

Biokemijski pokazatelji u sjemennoj plazmi domaćih životinja i ljudi



I. Žura Žaja*, I. Švub, S. Milinković-Tur, S. Vince, H. Valpotić,
D. Đuričić, S. Čipčić i M. Samardžija

Sažetak

Ejakulat je mješavina spermija proizvedenih u testisima i sjemene plazme koju izlučuju akcesorne spolne žlijezde i epididimisi, a miješaju se tijekom ejakulacije. Sjemenja plazma sadrži različite tvari koje utječu na funkciju i preživljavanje spermija tijekom prolaska kroz ženski spolni sustav te pruža zaštitu od oksidacijskog stresa, a ima i važne regulatorne funkcije u raznim procesima prije prodora spermija u jajnu stanicu. Funkcije se odnose na prehranu, zaštitu, regulaciju gibljivosti i kapacitaciju spermija, prepoznavanje i vezanje gamenta. Spoznaje o fiziološkim značajkama spermija i sjemene plazme te utjecaj pasmine, linije i pojedinačnih značajki rasplodnjaka, preduvjet su za uspješno unapređenje reproduktivne učinkovitosti te nasljeđivanje najboljih značajki genoma sjemenja. Poznavanje kemijskog sastava sjemene plazme je važno pri odabiru razrjeđivača, koji održava i produžuje životni vijek spermija tijekom čuvanja sjemenja. Lipidi, bjelančevine, ugljikohidrati i minerali, sudjeluju u izgradnji i metaboličkim procesima spermija. Lipidi se nalaze u staničnoj membrani spermija,

sudjeluju u metabolizmu i kapacitaciji spermija, hiperaktivaciji i akrosomskoj reakciji te oplodnji jajne stanice. Bjelančevine sudjeluju u kapacitaciji i oplodnji, a pri transportu spermija fagocitiraju i vežu propale spermije. Minerali u sjemennoj plazmi uspostavljaju i održavaju osmotsku ravnotežu, djeluju antibakterijski, neophodni su za pravilno gibanje spermija. Neki od minerala su sastavni dijelovi enzima, dok drugi sudjeluju u njihovoj aktivaciji. Istraživanja neplodnosti, posebice muškaraca, usmjerena su sve više na analiziranje i određivanje biokemijskih pokazatelja sjemene plazme, jer se ustvrdilo da brojnost i gibljivost spermija nisu dostatno mjerilo za procjenu oplodne sposobnosti spermija već je nužan kvalitetan medij za održavanje njihovih značajki. Pojedini biokemijski pokazatelji u sjemennoj plazmi su mjerilo funkcije ili disfunkcije testisa i akcesornih spolnih žlijezda ili se odnose na kakvoću sjemenja i rasplodnu učinkovitost ili neplodnost.

Cljučne riječi: biokemijski pokazatelji, sjemenja plazma, spermij, lipidi, bjelančevine, minerali

Dr. sc. Ivona ŽURA ŽAJA*, dr. med. vet., docentica, dopisni autor, (e-mail: izzaja@vef.hr), Ivana ŠVUB, dr. med. vet., dr. sc. Suzana MILINKOVIĆ-TUR, dr. med. vet., redovita profesorica, dr. sc. Silvijo VINCE, dr. med. vet., izvanredni profesor, dr. sc. Hrvoje VALPOTIĆ, dr. med. vet., izvanredni profesor, dr. sc. Marko SAMARDŽIJA, dr. med. vet., redoviti profesor, Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Hrvatska; dr. sc. Dražen ĐURIČIĆ, dr. med. vet., docent, znanstveni savjetnik, Veterinarska stanica Đurđevac, Hrvatska; Snježana ČIPČIĆ, dr. med. vet., Zagreb, Hrvatska

Uvod

Sjeme se sastoji od spermija i sjemenske plazme (Slika 1.). Tijekom ejakulacije spermiji prolazi kroz sjemenovode, mokraćnicu te se spajaju sa sjemenom plazmom tvoreći sjeme (Dabrovich i sur., 2014.). Sjemeni plazma je tekućina koja nastaje miješanjem proizvoda akcesornih spolnih žlijezda te u manjoj mjeri proizvoda testisa, epididimisa i sjemenovoda. Sjemeni plazma se sastoji od: iona (Na^+ , K^+ , Zn^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cl^-), energetskih supstrata (fruktoza, sorbitol, glicerilfosfolina), organskih spojeva (bjelančevina s malom i velikom molekulskom masom, peptidi, aminokiseline, lipidi, limunska kiselina, hormoni, citokini) itd. U sjemenoj se plazmi nalaze i dušikovi spojevi, kao što su amonijak, ureja, mokraćna kiselina i kreatinin te askorbinska kiselina i hipotaurin (Rodriguez-Martinez i sur., 2011., Žura Žaja, 2015.). Biokemijski sastav i volumen sjemenske plazme određen je veličinom i sekretornom sposobnošću te kapacitetom pohrane različitih organa muškog reproduktivnog sustava. Štoviše, razlike u koncentracijama pojedinih sastojaka u sjemenoj plazmi mogu biti posljedica učinka vanjskih čimbenika kao što su: hranidba, smještaj, mikroklimatski uvjeti te razdoblje u godini, posebice u sezonski poliestričnih životinja, ali i metodi analize biokemijskih tvari, aktivnosti enzima prisutnih u sjemenoj plazmi i metaboličke aktivnosti samih spermija suspendiranih u sjemenoj plazmi (Juyena i Stelletta, 2012.). Nadalje, razlike se mogu naći i unutar vrste i pasmine, a čak niti ista jedinka nema uvijek jednaki sastav sjemenske plazme (Žura Žaja i sur., 2016.a,b).

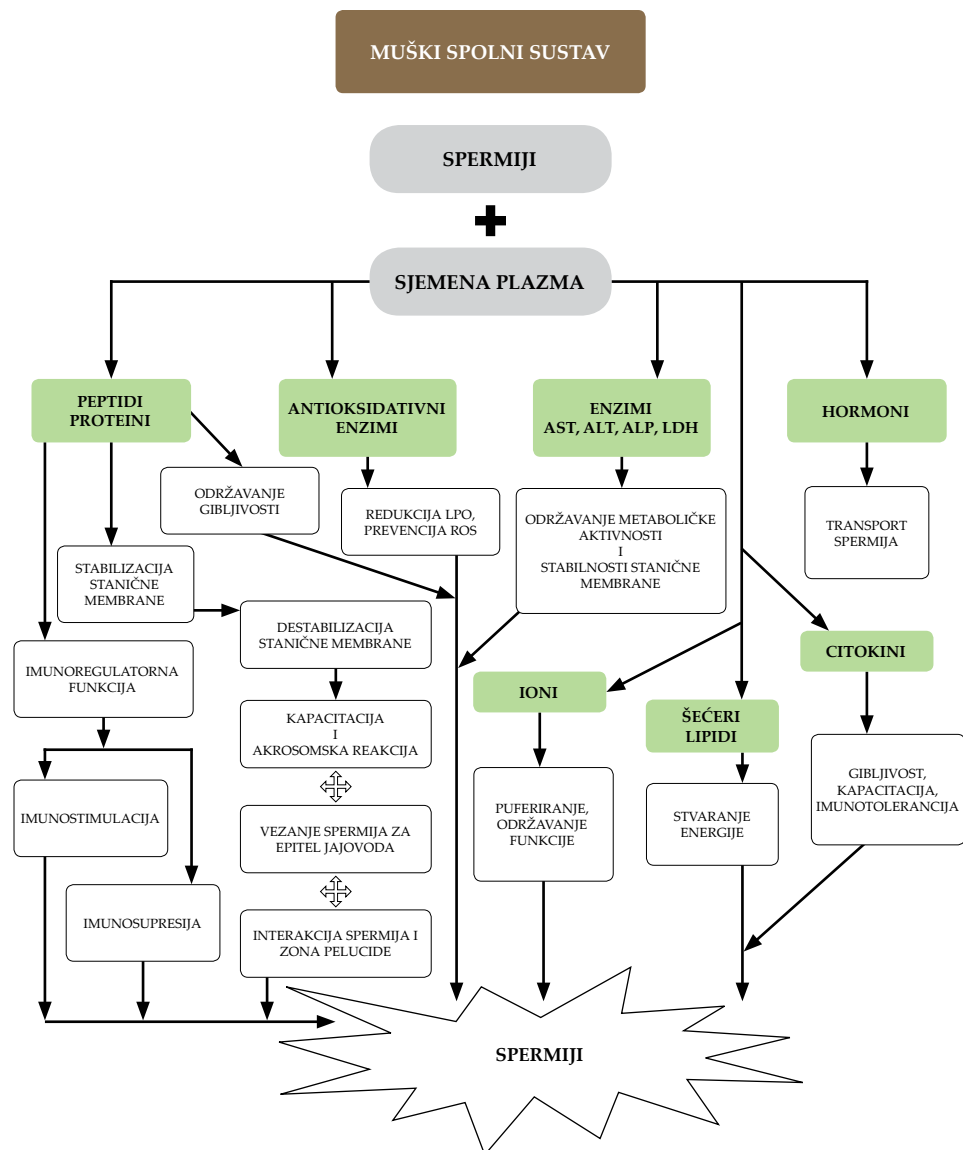
Sjemeni plazma dobiva sve više na važnosti od kada se ustanovilo da brojnost, gibljivost i pravilna morfologija spermija nisu dostatno mjerilo za procjenu oplodne sposobnosti spermija. Pojedi-

ni su biokemijski pokazatelji u sjemenoj plazmi mjerilo funkcije ili disfunkcije testisa i akcesornih spolnih žlijezda ili se odnose na kakvoću sjemena i rasplodnu učinkovitost ili neplodnost (WHO, 2010., López Rodríguez i sur., 2013., Žura Žaja, 2015., Talluri i sur., 2017.). Uvriježeno je da se sjemeni plazma može nadomjestiti razrjeđivačima bez značajnijeg štetnog utjecaja na spermije no nedavna su istraživanja ustvrdila da sjemeni plazma ima različite funkcije u metabolizmu spermija (Rodriguez-Martinez i sur., 2011.). Naime, funkcija sjemenske plazme fiziološki je povezana s ejakulacijom spermija te njihovim opstankom u ženskom spolnom sustavu. Nekoliko je istraživanja u različitim vrstama ustvrdilo različite funkcije sjemenske plazme, uključujući: 1) aktivaciju i povećanje gibljivosti spermija te poboljšanje sveukupne kvalitete sperme; 2) puferiranje, kako bi se osigurao optimalni osmotski i hranjivi medij; 3) prevenciju prijevremene aktivacije tijekom fiziološkog transporta spermija te stabilizaciju stanične membrane uz pomoć inhibitora kapacitacije; 4) zaštitu spermija od fagocitoze i razaranja u upalnim procesima; 5) reguliranje transporta i eliminacije spermija; 6) poboljšanje postotka ovulacije u krava, kao i indukciju ovulacije u svinja i deva; 7) poboljšanje interakcije spermij-jajna stanica; 8) aktivaciju ekspresije embrionalnih citokina i pomoći u pripremi majčinog sustava za razvoj embrija, napose u uspostavljanju imunostolerancije nužne za održivost gravidnosti; i 9) utjecaj na plodnost (Rodriguez-Martinez i sur., 2011., Juyena i Stelletta, 2012., Rodríguez-Gil i sur., 2013. Rodriguez-Martinez, 2019) (Slika 1). Također, sjemeni plazma je spermijima izvor hrane, siguran medij za transport prilikom kojeg pruža zaštitu od oksidacijskog stresa te osigurava nutrijente potrebne za kapacitaciju i oplodnju.

Ugljikohidrati

Spermiji i sjemena plazma sadrže jednostavne šećere, koji imaju značajnu funkciju u energetskom metabolizmu spermija. Koncentracija i sastav

šećera ovisan je o vrsti životinje, o razini testosterona i godišnjem dobu. Primjerice, sperma nerasta sadrži 16 do 80 mg/dL ukupnih ugljikohidrata od toga 9 do 60 mg/dL fruktoze, galaktoze 4 do



Slika 1. Prikaz najznačajnijih sastojaka i funkcija sjemene plazme. Kratice označavaju: AST, aspartat aminotransferaza; ALT, alanin aminotransferaza; ALP, alkalna fosfataza; LDH, laktat dehidrogenaza; LPO, lipidna peroksidacija; ROS, reaktivni kisikovi spojevi (prema Juyena i Stelletta, 2012.).

20 mg/dL, glukoze 1 do 5 mg/dL i 300 do 400 mg/dL inozitola (Gerfen i sur., 1994.). Nadalje, nekoliko je autora ustvrdilo da spermiji nerasta dobivaju energiju ne samo metaboliranjem glukoze i fruktoze, već i iz neheksoznih spojeva poput glicerola, piruvata, laktata i citrata te neuobičajenih heksoza, primjerice sorbitola i manoze (Rodríguez-Gil, 2013.). Sorbitol je također sastojak sjemene plazme, i kao inozitol spada u šećerne alkohole, a kemijska mu je građa slična fruktozi te se također sintetizira u sjemenim vezikulama. Enzim sorbitol dehidrogenaza pretvara ga u fruktozu te se rabi kao metabolički supstrat, a u sjemenju nerasta izmjerena je količina od 6 do 18 mg/dL (Juyena i Stelletta, 2012.). Inozitol osigurava osmotski tlak u sjemenju tekućini, a izlučuju ga sjemene vezikule te ga u sjemenju plazmi nerasta ima oko 2 do 3% (Frunzā i sur., 2008., Rodriguez-Martinez i sur., 2011.). Sjemena plazma nerasta obiluje ergotioninom (0,3-0,8 mmol/L), koji se stvara u sjemenim vezikulama te djeluje antioksidacijski štiteći sulfhidrilne veze bjelančevina (Nikodemus i sur., 2011.). Budući da enzim heksokinaza ima veći afinitet prema glukozi u odnosu na druge monosaharide, spermiji nerasta brže i učinkovitije koriste glukozu i to najvećim dijelom glikolizom (Rodríguez-Gil, 2013.).

Lipidi

Adekvatan lipidni sastav stanične membrane spermija i sjemene plazme ključni su u funkciji spermija. U lipide se ubrajaju kolesterol, fosfolipidi, diacilgliceroli, triacilgliceroli i voštani esteri. Epididimisi i spermiji izvori su lipida u sjemenju plazmi (Žura Žaja i sur., 2016.c). Lipidi u ejakulatu, a posebice fosfolipidi i kolesterol, neophodni su za pravilnu strukturu i funkciju stanične membrane spermija. Nadalje, imaju i značajnu funkciju u metabolizmu i

kapacitaciji spermija te oplodnji jajne stanice (Lu i sur., 2016., Žura Žaja i sur., 2016.b). U nedostatku supstrata za glikolizu, endogeni i egzogeni lipidi imaju značajnu funkciju u opskrbi spermija energijom za njihovu gibljivost i održivost. U sjemenju plazmi su prisutne različite vrste fosfolipida, među kojima se lecitin nalazi u najvećoj količini u većine životinjskih vrsta, a može poslužiti kao supstrat za stvaranje energije spermijima u danom trenutku (Frunzā i sur., 2008., Juyena i Stelletta, 2012.).

Triacilgliceroli se u organizmu rabe za pohranu energije, ali i u sintezi drugih masti poput kolesterola. Žlijezde muškog reproduktivnog sustava izlučuju triacilglicerole u sjemenju plazmu. Spermiji u aerobnim uvjetima koriste triacilglicerole za energetske potrebe (Argov i sur., 2007.). Intravaskularni transport triacilglicerola omogućuju dvije podskupine lipoproteina, lipoproteini vrlo male gustoće ili hilomikroni, za koje se vežu buduću su netopljivi u vodi (Beer-Ljubić i sur., 2009., Žura Žaja i sur., 2016.b). Naime, Argov i sur. (2007.) su po prvi puta dokazali prisutnost receptora za lipoproteine vrlo male gustoće na spermijima bikova, što pojašnjava mehanizam kojim spermiji koriste izvanstanične lipide.

Spermiji rabe fruktozu i slobodne masne kiseline za opskrbu energijom ili ih inkorporiraju u triacilglicerole. Naime, u dostupnoj literaturi postoje kontroverzni rezultati o učinku veće koncentracije triacilglicerola u sjemenju na plodnost muškaraca, odnosno mužjaka. Tako, Sebastian i sur. (1987.) te Lu i sur. (2016.) navode da je neplodnost povezana s povećanjem koncentracije većine podskupina neutralnih lipida u sjemenju muškaraca. Dok su Čevik i sur. (2007.) u svojem istraživanju ustvrdili značajno veću koncentraciju triacilglicerola u skupini normospermičnih bikova u odnosu na skupinu bikova s oligospermijom.

Sveukupna su istraživanja o učinku triacilglicerola na mušku plodnosti oskudna u odnosu na fosfolipide, a napose kolesterol. Novija su istraživanja usmjerena prema analizi masnokiselinskog sastava pojedinih lipida spermija i sjemene plazme u humanoj i animalnoj andrologiji.

Fosfolipidi su važna skupina spojeva koja izgrađuje staničnu membranu, a izlučuju ih epididimisi i prostata. Polovica je fosfolipida u sjemenjnoj plazmi „slobodna“, dok je druga polovica vezana za lipoproteine (Žura Žaja i sur., 2015., Žura Žaja i sur., 2016.b). Spermiji koriste fosfolipide za proizvodnju energije u odsustvu topljivih ugljikohidrata (Juyena i Stelletta, 2012.). Štoviše, spermiji, u određenim uvjetima, mogu izmjenjivati lipide iz izvanstaničnog okoliša. Lizofosfolipidi su skupina jednostavnih fosfolipida, koji su uključeni u biosintezu stanične membrane, a imaju funkciju i u akrosomalnoj egzocitozi. Nadalje, odnos kolesterola i fosfolipida važan je pokazatelj kapacitacijsko-dekapitacijskih procesa (Beer-Ljubić i sur., 2009., Mandal i sur., 2014.).

Dostupna istraživanja ukazuju na pozitivan učinak veće koncentracije fosfolipida s plodnošću sjemena. Tako je, nađena pozitivna korelacija između koncentracije fosfolipida u sjemenjnoj plazmi i broja spermija, odnosno plodnosti u muškaraca (Sebastian i sur., 1987.). Štoviše, u sjemenjnoj je plazmi azospermičnih i oligospermičnih muškaraca smanjena koncentracija ukupnih fosfolipida, kao i u spermijama oligospermičnih muškaraca. Am-In i sur. (2011.) su među skupinama nerasta s lošom i dobrom gibljivošću spermija našli značajnu razliku u koncentraciji ukupnih lipida, fosfolipida i kolesterola.

Kolesterol je jednostavni lipid iz skupine steroida. Jetra sintetizira veći dio kolesterola, ali organi poput testisa, jajnika i nadbubrežnih žlijezda također sintetiziraju kolesterol (Sharpe i sur., 2006.). Budući da je netopljiv u vodi, kolesterol se u

serumu i sjemenjnoj plazmi transportira u obliku lipoproteina i to: lipoproteina vrlo male gustoće, lipoproteina male gustoće i/ili lipoproteina velike gustoće (Beer-Ljubić i sur., 2009., Žura Žaja i sur., 2016.b). Kolesterol je glavni sterol u ejakuliranom sjemenju sisavaca. Velika se količina kolesterola sintetizira u epididimisima, odakle se tijekom sazrijevanja spermija transportira u njihove stanične membrane (Jacyno i sur., 2009., Žura Žaja i sur., 2016.c). Stanična se membrana spermija različitih vrsta životinja odlikuje različitim udjelom kolesterola. Tako, stanična membrana spermija nerasta ima mnogo manje kolesterola u usporedbi s drugim vrstama. Omjer između kolesterola i fosfolipida u staničnoj membrani spermija nerasta najniži je i iznosi 0,20, što je uzrok izrazite osjetljivosti spermija na osmotske promjene i promjene temperatura tijekom smrzanja. Stanične membrane spermija nerasta koje sadrže veću količinu kolesterola otpornije su na osmotski „šok“ (Jacyno i sur., 2009.). Kolesterol regulira fluidnost stanične membrane, tijekom sazrijevanja spermija u epididimisu, te tijekom kapacitacije i akrosomske reakcije u ženskom spolnom sustavu (Jacyno i sur., 2009., Žura Žaja i sur., 2016.c). Tijekom procesa kapacitacije „napušta“ staničnu membranu spermija i veže se za bjelančevine u sjemenjnoj plazmi i bjelančevine u ženskom spolnom sustavu (Beer-Ljubić i sur., 2009.). Prostata izlučuje kolesterol u sjemenju plazmu, a spermiji nakon ejakulacije iz sjemene plazme dobivaju dodatnu količinu kolesterola, koji ih potom štiti od štetnih okolišnih čimbenika (Jacyno i sur., 2009.). Kolesterol u sjemenjnoj plazmi muškaraca inhibira preuranjenu akrosomsku reakciju te pospješuje preživljavanje spermija. Sjemenja plazma nerasta sadrži relativno male količine kolesterola (Jacyno i sur., 2009., Žura Žaja i sur., 2016.b). Koncentracija kolesterola u sjemenjnoj plazmi muškaraca iznosi 25 mg/dL, što je nekoliko puta više u odnosu na neraste (Cross, 1996., Jacyno i sur., 2009.).

Slične su rezultate dobili i Diaconescu i sur. (2014.) koji su ustvrdili slične koncentracije kolesterola u sjemenoj plazmi bikova i muškaraca, dok je u nerasta koncentracija bila desetak puta niža.

Nekoliko istraživanja govore u prilog tome da veća koncentracija kolesterola u sjemenu pozitivno utječe na plodnost. U istraživanju kojeg su proveli Jacyno i sur. (2009.) koncentracija je kolesterola u sjemenoj plazmi nerasta pozitivno korelirala s gibljivošću, koncentracijom i ukupnim brojem spermija, dok je negativno korelirala s udjelom morfološki promijenjenih spermija. Slično tome, Al-Janabi i sur. (2012.) ustvrdili su značajnu pozitivnu korelaciju između koncentracije kolesterola u ejakulatu i koncentracije spermija. U sjemenoj je plazmi azoospermičnih i oligospermičnih muškaraca utvrđena veća koncentracija ukupnog kolesterola u sjemenoj plazmi u odnosu na plodne muškarce (Sebastian i sur., 1987.), dok Meseguer i sur. (2004.) nisu ustvrdili razliku u koncentraciji kolesterola u sjemenoj plazmi među neplodnim i plodnim muškarcima.

Pojedini autori tvrde da je koncentracija kolesterola u ejakulatu povezana s razdobljem u godini (Gündoğan, 2006., Beer-Ljubić i sur., 2009.).

Bjelančevine

Bjelančevine su neophodne za normalnu funkciju spermija i interakciju spermija s okolinom, odnosno s različitim tvarima u različitim dijelovima ženskog spolnog sustava tijekom njihova prolaska prema jajnoj stanici. Specifični peptidi i proteini djeluju kao signali za moduliranje imunskog sustava ženki u netoleranciji ili toleranciji antigena sperme, možda čak utječu i na relativnu plodnost mužjaka i/ili para uspostavljanjem stanja majčinske tolerancije prema embriju. Bjelančevine u sjemenoj plazmi imaju nekoliko značajnih funkcija koje prethode oplodnji, kao što su regulacija kapacitacije i akrosomske

reakcije, uspostava spremnika spermija u jajovodu, modulacija imunskog odgovora sluznice maternice te transportu spermija unutar ženskog spolnog sustava. Nadalje, bjelančevine sudjeluju i u interakciji i fuziji gameta (Koziorowska-Gilun i sur., 2011., Rodriguez-Martinez i sur., 2011., Caballero i sur., 2012.).

Do sada istražene bjelančevine imaju mnoštvo funkcija, no samo ih je nekoliko povezano s (ne)plodnošću. Koncentracija bjelančevina u spermi manja je od one u krvnoj plazmi te je stoga prosječna količina bjelančevina od 30 do 60 g/L (Rodriguez-Martinez i sur., 2011.). Naime koncentracija i podrijetlo bjelančevina u sjemenoj plazmi razlikuje se između životinjskih vrsta (Diaconescu i sur., 2014.). U spermi je mnoštvo bjelančevina od kojih su pojedine enzimi primjerice: katalaza, fosfataza, mucinaza, hijaluronidaza, tripsin, amilaza, lipaza i kolinesteraza (Cergolj i Samardžija, 2006.).

Kisela fosfataza (ACP) je ključna za metaboličke i energetske transdukcijske procese stanica odnosno neophodna je u proizvodnji, transportu i recikliranju fosfata. U sjemenoj plazmi nerasta ACP se nalazi u četiri molekularna oblika podrijetlom iz sjemenih vezikula, epididimisa i prostate. Aktivnost je ACP-a podrijetlom iz epididimisa najzastupljenija i iznosi oko 90% ukupne aktivnosti u sjemenoj plazmi nerasta (Wysocki i Strzezek, 2003.). U pasa i ljudi je najzastupljenija ACP iz prostate, a povišene vrijednosti u krvi ukazuju na benigne hiperplazije ili razvoj karcinoma prostate. ACP je u sjemenoj plazmi uključena u kapacitaciju spermija, akrosomsku reakciju, hiperaktivaciju i vezanje za *zona pellucidu*/oplodnju jajne stanice (Wysocki i Strzezek, 2003., Stasiak i sur., 2010.). Nadalje, ACP iz epididimisa je uključena u post testikularne procese sazrijevanja spermija (Wysocki i Strzezek, 2006., Žura Žaja i sur., 2016.c), tj. u fosforilacijsko-defosforilacijske procese. Soucek i Vary (1984.) ustvrdili su da su

kisela i alkalna fosfataza sastavni dijelovi stanične membrane spermija te da je ACP nađena i u izvanjskoj akrosomalnoj membrani spermija.

Alkalna fosfataza (ALP) katalizira hidrolizu fosfatnih skupina u nizu različitih supstrata u sjemenoj plazmi te membrani spermija mužjaka različitih vrsta životinja i ljudi. Podrijetlo ALP u sjemenoj plazmi ovisi o životinjskoj vrsti. U nerasta i pasa se veći dio ALP-a sintetizira u epididimisu, a akcesorne spolne žlijezde i testis stvaraju zanemarivu količinu tog enzima (Bucci i sur., 2014., Žura Žaja i sur., 2016.c). U bikova su pak sjemene vezikule najznačajniji izvor ALP-a, u kunića testisi, epididimisi, *vas deferens* i ampula sjemenovoda podjednako sintetiziraju veliku količinu enzima, u konja najveće vrijednosti nađene su u testisima i epididimisima, dok su u muškaraca najveće vrijednosti u prostati (Turner i McDonnell, 2003., Bucci i sur., 2014.). Osim u sjemenoj plazmi, ALP sastavni je dio stanične membrane spermija te je povezana s citoplazmatskom kapljicom. ALP iz sjemena može hidrolizirati fosfatne estere raznih mononukleotida, šećera, glicerofosfata i piridoksal-fosfata, kao i adenozin trifosfata (Glogowski i sur., 2002.). ALP sudjeluje i u proizvodnji slobodne fruktoze u ejakulatu, koja nakon fruktolize osigurava energiju neophodnu za gibljivost spermija (Stasiak i sur., 2010.). Neke su studije pokazale korelaciju između aktivnosti enzima i koncentracije spermija povezane s plodnošću bikova (Stallcup, 1965.), nerasta (Bucci i sur., 2014.) i pastuha (Pesch i sur., 2006.).

ALP ima važnu funkciju u kapacitaciji spermija. Velike su vrijednosti ALP aktivnosti nađene u sjemenoj plazmi, a vjerojatno su odgovorne i za održavanje spermija u stanju anabioze te u sprječavanju prijevremene kapacitacije. Sjemeni plazma sadrži čimbenike koji inhibiraju kapacitaciju spermija (Bucci i sur., 2014.). Tijekom prolaska kroz ženski

spolni sustav spermiji sa svojih površina gube bjelančevine sjemene plazme, kao i druge čimbenike koji ih oblažu i koji su odgovorni za dekapacitaciju, potom prolaze kroz proces kapacitacije i stječu oplodnu sposobnost (Brüssow i sur., 2008.).

Aktivnosti se enzima poput γ -glutamyl-transferaze i ALP odnose na kakvoću sjemena i funkciju membrana te sudjeluju u različitim metaboličkim procesima tijekom dozrijevanja spermija (Kumar i sur., 2000., Bucci i sur., 2014., Žura Žaja i sur., 2016.a,c).

Gama-glutamyl transferaza (GGT) je enzim prisutan u membranama stanica mnogih tkiva kao i sjemenih vezikula. GGT ima važnu funkciju u održavanju unutarstaničnog cisteina i glutationa (GSH), koji su važni u očuvanju unutarstanične homeostaze protiv oksidacijskog stresa (Yokoyama, 2007.). Seligman i sur. (2005.) dokazali da je GGT aktivno uključen u proces razgradnje glutationa u cistein, a koji je najintenzivniji u glavi epididimida. GGT je enzim važan u reprodukciji mužjaka, obilno ga se nalazi u tkivima epididimisa, a njegova je prisutnost presudna za mušku plodnost (Kumar i sur., 2000., Žura Žaja i sur., 2016.c). Iako autori navode da je enzim lokaliziran u epitelu epididimisa, ustvrđeno je da i u tekućini epididimisa postoji slobodni oblik GGT-a, kojega je aktivnost 200 do 500 puta veća u sjemeni nego u serumu (Seligman i sur., 2005.). Mužjaci miševa, koji nemaju GGT imaju znatno manje testise, sjemene vezikule i epididimise te oligospermiju ili azospermiju. Osim toga spermiji su im nepokretni i neplodni (Kumar i sur., 2000.).

GGT je prisutna u području akrosome i središnjem dijelu spermija pojedinih vrsta sisavaca te može u trenutku penetracije spermija dodatno utjecati na udio GSH u oociti. Obzirom na veliki broj mitohondrija u spermiju, ovi su antioksidativni mehanizmi važni u održavanju gi-

bljivosti spermija, brzine hiperaktivacije i održanja tijekom skladištenja (Stefanov i sur., 2013., Žura Žaja i sur., 2019.).

Istraživanjima je ustvrđeno da veća aktivnost GGT-a ima pozitivan učinak na kvalitetu sjemena (Pesch i sur., 2006., López Rodríguez i sur., 2013., Stefanov i sur., 2013.). Značajna korelacija između GGT-a i gibljivosti spermija može ukazivati na njegovu funkciju u zaštiti stanica od slobodnih radikala kisika.

Laktat dehidrogenaza (LDH) je enzim uključen u završni dio glikolize. LDH se nalazi u sisavaca i ptica u tri izoforme i to izoenzimi: A4, B4 te C4 (X). LDHC je prisutan u testisima, odnosno spermatocitama, spermatidama i spermijima, ali je nađen i u maloj količini u jajnim stanicama (Odet i sur., 2008.). U spermiji LDH i sorbitol dehidrogenaza su enzimi aktivni u procesima u kojima se stvara energija (Diaconescu i sur., 2014.). Nadalje, uklanjanjem *Ldhc* gena u miševa dolazi do nemogućnosti hiperaktivacije spermija, nemogućnosti njihova prodora u zonu pellucidu *in vitro* te nemogućnosti provođenja procesa fosforilacije, koja je karakteristična za kapacitaciju spermija. Rezultati ukazuju da enzim LDHC ima značajnu funkciju u održavanju procesa glikolize i proizvodnje ATP-a u biču spermija (*flagellum*), koji su potrebni za plodnost mužjaka i funkcije spermija (Odet i sur., 2008.).

U više se istraživanja navodi da LDH ima važnu metaboličku funkciju u kapacitaciji spermija i oplodnji (Duan i Goldberg, 2003., Asadpour, 2012.). U pojedinim istraživanjima autori navode da povećane vrijednosti LDH u sjemenu imaju pozitivan učinak na kvalitetu sjemena. Primjerice, Asadpour (2012.) i Pesch i sur. (2006.) su ustvrdili da povećanje postotka živih i normalnih spermija te gibljivosti spermija korelira s povećanjem aktivnosti LDH u sjemennoj plazmi. No, Duan i Goldberg (2003.) navode da povećanje aktivnosti LDH u sjemennoj plazmi, može biti pokazatelj

funkcionalnih oštećenja stanične membrane spermija.

Kreatin kinaza (CK) je ključni enzim za staničnu energetiku, a predstavlja sustav enzima s nekoliko izoenzima koji su različito razmješteni, posebice na onim mjestima gdje se energija stvara i/ili ulaže. Podrijetlo CK u sjemennoj plazmi dijelom je iz prostate, ali i iz drugih akcesornih spolnih žlijezda, gdje katalizira regeneraciju ATP-a nužnu za površinsku fosforilaciju spermija (Teixeira i Borges, 2012.). Naime, velika količina CK prisutna je u spermijima i sjemennoj plazmi (Teixeira i Borges, 2012., Žura Žaja i sur., 2016.a).

Utvrdeno je da je razina kreatin kinaze u ljudskoj spermiji objektivan biokemijski biljeg za zrelost spermija i oplodni potencijal (Huszar i Vigue, 1993., Hallak i sur., 2001.). U uzorcima ejakulata sa smanjenom koncentracijom spermija, CK aktivnost bila je 10 do 20 puta veća od one u normospermičnim ejakulatima. Imunocitokemijska istraživanja CK pojedinog spermija ukazuju da su povećane koncentracije CK odraz zaostale citoplazme spermija koja nije bila „izbačena“ tijekom kasne spermiogeneze (Huszar i Vigue, 1993., Hallak i sur., 2001.). Nezreli spermiji s povećanom količinom citoplazme imaju veću količinu CK enzima i ne vežu se za jajnu stanicu, a imaju i veći stupanj lipidne peroksidacije (Huszar i Vigue sur., 1994., Huszar i sur., 1997.). Smatra se da je funkcionalna manjkavost spermija povezana s povišenim razinama određenih enzima, kao što su CK, LDH i glukoza-6-fosfat dehidrogenaza te manjkavosti u spermiogenezi, koja dovodi do otpuštanja nezrelih spermija iz germinativnog epitela (Hallak i sur., 2001.). Naime, aktivnost je CK negativno korelirala s koncentracijom spermija, ukupnim brojem spermija, progresivnom gibljivošću te spermijima normalne morfologije, a pozitivno korelirala s postotkom spermija s abnormalnim oblikom repa. CK može biti osjetljiv pokazatelj kvalitete i zrelosti

spermija u praćenju liječenih bolesnika (Hallak i sur., 2001., Zeqiraj i sur., 2014.).

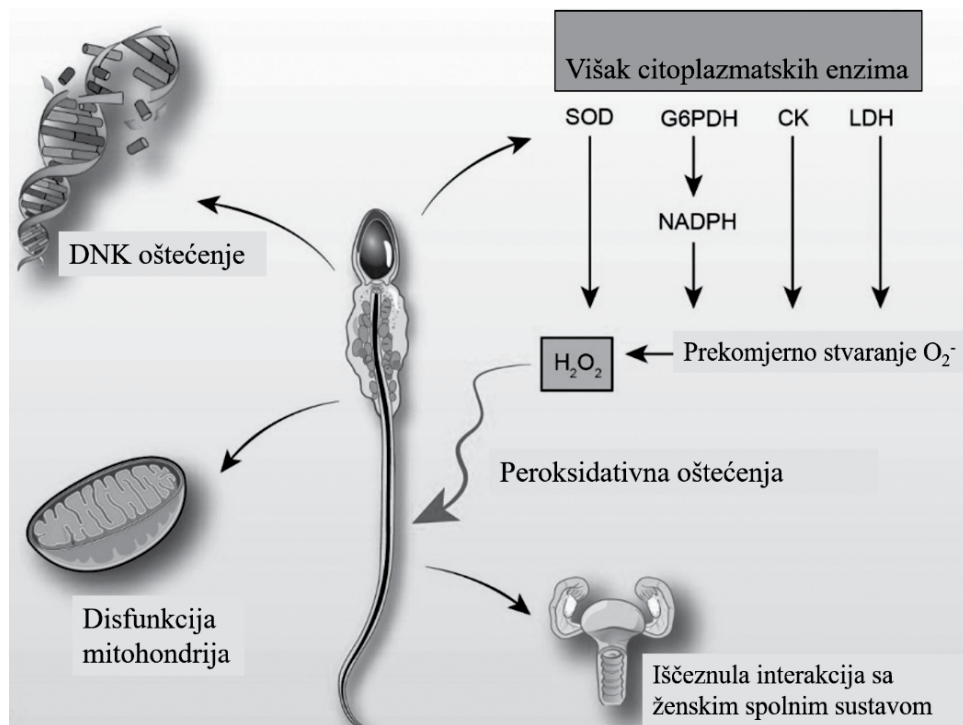
Korelacija između aktivnosti CK i koncentracije malondialdehida (MDA) pokazuje da je povećana razina lipidne peroksidacije povezana s nepotpunom zrelošću spermija (Slika 2.) (Huszar i Vigue, 1994., Alani i sur., 2009.). Alani i sur. (2009.) su u svojem istraživanju otkrili značajno višu koncentraciju MDA i aktivnost CK u sjemennoj plazmi neplodnih muškaraca s normozoospermijom u usporedbi s plodnim muškarcima. Nadalje, smatraju da bi određivanje aktivnosti CK i koncentracije MDA u sjemennoj plazmi mogla biti prihvaćena metoda za razlikovanje neplodnih uzoraka sjemena od zdravih, uz već prihvaćene standardne analize sjemena.

Jednako su tako, enzimi alanin aminotransferaza (ALT), aspartat

aminotransferaza (AST) i LDH značajni u metaboličkim procesima koji osiguravaju energiju za preživljavanje, giblivosť i plodnost spermija (Dogan i sur., 2009.). Tako, povećanje postotka abnormalnih spermija u ejakulatu rezultira povećanjem koncentracije aminotransferaza u izvanstaničnoj tekućini, zbog oštećenja membrane spermija i istjecanja tih enzima iz spermija (Gundogan, 2006). Stoga, mjerenje aktivnosti aminotransferaza (AST i ALT) u sjemennoj plazmi dobar je pokazatelj stabilnosti stanične membrane spermija i kakvoće sjemena (Dogan i sur., 2009.).

Minerali

Sjemena plazma sadrži elemente u tragovima primjerice Ca, Mg, Cu, Zn i Se u vezanom i slobodnom obliku.



Slika 2. Povezanost zaostale citoplazmatske kapljice spermija s većom količinom citoplazmatskih enzima (prema Rengan i sur., 2012.).

Navedeni elementi imaju vrlo značajnu funkciju i utječu na različite značajke sjemena, primjerice gibljivost spermija (Abd-Alrahman i Abdella, 2013., Brini i sur., 2013.). Kationi Na, K, Ca i Mg neophodni su za uspostavljanje i održavanje osmotske ravnoteže, a osim toga esencijalni su elementi i sastavni dijelovi mnogih važnih enzima. Naime, neprimjerene koncentracije Ca, Mg, Zn i Cu u sjemennoj plazmi koreliraju s neplodnošću u muškaraca. Dakle, procjena sastava i koncentracije minerala u sjemennoj plazmi može biti važan kriterij za procjenu plodnosti i dijagnostiku muških reproduktivnih poremećaja.

Kalcij je u izvanstaničnoj tekućini najvećim dijelom vezan za bjelančevine, a drugi dio se Ca nalazi u sastavu anionskih spojeva i kao ionski Ca. Najznačajnija funkcija Ca vezanog za bjelančevine je regulacija pH izvanstanične tekućine, pri čemu alkalni pH prouzroči povećano vezivanje Ca i time smanjuje ionizirani Ca (Brini i sur., 2013.). Najznačajniji izvor Ca u sjemennoj plazmi muškarca je sekret prostate, a u nerasta sekret sjemenih vezikula (Mann, 1954.).

Odavno je poznato da je izvanstanični Ca potreban za uspješnu oplodnju. Također je dokazano da su Ca^{2+} nužni za održivost, gibljivost, progresivnu gibljivost i kapacitaciju spermija. Spermijima su za održavanje normalne gibljivosti neophodni unutarstanični Ca^{2+} kao i Ca iz sjemene plazme, uz brojne druge čimbenike. Nadalje, čini se da spermiji imaju funkcionalni raspon koncentracije Ca koji mogu tolerirati u izvanstaničnom okolišu, a koncentracija Ca koja prelazi te vrijednost prouzroči smanjenu aktivnost spermija. Breitbart (2003.) navodi da unutarstanični Ca i bikarbonati imaju najznačajniju funkciju u procesu kapacitacije spermija nerasta. Witte i Schäfer-Somi (2007.) isto tako naglašavaju važnost Ca, kolesterola i progesterona u indukciji kapacitacije i akrosomske reakcije u spermijima sisavaca.

Naime, proces sazrijevanja spermija mijenja odgovor spermija na Ca ione, koji imaju dvojak učinak na gibljivost spermija. U epididimisu, u kojem se nalazi velika koncentracija iona Ca, Ca^{2+} potiču nezrele spermije na gibanje, dok u ejakuliranom sjemenu velika koncentracija Ca^{2+} smanjuje gibljivost spermija. Akcesorne spolne žlijezde izlučuju bjelančevine koje vežu Ca i inhibitore tih bjelančevina, koje se tijekom ejakulacije miješaju sa spermijima. U ženskom spolnom sustavu spermiji stječu puni kapacitet za oplodnju jajne stanice. Tijekom procesa kapacitacije inhibitori se vežu na bjelančevine koje prenose Ca te bivaju uklonjene, a oslobođeni ioni Ca aktiviraju akrosomsku reakciju i olakšavaju prodiranje spermija u jajnu stanicu. Uz priliv Ca^{2+} , akrosomska reakcija popraćena je i oslobađanjem enzima uz membranske promjene, koje su nužne u interakciji spermij-jajna stanica (Zaneveld i sur., 1991., Žura Žaja i sur., 2015.).

Pojedini autori navode povoljan učinak veće koncentracije Ca na mušku plodnost. Značajna pozitivna korelacija ustvrđena je između koncentracije Ca u sjemennoj plazmi i gibljivosti spermija te stupnja aktivnosti spermija (Al-Janabi i sur., 2012., Zhang i sur., 2010.). Nadalje, nađena je značajno smanjenja koncentracija K i Ca u sjemennoj plazmi neplodnih muškarcima u usporedbi s plodnima (Hamad i sur., 2014.).

Različita istraživanja na različitim životinjskim vrstama navode podatke o utjecaju godišnjeg doba, pasmine, učestalosti uzimanja ejakulata i ostalih okolišnih čimbenika na razinu koncentracije Ca u sjemenu (Mert i sur. 2009., Asadpour, 2012., Žura Žaja i sur., 2016.a).

Magnezij (Mg) ima značajnu funkciju u brojnim biološkim procesima, primjerice staničnom energetskom metabolizmu, stabilizaciji stanične membrane, staničnim diobama i sintezi

bjelančevina (Çevik i sur., 2007., Abd-Alrahman i Abdella, 2013.). Budući da sudjeluje u metabolizmu bjelančevina, ugljikohidrata, masti i nukleinskih kiselina Mg je nužan za normalno funkcioniranje spermija, posebice u metaboličkim procesima. Nadalje, ionski Mg je značajan u regulaciji funkcija mitohondrija, uključujući i kontrolu njihovog volumena, sastava iona te proizvodnje ATP-a (Pasternak i sur., 2010.). No, Mg ima i funkciju u spermatogenezi, posebice u gibljivosti spermija.

U dostupnoj literaturi postoje istraživanja s oprečnim rezultatima vezano uz činjenicu je li poželjna veća ili manja koncentracija Mg u sjemenju. U istraživanju Çevik i sur. (2007.) ustvrdili su značajno manju koncentraciju Mg u sjemenju plazmi bikova s oligospermijom. Slično navode Zhang i sur. (2010.), koji su ustvrdili značajnu negativnu korelaciju Mg u sjemenju plazmi s parametrima spermija. Nadalje, rezultati Abd-Alrahman i Abdella (2013.) ukazuju da porast koncentracije Mg u sjemenju plazmi muškaraca prouzroči smanjenje gibljivosti spermija. Navedeno se ne podudara s rezultatima studije Bassej i sur. (2013.), koji navode da je koncentracija Ca i Mg u sjemenju plazmi bila značajno veća u skupini plodnih muškaraca u odnosu na skupine neplodnih muškaraca. Nadalje, nerasti s dobrom kvalitetom sjemena imali su veću koncentraciju Mg u sjemenju plazmi od onih s lošom kvalitetom (López Rodríguez i sur., 2013.). Dobiveni rezultati navedenih autora ukazuju da Ca i Mg u sjemenju plazmi imaju vrlo značajnu funkciju u muškoj plodnosti te bi se trebali uzeti u obzir u dijagnostici i liječenju muške neplodnosti.

Cink (Zn) ima važnu funkciju u fiziologiji spermija, u proizvodnji i/ili održivosti spermija, u prevenciji razgradnje te stabilizaciji stanične membrane spermija, stabilizaciji

kromatina u jezgri spermija, gibljivosti spermija, a djeluje i antioksidativno (Lipenský i sur., 2014.). Cu, Zn i Se sudjeluju u mnogim biokemijskim procesima koji podržavaju stanični život. Najvažniji od tih procesa su stanično disanje, stanični aerobni procesi, stanična dioba, DNK i RNK replikacija, održavanje integriteta stanične membrane i vezivanje slobodnih radikala kisika. Cu, Zn, Se su uključeni u uklanjanje slobodnih radikala kisika pomoću kaskadnih enzimskih sustava te štite bjelančevine i lipide od oksidacijskog oštećenja. Cu i Zn su kočimbenici u reakciji koju katalizira enzim superoksid dismutaza u kojoj se superoksidni radikal prevodi u manje štetan vodikov peroksid. Minerali kao što su Zn i Se, zbog njihovih antioksidativnih svojstava povezani su s kvalitetom sjemena u muškaraca, (Bedwal i Bahuguna, 1994., López Rodríguez i sur., 2013.).

U spolno zrelih muških jedinki velika je koncentracija Zn u testisima, a prostata ima najveću koncentraciju Zn u tijelu te je stoga u WHO priručniku opisan kao pokazatelj funkcije prostate (WHO, 2010.). U štakora se uslijed nedostatka Zn često opaža veći udio spermija patoloških oblika (Bedwal i Bahuguna, 1994.), a López Rodríguez i sur. (2013.) našli su negativnu korelaciju koncentracije Zn u sjemenju plazmi nerasta s udjelom spermija s abnormalnim repom. Veća koncentracija Zn izmjerena je u sjemenju plazmi nerasta s boljom kvalitetom sjemena u odnosu na one s lošijom (Lipenský i sur., 2014.). Osim navedenog, nedostatka Zn inhibira steroidogenezu u testisima što rezultira smanjenom proizvodnjom ili izostankom proizvodnje spermija (Hamdi i sur., 1997.).

Najviše je istraživanja o važnosti Zn u reprodukciji provedeno u ljudi, no rezultati su nekonzistentni pa su Zhao i Xiong (2005.) u svom istraživanju ustvrdili da je manja koncentracija Zn u sjemenju plazmi povezana sa smanjenom

produkcijom i gibljivosti spermija te neplodnosti u muškaraca. Gotovo istovjetne rezultate navode Colagar i sur. (2009.) te Atig i sur. (2012.). Suprotno prethodno navedenim istraživanjima, Abd-Alrahman i Abdella, (2013.) ustvrdili su negativnu korelaciju između gibljivosti spermija i koncentracije Zn i Mg u sjemennoj plazmi muškaraca.

Zaključna razmatranja

Sjemena plazma je značajna za metabolizam spermija kao i za njihovu funkciju, preživljavanje i transport u ženskom spolnom sustavu. Nadalje, sjemena plazma ima važnu funkciju tijekom kapacitacije spermija, stimulira imunostni sustav sluznice uterusa za neutralizaciju patogena, a da pri tome tolerira spermije i zametke. Lipidi sjemena izgrađuju staničnu membranu spermija, sudjeluju u metabolizmu i kapacitaciji spermija, hiperaktivaciji i akrosomskoj reakciji te oplodnji jajne stanice. U nedostatku ostalih supstrata, spermiji koriste lipide za proizvodnju energije za njihovu gibljivost i održivost, a veća koncentracija lipida u sjemenu omogućuje njegovu uspješniju pohranu i očuvanje.

Bjelančevine utječu na stabilnost stanične membrane spermija te njihovu gibljivost, a sudjeluju u kapacitaciji i interakciji s jajnom stanicom i u oplodnji. Pri transportu spermija duž ženskog spolnog sustava bjelančevine sudjeluju u fagocitozi i vezanju propalih spermija. Veća koncentracija bjelančevina u sjemenu utječe na bolju mogućnost smrzanja sjemena, odnosno bolju kakvoću sjemena nakon odmrzavanja i veću sposobnost spermija za oplodnju jajne stanice.

Minerali sjemene plazme, iako u malim koncentracijama, nužni su za gibljivost spermija, uspostavljanje i održavanje osmotske ravnoteže, sastavni su dijelovi enzima uključenih u važne metaboličke procese spermija.

U humanoj medicini određivanje biokemijskih pokazatelja u sjemennoj plazmi od kliničkog je značenja, primjerice za otkrivanje patologije testisa i/ili akcesornih spolnih žlijezda, za provjeru reproduksijskog potencijala te praćenja reproduktivnog zdravlja. Analiza biokemijskih pokazatelja u sjemennoj plazmi pruža mogućnost ranog otkrivanja bolesti, posebice raka prostate u muškaraca.

U veterinarskoj medicini, određivanje pojedinih biokemijskih pokazatelja u sjemennoj plazmi rasplodnjaka, ima primjenu u dijagnostici neplodnosti i/ili bolesti spolnih organa, procjeni i praćenju reproduksijskog zdravstvenog stanja i procjeni kakvoće ejakulata.

Literatura

1. ABD-ALRAHMAN, D. A. and A. M. ABDELLA (2013): Evaluaton of seminal zinc, magnesium and calcium levels in fertile sudance male with asthenozoospermia. *Lab. Med. J.* 1, 9-14.
2. ALANI, G. T. and H. D. EL YASEEN (2009): Creatin kinase activity and malondialdehide in the seminal plasma of normospermic infertilit males. *J. Fac. Med. Baghdad.* 51, 336-340.
3. AL-JANABI, A. S., F. A. AL-MEMAWI and M. Q. AL-LAMI (2012): Relationship of seminal reproductive hormones with sperm function tests in asthenospermic patients. *J. Med.* 46, 97-107.
4. AM-IN, N., R. N. KIRKWOOD, M. TECHAKUMPHU and W. TANTASUPARUK (2011): Lipid profiles of sperm amd seminal plasma from boars having normal or low sperm motility. *Therogenology* 75, 897-903.
5. ARGOV, N., D. SKLAN, Y. ZERON and Z. ROTH (2007): Association between sesonal changes in fatty-acid composition, expression of VLDL receptor and bovine sperm quality. *Theriogenology* 67, 878-885.
6. ASADPOUR, R. (2012): Relationship between Mineral Composition of Seminal Plasma and Semen Quality in Various Ram Breeds. *Acta. Sci. Vet.* 40, 1027-1035.
7. ATIG, F., M. RAFFA, B.-A. HABIB, A. KERKENI, A. SAAAD and M. AJJINA (2012): Impact of seminal trace element and glutathione levels on semen quality of Tunisian infertile men. *BMC Urol.* 12, 2-8.
8. BASSEY, I. E., O. E. ESSIEN, A. E. UDOH, I. U. IMO and I. O. EFFIONG (2013): Seminal plasma selenium, calcium, magnesium and zinc levels in infertile men. *J. Med. Sci.* 13, 483-487.
9. BEDWAL, R. S. and A. BAHUGUNA (1994): Zinc, copper and selenium in reproduction. *Experientia* 50, 626-640.
10. BEER-LJUBIĆ, B., J. ALADROVIĆ, T. S., MARENJAK, R. LAŠKAJ, I. MAJIĆ-BALIĆ and S.

- MILINKOVIĆ-TUR (2009): Cholesterol concentration in seminal plasma as a predictive tool for quality semen evaluation. *Theriogenology* 72, 1132-1140.
11. BREITBART, H. (2003): Signaling pathways in sperm capacitation and acrosome reaction. *Cell Mol. Biol.* 49, 321-327.
 12. BRINI, M., D. OTTOLINI, T. CALÍ and E. CARAFOLI (2013): Calcium in Health and Disease. In: *Interrelations between Essential Metal Ions and Human Diseases.* (Sigel, A., H. Sigel, R. K. O. Sigel, eds.), Springer, Dorrecht, Heidelberg, New York, London, pp. 81-137.
 13. BRÜSSOW, K. P., J. RATKY and H. RORIGUEZ-MARTINEZ (2008): Fertilization and early embryonic development in the porcine fallopian tube. *Reprod. Domest. Anim.* 43, 245-251.
 14. BUCCI, D., G. ISANI, E. GIARETTAM, M. SPINACI, C. TAMANINI, E. FERLIZZA and G. GALEATI (2014): Alkaline phosphatase in boar sperm function. *Andrology* 2, 100-106.
 15. CABALLERO, I., I. PARRILLA, C. ALMIÑANA, D. DEL OLMO, J. ROCCA, E. A. MARTINEZ and J. M. VÁZQUEZ (2012): Seminal Plasma Proteins as modulators of the Sperm Function and Their Application in Sperm Biotechnologies. *Reprod. Domest. Anim.* 47, 12-21.
 16. CERGOLJ, M. i M. SAMARDŽIJA (2006): *Veterinary andrology.* (M. Samardžija, ed.). Faculty of Veterinary Medicine University of Zagreb, Croatia. (In Croatian).
 17. ČEVİK, M., P. B. TUNCER, U. TASDEMİR and T. ÖZGÜRTAS (2007): Comparison of spermatological characteristic and biochemical seminal plasma parameters of normozoospermic and oligoasthenozoospermic bulls of two breeds. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* 31, 381-387.
 18. COLAGAR, A. H., E. T. MARZONY and M. J. CHAICHI (2009): Zinc levels in seminal plasma are associated with sperm quality in fertile and infertile men. *Nutr. Res.* 29, 82-88.
 19. CROSS, N. L. (1996): Human seminal plasma prevents sperm from becoming acrosomally responsive to the agonist progesterone: cholesterol is the major inhibitor. *Biol. Reprod.* 54, 136-145.
 20. DABROVICH, A. P., P. SARAON, K. JARVI and E. P. DIAMANDIS (2014): Seminal plasma as a diagnostic fluid for male reproductive system disorders. *Nat. Rev. Urol.* 11, 278-288.
 21. DIACONESCU, C., M. MATEI, G. TĂLPU and P. TĂPĂLOAGĂ (2014): Comparative physicochemical and biochemical characterization of bull and boar semen. *Anim. Sci. J.* 57, 141-145.
 22. DOGAN, I., U. POLAT and Z. NUR (2009): Correlations between seminal plasma enzyme activities and semen parameters in seminal fluid of Arabian horses. *Iran. J. Vet. Res.* 10, 119-124.
 23. DUAN, C. and E. GOLDBER (2003): Inhibition of lactate dehydrogenase C4 (LDHC4) blocks capacitation of mouse sperm in vitro. *Cytogenet. Genome Res.* 130, 352-359.
 24. FRUNZĂ, I., H. CERNESCU and G. KORODI (2008): Physical and chemical parameters of boar sperm. *Lucrări Stiintifice Medicină Veterinară* 41, 634-640.
 25. GERFEN, R. W., B. R. WHITE, M. A. COTTA and M. B. WHEELER (1994): Comparison of the semen characteristics of fengjing, meishan and yorkshire boars. *Theriogenology* 41, 461-469.
 26. GLOGOWSKI, J., D. R. DANFORTH and A. CIERESZKO (2002): Inhibition of Alkaline Phosphatase Activity of Boar Semen by Pentoxifylline, Caffeine, and Theophylline. *J. Androl.* 23, 783-792.
 27. GÜDOĞAN, M. (2006): Some reproductive parameters and seminal plasma constituents in relation to season in Akkaraman and Awassi rams. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* 30, 95-100.
 28. HALLAK, J., R. K. SHARMA, F. F. PASQUAOTTO, P. RANGANATHAN, A. J. THOMAS, JR and A. AGARAWAL (2001): Creatine kinase as an indicator of sperm quality and maturity in men with oligospermia. *Urology* 58, 446-445.
 29. HAMAD, A. W. R., H. I. AL-DAGHISTANI, W. D. SHQUIRAT, M. ABDEL-DAYEM and M. AL-SWAIFI (2014): Sodium, potassium, calcium and copper levels in seminal plasma are associated with sperm quality in fertile and infertile men. *Biochem. Pharmacol.* 3, 1 - 7.
 30. HAMDI, S. A., O. I. NASSIF and M. S. ARDAWI (1997): Effect of marginal or severe dietary zinc deficiency on testicular development and functions of the rat. *Arch. Androl.* 38, 243-253.
 31. HUSZAR, G. and L. VIGUE (1993): In complete development of human spermatozoa is associated with increased creatine phosphokinase concentrations and abnormal head morphology. *Mol. Reprod. Dev.* 34, 292-298.
 32. HUSZAR, G. and L. VIGUE (1994): Correlation between the rate of lipid peroxidation and cellular maturity as measured by creatine kinase activity in human spermatozoa. *J. Androl.* 15, 71-77.
 33. HUSZAR, G., M. SBRACIA, L. VIGUE, D. J. MILLER and B. D. SHUR (1997): Sperm plasma membrane remodeling during spermiogenetic maturation in men: relationship among plasma membrane, β 1,4-Galactosyltransferase, cytoplasmic creatine phosphokinase and creatine phosphokinase isoform ratios. *Biol. Reprod.* 56, 1020-1024.
 34. JACYNO, E., A. KOKODZIEJ, M. KAVEČKA, A. PITRUSZKA, B. MATYSIAK and M. KAMYCZEK (2009): The relationship between blood serum and seminal plasma cholesterol content in young boars and their semen qualitative traits and testes size. *Arch. Tierzucht* 52, 161-168.
 35. JUYENA, N. S. and C. STELLETTA (2012): Seminal plasma an essential attribute to spermatozoa. *J. Androl.* 33, 536-551.
 36. KOZIOROWSKA-GILUN, M., M. KOZIOROWSKI, J. STRZEŻEK and L. FRASER (2011): Seasonal changes in antioxidant defence systems in seminal plasma and fluids of the boar reproductive tract. *Reprod. Biol.* 11, 37-47.
 37. KUMAR, R. T., A. L. WISEMAN, G. KALA, S. V. KALA, M. M. MATZUK and M. W. LIEBERMAN (2000): Reproductive defects in g-glutamyl transpeptidase deficient mice. *Endocrinology* 141, 4270-4277.
 38. LIPENSKÝ, J., A. LUSTYKOVÁ, S. FRYDRYCHOVÁ, E. VÁCLAVKOVÁ, M. ROZKOTI and J. ČEŘOVSKÝ (2014): Seminal plasma zinc concentration in relation to sperm quality parameters in boars. *Res. Pig Breed.* 8, 29-31.
 39. LÓPEZ RORIGUEZ, A., T. RIJSELAERE, J. BEEK, P. VYT, A. VAN SOOM and D. MAES (2013): Boar seminal plasma components and their relation with semen quality. *Syst. Biol. Reprod. Med.* 59, 5-12.

40. LU, J. C., J. JING, Q. YAO, K. FAN, G. H. WANG, R. X. FENG, Y. J. LIANG, L. CHEN, Y. F. GE and B. YAO (2016): Relationship between lipids levels of serum and seminal plasma and semen parameters in 631 chinese subfertile men. *PLoS One*, 11:e0146304. doi: 10.1371/journal.pone.0146304. eCollection 2016.
41. MANDAL, R., D. BADIYAKAR and J. CHAKRABARTY (2014): Role of membrane lipid fatty acids in sperm cryopreservation. *Advances in Andrology*, Article ID 190542, 9 pp, doi. org/10.1155/2014/190542
42. MANN, T. (1954): *The biochemistry of semen*. Metuen and Co. Ltd. London.
43. MERT, H., K. KARAKUS, A. YILMAZ, T. AYGUN, N. MERT, B. APAYDIN and E. SEYHAN (2009): Effects of genotype on testis, semen quality, and mineral composition of semen in various ram breeds. *Biol. Trace Elem. Res.* 132, 93-102.
44. MESEGUER, M., N. GARRIDO, J. A. MARTÍNEZ-CONEJERO, C. SIMÓN, A. PELLICER and J. REMOHÍ (2004): Relationship between standard semen parameters, calcium, cholesterol contents, and mitochondrial activity in ejaculated spermatozoa from fertile and infertile males. *J. Assist. Reprod. Genet.* 21, 445-451.
45. NIKODEMUS, D., D. LAZIC, M. BACH, T. BAUER, C. PFEIFFER, L. WILTZER, E. LAIN, E. SCHÖMIG and D. GRÜNDEMANN (2011): 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.* 62, 411-419.
46. ODET, F., C. DUAN, W. D. WILLIS, E. H. GOUNING, A. KUNG, E. M. EDDY and E. GOLDBERG (2008): Expression of the gene for mouse lactate dehydrogenase C (Ldhc) is required for male fertility. *Biol. Reprod.* 79, 26-32.
47. PASTERNAK, K., J. KOCOT and A. HORECKA (2010): Biochemistry of magnesium. *J. Elementol.* 15, 601-616.
48. PESCH, S., M. BERGMANN and H. BOSTEDT (2006): Determination of some enzymes and macro- and microelements in stallion seminal plasma and their correlations to semen quality. *Theriogenology* 66, 307-313.
49. RENGAN, A. K., A. AGARWAL, M. VAN DER LINDE and S. S. DU PLESSIS (2012): An investigation of excess residual cytoplasm in human spermatozoa and its distinction from the cytoplasmic droplet. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 10, 92. <http://www.rbej.com/content/10/1/92>
50. RODRÍGUEZ-GIL, J. E. (2013): Biological aspects of the mature boar spermatozoon. In: *Boar Reproduction* (Bonet, S. et al. eds.), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp. 49-64.
51. RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H., U. KVIST, J. ERNERUNH, L. SANZ and J. J. CALVETE (2011): Seminal plasma proteins: what role do they play? *Am. J. Reprod.* 59, 7-11.
52. RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. (2019): Semen evaluation: can we forecast fertility? *Vet. stn.* 50, In press.
53. SEBASTIAN, S. M., S. SELVARAJ, M. M. ARULDHAS and P. GOVINDARAJULU (1987): Pattern of neutral and phospholipids in the semen of normospermic, oligospermic and azoospermic men. *J. Reprod. Fert.* 79, 373-378.
54. SELIGMAN, J. G. L. NEWTON, R. C. FAHEY, R. SHALGI and N. S. KOSOWER (2005): Nonprotein thiols and disulfides in rat epididymal spermatozoa and epididymal fluid: role of g-glutamyl-transpeptidase in sperm maturation. *J. Androl.* 26, 629-637.
55. SHARPE, R. L., M. DROLET and D. L. MACLATCHY (2006): Investigation of de novo cholesterol synthetic capacity in the gonads of goldfish (*Carassius auratus*) exposed to the phytoestrogen. *Reprod. Biol. Endocrin.* 4, 1-11.
56. SOUCEK, D. A. and J. C. VVARY (1984): Some properties of acid and alkaline phosphatases from boar sperm plasma membranes. *Biol. Reprod.* 31, 687-693.
57. STALLCUP, O. T. (1965): Acid and alkaline phosphatase activity in bovine semen as related to fertility. *J. Dairy. Sci.* 48, 752-754.
58. STASIAK, K. B. JANICKI and B. KUPCEWICZ (2010): Biologic parameters of polar fox (*Alopex lagopus* L.) semen during the breeding season. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* 34, 327-331.
59. STEFANOV, R., D. ABADJIEVA, M. CHERVENKOV, E. KISTANOVA, D. KACHEVA, P. TAUSHANOVA and B. GEORGIEV (2013): Enzyme activities and motility of boar spermatozoa during 72- hours lowtemperature storage. *Bulg. J. Vet. Med.* 16, 237-242.
60. TALLURI, T. R., G. MAL and S. K. RAVI (2017): Biochemical components of seminal plasma and their correlation to the fresh seminal characteristics in Marwari stallions and Potou jacks. *Vet. World* 10, 214-220.
61. TEIXEIRA, A. M. and G. F. BORGES (2012): Creatine kinase: structure and function. *Braz. J. Biomotricity* 6, 53-65.
62. TURNER, R. M. O. and S. M. McDONELL (2003): Alkaline phosphatase in stallion semen: characterization and clinical applications. *Theriogenology* 60, 1-10.
63. WHO (2010): World Health Organization: WHO laboratory manual for the examination of human sperm and semen – cervical mucus interaction. 5thed., WHO press, Geneva.
64. WITTE, T. S. and S. SCHÄER-SOMI (2007): Involvement of cholesterol, calcium and progesterone in the induction of capacitation and acrosome reaction of mammalian spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.* 102, 181-193.
65. WYSOCKI, P. and J. STRZEZEK (2003): Purification and characterization of a protein tyrosine acid phosphatase from boar seminal vesicle glands. *Theriogenology* 59, 1011-1025.
66. WYSOCKI, P. and J. STRZEZEK (2006): Isolation and biochemical characteristics of a molecular form of epididymal acid phosphatase of boar seminal plasma. *Theriogenology* 66, 2152-2159.
67. YOKOYAMA, H. (2007): Gamma glutamyl transpeptidase (gamma GTP) in the era of metabolic syndrome. *Nihon Arukoru Yakubutsu Igakkai Zasshi* (in Japanese), 42, 110-124.
68. ZANEVELD, L. J., C. J. DE JONGE, R. A. ANDERSON and S. R. MACK (1991): Human sperm capacitation and the acrosome reaction. *Hum. Reprod.* 6, 1265-1274.
69. ZEQR AJ, A. and Z. GASHI (2014): Creatine kinase activity in human seminal fluid. *Int. J. Innov. Sci. Eng. Technol.* 1, 3. www.ijiset.com
70. ZHANG, R. S., H. J. SUN and L. W. ZHENG (2010): Correlation of the contents of trace elements in male

- body fluids with sperm quality. *Zhonghua Nan Ke Xue* 16, 1019-1022.
71. ZHAO, R. P. and C. L. XIONG (2005): Zinc content analysis in serum, seminal plasma and spermatozoa of astenozoospermic and oligoastenozoospermic patients. *Zhonghua Nan Ke Xue* 11, 680-682.
 72. ŽURA ŽAJA, I. (2015): Pokazatelji antioksidacijskog sastava u sjemenoj plazmi i spermijima rasplodnih nerasta različitih pasmina. Dissertation, Faculty of Veterinary Medicine University of Zagreb, Croatia (In Croatian).
 73. ŽURA ŽAJA, I., M. SAMARDŽIJA, S. VINCE, I. MAJIĆ-BALIĆ, M. VILIĆ, D. ĐURIČIĆ and S. MILINKOVIĆ-TUR (2016a): Influence of boar breeds or hybrid genetic composition on semen quality and seminal plasma biochemical parameters. *Anim. Reprod. Sci.* 164, 169-176.
 74. ŽURA ŽAJA, I., M. SAMARDŽIJA, S. VINCE, M. VILIĆ, I. MAJIĆ-BALIĆ, D. ĐURIČIĆ and S. MILINKOVIĆ-TUR (2016b): Differences in seminal plasma and spermatozoa antioxidative systems and seminal plasma lipid and protein levels among boar breeds and hybrid genetic traits. *Anim. Reprod. Sci.* 170, 75-82.
 75. ŽURA ŽAJA, I., M. SAMARDŽIJA, S. VINCE, A. SLUGANOVIĆ, S. STRELEC, J. ŠURAN, I. DELVECHIO, D. ĐURIČIĆ, M. OSTOVIĆ, H. VALPOTIĆ and S. MILINKOVIĆ-TUR (2016c): Antioxidant protection and lipid peroxidation in testes and different parts of epididymis in boars. *Theriogenology* 86, 2194-2201.
 76. ŽURA ŽAJA, I., A. SLUGANOVIĆ, M. SAMARDŽIJA, S. MILINKOVIĆ-TUR, T. DOBRANIĆ, S. STRELEC, D. ĐURIČIĆ, H. VALPOTIĆ and S. VINCE (2019): The effects of oxidative stress on the male reproductive system and mechanisms of antioxidant protection. *Vet. stn.* 50, 43-54. (In Croatian).

Biochemical parameters of seminal plasma in domestic animals and humans

Ivona ŽURA ŽAJA, DVM, PhD, Assistant Professor, Ivana ŠVUB, DVM, Suzana MILINKOVIĆ-TUR, DVM, PhD, Full Professor, Silvijo VINCE, DVM, PhD, Associate Professor, Hrvoje VALPOTIĆ, DVM, PhD, Associate Professor, Marko SAMARDŽIJA, DVM, PhD, Full Professor, Faculty of Veterinary Medicine, University of Zagreb, Croatia; Dražen ĐURIČIĆ, DVM, PhD, Assistant Professor, Scientific Advisor, Veterinary Practice Đurđevac, Croatia; Snježana ČIPČIĆ, DVM, Zagreb, Croatia

Semen is a mixture of spermatozoa, produced by the testicles, and seminal plasma secreted by the accessory sexual glands and epididymis, which are then combined at the time of ejaculation. Seminal plasma contains particles of different size that affect spermatozoa viability and function during their migration along the female reproductive tract, enabling protection from oxidative stress, and having important physiological roles in different processes prior to the penetration of a spermatozoon into an egg cell. These functions are referred to as: nutrition, protection, regulation of motility and capacitation of spermatozoa, gamete recognition and binding. Knowledge of physiological characteristics of sperm and seminal plasma, influence of breed, lines and individual impacts of disorders, are required for further advancement of reproduction efficiency and inheritance of the best traits of the semen genome. Knowledge of the chemical composition of seminal plasma is very important in the selection of the diluent, as it maintains and extends the lifetime of the spermatozoa during semen storage. Lipids, proteins and minerals participate in the metabolic and other processes of spermatogenesis. Lipids are constituents

of the cell membrane, participate in the metabolism and capacitation of spermatozoa, hyperactivation and acrosomal reaction, as well as in the fertilization of an egg cell. Proteins participate in capacitation and fertilization and in the transportation of spermatozoa through the female reproductive tract, and they facilitate phagocytosis and binding of dysfunctional spermatozoa. Minerals in the seminal plasma establish and maintain the osmotic equilibrium, they act as antibacterial agents and are essential for the proper motility of spermatozoa. Some are components of enzymes, while others participate in their activation. Infertility studies, particularly in humans, are focused more on analysing and determining seminal plasma parameters, as the number and motility of spermatozoa are not the only prerequisite for successful fertilization. Namely, it is also necessary to have a quality medium for maintaining their normal characteristics. Certain biochemical parameters in seminal plasma are used to measure the function or dysfunction of the testicles and accessory sex glands, or are related to semen quality and fertility or infertility.

Key words: *biochemical parameters; seminal plasma; spermatozoa; lipids; proteins; minerals*