKOŠEK PIPAN M. Vpliv odstranitve nizkomolekulskih ... na oksidativni status in lastnosti ... semena ...

Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2014. Doktorska disertacija

Robertson SA. Seminal fluid signaling in the female reproduction tract: lessons from rodents and pigs. *J Anim Sci* 2007; 85: 36–44.

Roca J, Rodriguez MJ, Gil MA, et al. Survival and in vitro fertility of boar spermatozoa frozen in the presence of superoxide dismutase and/or catalase. *J Androl* 2005; 26: 15–24.

Rodriguez-Martinez H, Saravia F, Wallgren M, et al. Boar spermatozoa in the oviduct. *Theriogenology* 2005; 63: 514–35.

Rodriguez-Martinez H, Barth AD. In vitro evaluation of sperm quality related to in vivo function and fertility. *Soc Reprod Fertil* 2007; 64: 39–54.

Rodriguez-Martinez H, Kvist U, Ernerudh J, Sanz L, Calvete JJ. Seminal plasma proteins: what role do they play? *Am J Reprod Immunol* 2011; 66: 11–22.

Rosatti MI, Beconi MT, Córdoba M. Proacrosin-acrosin activity in capacitated and acrosome reacted sperm from cryopreserved bovine semen. *Biocell* 2004; 28(3): 311–6.

Rutherford KJ, Swiderek KM, Green CB, Chen S, Shively JE, Kwok SCM. Purification and characterization of PSP-1 and PSP-II, two major proteins from porcine seminal plasma. *Arch Biochem Biophys* 1992; 295(2): 352–9.

Saleh RA, Agarwal A. Oxidative stress and male infertility: from research bench to clinical practice. *J Androl* 2002; 23: 737–52.

Sanocka D, Kurpisz M. Reactive oxygen species and sperm cells. *Reprod Biol Endocrinol* 2004; 2: 1–7.

Satorre MM, Breininger E, Beconi MT, Beorlegui NB. Protein tyrosine phosphorylation under capacitating conditions in porcine fresh spermatozoa and sperm cryopreserved with and without alpha tocopherol. *Andrologia* 2009; 41(3): 184–92.

Satorre MM, Breininger E, Beconi MT, Beorlegui NB. Cryopreservation with α -tocopherol and Sephadex filtration improved the quality of boar sperm. *Theriogenology* 2012; 78(7): 1548–56.

Schmehl MK, Anderson SP, Vazquez IA, Graham EF. The effect of dialysis of extended ram semen prior to freezing on post-thaw survival and fertility. *Cryobiology* 1986; 23(5): 406–14.

Schulze M, Henning H, Rüdiger K, Wallner U, Waberski D. Temperature management during semen processing: Impact on boar sperm quality under laboratory and field conditions. *Theriogenology* 2013; 80: 990–8.

Scibior D, Czeczot H. Katalaza – budowa, właściwości, funkcje.

ZAKOŠEK PIPAN M. Vpliv odstranitve nizkomolekulskih ... na oksidativni status in lastnosti ... semena ...

Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2014. Doktorska disertacija

Postepy Hig Med Dosw (Online) 2006; 3: e170–80.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16618987> (21. marec 2006)

Severo CK, Pereira GR, Pereira AM, et al. Cysteine addition on short-term cooled boar semen preservation and its relationship with swine field fertility.

Pesq Vet Bras 2011; 31(1): 25–32.

Selvaraju S, Reddy IJ, Nandi S, Rao SBN, Ravindra JP. Influence of IGF-I on buffalo (*Bubalus bubalis*) spermatozoa motility, membrane integrity, lipid peroxidation and fructose uptake *in vitro*. Anim Reprod Sci 2009; 113: 60–70.

Serafini M, Del Rio D. Understanding the association between dietary antioxidants, redox status and disease: is the total antioxidant capacity the right tool?

Redox Rep 2004; 9(3): 145–51.

Sharma RK, Pasqualotto FF, Nelson DR, Thomas AJ, Agarwal A. The reactive oxygen species-total antioxidant capacity score is a new measure of oxidative stress to predict male infertility. Hum Reprod 1999; 14: 2801–7.

Silva PFN, Gadella BM. Detection of damage in mammalian sperm cells.

Theriogenology 2006; 65: 958–78.

Silva DM, Zangeronimo MG, Murgas LDS, et al. Addition of IGF-I to storage-cooled boar semen and its effects on sperm quality. Growth Horm IGF Res 2011; 21: 325–30.

Simões R, Feitosa WB, Perez Siqueira AF et al. Influence of bovine sperm DNA fragmentation and oxidative stress on early embryo *in vitro* development outcome. Reproduction 2013; 146: 433–41.

Simon L, Lewis SE. Sperm DNA damage or progressive motility: which one is the better predictor of fertilization *in vitro*? Syst Biol Reprod Mol 2011; 57: 133–8.

Słowińska M, Dietrich GJ, Liszewska E, Kozłowski K, Jankowski J, Ciereszko A. Effect of dialysis on the proacrosin/acrosin system and motility of turkey (*Meleagris gallopavo*) spermatozoa during liquid storage. Br Poult Sci 2013; 54(5): 661–8.

Sohrabipour S, Jafari A, Kamalinejad M, Sarrafnejd A, Shahrestany T, Sadeghipour HR. The role of flaxseed and vitamin E on oxidative stress in prepubertal rats with experimental varicocele: experimental study. Iran J Reprod Med Vol 2013; 6: 459–66.

Stanger JD, Vo L, Yovich JL, Almabobi G. Hypo-osmotic swelling test identifies individual spermatozoa with minimal DNA fragmentation.

Reprod Biomed Online 2010; 21(4): e474–84.

<http://www.rbmojournal.com/article/S1472-6483%2810%2900435-9/pdf>

ZAKOŠEK PIPAN M. Vpliv odstranitve nizkomolekulskih ... na oksidativni status in lastnosti ... semena ...

Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2014. Doktorska disertacija

Strzezek J, Kordan W, Kostyra H, Zaborniak, A. Purification and partial characterization of a 5700 Da sperm motility inhibitor factor from seminal plasma of boar. *Anim Reprod Sci* 1992; 29: 35–42.

Strzezek J, Korda W, Glogowski J, Wysocki P, Borkowski K. Influence of semen-collection frequency on sperm quality in boars, with special reference to biochemical markers. *Reprod Domest Anim* 1995; 30(2): 85-94.

Strzezek J, Lapkiewicz S, Lecewicz M. A note on antioxidant capacity of boar seminal plasma. *Anim Sci Pap Rep* 1999; 17: 181–8.

Strzezek J, Kosiniak-Kamysz K, Kuklinska M, Bittmar A, Podstawski Z, Rafalski G. Enzymatic and non-enzymatic antioxidant in stallion and boar semen. In: 4th Annual Conference on European Society for Domestic Animal Reproduction (ESDAR), Prague 2000: 56.

Strzezek J. Secretory activity of boar seminal vesicle glands. *Reprod Biol* 2002a; 2: 243–66.

Strzezek J, Saiz-Cidoncha F, Wysocki P, Tyszkiewicz A, Jastrzebski M. Seminal plasma proteins as markers of biological value of boar semen. *Anim Sci Pap Rep* 2002b; 20: 255–66.

Strzezek J, Lecewitz M, Dziekonska A, Fraser L. A simple method of extraction of lipoprotein fractions from avian egg yolk – protective effect on cooled boar semen. *Theriogenology* 2003; 6: 690–1.

Strzezek J, Fraser L, Kuklinska M, Dziekonska A, Lecewicz M. Effects of dietary supplementation with polyunsaturated fatty acids and antioxidants on biochemical characteristics of boar semen. *Reprod Biol* 2004; 4: 271–87.

Strzezek J, Wysocki P, Kordan K et al. Proteomics of boar seminal plasma – current studies and possibility of their application in biotechnology of animal reproduction. *Reprod Biol* 2005; 5: 271–90.

Suarez SS, Pacey AA. Sperm transport in the female reproductive tract. *Hum Reprod Update* 2006; 12(1): 23–37.

Suleiman SA, Ali ME, Zaki ZM, el-Malik EM, Nasr MA. Lipid peroxidation and human sperm motility: protective role of vitamin E. *J Androl* 1996; 17: 530–7.

Szczesniak-Fabianczyk B, Bochenek M, Smorag Z, Silvestre MA. Effect of antioxidants added to boar semen extender on the semen survival time and sperm chromatin structure. *Reprod Biol* 2003; 3: 81–7.

Tamuli MK, Watson PF. Cold resistance of live boar spermatozoa during incubation after ejaculation. *Vet Rec* 1994; 135: 160–2.

ZAKOŠEK PIPAN M. Vpliv odstranitve nizkomolekulskih ... na oksidativni status in lastnosti ... semena ...

Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2014. Doktorska disertacija

Tardif S, Dubé C, Chevalier S, Bailey JL. Capacitation is associated with tyrosine phosphorylation and tyrosine kinase-like activity of pig sperm proteins. *Biol Reprod* 2001; 65(3): 784–92.

Tavilani H, Goodarzi MT, Doosti M, et al. Relationship between seminal antioxidant enzymes and the phospholipid and fatty acid composition of spermatozoa. *Reprod Biomed online* 2008; 16(5): 649–56.

Tibary A, Graham EF, Asri A, Boukhliq R, Deyo R. Effect of dialysis or centrifugation on post-thaw motility and fertility of Santa Gertrudis bull semen collected by electroejaculation. *Theriogenology* 1990; 33(3): 733–9.

Tienthai P, Chanapiwat P, Manee-in S, Grongsang D, Kaeoket K. Assessment of appropriate *l*-cysteine concentration for boar semen cryopreservation by using flow cytometry. *Thai J Vet Med* 2012; 42(4): 483–8.

Töpfer-Petersen E, Ekhlaei-Hundrieser M, Tsolova M. Glycobiology of fertilization in the pig. *Int J Dev Biol* 2008; 52: 717–36.

Tsai WW, Niessen S, Goebel N, Yates JR, Guccione E, Montminy M. PRMT5 modulates the metabolic response to fasting signals. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013; 110: 8870–5.

Vadnais ML, Kirkwood RN, Tempelmann RJ, Sprecher DJ, Chou K. Effect of cooling and seminal plasma on the capacitation status of fresh boar sperm as determined using chlortetracycline assay. *Anim Reprod Sci* 2005; 87: 121–32.

Vazquez JM, Roldan ER. Phospholipid metabolism in boar spermatozoa and role of diacylglycerol species in the *de novo* formation of phosphatidylcholine. *Mol Reprod Dev* 1997; 47: 105–12.

Vallorani C, Spinaci M, Bucci D, Tamanini C, Galeati G. Effect of antioxidants on boar spermatozoa during sorting and storage. *Animal Reprod Sci* 2010; 122: 58–65.

Vilagran I, Castillo J, Bonet S, et al. Acrosin-binding protein (ACRBP) and triosephosphate isomerase (TPI) are good markers to predict boar sperm freezing capacity. *Theriogenology* 2013; 80(5): 443–50.

Voet D, Voet JG, Pratt CW. Fundamentals of biochemistry: life at the molecular level. 2nd ed. Hoboken: John Wiley and Sons, 2006: 30–1.

Waberski D, Classen R, Hahn T, et al. LH profile and advancement of ovulation after transcervical infusion of seminal plasma at different stages of oestrus in gilts. *J Reprod Fertil* 1997; 109: 29–34.

ZAKOŠEK PIPAN M. Vpliv odstranitve nizkomolekulskih ... na oksidativni status in lastnosti ... semena ...

Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2014. Doktorska disertacija

Waberski D, Helms D, Bayerbach M et al. Sperm chromatin structure in boars used in artificial insemination. *Reprod Domest Anim* 2002; 37(4): 257.

Waberski D, Schapmann E, Henning H, Riesenbeck A, Brandt H. Sperm chromatin structural integrity in normospermic boars is not related to semen storage and fertility after routine AI. *Theriogenology* 2011; 75: 337–45.

Walczak-Jedrzejowska R, Wolski JK, Slowikowska-Hilczer J. The role of oxidative stress and antioxidants in male fertility. *Cent Eur J Urol* 2013; 66(1): 60–7.

Watson PF. Cooling of spermatozoa and fertilizing capacity. *Reprod Domest Anim* 1996; 31: 135–40.

Young IS, McEnemy J. Lipoprotein oxidation and atherosclerosis. *Biochem Soc Trans* 2001; 29: 358–9.

Zee YP, López-Fernández C, Arroyo F, Johnston SD, Holt WV, Gosalvez J. Evidence that single-stranded DNA breaks are a normal feature of koala sperm chromatin, while double-stranded DNA breaks are indicative of DNA damage. *Reproduction* 2009; 138: 267–78.

Zrimšek P, Kunc J, Kosec M, Mrkun J. Spectrophotometric application of resazurin reduction assay to evaluate boar semen quality. *Int J Androl* 2004; 27: 57–62.

11 PRILOGE

11.1 Priloga 1: Primerjava koncentracij izmerjenih spektrofotometrično in določenih s štetjem z Neubauerjevo kamrico

Tabela 6: Primerjava koncentracij izmerjenih spektrofotometrično in s štetjem z Neubauerjevo kamrico

Table 6: Comparison of concentrations measured with spectrophotometer and with counting spermatozoa with Neubauer chamber

Številka vzorca	Ejakulat (10^6 semenčic/ml)		Redčitev 1:2 BTS (10^6 semenčic/ml)		Vzorec redčen do koncentracije $30-50 \times 10^6$ semenčic/ml	
	Fotometer	Kamrica	Fotometer	Kamrica	Fotometer	Kamrica
1.	297,00	249,17	181,00	109,38	102,67	49,25
2.	338,33	292,50	223,67	148,13	78,00	49,00
3.	312,00	233,75	210,33	110,63	58,33	42,00
4.	414,33	296,25	200,00	150,00	82,00	53,50
5.	416,67	358,75	238,00	173,13	101,00	51,83
6.	347,67	278,75	213,33	143,13	94,67	48,75
Razlika (%)	24,84		54,41		74,81	

11.2 Priloga 2: Koeficient variacij za ponovitev v testu za posamezne metode uporabljene za ugotavljanje lastnosti kratkotrajno hranjenega semena po dializi

Tabela 7: Koeficienti variacij za ponovitev v testu

Table 7: Intra-assay coefficients of variability

Metoda	CV (%)
Koncentracija	2,8 ± 1,4
Gibljinost	3,3 ± 1,7
Progresivna gibljinost	2,8 ± 1,5
Preživitvena sposobnost	2,0 ± 1,7
MN	5,1 ± 2,5
Presnovna aktivnost	9,5 ± 4,2
Kapacitacija	5,8 ± 4,3
TAC	2,6 ± 2,9
SOD	2,5 ± 2,0
TBARS	4,6 ± 2,6

Legenda: MN – morfološko normalne semenčice; TAC – skupna antioksidantna kapaciteta; SOD – superoksid dismutaza; TBARS – lipidna peroksidacija določena s testom TBARS; CV – koeficient variacije

Legend: MN – morphologically normal spermatozoa; TAC – total antioxidant capacity; SOD – superoxide dismutase; TBARS – lipid peroxidation measured with TBARS assay; CV – coefficient of variation

11.3 Priloga 3: Ugotavljanje lastnosti kratkotrajno hrانjenega semena po dializi - Vrednosti osnovnih parametrov

Tabela 8: Vrednosti osnovnih parametrov (povprečna vrednost \pm SD, mediana) v dializiranem in nedializiranem semenu v času kartkotrajno hrانjenega semena

Table 8: Values of basic semen parameters (mean \pm SD, median) in dialysed and non-dialysed semen during short storage of semen

Semenski parametri (%)	Vzorci semena						
	N0	N1	D1	N2	D2	N3	D3
Gibljivost	a, A	a	A	ac*	AC*	bc	BC
Povprečje \pm SD	81,8 \pm 8,2	78,3 \pm 6,0	78,7 \pm 7,1	75,2 \pm 8,8	77,6 \pm 6,7	68,9 \pm 15,5	72,0 \pm 13,0
Mediana	82,3	79,7	80,0	76,0	80,3	73,0	75,6
Progresivna gibljivost	a, A	b	B	b	B	b	B
Povprečje \pm SD	39,9 \pm 5,2	30,6 \pm 6,1	29,7 \pm 7,6	28,1 \pm 7,1	30,1 \pm 6,1	26,3 \pm 8,1	28,9 \pm 6,3
Mediana	40,7	30,3	30,3	26,7	30,0	25,3	28,7
Preživitvena sposobnost	a, A	b	B	b	B	b	B
Povprečje \pm SD	93,2 \pm 4,0	90,0 \pm 4,5	89,3 \pm 3,9	88,1 \pm 5,0	88,2 \pm 3,6	87,8 \pm 4,5	87,7 \pm 3,6
Mediana	93,5	91,5	89,5	89,5	88,5	88,0	88,5

Legenda: N0 – nativni vzorci; N1 – nedializirani vzorci 1. dan; D1 – dializirani vzorci 1. dan; N2 – nedializirani vzorci 2. dan; D2 – dializirani vzorci 2. dan; N3 – nedializirani vzorci 3. dan; D3 – dializirani vzorci 3. dan
Vrednosti parametrov vzorcev N0, N1, N2, N3, ki so se statistično značilno razlikovali ($P < 0,05$), so označeni z različnimi malimi črkami. Vrednosti parametrov vzorcev N0, D1, D2, D3, ki so se statistično značilno razlikovali ($P < 0,05$), so označeni z različnimi velikimi črkami. Vrednosti parametrov dializiranega in nedializiranega semena na isti dan hrانjenja, ki sta označeni z *, sta se statistično značilno razlikovali ($P < 0,05$).

Legend: N0 – native samples; N1 – non-dialysed samples on day 1; D1 – dialysed samples on day 1; N2 – non-dialysed samples on day 2; D2 – dialysed samples on day 2; N3 – non-dialysed samples on day 3; D3 – dialysed samples on day 3

Values of N0, N1, N2, N3 marked by different lowercase letters for each parameter differ significantly ($P < 0.05$). Values of N0, D1, D2, D3 marked by different uppercase letters for each parameter differ significantly ($P < 0.05$). Values for dialysed and non-dialysed semen parameters on the same day, marked by *, differ significantly ($P < 0.05$).

11.4 Priloga 4: Ugotavljanje lastnosti kratkotrajno hrانjenega semena po dializi - Morfološke napake semenčic

Tabela 9: Vrednosti deležev različnih morfoloških napak (povprečna vrednost ± SD, mediana) v dializiranem in nedializiranem semenu v času kartkotrajno hrانjenega semena

Table 9: Proportions of different morphological abnormalities (mean ± SD, median) in dialysed and non-dialysed semen during short semen storage

Morfološke napake (%)	Vzorci semena						
	N0	N1	D1	N2	D2	N3	D3
MN	aA	ac*	AC*	bc	BC	d*	B*
Povprečje ± SD	73,1 ± 9,6	66,0 ± 9,0	68,0 ± 9,3	62,1 ± 8,1	63,1 ± 8,3	55,9 ± 9,4	59,7 ± 8,6
Mediana	75,2	67,0	72,0	62,5	63,5	55,7	62,2
Glava	aA	a	A	a	A	a	A
Povprečje ± SD	0,68 ± 0,57	0,66 ± 0,50	0,53 ± 0,44	0,56 ± 0,53	0,56 ± 0,37	0,66 ± 0,40	0,69 ± 0,48
Mediana	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,75	0,5
Akrosom	aA	ac	AC	bc	BC	b*	B*
Povprečje ± SD	7,2 ± 6,3	12,9 ± 8,7	13,3 ± 6,7	16,9 ± 8,5	17,7 ± 6,9	24,8 ± 8,0	21,9 ± 7,0
Mediana	4,75	10,75	11,5	14,75	16,5	22,0	19,0
Vezni del	aA	a	A	a	A	a	A
Povprečje ± SD	6,76 ± 5,32	8,04 ± 4,95	6,10 ± 3,30	7,28 ± 3,01	6,72 ± 3,52	5,47 ± 3,24	5,90 ± 2,48
Mediana	5,25	6,25	5,25	6,0	6,5	4,75	6,0
Vrat	aA	a	A	a	A	a	A
Povprečje ± SD	0,34 ± 0,41	0,47 ± 0,62	0,25 ± 0,32	0,34 ± 0,49	0,41 ± 0,44	0,24 ± 0,30	0,46 ± 0,80
Mediana	0,25	0,25	0,0	0,25	0,25	0,25	0,25
PK	aA	a	A	a	A	a	A
Povprečje ± SD	8,66 ± 5,70	9,96 ± 5,84	8,78 ± 5,08	10,15 ± 6,45	9,24 ± 5,79	10,63 ± 7,65	9,21 ± 5,73
Mediana	5,75	9,0	7,75	8,25	8,5	10,25	8,0
Rep	aA	a	A	a	A	a	A
Povprečje ± SD	4,78 ± 7,30	5,21 ± 5,46	5,71 ± 5,90	5,34 ± 3,50	5,47 ± 3,68	5,71 ± 4,42	5,31 ± 5,44
Mediana	2,75	3,5	3,5	5,75	4,5	4,25	3,75

ZAKOŠEK PIPAN M. Vpliv odstranitve nizkomolekulskih ... na oksidativni status in lastnosti ... semena ...

Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2014. Doktorska disertacija

Legenda: N0 – nativni vzorci; N1 – nedializirani vzorci po 24h; D1 – dializirani vzorci po 24h; N2 – nedializirani vzorci po 48h; D2 – dializirani vzorci 48h; N3 – nedializirani vzorci po 72h; D3 – dializirani vzorci po 72h; MN – morfološko normalne semenčice; PK – protoplazmatske kapljice

Vrednosti parametrov vzorcev N0, N1, N2, N3, ki so se statistično značilno razlikovali ($P < 0,05$), so označeni z različnimi malimi črkami. Vrednosti parametrov vzorcev N0, D1, D2, D3, ki so se statistično značilno razlikovali ($P < 0,05$), so označeni z različnimi velikimi črkami. Vrednosti parametrov dializiranega in nedializiranega semena na isti dan hranjenja, ki sta označeni z *, sta se statistično značilno razlikovali ($P < 0,05$).

Legend: N0 – native samples; N1 – non-dialysed samples after 24h; D1 – dialysed samples after 24h; N2 – non-dialysed samples after 48h; D2 – dialysed samples after 48h; N3 – non-dialysed samples after 72h; D3 – dialysed samples after 72h; MN – morphologically normal spermatozoa; PK – protoplasmatic droplets

Values of N0, N1, N2, N3 marked by different lowercase letters for each parameter differ significantly($P < 0.05$). Values of N0, D1, D2, D3 marked by different uppercase letters for each parameter differ significantlyent ($P < 0.05$). Values of parameters for dialysed and non-dialysed semen on the same day, marked by *, differ significantly ($P < 0.05$).

11.5 Priloga 5: Ugotavljanje lastnosti kratkotrajno hrانjenega semena po dializi - Stopnja kapacitacije semenčic

Tabela 10: Vrednosti deležev nekapacitiranih, kapacitiranih semenčic in semenčic z akrosomsko reakcijo (povprečna vrednost \pm SD, mediana) v dializiranem in nedializiranem semenu v času kartkotrajno hrانjenega semena

Table 10: Proportions of non-capacitated, capacitated and acrosome reacted spermatozoa (mean \pm SD, median) in dialysed and non-dialysed semen during short semen storage

Kategorija semenčic (%)	Vzorci semena						
	N0	N1	D1	N2	D2	N3	D3
Nekapacitirane	aA	ac	AC	bc	BC	b*	B*
Povprečje \pm SD	86,9 \pm 8,8	75,5 \pm 9,3	78,3 \pm 8,8	70,1 \pm 9,1	71,7 \pm 8,1	63,0 \pm 11,4	68,2 \pm 10,1
Mediana	88,0	77,0	79,7	72,5	75,0	66,0	71,0
Kapacitirane	aA	ac	AC	bc	BC	b	B
Povprečje \pm SD	11,2 \pm 5,8	20,0 \pm 6,9	18,6 \pm 6,6	23,9 \pm 5,0	23,4 \pm 4,6	29,2 \pm 8,4	25,6 \pm 6,7
Mediana	10,2	20,0	18,3	24,0	22,5	26,5	23,0
AR	aA	ac	AC	bc*	BC*	b*	B*
Povprečje \pm SD	1,9 \pm 3,3	4,5 \pm 4,9	3,1 \pm 2,9	6,0 \pm 5,3	4,9 \pm 5,0	7,8 \pm 5,5	6,1 \pm 6,0
Mediana	1,5	4,0	2,5	4,5	4,0	6,5	4,5

Legenda: N0 – nativni vzorci; N1 – nedializirani vzorci po 24h; D1 – dializirani vzorci po 24h; N2 – nedializirani vzorci po 48h; D2 – dializirani vzorci po 48h; N3 – nedializirani vzorci po 72h; D3 – dializirani vzorci po 72h; AR – semenčice z akrosomsko reakcijo

Vrednosti parametrov vzorcev N0, N1, N2, N3, ki so se statistično značilno razlikovali ($P < 0,05$), so označeni z različnimi malimi črkami. Vrednosti parametrov vzorcev N0, D1, D2, D3, ki so se statistično značilno razlikovali ($P < 0,05$), so označeni z različnimi velikimi črkami. Vrednosti parametrov dializiranega in nedializiranega semena na isti dan hranjenja, ki sta označeni z *, sta se statistično značilno razlikovali ($P < 0,05$).

Legend: N0 – native samples; N1 – non-dialysed samples after 24h; D1 – dialysed samples after 24h; N2 – non-dialysed samples after 48h; D2 – dialysed samples after 48h; N3 – non-dialysed samples after 72h; D3 – dialysed samples after 72h; AR – acrosome reacted spermatozoa

Values of N0, N1, N2, N3 marked by different lowercase letters for each parameter differ significantly ($P < 0.05$). Values of N0, D1, D2, D3 marked by different uppercase letters for each parameter differ significantly ($P < 0.05$). Values of parameters for dialysed and non-dialysed semen measured on the same day, marked by *, differ significantly ($P < 0.05$).

11.6 Priloga 6: Ugotavljanje lastnosti kratkotrajno hrانjenega semena po dializi - Parametri merjeni v semenski plazmi (TAC, SOD, TBARS)

Tabela 11: Vrednosti parametrov TAC, SOD, TBARS (povprečna vrednost \pm SD, mediana) v dializiranem in nedializiranem semenu v času kartkotrajno hrانjenega semena

Table 11: Values of TAC, SOD, TBARS (mean \pm SD, median) in dialysed and non-dialysed semen during short semen storage

Parametri oksidativnega stresa	Vzorci semena						
	N0	N1	D1	N2	D2	N3	D3
TAC ($\mu\text{mol/l}$)	aA	a*	B*	a*	B*	a*	B*
Povprečje \pm SD	808,8 \pm 185,0	787,6 \pm 183,5	473,8 \pm 149,2	786,5 \pm 186,1	483,5 \pm 158,3	770,9 \pm 194,5	486,8 \pm 154,4
Mediana	810,0	805,0	465,0	790,0	480,0	795,0	500,0
SOD (U/ml)	aA	b*	B*	bd*	B*	cd*	B*
Povprečje \pm SD	1,31 \pm 0,66	2,25 \pm 0,82	2,16 \pm 0,79	2,54 \pm 0,86	2,33 \pm 0,84	2,72 \pm 0,89	2,24 \pm 0,84
Mediana	1,22	2,07	2,06	2,46	2,23	2,45	2,24
TBARS ($\mu\text{mol/l}$)	aA	a*	B*	a*	B*	a*	B*
Povprečje \pm SD	39,9 \pm 5,4	38,4 \pm 3,2	74,0 \pm 8,3	38,7 \pm 5,3	74,7 \pm 8,9	39,0 \pm 4,4	76,2 \pm 8,5
Mediana	40,7	36,7	69,7	37,8	71,4	38,6	72,7

Legenda: N0 – nativni vzorci; N1 – nedializirani vzorci po 24h; D1 – dializirani vzorci po 24h; N2 – nedializirani vzorci po 48h; D2 – dializirani vzorci po 48h; N3 – nedializirani vzorci po 72h; SOD – superoksid dismutaza; TAC – celokupna antioksidantna kapaciteta; TBARS – lipidna peroksidacija določena s testom TBARS

Vrednosti parametrov vzorcev N0, N1, N2, N3, ki so se statistično značilno razlikovali ($P < 0,05$), so označeni z različnimi malimi črkami. Vrednosti parametrov vzorcev N0, D1, D2, D3, ki so se statistično značilno razlikovali ($P < 0,05$), so označeni z različnimi velikimi črkami. Vrednosti parametrov dializiranega in nedializiranega semena na isti dan hranjenja, ki sta označeni z *, sta se statistično značilno razlikovali ($P < 0,05$).

Legend: N0 – native samples; N1 – non-dialysed samples after 24h; D1 – dialysed samples after 24h; N2 – non-dialysed samples after 48h; D2 – dialysed samples after 48h; N3 – non-dialysed samples after 72h; D3 – dialysed samples after 72h; SOD – superoxide dismutase; TAC – total antioxidant capacity; TBARS – lipid peroxidation measured with TBARS assay

Values of N0, N1, N2, N3 marked by different lowercase letters for each parameter differ significantly ($P < 0,05$). Values of N0, D1, D2, D3 marked by different uppercase letters for each parameter differ significantly ($P < 0,05$). Values for dialysed and non-dialysed semen parameter on the same day, marked by *, differ significantly ($P < 0,05$).

ZAKOŠEK PIPAN M. Vpliv odstranitve nizkomolekulskeih ... na oksidativni status in lastnosti ... semena ...

Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2014. Doktorska disertacija.

11.7 Priloga 7: Optimizacija dodatka antioksidantov - osnovni semenski parametri

Tabela 12: Osnovni semenski parametri (povprečna vrednost \pm SD) po treh dneh hranjenja pri skupinah semena z dodatkom različnih koncentracij L-cisteina in / ali α -tokoferola (n=8)

Table 12: Basic semen parameters (mean \pm SD) after three days of storage in groups of semen with different concentrations of L-cysteine and / or α -tocopherol (n=8)

Semenski parametri – 3 dan		α -tokoferol (μ M)			L-cistein (mM)			α -tokoferol /L-cistein (μ M/mM)			
	Kontrola	100	200	400	2,5	5	10	100/2,5	200/2,5	100/5	200/5
Gibljivost	63,1 \pm 7,9	63,9 \pm 7,3	68,6 \pm 7,6	65,0 \pm 7,0	63,1 \pm 7,7	64,6 \pm 8,0	61,6 \pm 6,1	64,0 \pm 7,4	65,0 \pm 6,5	63,9 \pm 8,4	59,6 \pm 7,5
Progresivna gibljivost	37,4 \pm 9,1	38,8 \pm 10,3	41,9 \pm 8,7	41,0 \pm 9,7	40,3 \pm 10,8	38,9 \pm 10,6	38,8 \pm 9,8	39,2 \pm 8,1	39,8 \pm 9,1	38,1 \pm 9,4	35,4 \pm 9,9
Morfološko normalne	57,6 \pm 5,1	56,5 \pm 6,1	60,6 \pm 5,6	58,5 \pm 5,9	57,3 \pm 5,5	57,1 \pm 5,9	59,0 \pm 5,5	58,9 \pm 5,9	57,6 \pm 6,3	58,5 \pm 5,6	56,7 \pm 4,8
Preživitvena sposobnost	65,4 \pm 7,6	66,2 \pm 9,2	68,9 \pm 8,1	67,1 \pm 7,9	65,9 \pm 7,8	66,2 \pm 8,3	62,2 \pm 7,6	66,3 \pm 6,5	64,2 \pm 10,1	66,9 \pm 8,4	63,4 \pm 7,6
K + AR	14,7 \pm 5,2	12,8 \pm 5,4	11,5 \pm 4,9	12,3 \pm 4,4	12,9 \pm 4,7	13,4 \pm 4,7	14,2 \pm 4,9	13,0 \pm 4,8	12,8 \pm 4,0	12,3 \pm 4,8	14,1 \pm 4,8

Legenda: K + AR – kapacitirane semenčice in semenčice z akrosomsko reakcijo. Posamezni parametri se med skupinami niso statistično značilno razlikovali ($P > 0,05$).

Legend: K + AR – capacitated and acrosomally reacted spermatozoa. Specific parameter did not differ significantly between different groups ($P > 0.05$).

11.8 Priloga 8: Koeficient variacij za ponovitev v testu za posamezne metode uporabljene za ugotavljanje lastnosti kratkotrajno hrانjenega semena po dializi in dodatku antioksidanta

Tabela 13: Koeficienti variacij za ponovitev v testu

Table 13: Intra-assay coefficients of variability

Metoda	CV (%)	Metoda	CV (%)
Koncentracija	9,6 ± 4,3	Membranski potencial	3,6 ± 2,4
Gibljivost	1,9 ± 0,8	Mitohondrijski potencial	9,6 ± 5,3
Progresivna gibljivost	2,5 ± 1,5	DNK fragmentacija	8,6 ± 4,8
MN	5,3 ± 3,4	TAC	2,9 ± 0,8
Presnovna aktivnost	7,2 ± 3,4	SOD	3,2 ± 0,03
HOST	6,6 ± 3,8	TBARS	2,9 ± 1,4
Kapacitacija	4,9 ± 3,3	8-isoprostan	5,4 ± 2,5

Legenda: MN – morfološko normalne semenčice; HOST – hipoozmotski test; TAC – skupna antioksidantna kapaciteta; SOD – superoksid dismutaza; TBARS – lipidna peroksidacija določena s testom TBARS; CV – koeficient variacije

Legend: MN – morphologically normal spermatozoa; HOST – hypoosmotic test; TAC – total antioxidant capacity; SOD – superoxide dismutase; TBARS – lipid peroxidation measured with TBARS assay; CV – coefficient of variation

11.9 Priloga 9: Ugotavljanje lastnosti kratkotrajno hranjenega semena po dializi in dodatku antioksidanta - Gibljivost semenčic

Tabela 14: Vrednosti gibljivosti (povprečna vrednost \pm SD, mediana) na dan 0 in v različnih skupinah kratkotrajno hranjenega semena

Table 14: Motility values (mean \pm SD, median) on day 0 and in different semen groups of short-term stored semen

Gibljivost semenčic (%)	Vzorci semena				
	N0	N3	N3A	D3	D3A
Gibljivost	a	bA	bA	bA	bA
Povprečje \pm SD	80,5 \pm 4,4	60,4 \pm 11,9	60,7 \pm 12,0	63,5 \pm 11,2	66,0 \pm 10,2
Mediana	80,1	62,6	61,6	66,0	65,1
Progresivna gibljivost	a	bA	bAC	bAC	bBC
Povprečje \pm SD	47,2 \pm 7,7	30,0 \pm 7,8	30,9 \pm 7,6	35,2 \pm 8,9	37,4 \pm 8,1
Mediana	47,3	29,6	30,2	33,5	37,2

Legenda: N0 – nativni vzorci; N3 – nedializirani vzorci po 72h; N3A – nedializirani vzorci z dodatkom antioksidanta po 72h; D3 – dializirani vzorci po 72h; D3A – dializirani vzorci z dodatkom antioksidanta po 72h

Vrednosti parametrov vzorcev N0, ki so se statistično značilno razlikovale ($P < 0,05$) od vzorcev N3, N3A, D3, D3A, so označene z različnimi malimi črkami. Vrednosti parametrov vzorcev N3, N3A, D3, D3A, ki so se med seboj statistično značilno razlikovale ($P < 0,05$), so označene z različnimi velikimi črkami.

Legend: N0 – native samples; N3 – non-dialysed samples after 72h; N3A – non-dialysed samples with antioxidant after 72h; D3 – dialysed samples after 72h; D3A – dialysed samples with antioxidant after 72h. Values of N0 and N3, N3A, D3, D3A marked by different lowercase letters differ significantly ($P < 0.05$). Values of N3, N3A, D3, D3A marked by different uppercase letters for each parameter differ significantly ($P < 0.05$).

11.10 Priloga 10: Ugotavljanje lastnosti kratkotrajno hrانjenega semena po dializi in dodatku antioksidanta – Morfološke napake semenčic

Tabela 15: Vrednosti deležev različnih morfoloških napak (povprečna vrednost \pm SD, mediana) v nativnih vzorcih in v različnih skupinah kratkotrajno hrانjenega semena

Table 15: Values of proportions of different morphological abnormalities (mean \pm SD, median) in native samples and in different groups of short-term stored semen

Morfološke napake (%)	Vzorci semena				
	N0	N3	N3A	D3	D3A
MN	a	bA	bA	bA	bA
Povprečje \pm SD	75,6 \pm 6,9	59,8 \pm 9,6	59,3 \pm 9,3	65,2 \pm 9,2	66,3 \pm 9,4
Mediana	76,4	57,2	57,1	62,1	63,5
Glava	a	aA	aA	aA	aA
Povprečje \pm SD	2,7 \pm 3,0	3,0 \pm 3,0	2,9 \pm 3,0	2,7 \pm 2,8	2,7 \pm 2,7
Mediana	2,25	2,75	2,1	2,1	2,5
Akrosom	a	bAC	bA	bAC	bBC
Povprečje \pm SD	3,9 \pm 2,3	18,0 \pm 5,5	18,5 \pm 5,5	14,6 \pm 4,9	14,0 \pm 5,2
Mediana	3,1	19,2	19,6	15,7	15,0
Vezni del	a	aA	aA	aA	aA
Povprečje \pm SD	1,6 \pm 1,4	1,7 \pm 1,5	1,9 \pm 1,7	1,9 \pm 1,6	1,8 \pm 1,5
Mediana	1,5	1,4	1,5	1,5	2,0
Vrat	a	aA	aA	aA	aA
Povprečje \pm SD	0,7 \pm 1,0	0,9 \pm 1,3	0,7 \pm 1,2	0,8 \pm 1,2	0,6 \pm 1,0
Mediana	0,25	0,0	0,0	0,0	0,0
PK	a	aA	aA	aA	aA
Povprečje \pm SD	10 \pm 5,2	10,4 \pm 5,0	10,3 \pm 5,2	9,3 \pm 5,2	9,6 \pm 4,8
Mediana	10,7	10,7	11,2	9,2	9,5
Rep	a	aA	aA	aA	aA
Povprečje \pm SD	7,1 \pm 4,5	7,5 \pm 4,4	7,9 \pm 4,4	7,3 \pm 4,2	7,2 \pm 4,2
Mediana	6,6	7,0	7,5	7,2	6,2

ZAKOŠEK PIPAN M. Vpliv odstranitve nizkomolekulskih ... na oksidativni status in lastnosti ... semena ...

Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2014. Doktorska disertacija

Legenda: N0 – nativni vzorci; N3 – nedializirani vzorci po 72h; N3A – nedializirani vzorci z dodatkom antioksidanta po 72h; D3 – dializirani vzorci po 72h; D3A – dializirani vzorci z dodatkom antioksidanta po 72h; MN – morfološko normalne semenčice; PK – protoplazmatske kapljice

Vrednosti parametrov vzorcev N0, ki so se statistično značilno razlikovale ($P < 0,05$) od vzorcev N3, N3A, D3, D3A, so označene z različnimi malimi črkami. Vrednosti parametrov vzorcev N3, N3A, D3, D3A, ki so se med seboj statistično značilno razlikovale ($P < 0,05$), so označene z različnimi velikimi črkami.

Legend: N0 – native samples; N3 – non-dialysed samples after 72h; N3A – non-dialysed samples with antioxidant after 72h; D3 – dialysed samples after 72h; D3A – dialysed samples with antioxidant after 72h; MN – morphologically normal spermatozoa; PK – protoplasmatic droplets

Values of N0 and N3, N3A, D3, D3A marked by different lowercase letters differ significantly ($P < 0.05$). Values of N3, N3A, D3, D3A marked by different uppercase letters for each parameter differ significantly ($P < 0.05$).

11.11 Priloga 11: Ugotavljanje lastnosti kratkotrajno hrانjenega semena po dializi in dodatku antioksidanta – Integriteta plazemske membrane semenčic

Tabela 16: Deleži semenčic z različnimi oblikami nabrekanja repov (povprečna vrednost \pm SD, mediana) v nativnih vzorcih in v različnih skupinah kratkotrajno hrانjenega semena

Table 16: Percentage of spermatozoa with different types of tail swelling (mean \pm SD, median) in native samples and in different groups of short-term stored semen

Kategorija semenčic (%)	Vzorci semena				
	N0	N3	N3A	D3	D3A
A	a	bA	bA	bA	bA
Povprečje \pm SD	14,4 \pm 3,8	36,6 \pm 9,8	36,7 \pm 9,6	32,5 \pm 10,3	30,6 \pm 7,9
Mediana	14,7	34,9	34,2	32,1	28,7
B	a	bA	bAC	bAC	bBC
Povprečje \pm SD	20,3 \pm 9,6	34,5 \pm 11,0	32,8 \pm 11,0	28,2 \pm 8,0	25,5 \pm 7,1
Mediana	19,0	37,1	36,6	28,4	25,4
C	a	bA	bA	bB	aB
Povprečje \pm SD	38,2 \pm 5,1	19,2 \pm 7,5	20,5 \pm 7,1	27,8 \pm 10,0	32,1 \pm 8,9
Mediana	38,1	18,4	20,9	26,1	31,0
D	a	bA	bA	bA	bA
Povprečje \pm SD	26,3 \pm 11,6	9,3 \pm 4,4	9,6 \pm 4,5	11,2 \pm 4,8	11,2 \pm 4,3
Mediana	24,6	8,2	8,6	11,0	11,0
E	a	aA	aA	aA	aA
Povprečje \pm SD	0,8 \pm 0,9	0,4 \pm 0,6	0,5 \pm 0,7	0,3 \pm 0,4	0,6 \pm 0,6
Mediana	0,5	0,0	0,0	0,25	0,5

ZAKOŠEK PIPAN M. Vpliv odstranitve nizkomolekulskih ... na oksidativni status in lastnosti ... semena ...

Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2014. Doktorska disertacija

Legenda: N0 – nativni vzorci; N3 – nedializirani vzorci po 72h; N3A – nedializirani vzorci z dodatkom antioksidanta po 72h; D3 – dializirani vzorci po 72h; D3A – dializirani vzorci z dodatkom antioksidanta po 72h; A – nenabrekli repi; B – rahlo nabrekla konica repa; C – nabrekla spodnja polovica repa; D –nabrekel rep po celotni dolžini; E – vrečast rep

Vrednosti parametrov vzorcev N0, ki so se statistično značilno razlikovale ($P < 0,05$) od vzorcev N3, N3A, D3, D3A, so označene z različnimi malimi črkami. Vrednosti parametrov vzorcev N3, N3A, D3, D3A, ki so se med seboj statistično značilno razlikovale ($P < 0,05$), so označene z različnimi velikimi črkami.

Legend: N0 – native samples; N3 – non-dialysed samples after 72h; N3A – non-dialysed samples with antioxidant after 72h; D3 – dialysed samples after 72h; D3A – dialysed samples with antioxidant after 72h; A – no swelling on the tail region; B – swollen at the tip; C – swelling of the distal half; D – swollen along the entire length; E – sacculated tail

Values of N0 and N3, N3A, D3, D3A marked by different lowercase letters differ significantly ($P < 0.05$). Values of N3, N3A, D3, D3A marked by different uppercase letters for each parameter differ significantly ($P < 0.05$).

11.12 Priloga 12: Ugotavljanje lastnosti kratkotrajno hrانjenega semena po dializi in dodatku antioksidanta – Stopnja kapacitacije semenčic

Tabela 17: Vrednosti deležev nekapacitiranih, kapacitiranih semenčic in semenčic z akrosomsko reakcijo (povprečna vrednost \pm SD, mediana) v nativnih vzorcih in v različnih skupinah kratkotrajno hrانjenega semena

Table 17: Values of proportions of non-capacitated, capacitated and acrosome reacted spermatozoa (mean \pm SD, median) in native samples and in different groups of short-term stored semen

Kategorija semenčic (%)	Vzorci semena				
	N0	N3	N3A	D3	D3A
Nekapacitirane	a	bA	bA	bA	bA
Povprečje \pm SD	83,6 \pm 5,6	57,5 \pm 9,8	59,1 \pm 12,2	65,9 \pm 10,8	64,8 \pm 8,6
Mediana	84,0	57,5	57,4	64,1	64,1
Kapacitirane	a	bA	bA	bA	bA
Povprečje \pm SD	12,3 \pm 4,5	27,2 \pm 7,7	26,0 \pm 9,0	25,2 \pm 7,3	24,5 \pm 8,2
Mediana	11,5	25,9	27,1	25,9	25,0
AR	a	bA	bA	bB	bB
Povprečje \pm SD	4,1 \pm 2,7	15,3 \pm 4,7	15,0 \pm 4,9	10,9 \pm 3,8	10,7 \pm 3,5
Mediana	3,5	15,0	13,4	9,2	9,4

Legenda: N0 – nativni vzorci; N3 – nedializirani vzorci po 72h; N3A – nedializirani vzorci z dodatkom antioksidanta po 72h; D3 – dializirani vzorci po 72h; D3A – dializirani vzorci z dodatkom antioksidanta po 72h; AR – semenčice z akrosomsko reakcijo

Vrednosti parametrov vzorcev N0, ki so se statistično značilno razlikovale ($P < 0,05$) od vzorcev N3, N3A, D3, D3A, so označene z različnimi malimi črkami. Vrednosti parametrov vzorcev N3, N3A, D3, D3A, ki so se med seboj statistično značilno razlikovale ($P < 0,05$), so označene z različnimi velikimi črkami.

Legend: N0 – native samples; N3 – non-dialysed samples after 72h; N3A – non-dialysed samples with antioxidant after 72h; D3 – dialysed samples after 72h; D3A – dialysed samples with antioxidant after 72h; AR – acrosome reacted spermatozoa

Values of N0 and N3, N3A, D3, D3A marked by different lowercase letters differ significantly ($P < 0.05$). Values of N3, N3A, D3, D3A marked by different uppercase letters for each parameter differ significantly ($P < 0.05$).

11.13 Priloga 13: Ugotavljanje lastnosti kratkotrajno hrانjenega semena po dializi in dodatku antioksidanta – Stopnja kapacitacije semenčic po izpostavitvi semena mediju za kapacitacijo

Tabela 18: Vrednosti deležev nekapacitiranih, kapacitiranih semenčic in semenčic z akrosomsko reakcijo (povprečna vrednost \pm SD, mediana) v nativnih vzorcih in v različnih skupinah kratkotrajno hrانjenega semena po izpostavitvi semena mediju za kapacitacijo

Table 18: Values of proportions of non-capacitated, capacitated and acrosome reacted spermatozoa (mean \pm SD, median) in native samples and in different groups of short-term stored semen after semen incubation in capacitating medium

Kategorija semenčic (%)	Vzorci semena				
	N0	N3	N3A	D3	D3A
Nekapacitirane	a	aA	aA	aA	aA
Povprečje \pm SD	29,6 \pm 11,1	25,6 \pm 6,3	25,9 \pm 5,9	25,7 \pm 5,5	26,7 \pm 6,0
Mediana	26,2	25,0	24,1	25,0	26,0
Kapacitirane	a	bA	bA	aA	aA
Povprečje \pm SD	62,1 \pm 10,7	55,7 \pm 8,4	55,7 \pm 8,6	59,3 \pm 9,0	59,9 \pm 8,2
Mediana	65,1	57,5	59,1	62,1	61,7
AR	a	bA	bA	bAC	bBC
Povprečje \pm SD	8,3 \pm 3,6	18,7 \pm 5,2	18,4 \pm 5,3	15,1 \pm 5,0	13,4 \pm 3,8
Mediana	7,9	18,2	17,4	13,9	13,0

Legenda: N0 – nativni vzorci; N3 – nedializirani vzorci po 72h; N3A – nedializirani vzorci z dodatkom antioksidanta po 72h; D3 – dializirani vzorci po 72h; D3A – dializirani vzorci z dodatkom antioksidanta po 72h; AR – semenčice z akrosomsko reakcijo

Vrednosti parametrov vzorcev N0, ki so se statistično značilno razlikovale ($P < 0,05$) od vzorcev N3, N3A, D3, D3A, so označene z različnimi malimi črkami. Vrednosti parametrov vzorcev N3, N3A, D3, D3A, ki so se med seboj statistično značilno razlikovale ($P < 0,05$), so označene z različnimi velikimi črkami.

Legend: N0 – native samples; N3 – non-dialysed samples after 72h; N3A – non-dialysed samples with antioxidant after 72h; D3 – dialysed samples after 72h; D3A – dialysed samples with antioxidant after 72h; AR – acrosome reacted spermatozoa

Values of N0 and N3, N3A, D3, D3A marked by different lowercase letters differ significantly ($P < 0.05$).

Values of N3, N3A, D3, D3A marked by different uppercase letters for each parameter differ significantly ($P < 0.05$).

11.14 Priloga 14: Ugotavljanje lastnosti kratkotrajno hrانjenega semena po dializi in dodatku antioksidanta – Membranski potencial

Tabela 19: Deleži različnih kategorij semenčic (povprečna vrednost \pm SD, mediana) v testu membranskega potenciala v nativnih vzorcih in v različnih skupinah kratkotrajno hrانjenega semena

Table 19: Percentage of different categories of spermatozoa (mean \pm SD, median) in native samples and in different groups of short-term stored semen

Kategorija semenčic (%)	Vzorci semena				
	N0	N3	N3A	D3	D3A
Žive	a	bA	bAC	bBC	bB
Povprečje \pm SD	67,3 \pm 7,0	37,1 \pm 8,5	42,6 \pm 9,7	46,5 \pm 9,6	54,5 \pm 8,8
Mediana	67,0	39,8	44,2	48,0	55,3
Apoptotične	a	bA*	bA	bA	bA*
Povprečje \pm SD	7,0 \pm 5,2	14,9 \pm 5,0	11,4 \pm 5,2	11,8 \pm 5,1	9,8 \pm 3,8
Mediana	6,8	12,8	10,4	11,6	10,3
Nekrotične	a	aA	aA	aA	aA
Povprečje \pm SD	1,0 \pm 1,7	2,5 \pm 3,3	1,9 \pm 3,1	2,0 \pm 3,1	1,6 \pm 2,6
Mediana	0,1	0,3	0,2	0,4	0,1
Mrtve	a	bA	bAC	bBC	bB
Povprečje \pm SD	24,7 \pm 6,7	45,7 \pm 9,8	44,1 \pm 9,9	39,8 \pm 9,3	34,1 \pm 8,8
Mediana	25,1	45,9	41,7	36,8	33,3

Legenda: N0 – nativni vzorci; N3 – nedializirani vzorci po 72h; N3A – nedializirani vzorci z dodatkom antioksidanta po 72h; D3 – dializirani vzorci po 72h; D3A – dializirani vzorci z dodatkom antioksidanta po 72h; * – $0,05 < P < 0,1$

Vrednosti parametrov vzorcev N0, ki so se statistično značilno razlikovale ($P < 0,05$) od vzorcev N3, N3A, D3, D3A, so označene z različnimi malimi črkami. Vrednosti parametrov vzorcev N3, N3A, D3, D3A, ki so se med seboj statistično značilno razlikovale ($P < 0,05$), so označene z različnimi velikimi črkami.

Legend: N0 – native samples; N3 – non-dialysed samples after 72h; N3A – non-dialysed samples with antioxidant after 72h; D3 – dialysed samples after 72h; D3A – dialysed samples with antioxidant after 72h; * – $0.05 < P < 0.1$

Values of N0 and N3, N3A, D3, D3A marked by different lowercase letters differ significantly ($P < 0.05$). Values of N3, N3A, D3, D3A marked by different uppercase letters for each parameter differ significantly ($P < 0.05$).

11.15 Priloga 15: Ugotavljanje lastnosti kratkotrajno hranjenega semena po dializi in dodatku antioksidanta – Mitohondrijski potencial

Tabela 20: Vrednosti porušenega mitohondrijskega potenciala (povprečna vrednost \pm SD, mediana) v nativnih vzorcih in v različnih skupinah kratkotrajno hranjenega semena

Table 20: Values of loss of mitochondrial potential (mean \pm SD, median) in native samples and in various groups of short-term stored semen

Delež semenčic s porušenim MP (%)	Vzorci semena				
	N0	N3	N3A	D3	D3A
MP	a	bA	bA	bA	aA
Povprečje \pm SD	4,8 \pm 7,6	26,1 \pm 25,9	22,7 \pm 25,0	19,5 \pm 22,7	14,8 \pm 19,3
Mediana	3,4	21,1	20,2	17,5	9,5

Legenda: N0 – nativni vzorci; N3 – nedializirani vzorci po 72h; N3A – nedializirani vzorci z dodatkom antioksidanta po 72h; D3 – dializirani vzorci po 72h; D3A – dializirani vzorci z dodatkom antioksidanta po 72h; MP – delež semenčic s porušenim mitohondrijskim potencialom

Vrednosti parametrov vzorcev N0, ki so se statistično značilno razlikovale ($P < 0,05$) od vzorcev N3, N3A, D3, D3A, so označene z različnimi malimi črkami. Vrednosti parametrov vzorcev N3, N3A, D3, D3A, ki so se med seboj statistično značilno razlikovale ($P < 0,05$), so označene z različnimi velikimi črkami.

Legend: N0 – native samples; N3 – non-dialysed samples after 72h; N3A – non-dialysed samples with antioxidant after 72h; D3 – dialysed samples after 72h; D3A – dialysed samples with antioxidant after 72h; * – $0.05 < P < 0.1$; MP – percentage of spermatozoa with loss of mitochondrial potential

Values of N0 and N3, N3A, D3, D3A marked by different lowercase letters differ significantly ($P < 0.05$).

Values of N3, N3A, D3, D3A marked by different uppercase letters for each parameter differ significantly ($P < 0.05$).

11.16 Priloga 16: Ugotavljanje lastnosti kratkotrajno hrانjenega semena po dializi in dodatku antioksidanta – DNK fragmentacija

Tabela 21: Vrednosti različnih tipov DNA fragmentacije (povprečna vrednost \pm SD, mediana) v nativnih vzorcih in v različnih skupinah kratkotrajno hrانjenega semena

Table 21: Values of different types of DNA fragmentation (mean \pm SD, median) in native samples and in various groups of short-term stored semen

"Halo" efekt (%)	Vzorci semena				
	N0	N3	N3A	D3	D3A
Normalen	a	bA	bA	bA	aA
Povprečje \pm SD	90,8 \pm 6,6	82,9 \pm 6,9	82,3 \pm 7,6	81,9 \pm 6,9	85,3 \pm 6,4
Mediana	93,3	83,8	83,6	82,9	86,1
Nični oz. mali	a	bA	bA	bA	bA
Povprečje \pm SD	8,4 \pm 6,1	14,3 \pm 6,0	15,3 \pm 6,9	15,2 \pm 6,2	12,6 \pm 5,7
Mediana	6,2	13,2	13,8	14,4	11,2
Veliki	a	bA	bA	bA	aA
Povprečje \pm SD	0,7 \pm 0,6	2,8 \pm 1,2	2,4 \pm 1,2	2,9 \pm 1,0	2,1 \pm 1,0
Mediana	0,7	2,5	2,3	2,7	2,1

Legenda: N0 – nativni vzorci; N3 – nedializirani vzorci po 72h; N3A – nedializirani vzorci z dodatkom antioksidanta po 72h; D3 – dializirani vzorci po 72h; D3A – dializirani vzorci z dodatkom antioksidanta po 72h

Vrednosti parametrov vzorcev N0, ki so se statistično značilno razlikovale ($P < 0,05$) od vzorcev N3, N3A, D3, D3A, so označene z različnimi malimi črkami. Vrednosti parametrov vzorcev N3, N3A, D3, D3A, ki so se med seboj statistično značilno razlikovale ($P < 0,05$), so označene z različnimi velikimi črkami.

Legend: N0 – native samples; N3 – non-dialysed samples after 72h; N3A – non-dialysed samples with antioxidant after 72h; D3 – dialysed samples after 72h; D3A – dialysed samples with antioxidant after 72h
Values of N0 and N3, N3A, D3, D3A marked by different lowercase letters differ significantly ($P < 0.05$). Values of N3, N3A, D3, D3A marked by different uppercase letters for each parameter differ significantly ($P < 0.05$).

11.17 Priloga 17: Ugotavljanje lastnosti kratkotrajno hrانjenega semena po dializi in dodatku antioksidanta – Parametri merjeni v semenski plazmi (TAC, SOD, TBARS, 8-isoprostan)

Tabela 22: Vrednosti parametrov TAC, SOD, TBARS in 8-isoprostan (povprečna vrednost \pm SD, mediana) v nativnih vzorcih in v različnih skupinah kratkotrajno hrانjenega semena

Table 22: Values of TAC, SOD, TBARS and 8-isoprostane (povprečna vrednost \pm SD, median) in native samples and in various groups of short-term stored semen

Parametri oksidativnega stresa	Vzorci semena				
	N0	N3	N3A	D3	D3A
TAC ($\mu\text{mol/l}$)	a	aA	aA	aA	aA
Povprečje \pm SD	901,8 \pm 142,2	853,0 \pm 162,1	867,0 \pm 142,3	778,0 \pm 105,1	831,3 \pm 158,4
Mediana	862,5	840,0	860,0	760,0	867,5
SOD (U/ml)	a	bA*	bA	bA	bA*
Povprečje \pm SD	1,86 \pm 0,66	3,14 \pm 0,91	2,74 \pm 0,82	2,95 \pm 0,66	2,53 \pm 0,57
Mediana	1,81	2,84	2,47	3,03	2,51
TBARS ($\mu\text{mol/l}$)	a	bA	bA	bA*	aA*
Povprečje \pm SD	37,4 \pm 12,4	54,0 \pm 15,9	49,8 \pm 16,4	55,1 \pm 17,7	43,3 \pm 14,9
Mediana	40,4	50,9	48,5	52,8	44,1
8-isoprostan (ng/ml)	a	bA	bA	bA*	aA*
Povprečje \pm SD	0,83 \pm 0,31	1,59 \pm 0,99	1,55 \pm 0,96	1,74 \pm 1,05	1,35 \pm 0,83
Mediana	0,76	1,17	1,14	1,34	1,04

Legenda: N0 – nativni vzorci; N3 – nedializirani vzorci po 72h; N3A – nedializirani vzorci z dodatkom antioksidanta po 72h; D3 – dializirani vzorci po 72h; D3A – dializirani vzorci z dodatkom antioksidanta po 72h; TAC – celokupna antioksidantna kapaciteta; TBARS – lipidna peroksidacija določena s testom TBARS; SOD – aktivnost superoksid dismutaze; * – $0,05 < P < 0,1$
Vrednosti parametrov vzorcev N0, ki so se statistično značilno razlikovale ($P < 0,05$) od vzorcev N3, N3A, D3, D3A, so označene z različnimi malimi črkami. Vrednosti parametrov vzorcev N3, N3A, D3, D3A, ki so se med seboj statistično značilno razlikovale ($P < 0,05$), so označene z različnimi velikimi črkami.

Legend: N0 – native samples; N3 – non-dialysed samples after 72h; N3A – non-dialysed samples with antioxidant after 72h; D3 – dialysed samples after 72h; D3A – dialysed samples with antioxidant after 72h; TAC – total antioxidant capacity; TBARS – lipid peroxidation measured with TBARS analysis; SOD – superoxide dismutase activity; * – $0.05 < P < 0.1$

Values of N0 and N3, N3A, D3, D3A marked by different lowercase letters differ significantly ($P < 0.05$). Values of N3, N3A, D3, D3A marked by different uppercase letters for each parameter differ significantly ($P < 0.05$).

11.18 Priloga 18: Število vzorcev razvrščenih glede na ustreznost semena in rezultat testa, v katerem smo diagnostično vrednotili SOD z vidika napovedi kakovosti semena po 72 urah hranjenja

Tabela 23: Prikaz števila vzorcev (N) za vsak posamezen parameter razvrščenih glede na ustreznost semena in rezultat testa, v katerem smo diagnostično vrednotili SOD z vidika napovedi kakovosti semena po 72 urah hranjenja

Table 23: The numbers of samples (N) for individual parameters sorted according to semen adequacy and results of the test in which the diagnostic utility of SOD, as a predictor of semen quality after 72 hours of storage, were evaluated

Semenski parametri – 3. dan	Ustrezni vzorci (N)	Mejna vrednost SOD – dan 0	Dejansko pozitivni (N)	Dejansko negativni (N)	Lažno pozitivni (N)	Lažno negativni (N)
SOD (U/ml)						
PG	9	1,22	7	8	1	1
MN	12	1,26	4	9	3	1
Žive	13	1,26	4	10	3	0
Ustreznost (4 parametri)	7	1,05	9	7	0	1
SOD ($U/10^6$ semenčic)						
PG	9	$4,05 \times 10^{-3}$	7	6	2	2
MN	12	$4,05 \times 10^{-3}$	8	4	1	4
Žive	13	$4,05 \times 10^{-3}$	9	4	0	4
Ustreznost (4 parametri)	7	$4,05 \times 10^{-3}$	7	8	2	0

Legenda: PG – progresivna gibljivost; MN – morfološko normalne semenčice; Žive – žive semenčice; ustreznost (4 parametri) – kriterij za ustreznost vzorca po treh dneh hranjenja: preživitvena sposobnost: > 85 %; delež gibljivih semenčic: > 70 %; delež progresivno gibljivih semenčic: > 25 %; delež morfološko normalnih semenčic: > 50 %

Legend: PG – progressive motility; MN – morphologically normal spermatozoa; Žive – live spermatozoa; ustreznost (4 parametri) – criteria for satisfactory sample after three days of storage: viability: > 85 %; percentage of motile spermatozoa: > 70 %; percentage of progressively motile spermatozoa: > 25 %; percentage of morphologically normal spermatozoa: > 50 %.

11.19 Priloga 19: Število vzorcev razvrščenih glede na ustreznost semena in rezultat testa, v katerem smo diagnostično vrednotili SOD z vidika pokazatelja kakovosti semena po 72 urah hranja

Tabela 24: Prikaz števila vzorcev (N) za vsak posamezen parameter, razvrščenih glede na ustreznost semena in rezultat testa, v katerem smo diagnostično vrednotili SOD z vidika pokazatelja kakovosti semena po 72 urah hranja

Table 24: Number of samples (N) for each individual parameter sorted according to semen adequacy and results of the test in which the diagnostic utility of SOD as an indicator of semen quality after storage was evaluated

Semenski parametri – 3. dan	Ustrezni vzorci (N)	Mejna vrednost SOD – 3. dan	Dejansko pozitivni (N)	Dejansko negativni (N)	Lažno pozitivni (N)	Lažno negativni (N)
SOD (U/ml)						
Gibljivost	12	2,80	4	9	3	1
PG	9	2,40	8	8	1	0
MN	12	2,45	5	9	3	0
Ustreznost (4 parametri)	7	2,40	8	6	1	2
SOD ($U/10^6$ semenčic)						
PG	9	$8,26 \times 10^{-3}$	7	5	3	2
MN	12	$9,50 \times 10^{-3}$	10	3	2	2
Žive	13	$9,50 \times 10^{-3}$	11	3	1	2
Ustreznost (4 parametri)	7	$9,50 \times 10^{-3}$	7	5	5	0

Legenda: PG – progresivna gibljivost; MN – morfološko normalne semenčice; ustreznost (4 parametri) – kriterij za ustreznost vzorca po treh dneh hranjenja: preživitvena sposobnost: > 85 %; delež gibljivih semenčic: > 70 %; delež progresivno gibljivih semenčic: > 25 %; delež morfološko normalnih semenčic: > 50 %.

Legend: PG – progressive motility; MN – morphologically normal spermatozoa; ustreznost (4 parametri) – criteria for satisfactory sample after three days of storage: viability: > 85 %; percentage of motile spermatozoa: > 70 %; percentage of progressively motile spermatozoa: > 25 %; percentage of morphologically normal spermatozoa: > 50 %.