

# Učinci oksidacijskog stresa na muški spolni sustav i mehanizmi antioksidacijske zaštite



I. Žura Žaja\*, A. Sluganović, M. Samardžija, S. Milinković-Tur, T. Dobranić, S. Strelec, D. Đuričić, H. Valpotić i S. Vince

## Sažetak

Za održavanje fizioloških procesa spermatogeneze i steroidogeneze u testisima te povoljnih mikrookolišnih uvjeta u tkivima epididimisa tijekom sazrijevanja, prolaska i pohrane spermija nužno je primjereno djelovanje antioksidansa radi održavanja fiziološke razine reaktivnih kisikovih spojeva (ROS). Stanje oksidacijskog stresa, koje nastaje narušavanjem ravnoteže između oksidansa (ROS i dr.) i prooksidansa (antioksidansi) u korist oksidansa, može za posljedicu imati narušavanje spermatogeneze i steroidogeneze. Tkiva testisa i epididimisa sa spermijima različitog stupnja zrelosti podložna su lipidnoj peroksidaciji, odnosno oksidacijskom stresu. Narušene funkcije testisa mogu se odraziti i na sposobnost stvaranja gibljivih, vijabilnih i morfološki normalnih spermija koji imaju sposobnost oploditi jajne stanice te održati rast i razvoj zametka. Visoka je aktivnost antioksidacijskih enzima u testisima nužna za primjerenu zaštitu spermija i stanica tkiva testisa od oksidacijskih oštećenja. Nadalje, stjecanje gibljivosti i oplodne sposobnosti spermija tijekom njihovog prolaska kroz epididimis povezano je s različitim biokemijskim promjenama osobito u svojstvima njihove

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

**Ključne riječi:** antioksidacijska zaštita; oksidativni stres; lipidna peroksidacija; testisi; epididimisi; spermiji

Dr. sc. Ivona ŽURA ŽAJA\*, dr. med. vet., docentica, dopisni autor, (e-mail: izzaja@vef.hr), Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Hrvatska; Anamaria SLUGANOVIĆ, dr. med. vet.; dr. sc. Marko SAMARDŽIJA, dr. med. vet., redoviti profesor, dr. sc. Suzana MILINKOVIĆ-TUR, dr. med. vet., redovita profesorica, dr. sc. Tomislav DOBRANIĆ, dr. med. vet., redoviti profesor, Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Hrvatska; Sara STRELEC, dr. med. vet.; dr. sc. Hrvoje VALPOTIĆ, dr. med. vet., docent, dr. sc. Silvio VINCE dr. med. vet., izvanredni profesor, Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Hrvatska; dr. sc. Dražen ĐURIČIĆ, dr. med. vet., docent, Veterinarska stanica Đurđevac, Đurđevac, Hrvatska

## Uvod

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

Spermatogeneza je izuzetno aktivan replikacijski proces tijekom kojeg se stvara približno 1000 spermija u sekundi. Veliki stupanj staničnih dioba, svojstven procesu spermatogeneze, zahtijeva potrošnju velike količine kisika u mitohondrijima stanica zametnog epitela (spermatogonije). Mitohondriji su najznačajniji unutarstanični izvor reaktivnih kisikovih spojeva (engl. *reactive oxygen species*; ROS) koji nastaju u sustavu prijenosa elektrona (procesima oksidativne fosforilacije) zbog stvaranja ATP-a. Oskudna vaskularizacija testisa uvjetuje nizak parcijalni tlak kisika u njegovu mikrookolišu. Zbog velikog udjela višestrukonezasićenih masnih kiselina i prisustva sustava koji stvaraju ROS tkivo testisa je podložno oksidacijskom stresu. Stanje oksidacijskog stresa, koje nastaje narušavanjem ravnoteže između oksidansa (ROS i dr.) i prooksidansa (antioksidansi) u korist oksidansa, može

za posljedicu imati narušavanje spermatogeneze i steroidogeneze (Hales i sur., 2005.). Narušene funkcije testisa mogu se odraziti i na sposobnost stvaranja gibljivih, vijabilnih i morfološki normalnih spermija koji imaju sposobnost oploditi jajne stanice i održati rast i razvoj zametka (Aitken i Roman, 2008.).

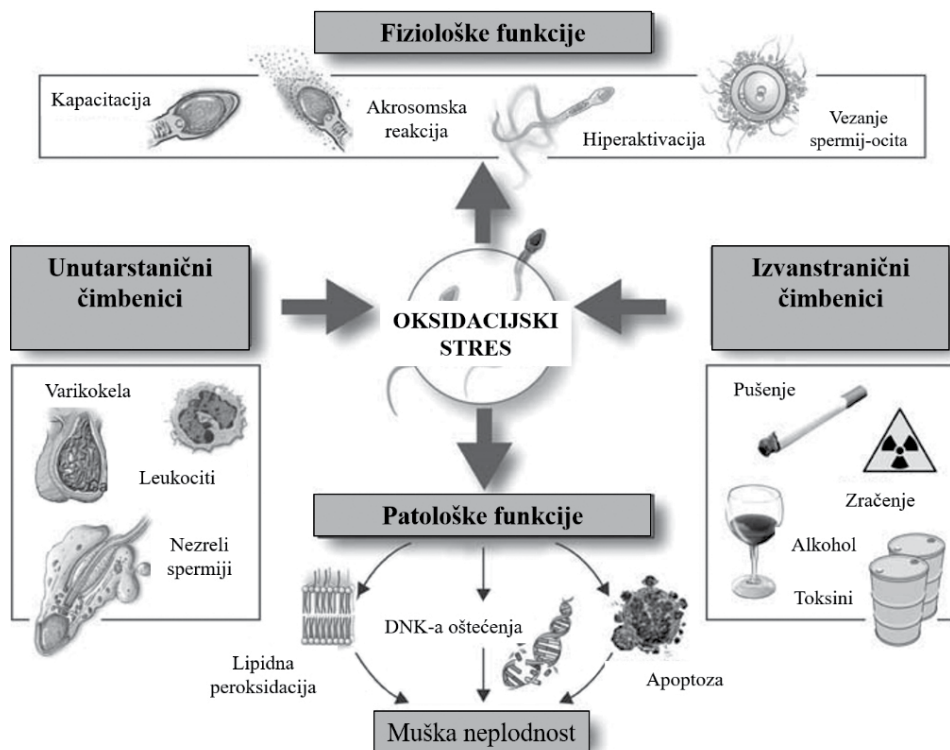
U sisavaca se posttestikularno sazrijevanje spermija u epididimisu smatra nužnim procesom u pretvorbi nezrelih gameta u zrele spermije koji su sposobni za oplodnju jajne stanice. Shodno tome, epididimis osigurava optimalan mikrookoliš za koncentriranje, prijenos, zaštitu, sazrijevanje i skladištenje spermija. Poznato je da su ROS ključni čimbenici u procesu sazrijevanja spermija te da su u primjerenim količinama nužni za njihove fiziološke funkcije, primjerice u procesima kapacitacije, hiperaktivacije, akrosomske reakcije i fuzije spermija s oocitom (De Lamirande i Gagnon, 1993., Sanocka i Kurpisz, 2004.). Međutim, tijekom procesa sazrijevanja i skladištenja u epididimisu sve do oplodnje, spermiji su izloženi oštećenjima koja nastaju kao posljedica oksidacijskog stresa, i to znatno više od drugih stanica u organizmu (Chabory i sur., 2010., Noblanc i sur., 2012.). Štoviše, spermiji su izrazito podložni oksidacijskom stresu prouzročenom prekomjernim stvaranjem ROS-a zbog prisustva velikog udjela višestrukonezasićenih masnih kiselina u njihovoj staničnoj membrani i oskudnoj količini citoplazme, a samim time i neadekvatnom količinom antioksidacijskih enzima (Koziorowska-Gilun i sur., 2011.). Specifična struktura stanične membrane spermija osigurava fleksibilnost i funkcionalnu sposobnost spermija. Sve lipidne komponente koje se nalaze u membrani spermija odgovorne su za razne procese kao što su: spermatogeneza, sazrijevanje spermija, kapacitacija, akrosomska

reakcija te spajanje membrana gameta, a istodobno su glavni supstrati za lipidnu peroksidaciju (engl. *lipid peroxidation*; LPO) (Alvarez i sur., 1987., Žura Žaja, 2015.). Epididimisi i akcesorne spolne žlijezde imaju važnu funkciju u zaštiti spermija od oksidacijskog stresa uklanjanjem suvišne količine ROS-a i izlučivanjem antioksidansa u sjemenu plazmu (Vernet i sur., 2004., Koziorowska-Gilun i sur., 2011., Žura Žaja i sur., 2016.a, Vince i sur., 2018.). U 50% slučajeva muška je neplodnost povezana s izostalom spermatogenezom, dok je druga polovica idiopatske muške neplodnosti povezana s poremetnjom u procesima sazrijevanja i pohrane spermija u epididimisu, čiji je najznačajniji uzrok oksidacijski stres. Bolje razumijevanje funkcije i biokemijske osobitosti epididimisa, zaštite od

oksidacijskog stresa i zbivanja koji prate posttestikularne procese sazrijevanja spermija, predstavljaju nužne spoznaje koje bi mogle biti od koristi u liječenju određenih oblika muške neplodnosti i boljeg očuvanja sjemena (Chabory i sur., 2010., Arrotéa i sur., 2012., Noblanc i sur., 2012., Žura Žaja i sur., 2016.b).

## Reaktivni kisikovi spojevi i oksidacijski stres

Kisik je neophodan aerobnim organizmima koji kao izvor energije koriste oksidacijski metabolizam. Međutim, potrošnja kisika stvara međuproizvode, reaktivne oblike kisikovih metabolita koji se nazivaju ROS i peroksidirane molekule, a



**Slika 1.** Reaktivni kisikovi spojevi i oksidacijski stres u muškom spolnom sustavu (preuzeto od Agarwal i sur., 2014.)

mogu biti štetni za stanicu (Chabory i sur., 2010., Ogbuewu i sur., 2010.). U organizmu su ROS najzastupljeniji radikali te obuhvaćaju superoksidni anion ( $O_2^{\cdot-}$ ), hidroksilni radikal ( $OH^{\cdot}$ ), vodikov peroksid ( $H_2O_2$ ), singletni kisik ( $^1O_2$ ), hipoklornu kiselinu i peroksilne radikale. U stanicama eukariota postoje mnogi metabolički putovi koji sudjeluju u stvaranju ROS-a, a potaknuti su unutarstaničnim i izvanstaničnim čimbenicima (Slika 1.). Slobodni radikali nastaju u stanici tijekom fizioloških i patoloških procesa, primjerice u respiratornom lancu mitohondrija, metabolizmu arahidonske kiseline u staničnim membranama, oksidacijom masnih kiselina u peroksisomima, aktivnošću fagocita, neenzimskim reakcijama kisika te pod utjecajem ultraljubičastog i ionizirajućeg zračenja i drugih patoloških procesa (Poljsak i sur., 2013.). Spajanjem  $O_2^{\cdot-}$  s  $H_2O_2$  u reakcijama koje kataliziraju prijelazni metali nastaje hidroksilni radikal (Slika 2.). Hidroksilni je radikal vrlo reaktivan te reagira sa svim molekulama u staničnom okolišu, ponajprije s tkivima koja sadrže veliki udio lipida stvarajući pri tome niz štetnih učinaka. Stres, anestezija, lijekovi (citostatici, analgetici), upalna stanja pa čak i normalni stanični metabolizam stvaraju ROS u različitim količinama. Za razliku od atmosferskog  $O_2$ , ROS može prouzročiti neograničenu oksidaciju različitih staničnih molekula, što dovodi do uništenja stanica posredovano ROS-om. Zbog stvaranja velike količine ili neučinkovitog uklanjanja ROS-a dolazi do oksidacijskog stresa, a time i do oksidacijskih oštećenja lipida, aminokiselina, ugljikohidrata te DNK-a (Ogbuewu i sur., 2010., Žura Žaja, 2015.). Iako je oksidacijski stres dominantan čimbenik u etiologiji muške neplodnosti, temeljni mehanizmi koji ga prouzročite još uvijek nisu u potpunosti razjašnjeni (Aitken i Roman, 2008.).

Pored njihovih štetnih učinaka, male količine ROS-a neophodne su za mnoge stanične funkcije te sudjeluju u regulaciji gena i staničnog rasta, unutarstaničnoj signalizaciji i ostalim vrstama prijenosa signala (Chabory i sur., 2010., Rahal i sur., 2014., Žura Žaja i sur., 2016.c). Međutim, prekomjerno stvaranje ROS-a može dovesti do stanične patologije i smrti (Slika 1.). Tkivo testisa je izrazito ovisno o kisiku za odvijanje normalne spermatogeneze, ali je istodobno jako podložno i toksičnim učincima reaktivnih kisikovih metabolita (Chabory i sur., 2010.). Oksidacijsko oštećenje DNK-a i bjelančevina prouzročeno ROS-om, može mijenjati strukturu i funkciju spermija te prouzročiti povećanu osjetljivost spermija na majčinske makrofage (Aitken i sur., 1994.).

Oksidacijsko se oštećenje mitohondrijske DNK-a zbiva u svim stanicama koje su poput spermija bogate mitohondrijima, a negativno utječe na fosforilaciju i stvaranje ATP-a, što uzrokuje gubitak gibljivosti i oplodni potencijal spermija (Cummins i sur., 1994., Žura Žaja, 2015.). Endogeno oksidacijsko oštećenje DNK-a u jezgri zametnih stanica (spermatogonija) povezano je s ranim prekidom gravidnosti, nasljednim mutacijama, genetskim bolestima i povećanom učestalošću urođenih psihofizičkih mana, morbiditetom potomaka i karcinomima u ranoj dobi. Većina se oštećenja DNK-a poprave sustavom za reparaciju, no oštećeni se dijelovi mogu odraziti kao mutacije tijekom DNK-a replikacije koja prati diobu stanica u spermatogenezi, oogenezi i embriogenezi (Kemal Duru i sur., 2000., Aitken i Sawyer, 2003., Žura Žaja, 2015.). Tijekom oksidacije bjelančevina nastaje mnoštvo fizikalnih i biokemijskih promjena kao što su primjerice: povećanje osjetljivosti oksidiranih bjelančevina na proteolitičku enzimsku razgradnju, promjene mehaničkih svojstava, promjene u građi,

povećanje hidrofobnosti, promjena u vezanju kočimbenika, promjene enzimske aktivnosti i ionskog prijenosa itd. (Davies, 2003., Ljubičić i sur., 2013., Žura Žaja, 2015.). Nadalje, ROS može u staničnim membranama spermija oksidirati višestrukonezasićene masne kiseline koje su sastavni dio fosfolipida i lipoproteine male gustoće (engl. *low density lipoproteins*; LDL), a sam se proces naziva lipidna peroksidacija (LPO).

## Lipidna peroksidacija

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

Lipidna peroksidacija može prouzročiti gubitak integriteta stanične membrane, poremetiti funkcije spermija i potpuno inhibirati spermatogenezu (Ogbuewu i sur., 2010., Bansal i Bilaspuri,

2011.). Lipidna peroksidacija često nastaje kao odgovor na oksidacijski stres, a uključena je u mnogobrojna patološka stanja kao što su: upale, ateroskleroza, neurodegenerativne bolesti, karcinomi i neplodnost. Tijekom lipidne peroksidacije dolazi do razgradnje primarnih proizvoda LPO te nastanka sekundarnih proizvoda, raznih aldehida (Girotti, 1998., Guéraud i sur., 2010.). Neki su od tih aldehida izrazito reaktivni i mogu se smatrati sekundarnim toksičnim agensima te su u usporedbi s ROS-om relativno stabilni.

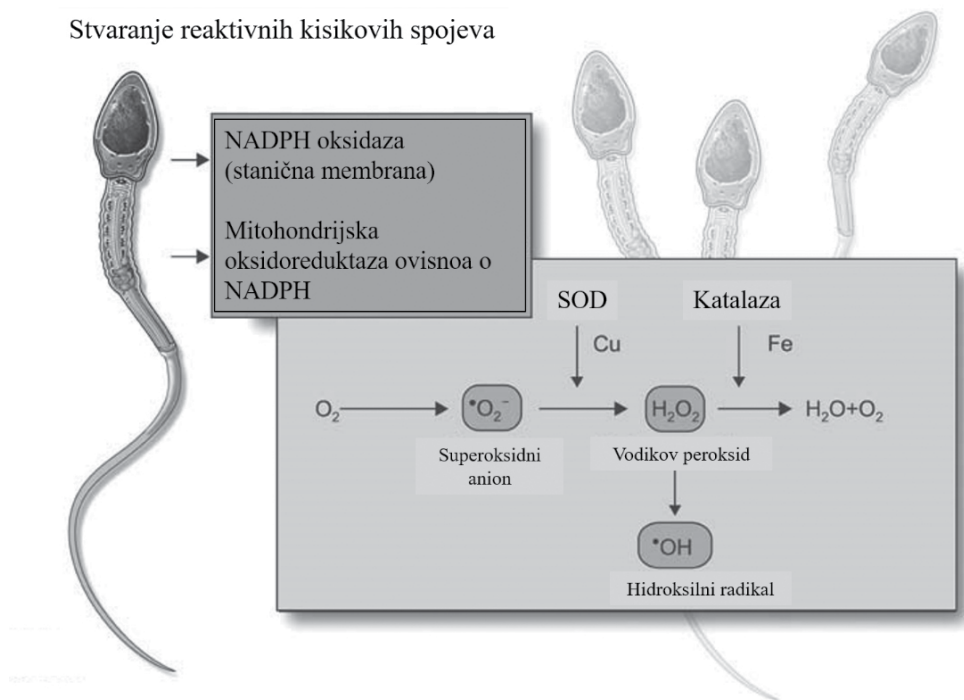
Intenzitet oksidacijskog stresa može se pratiti mjerenjem proizvoda oksidacije bioloških molekula i/ili određivanjem enzimskih i neenzimskih antioksidansa (Žura Žaja i sur., 2009., Poljsak i sur., 2013.). Malonilaldehid (engl. *malondialdehyde*; MDA) je najpoznatiji proizvod LPO čije se mjerenje koncentracije u tkivima koristi u određivanju intenziteta lipidne peroksidacije, odnosno oksidacijskog stresa (Žura Žaja, 2016.b). MDA je biološki vrlo aktivna molekula koja može prouzročiti znatna oštećenja bjelanjčevina i DNK-a s posljedičnim gubitkom stanične funkcije (Catalá, 2006., Žura Žaja, 2015.). Prekomjerno izlaganje spermija ROS-u povezano je s njihovom smanjenom gibljivošću, abnormalnom morfologijom te umanjanim kapacitetom za penetraciju oocite. Prema tome, antioksidacijska sposobnost spermija i okoliša u kojem su nastali i/ili su pohranjeni znatan su čimbenik u određivanju etiologije muške plodnosti i neplodnosti (Sikka, 2001., Aitken i Roman, 2008., Chabory i sur., 2010.).

## Antioksidacijski sustav

Antioksidansi su u muškom spolnom sustavu najznačajniji čimbenici u zaštiti protiv oksidacijskog stresa prouzročenog stvaranjem prekomjerne količine ROS-a, što može poremetiti spermatogenezu, steroidogenezu, funkciju



## Stvaranje reaktivnih kisikovih spojeva



**Slika 2.** Stvaranje reaktivnih kisikovih spojeva i antioksidacijska zaštita u muškom spolnom sustavu (preuzeto od Agarwal i sur., 2014.)

spermija i prouzročiti smanjenu plodnost, a i neplodnost (Aitken i Roman, 2008., Koziorowska-Gilun i sur., 2013.). Antioksidacijska zaštita spolnog sustava obuhvaća enzimski i neenzimski sustav koji djeluju interaktivno prekidajući oksidacijsku lančanu reakciju smanjujući pri tome oksidacijski stres (Vince i sur., 2018.). Primarni antioksidacijski enzimi uključeni u uklanjanje ROS-a u spermiji i različitim dijelovima muškog spolnog sustava su: superoksid dismutaza (engl. *superoxide dismutase*; SOD), glutation peroksidaza (engl. *glutathione peroxidase*; GSH-Px), katalaza (engl. *catalase*; CAT), ali i mnogi drugi enzimi poput sekundarnog antioksidacijskog enzima glutation reduktaze (engl. *glutathione reductase*; GSH-RD) i gama glutamil transferaze (engl. *gamma glutamyl transferase*; GGT), koji su povezani s mehanizmom

antioksidacijske zaštite (Koziorowska-Gilun i sur., 2013., Koziorowska-Gilun i sur., 2015., Žura Žaja, 2016.a., 2016.b., 2016.d.).

Prvu liniju zaštite od ROS-a čini metaloenzim SOD, koji katalizira dismutaciju superoksidnog radikala na molekulu kisika i  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Slika 2.). U testisima su prisutna tri izoenzima: citosolna, mitohondrijska i izvanstanična SOD, koje stvaraju Sertolijeve i zametne stanice testisa (Potts, 1999.). Enzimi GSH-Px i CAT kataliziraju istu reakciju, odnosno pretvorbu  $\text{H}_2\text{O}_2$  u vodu (Slika 2.). Iako je CAT enzim s velikom sposobnošću uklanjanja  $\text{H}_2\text{O}_2$ , smatra se da je GSH-Px ključni enzim u regulaciji i prevenciji oštećenja koja može prouzročiti  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Nadalje, GSH-Px može razložiti i organske hidroperokside, poput fosfolipidskih hidroperoksida, do

vođe ili alkohola, koristeći glutation kao reducens (Brigelius-Flohé i Maiorino, 2013., Koziarowska-Gilun i sur., 2013.). Osim navedenog, skupina GSH-Px enzima ima najznačajniju funkciju u zaštiti i očuvanja oplodne sposobnosti spermija tijekom njihovog stvaranja, sazrijevanja i pohrane u epididimisu (Chabory i sur., 2010., Žura Žaja i sur., 2016.b).

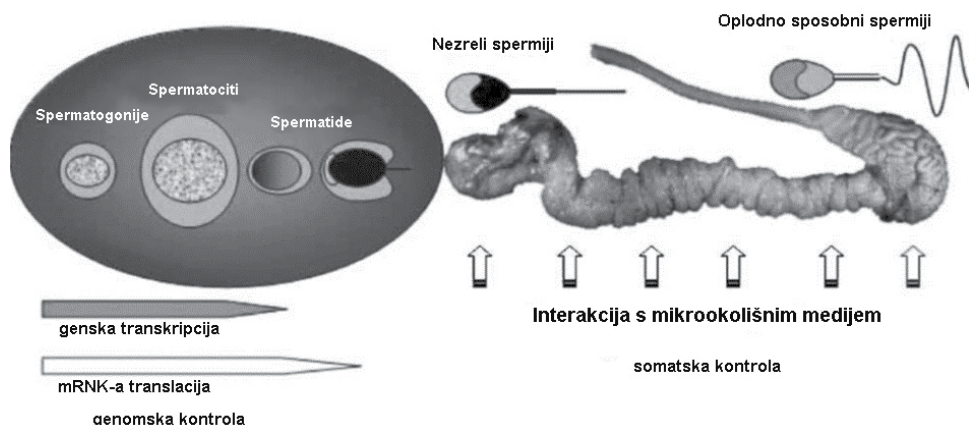
Neenzimska molekula glutation ima važnu funkciju u zaštiti stanica od oksidansa nastalih normalnim metabolizmom u stanici. GGT je uključen u metabolizam glutationa u prijenosu gama-glutamil funkcionalne skupine na različite akceptore, oslobađajući cistein kao proizvod za očuvanje unutarstanične homeostaze oksidacijskog stresa (Whitfield, 2001.). Na taj način GGT ima važnu funkciju u održavanju unutarstaničnog cisteina i glutationa. Enzim GSH-RD također sudjeluje u metabolizmu glutationa i to tako da obnavlja reducirani oblik glutationa iz njegovog oksidiranog oblika uz redukciju nikotinamid adenin dinukleotid fosfata (NADPH) u oksidirani oblik nikotinamidnog adenin dinukleotida (NADP<sup>+</sup>). Reducirani oblik glutationa je u

takvom obliku neophodan za primjereno funkcioniranje GSH-Px-a i niz drugih značajnih funkcija u kojima sudjeluje (Koziarowska-Gilun i sur., 2011.).

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

## Posttestikularni učinak na spermije i mikrookoliš epididimisa

Stvaranje muških gameta je rezultat opsežne stanične diferencijacije i preobrazbe okruglastih spermatida u izrazito polarizirane i gibljive stanice. Većina se složenih biokemijskih, fizioloških i morfoloških zbivanja stanične diferencijacije odvija u testisima tijekom procesa spermiogeneze i to uglavnom pod genomskom regulacijom gameta. Međutim, kada se DNK počne kondenzirati u izduženim spermatidama, proces transkripcije DNK-a u spermatogonijama se smanjuje, a zatim zaustavlja. U završnom



**Slika 3.** Shematski prikaz procesa tvorbe i kontrole muških gameta u testisima i epididimisima (preuzeto od Dacheux i sur., 2005.)

testikularnom stadiju diferencijacije muških gameta, spermiji koji nisu gibljivi pa stoga ni plodni, podvrgnuti su dodatnoj, diskretnoj i nužnoj postgonadnoj modifikaciji da bi postali sposobni oploditi jajnu stanicu. Smatra se da prisutnost specifičnog mikrookoliša spermija tijekom navedenih stadija modifikacije u epididimisu ima važnu funkciju u kontroli i indukciji završnih promjena stanične membrane spermija te njihovoj zaštiti (Dacheux i sur., 2005., Žura Žaja i sur., 2016.b).

Sazrijevanje spermija u epididimisu je izvan kontrole genoma spermatogonija pa je stoga u velikoj mjeri posljedica njihove interakcije s tekućinom epididimisa, uglavnom sa specifičnim bjelančevinama prisutnim u lumenu tubula epididimisa (Slika 5.). Sam proces sazrijevanja i prolaska spermija kroz epididimis u većine vrsta mužjaka traje od 12 do 14 dana. Specifični mikrookoliš epididimisa, koji je od krvotoka izoliran krvno-epididimisnom barijerom, štiti gamete do ejakulacije te utječe na regulaciju funkcije i integriteta epididimisa. U lumenu epididimisa spermiji se održavaju u vrlo specifičnom okolišu s optimalnom temperaturom, parcijalnim tlakom kisika, pH vrijednosti i uz prisutnost energetskih supstrata. Poznato je da u nedostatku supstrata za glikolizu, endogeni i egzogeni lipidi imaju znatnu funkciju u opskrbi spermija energijom za njihovu održivosti i gibljivost (Juyena i Stelletta, 2012., Žura Žaja i sur., 2016.b). Svi su navedeni uvjeti specifični za mikrookoliš epididimisa i bitni za sazrijevanje spermija, a narušavanjem bilo kojeg od njih može dovesti do poremećaja oplodne sposobnosti i očuvanja spermija (Dacheux i sur., 2005., Arrotéa i sur., 2012.). Razumijevanje posttestikularnih učinaka na spermije i mikrookoliš epididimisa važno je za utvrđivanje povoljnih biljega u procjeni plodnosti životinja, oplodne sposobnosti te očuvanja spermija.

Epididimisi imaju veliku sekretornu aktivnost, a iz tekućine koju izlučuju različita područja epididimisa prepoznato je nekoliko stotina bjelančevina. Uglavnom sve bjelančevine testisa koje dospiju u epididimis brzo se apsorbiraju u njegovom prvom dijelu. Sastav bjelančevina u lumenu epididimisa je uglavnom povezan sa specifičnom sekretornom aktivnošću koju karakterizira svako područje epididimisa (*caput*, *corpus* i *cauda*) u spolno zrelih jedinki (Thimon i sur., 2008.). Primjerice, u nerasta je utvrđeno više od 100 bjelančevina epididimisa (Syntin i sur., 1996.), a većina ih se izlučuje u njegovom prednjem dijelu. U nerasta se 6 do 8 puta više bjelančevina izlučuje u prednjem dijelu u odnosu na repni dio; glava (*caput*) izlučuje približno 83%, tijelo (*corpus*) izlučuje približno 16%, a rep (*cauda*) izlučuje svega 1% bjelančevina. Primjerice, prednji dio epididimisa (*caput*) karakteriziran je između ostalih bjelančevina sintezom i sekrecijom enzima glutation peroksidaze, koji je važan u zaštiti spermija od oksidacijskih oštećenja (Dacheux i sur., 2005., Žura Žaja, 2016.b).

Uspostava sekrecije bjelančevina u pojedinim dijelovima epididimisa zbiva se progresivno tijekom postnatalnog razvoja i prije puberteta, sukladno razvoju testisa. Laydigove stanice testisa izlučuju testosteron i estrogen koji se stvaraju iz kolesterola uz prisustvo specifičnih enzima. Spolni hormoni su važni endogeni čimbenici koji pozitivno utječu na stvaranje i aktivnost antioksidansa, a samim time i na smanjenje oksidacijskog stresa (Raeside i Renaud, 1983., Aitken i Roman, 2008., Zduńczyk i sur., 2011.). Androgeni hormoni kontroliraju približno polovicu bjelančevina koju sintetiziraju epididimisi s pozitivnim ili negativnim učinkom. Preostalih su 43% bjelančevina modulirane lokalnim čimbenicima, a svega 6% bjelančevina nije pod sustavnom, a ni pod lokalnom



kontrolom. Prvi dio epididimisa kontroliraju čimbenici iz tekućine koju izlučuju testisi (Syntin i sur., 1999.). Ostale specifične bjelančevine prednjeg dijela epididimisa, kao što su GSH-Px i heksozaminidaza, pozitivno su regulirane testosteronom, ali s vrlo različitim razinama osjetljivosti (Thimon i sur., 2008.).

Nakon što spermiji dopiju u epididimise, tijekom procesa sazrijevanja, stanična membrana spermija se znatno preoblikuje, odnosno mijenja se sastav i lokalizacija bjelančevina i lipida (kolesterola i fosfolipida) u njihovim membranama. Zbog ove promjene u staničnim membranama spermija zastupljenost fosfolipida se smanjuje, a kolesterola povećava, odnosno molarni omjer kolesterola i fosfolipida postaje dvostruko veći (Nikolopoulou i sur., 1985., Beer-Ljubić i sur., 2009., Žura Žaja i sur., 2016.b). Budući da nije topljiv u vodi, kolesterol se iz lumena epididimisa na membranu spermija prenosi specifičnom bjelančevinom. Bjelančevine epididimisa mijenjaju svojstva membrana spermija tako što vrše izmjenu bjelančevina ili lipida iz njihovog mikrookoliša ili izmjenom položaja prisutnih bjelančevina u membrani. Bjelančevine koje sudjeluju u navedenim procesima imaju prijenosnu, odnosno vezujuću funkciju. Površina membrane spermija može se mijenjati i enzimskom aktivnošću nekolicine značajnih bjelančevina iz epididimise tekućine, a obuhvaćaju enzime poput glikozidaza, fosfataza i proteaza. Primjerice, kisela je fosfataza (engl. *acid phosphatase*; ACP) u epididimisu uključena u post testikularne procese sazrijevanja spermija, tj. u fosforilacijsko-defosforilacijske procese te se nalazi u staničnim membranama spermija (Soucek i Vary, 1984., Wysocki i Strzezek, 2006.). Neki enzimi, odnosno bjelančevine epididimisa odgovorne su za procese u kojima negibljivi spermiji postaju gibljivi, a navedene procese

prate i promjene metaboličkih procesa kojima se osigurava energija za gibanje spermija (Žura Žaja i sur., 2016.e). Laktat dehidrogenaza (engl. *lactate dehydrogenase*; LDH) je enzim značajan u metaboličkim procesima koji osiguravaju energiju za preživljavanje i gibljivost spermija (Beu i sur., 2007.). Aktivnost navedenih enzima u tekućini epididimisa je neobično velika, najveća u odnosu na ostale tjelesne tekućine (Dacheux i sur., 2005., Žura Žaja i sur., 2016.b).

U svih do danas istraživanih vrsta, uključujući i neraste, čini se da specifične testikularne površinske bjelančevine spermija bivaju uklonjene ili podvrgnute daljnjoj obradi tijekom prolaska spermija kroz epididimise. Nestanak nekih bjelančevina povezan je sa specifičnim mehanizmom proteolize, koja inducira molekularnu preraspodjelu membrane ili otpuštanje odcepljene bjelančevine u lumen epididimisa. Povezanost sazrijevanja membrane spermija i fizioloških promjena koje se zbivaju u spermijima nisu u potpunosti razjašnjene. Prisutnost ili odsutnost definiranih antigena često je u korelaciji sa svojstvima spermija, kao što su prepoznavanje i vezanje spermija za zona pellucidu i membranu oocita ili početak gibanja spermija. Međutim, stvarni molekularni mehanizmi koji uzrokuju "sazrijevanje spermija" nisu do danas u potpunosti ustvrđeni (Dacheux i sur., 2005., Arrotéa i sur., 2012., Noblanc i sur., 2012.).

## Zaključna razmatranja

Tijekom prolaska kroz epididimise spermiji su podvrgnuti stalnoj promjeni mikrookoliša u lumenu, koji je modificiran zbog sekrecijskih i endocitotičkih aktivnosti stanica sluznice epitela. U konačnici, usklađena aktivnost u sekreciji različitih tvari kao i endocitozi u epitelnim stanicama duž kanala, utječe na konačno sazrijevanje spermija, njihovu koncentraciju, zaštitu, pohranu i oplodnu

sposobnost. Navedene uzastopne promjene prati i promjena osobitosti spermija tijekom njihovog prolaska kroz epididimis, a osobito promjene u svojstvima njihovih membrana. No, mijenja se i sastav bjelančevina, lipida i ostalih tvari u različitim dijelovima epididimisa, koje sudjeluju u procesima sazrijevanja spermija, a čije funkcije nisu u potpunosti razjašnjene. Međutim, ni sposobnost testisa i epididimisa da štite spermije od štetnih učinka oksidacijskih procesa koji se zbivaju tijekom njihove tvorbe, pohrane i sazrijevanja u epididimisima pomoću lokalno sintetiziranih antioksidansa, nije do sada dostatno istražena.

## Literatura

1. AGARWAL, A., G. VIRK, C. ONG and S. S. DU PLESSI (2014): Effect of Oxidative Stress on Male Reproduction. *World J. Mens Health* 32, 1-17. doi. org/10.5534/wjmh.2014.32.1.1
2. AITKEN, R. J. and D. SAWYER (2003): The human spermatozoon - not waving but drowning. *Adv. Exp. Med. Biol.* 518, 85-98.
3. AITKEN, R. J. and S. D. ROMAN (2008): Antioxidant systems and oxidative stress in the testes. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 1, 15-24.
4. AITKEN, R. J., K. WEST and D. W. BUCKINGHAM (1994): Leukocytic infiltration into the human ejaculate and its association with semen quality, oxidative stress and sperm function. *J. Androl.* 15, 343-352.
5. ALVAREZ, J. G., J. C. TOUCHSTONE, L. BLASCO and B. T. STOREY (1987): Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa. Superoxide dismutase as major enzyme protectant against oxygen toxicity. *J. Androl.* 8, 338-348.
6. ARROTÉIA, K. F., P. V. GARCIA, M. F. BARBIERI, M. L. JUSTINO and L. A. V. PEREIRA (2012): The Epididymis: Embryology, Structure, Function and Its Role in Fertilization and Infertility, Embryology - Updates and Highlights on Classic Topics, Prof. Luis Violin Pereira (Ed.), ISBN: 978- 953-51-0465-0, InTech, Available from: <http://www.intechopen.com/books/embryology-updates-and-highlights-on-classic-topics/the-epididymis-embryology-structure-function-and-its-role-in-fertilization-and-infertility>.
7. BANSAL A. K. and G. S. BILASPURI (2011): Impacts of Oxidative Stress and Antioxidants on Semen Functions. *Vet. Med. Int.* Article ID 686137, 7 pages doi:10.4061/2011/686137
8. 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.
9. BEU, C. C. L., A. M. ORSI, R. F. DOMENICONI and E. L. B. NOVELLI (2007): Localization of total proteins and lactate dehydrogenase in hamster epididymis. *Int. J. Morphol.* 25, 259-264.
10. BRIGELIUS-FLOHÉ, R. and M. MAIORINO (2013): Glutathione peroxidases, *Biochim. Biophys. Acta* 1830, 3289-3303.
11. CATALÁ, A. (2006): An overview of lipid peroxidation with emphasis in outer segments of photoreceptors and the chemiluminescence assay. *Int. J. Biochem. Cell B.* 38, 1482-1495.
12. CATALÁ, A. (2009): Lipid peroxidation of membrane phospholipids generates hydroxyalkenals and oxidized phospholipids active in physiological and/or pathological conditions. *Chem. Phys. Lipids* 157, 1-11.
13. CHABORY, E., C. DAMON, A. LENOIR, J. HENRY-BERGER, P. VERNET, R. CADET, F. SAEZ and J. R. DREVET (2010): Mammalian glutathione peroxidases control acquisition and maintenance of spermatozoa integrity. *J. Anim. Sci.* 88, 1321-1331.
14. CUMMINS, J. M., A. M. JEQUIER and K. RAYMOND (1994): Molecular biology of human male infertility: Links with aging, mitochondrial genetics and oxidative stress. *Mol. Rep. Dev.* 37, 345-362.
15. DACHEUX, J.-L., S. CASTELLA, J. L. GATTI and F. DACHEUX (2005): Epididymal cell secretory activities and the role of proteins in boar sperm maturation. *Theriogenology* 63, 319-341.
16. DAVIES, M. J. (2003): Singlet oxygen-mediated damage to proteins and its consequences. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 305, 761-770.
17. De LAMIRANDE, E. and C. GAGNON (1993): A positive role for the superoxide anion in triggering hyperactivation and capacitation of human spermatozoa. *Int. J. Androl.* 16, 21-25.
18. GIROTTI, A. W. (1998): Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. *J. Lipid Res.* 39, 1529-1542.
19. GUÉRAUD, F., M. ATALAY, N. BRESGEN, A. CIPAK, P. M. ECKL, L. HUC, I. JOUANIN, W. SIEMS and K. UCHIDA (2010): Chemistry and biochemistry of lipid peroxidation products. *Free Radical Res.* 44, 1098-1124.
20. HALES, D. B., J. ALLEN, T. SHANKARA, P. JANUS, S. BUCK, T. DIEMER and K. HELD HALES (2005): Mitochondrial function in Leydig cell steroidogenesis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1061, 120-134.
21. JUYENA, N. S. and C. STELLETTA (2012): Seminal plasma: an essential attribute to spermatozoa. *J. Androl.* 33, 536-551.
22. KEMAL DURU, N., M. MORSHEDI and S. OEHNINGER (2000): Effects of hydrogen peroxide on DNA and plasma membrane integrity of human spermatozoa. *Fertil. Steril.* 74, 1200-1207.

23. KOZIOROWSKA-GILUN, M., L. FRASERA, P. GILUN, M. KOZIOROWSKI and W. KORDANA (2015): Activity of antioxidant enzymes and their mRNA expression in different reproductive tract tissues of the male roe deer (*Capreolus capreolus*) during the pre-rut and rut seasons. *Small Rumin. Res.* 129, 97-103.
24. KOZIOROWSKA-GILUN, M., M. KOZIOROWSKI, L. FRASER and J. STRZEZEK (2011): Antioxidant Defence System of Boar Cauda Epididymidal Spermatozoa and Reproductive Tract Fluids. *Reprod. Domest. Anim.* 46, 527-533.
25. KOZIOROWSKA-GILUN, M., P. GILUN, L. FRASER, M. KOZIOROWSKI, W. KORDAN and S. STEFANCZYK-KRZYMOWSKA (2013): Antioxidant Enzyme Activity and mRNA Expression in Reproductive Tract of Adult Male European Bison (*Bison bonasus*, Linnaeus 1758). *Reprod. Domest. Anim.* 48, 7-14.
26. LJUBIČIĆ, I., L. RADIN, I. ŽURA ŽAJA, J. PEJAKOVIĆ HLEDE i S. MILINKOVIĆ-TUR (2013): Free radicals, oxidative stress and parasitic diseases. *Vet. stn.* 44, 285-297. (in Croatian).
27. NIKOLOPOULOU, M., D. A. SOUCEK and J. C. VARY (1985): Changes in the lipid content of boar sperm plasma membranes during epididymal maturation. *Biochim. Biophys. Acta* 815, 486-498.
28. NOBLANC, A., A. KOCER and J. R. DREVET (2012): Post-testicular protection of male gametes from oxidative damage. The role of the epididymis. *Med. Sci.* 28, 519-525.
29. OGBUEWU, I. P., N. O. ALADI, I. F. ETUK, M. N. OPARA, M. C. UCHEGBU, I. C. OKOLI and M. U. ILOEJE (2010): Relevance of oxygen free radicals and antioxidants in sperm production and function. *Res. J. Vet. Sci.* 3, 138-164.
30. POLJSKAK, B., D. ŠUPUT and I. MILISAV (2013): Achieving the balance between ROS and antioxidants: when to use the synthetic antioxidants. *Oxid. Med. Cell Longev.* Article ID 956792, 11 pages. doi:10.1155/2013/956792
31. POTTS, R. J., T. M. JEFFERIES and L. J. NOTARIANNI (1999): Antioxidant capacity of the epididymis. *Hum. Reprod.* 14, 2513-2516.
32. RAESIDE, J. I. and R. L. RENAUD (1983): Estrogen and androgen production by purified leydig cells of mature boars. *Biol. Reprod.* 28, 727-733.
33. RAHAL, A., A. KUMAR, V. SINGH, B. YADAV, R. TIWARI, S. CHAKRABORTY and K. DHAMA (2014): Oxidative Stress, Prooxidants, and Antioxidants: The Interplay. *Biomed. Res. Int.* Article ID 761264, 19 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2014/761264>
34. SANOCKA, D. and M. KURPISZ (2004): Reactive oxygen species and sperm cells. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2, 1-7.
35. SIKKA, S. C. (2001): Relative impact of oxidative stress on male reproductive function. *Curr. Med. Chem.* 8, 851-862.
36. SOUCEK, D. A. and J. C. VARY (1984): Some properties of acid and alkaline phosphatases from boar sperm plasma membranes. *Biol. Reprod.* 31, 687-693.
37. SYNTIN, P., F. DACHEUX, X. DRUART, J. L. GATTI, N. OKAMURA and J. L. DACHEUX (1996): Characterization and identification of proteins secreted in the various regions of the adult boar epididymis. *Biol. Reprod.* 55, 956-974.
38. SYNTIN, P., J. L. DACHEUX and F. DACHEUX (1999): Postnatal development and regulation of proteins secreted in the boar epididymis. *Biol. Reprod.* 61, 1622-1635.
39. ŠTEFAN, L., T. TEPŠIĆ, T. ZAVIDIĆ, M. URUKALO, D. TOTA i R. DOMITROVIĆ (2007): Lipidna peroksidacija - uzroci i posljedice. *Medicina* 43, 84-93.
40. THIMON, V., G. FRENETTE, F. SAEZ, M. THABET and R. SULLIVAN (2008): Protein composition of human epididymosomes collected during surgical vasectomy reversal: a proteomic and genomic approach. *Hum. Reprod.* 23, 1698-1707.
41. VERNET, P., R. J. AITKEN and J. R. DREVET (2004): Antioxidant strategies in the epididymis. *Mol. Cell Endocrinol.* 216, 31-39.
42. VINCE, S., I. ŽURA ŽAJA, M. SAMARDŽIJA, I. MAJIĆ BALIĆ, M. VILIĆ, D. ĐURIČIĆ, H. VALPOTIĆ, F. MARKOVIĆ and S. MILINKOVIĆ-TUR (2018): Age-related differences of semen quality, seminal plasma, and spermatozoa antioxidative and oxidative stress variables in bulls during cold and warm periods of the year. *Animal* 12, 559-568.
43. WAGNER, B. A., G. R. BUETTNER and C. P. BURNS (1994): Free radical mediated lipid peroxidation in cells: Oxidizability is a function of cell lipid bis-allylic hydrogen content. *Biochemistry* 33, 4449-4453.
44. WHITFIELD, J. B. (2001): Gamma glutamyl transferase. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 38, 263-355.
45. 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.
46. ZDUŃCZYK, S., T. JANOWSKI, A. RAŚ and W. BARAŃSKI (2011): Concentrations of oestrogens in blood plasma and seminal plasma of boars during the postpuberal period. *Pol. J. Vet. Sci.* 14, 539-544.
47. ŽURA ŽAJA, I., I. MAJIĆ-BALIĆ, B. BEER LJUBIĆ, J. ALADROVIĆ i S. MILINKOVIĆ-TUR (2009): Mokračna kiselina i albumini kao neenzimski antioksidansi u sjemenoj plazmi bikova. *Zbornik sažetaka radova, Veterinarska znanost i struka, Znanstveno-stručni sastanak, 1. i 2. listopada, Zagreb, Hrvatska, str.* 104-105.
48. ŽURA ŽAJA, I. (2015): Pokazatelji antioksidacijskoga sustava u sjemenoj plazmi i spermijima rasplodnih nerasta različitih pasmina. *Disertacija. Veterinarski fakultet Sveučilište u Zagrebu.* (in Croatian).
49. ŽURA ŽAJA, I., M. SAMARDŽIJA, S. VINCE, M. VILIĆ, I. MAJIĆ-BALIĆ, D. ĐURIČIĆ and S. MILINKOVIĆ-TUR (2016a): 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.
50. 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 (2016b): Antioxidant protection and lipid peroxidation in testes and different parts of epididymis in boars. *Theriogenology* 86, 2194-2201.
51. ŽURA ŽAJA, I., M. SAMARDŽIJA, S. VINCE, I. LJUBIČIĆ, L. RADIN, J. PEJAKOVIĆ HLEDE, D. ĐURIČIĆ, H. VALPOTIĆ, N. ROŠIĆ i S. MILINKOVIĆ-TUR (2016c): Positive and negative effects of reactive oxygen species on the fertilization ability of spermatozoa. *Vet. stn.* 47, 161-173. (in Croatian).
52. ŽURA ŽAJA, I., M. SAMARDŽIJA, S. VINCE, I. MAJIĆ-BALIĆ, D. ĐURIČIĆ and S. MILINKOVIĆ-TUR (2016d): Antioxidant system parameters in boar spermatozoa of different morphology and motility. *Vet. arhiv* 86, 655-666.
53. ŽURA ŽAJA, I., M. SAMARDŽIJA, S. VINCE, I. MAJIĆ-BALIĆ, M. VILIĆ, D. ĐURIČIĆ and S. MILINKOVIĆ-TUR (2016e): Influence of boar breeds or hybrid genetic composition on semen quality and seminal plasma biochemical variables. *Anim. Reprod. Sci.* 164, 169-176.

## The effects of oxidative stress on the male reproductive system and mechanisms of antioxidant protection

Ivona ŽURA ŽAJA, DVM, PhD, Assistant Professor, Faculty of Veterinary Medicine, University of Zagreb, Croatia; Anamaria SLUGANOVIĆ, DVM; Marko SAMARDŽIJA, DVM, PhD, Full Professor, Suzana MILINKOVIĆ-TUR, DVM, PhD, Full Professor, Tomislav DOBRANIĆ, DVM, PhD, Full Professor, Faculty of Veterinary Medicine University of Zagreb, Croatia; Sara STRELEC, DVM; Hrvoje VALPOTIĆ, DVM, PhD, Assistant Professor, Silvijo VINCE, DVM, PhD, Associate Professor, Faculty of Veterinary Medicine, University of Zagreb, Croatia; Dražen ĐURIČIĆ, DVM, PhD, Assistant Professor, Veterinary Practice Đurđevac, Đurđevac, Croatia

To maintain the physiological processes of spermatogenesis and steroidogenesis in the testes and favourable micro-environmental conditions in epididymis tissues during maturation, transport and storage of spermatozoa, it is crucial that the antioxidative enzymes act properly to control physiological levels of reactive oxygen species (ROS). The state of oxidative stress, caused by disruption of the balance between oxidants (ROS, etc.) and prooxidants (antioxidants) in favour of oxidants, can result in impairment of spermatogenesis and steroidogenesis. The tissues of the testes and epididymis, containing spermatozoa of varying degrees of maturity, are susceptible to lipid peroxidation, *i.e.* to oxidative stress. Altered function of the testes may be reflected in the ability to create motile, viable and morphologically normal spermatozoa that have the ability to fertilize the egg and sustain growth and development of the embryo. High activities of antioxidative enzymes in the testes of boars are essential for appropriate protection of spermatozoa and cells of testicular tissue against oxidative damage. Further, acquisition of spermatozoa motility and fertile capability during transport through the epididymis is associated with a series of biochemical changes, particularly in the characteristics of

their cell membranes. During passage through the epididymis, the spermatozoa undergo fluctuations in the microenvironment of the lumen, which is modified due to the secretion and endocytotic activity of the epithelial mucosa cells. Ultimately, synchronized activity in the secretion of various substances and endocytosis in epithelial cells along the epididymal channels affects the final maturation of the spermatozoa, their concentration, protection, storage, and fertilizing ability. These consecutive changes are followed by changes in the features of the spermatozoa during their passage through the epididymis, and in particular changes in the membrane properties. However, the composition of proteins, lipids and other substances in various parts of the epididymis involved in the processes of spermatozoa maturation, whose functions are not yet fully clarified, are also altered. The ability of the testes and epididymis to protect spermatozoa from the detrimental effects of oxidation processes occurring during their formation, storage, and maturation in the epididymis by locally synthesized antioxidants has not yet been studied in detail.

**Key words:** *antioxidative protection; oxidative stress; lipid peroxidation; testes; epididymis; spermatozoa*