

UNIVERZITET U BEOGRADU
FAKULTET VETERINARSKE MEDICINE
KATEDRA ZA PORODILJSTVO, STERILITET I V.O.
DOMAĆIH ŽIVOTINJA

Mr Goran R. Jakovljević

UTICAJ TEŠKIH METALA IZ HRANE I
VODE NA KVALITET DUBOKO
ZAMRZNUTOG SEMENA BIKA

Doktorska disertacija

Beograd, 2016.

**UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE
DEPARTMENT OF OBSTETRICS, STERILITY AND AI OF
DOMESTIC ANIMALS**

Mr Goran R. Jakovljevic

**THE INFLUENCE OF HEAVY METALS
FROM FEED AND WATER ON DEEP
FROZEN BULL'S SEMEN QUALITY**

Doctoral disertation

Belgrade, 2016.

MENTOR:

Dr Slobodanka Vakanjac, vanredni profesor,
Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu

ČLANOVI KOMISIJE:

1. Dr Dragan Šefer, redovni profesor,
Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu

2. Dr Miodrag Lazarević, redovni profesor,
Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu

3. Dr Vojislav Pavlović, redovni profesor u penziji,
Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu

4. Dr Aleksandar Milovanović, naučni saradnik,
Institut za veterinarstvo, Novi Sad.

Datum odbrane

Beograd

Zahvalnost

Na kraju jedne od najvažnijih i najozbiljnijih deonica u mom školovanju, želeo bih da se zahvalim dragim ljudima koji su mi svojom nesputanom voljom, željom i savetima pomogli da je završim.

Zahvaljujem se kao đak, kolega i prijatelj mojim mentorima:

- **Prof. dr Slobodanki Vakanjac** na bezgraničnoj toleranciji, strpljenju, posvećenosti i vremenu koje je posvetila meni, na savetima, podršci i kada nije sve išlo kako treba. Naš zajednički rad ostaće u najlepšem sećanju i biti podstrek za nove ciljeve i još bolju saradnju.
- **Prof. dr Miodragu Lazareviću**, kao dugogodišnjem saradniku, kolegi i profesoru na dobronamernoj i stručnoj pomoći i savetima tokom izrade ove disertacije. Nadam se i radujem našoj još uspešnijoj saradnji u budućnosti.
- **Prof. Dr Draganu Šeferu** i Katedri za ishranu Fakulteta veterinarske medicine i **Dr Aleksandru Milovanoviću** i Odeljenju za reprodukciju Naučnog instituta za vererinarstvo Novi Sad, na stručnoj pomoći i savetima tokom analiza i obrade dobijenih rezultata uzoraka tokom izrade disertacije.
- **Prof. Dr Vojislavu Pavloviću**, kao glavnom inicijatoru i motoru izrade disertacije, koji je verovao u mene i bio tu uvek kada zatreba. Profo, hvala Vam.
- **Prof. Dr Miloradu Miriloviću** koji je kao izuzetan kolega, pored svih obaveza, našao vremena da svojim savetima i statističkom obradom podataka doprinese da disertacija dobije svoj konačni oblik.

Veliku zahvalnost dugujem Naučnom institutu za reprodukciju i veštačko osemenjavanje Temerin, Greenlab-u i BVN Neustadt a.d. Aisch, Nemačka na čelu sa Dr Klausom Lajdingom, koji su omogućili prikupljanje materijala i uzoraka za ovu disertaciju i prijateljskom i kolegijalnom odnosu. Osim toga, zahvaljujem se i matičnoj kompaniji, Stočarsko veterinarskom centru Velika Plana kao i svim zaposlenima na razumevanju i pomoći.

Takođe se zahvaljujem dr Milovanu Jovičinu, vet. spec. Lazaru Subotinu i dipl. ing. Svetislavu Radmiloviću, mom kumu, koji su me od mog prvog radnog dana bodrili, podržavali i sve vreme sugerisali da istrajem do izrade disertacije.

Želeo bih da se zahvalim i svim prijateljima, rođacima i kolegama koji su verovali u mene i podržavali me.

Najveća zahvalnost pripada mojoj porodici, **supruzi Vesni** i mojim zvezdama vodiljama, **ćerki Ivoni** i **sinu Marku** kojima posvećujem ovaj doktorat.

UTICAJ TEŠKIH METALA IZ HRANE I VODE NA KVALITET DUBOKO ZAMRZNUTOG SEMENA BIKA

Rezime

Mineralne materije su neophodne za odvijanje bioloških funkcija i izgradnju tkiva biljaka, životinja i ljudi. Do sada je u živoj prirodi otkriveno ukupno 89 hemijskih elemenata, od koji su 27 esencijalni, a 16 ima značajnu ulogu u normalnim fiziološkim funkcijama organizma. Prirodni faktori životne sredine kao i različiti antropogeni zagađivači, utiču na funkcije reproduktivnog trakta i na kvalitet sperme životinja i ljudi. Termin „metali u tragovima“ podrazumeva koncentraciju u tkivima nižu od koncentracije gvožđa. Toksično dejstvo teških metala se zasniva na stimulaciji formiranja slobodnih radikala i reaktivnih kiseoničnih vrsta u organizmu što uzrokuje oksidativni stres i dovodi do lipidne peroksidacije membrane. Na taj način, oni mogu da izazovu oštećenja ćelija, poremećaje funkcija enzima ili genetskog materijala (DNK). U organizam se unose hranom, vodom ili dospevaju preko vazduha. Teški metali koji su toksični za spermu su Pb, Cd, Hg i Ni. Najmanje količine ovih elemenata oštećuju spermatozoide i dovode do smanjenja njihove pokretljivosti i broja. Oni negativno utiču na proces kapacitacije i akrozomsku reakciju, smanjuju aktivnost enzima koji učestvuju u odbrani od oksidativnog stresa i dovode do promena u tkivu testisa. Cilj naših istraživanja je bio određivanje koncentracija cinka, olova, žive i kadmijuma u hrani i vodi za priplodne bikove, vodi korišćenoj za izradu razređivača kao i u sadržaju otopljenih pajeta i analiza njihovog mogućeg uticaja na parametre kvaliteta sperme.

Koncentracija spermatozoida i broj spermatozoida po dozi su bili u zadovoljavajućem opsegu kao i prosečne vrednosti procenta ukupno pokretljivih spermatozoida, ukupnog broja pokretljivih spermatozoida u dozi, procenta i broja progresivno pokretljivih spermatozoida i između grupa bikova nisu dokazane statistički značajne razlike u srednjim vrednostima. Prosečan broj brzih spermatozoida u dozi je bio manji u odnosu na standardne vrednosti u svim grupama bikova. Srednje prosečne vrednosti procenta živih spermatozoida u dozi, živih spermatozoida sa inaktnim akrozomom, ukupnog broja oštećenih ćelija u dozi, spermatozoida sa protoplazmatskom kapljicom, primarno i sekundarno abnormalnih formi ćelija i ukupno patološki promenjenih spermatozoida su bile u prihvatljivim granicama. Između grupa bikova nisu dokazane statistički značajne razlike u srednjim vrednostima. Prosečne vrednosti procenta živih spermatozoida sa oštećenim akrozomom su takođe bile u prihvatljivom opsegu, ali su između pojedinih grupa bikova utvrđene statistički značajne razlike u srednjim vrednostima. Srednje vrednosti procenta spermatozoida sa neoštećenim hromatinom su bile nešto niže, a sa oštećenim hromatinom nešto više u odnosu na utvrđene standardne vrednosti. Između pojedinih grupa su utvrđene statistički značajne razlike u srednjim vrednostima. Prosečne vrednosti procenta živih spermatozoida u dozi i procenta živih spermatozoida sa intaktnim akrozomom su bile zadovoljavajuće u grupama B i D, a značajno manje u grupama A i C. Procenat mrtvih spermatozoida sa intaktnim akrozomom u dozi je bio zadovoljavajući,

ali su između pojedinih grupa utvrđene statistički značajne razlike u srednjim vrednostima. Procenat mrtvih spermatozoida sa oštećenim akrozomom u dozi i ukupan broj ćelija sa oštećenim akrozomom je bio zadovoljavajući u grupama, B, C i D, a značajno veći u grupi A. Procenat spermatozoida sa neoštećenim ili oštećenim membranama je bio zadovoljavajući, a između pojedinih grupa nisu utvrđene statistički značajne razlike u srednjim vrednostima. Srednje vrednosti krivolinijske brzine spermatozoida su bile u poželjnim granicama ali su pravolinijska brzina i prosečna brzina bile značajno manje u grupama A, B i C u odnosu na grupu D. Vrednosti za amplitudu lateralnog odklona se nisu značajno razlikovale između grupa i skladu su sa navodima iz literature. Srednje vrednosti indeksa lineranosti su bile niske u svim grupama dok je indeks oscilacije bio zadovoljavajući, a između pojedinih grupa su utvrđene statistički značajne razlike u srednjim vrednostima. Srednje vrednosti pravolinijskog indeksa, frekvence prelazaka pravolinijske putanje i ćelija koje se kreću manježno su bile u dozvoljenim granicama i bez statistički značajnih razlika.

Koncentracija cinka u senu je bila u opsegu od 12 mg/kg do 17 mg/kg, a u koncentrovanj hrani se kretala od 50 mg/kg do 84 mg/kg, što je znatno niže od koncentracija koje dozvoljavaju NRC, Pravilnik o kvalitetu hrane za životinje i Evropski pravilnik EC2002/32.

Koncentracija cinka u vodi za piće se kretala u opsegu od 0,03 mg/L do 0,74 mg/L dok je koncentracija žive u svim ispitivanim grupama bila približno ista (<0,001 mg/L). Koncentracija olova je iznosila 0,012 - 0,022 mg/L, a kadmijuma 0,0010 - 0,0014 mg/L što je u skladu su propisanim granicama.

Koncentracije cinka, žive, olova i kadmijuma u vodi koja je korišćena za pravljenje razređivača za seme, su bile približno iste u svim ispitivanim grupama i bile su ispod donje granice osetljivosti metode (<0,001 mg/L).

Koncentracija cinka u semenu bikova simentalke rase je u našim ispitivanjima bila u opsegu od $3,15 \pm 2,74$ do $6,44 \pm 0,57$ mg/kg, žive od $0,03 \pm 0,01$ do $0,07 \pm 0,01$ mg/kg i olova od $0,02 \pm 0,005$ mg/kg do $0,07 \pm 0,017$ mg/kg. Koncentracija kadmijuma je u ispitivanim uzorcima bila ispod nivoa detekcije metode (< 0,001 mg/kg).

Skoro svi ispitivani parametri kvaliteta semena su u bili u opsegu vrednosti karakterističnih za vrstu a korelacionom analizom nije utvrđena njihova povezanost sa sadržajem teških metala u hranivima i semenu pripremljenon za VO.

Ključne reči: bikovi, cink, hraniva, kadmijum, kvalitet semena, olovo, živa, voda.

Naučna oblast: Veterinarska medicina

Uža naučna oblast: Ginekologija sa andrologijom

UDC: 636.2/085.1:546.47/49+81:618

THE INFLUENCE OF HEAVY METALS FROM FEED AND WATER ON DEEP FROZEN BULL'S SEMEN QUALITY

Summary

Minerals are necessary for maintaining biological functions and also are incorporated in plants, animals and human tissues. So far, presence of 89 chemical elements is documented in live organisms, and out of it, 27 are essential, while 16 plays significant role in normal physiological functions. Environmental factors and also antropogenic pollutants influence functions of the reproductive tract and quality of the human and animals semen. Term „trace elements“ is used for those with lower concentration than the iron has. Toxic effects of so called „heavy metals“, are based on their ability to stimulate free radicals and reactive oxygen species formation in the body. This leads to oxidative stress and membrane lipid peroxidation. By this mechanism, they can cause cells damage, enzyme dysfunction and DNK damage. These elements may reach live organisms by food, water and air. Toxic heavy metals are: Pb, Cd, Hg and Ni. Vary small amounts of these metals in ejaculates can damage sperm cells lower their number and motility. They also exert negative effects on the capacitation process and acrosomal reaction, decrease activity of enzymes involved in anti-oxidative defense causing changes in testicular tissue. The aim of our investigations was to determine concentrations of zinc, lead, mercury and cadmium in feed and water for breeding bulls, water used for extender preparation and in the content of thawed straws and to analyse their possible influence on the semen quality parametrs. In the all examined samples of feed and water, concentrations of heavy metals were below the acceptable levels, as regulated by appropriate adapted roles and regulations.

Sperm concentration and number of sperm cells in a dose were in the satisfactory range as were mean values of the total motile sperm cells, total number of motile cells in a dose and percent and number of cells showing progressive motility. Between groups no statistically significant differences were noted. Mean number of the fast sperm cells was lower in comparison with standard values in all tested groups. Mean values of the percentage of live sperm cells, live cells with intact acrosome, total number of damaged cells per dose, sperm cells with protoplasmic droplet, cells with primary and secondary abnormal forms and total number of pathologically changed spermatozoa were within the acceptable limits. Between groups no statistically significant differences were noted. Mean values of live sperm cells with damaged acrosomes were also in acceptable range but between groups we were able to note statistically significant differences. Mean percentage of the sperm cells with intact chromatin were lower and, with damaged chromatin, were higher in comparison to standard values. We were able to note statistically significant differences between groups. Mean percentage of the live sperm cells in a dose and percentage of live cells with intact

acrosome were satisfactory in groups B and D but significantly lower in groups A i C. Percentage of dead sperm cells with intact acrosome in a dose was also satisfactory and we were able to note statistically significant differences between groups. Percentage of dead sperm cells with damaged acrosomes in a dose and total number of cells with damaged acrosomes was satisfactory in groups B, C and D, but significantly higher in a group A. Percentage of sperm cells with intact or damaged membranes was satisfactory and between groups no statistically significant differences were noted. Mean values of the curvilinear velocity were within the acceptable range but straight-line velocity and average path velocity were lower in groups A, B i C in comparison to the group D. Values obtained for the amplitude of lateral head displacement did not significantly differ and were in accordance with literature data. Mean values of the linearity index were low in all groups while wobble index was satisfactory and statistically significant differences were noted between groups. Mean values of the straightness, beat-cross frequency and cells with circular movements were within the acceptable limits and without statistically significant differences

Zinc concentration in hay was 12 to 17 mg/kg, and in concentrate 50 mg/kg to 84 mg/kg, which is far below the limits allowed by NRC, Rules on animals feed quality in Serbia and Evropean regulations EC2002/32.

Zinc concentration in drinking water was 0,03 mg/L to 0,74 mg/L, while mercury concentration was nearly same in all groups ($< 0,001$ mg/L). Lead concentration in water was 0,012 - 0,022 mg/L, and that of cadmium 0,0010 - 0,0014 mg/L which is below permitted limits.

Concentration of all metals tested, in water used for extender preparation, were similar in all investigated groups and bellow the method sensitivity level ($< 0,001$ mg/L).

In our investigations, zinc concentration in the semen of Simmental bulls was within the range of $3,15 \pm 2,74$ to $6,44 \pm 0,57$ mg/kg, mercury from $0,03 \pm 0,01$ to $0,07 \pm 0,01$ mg/kg and lead from $0,02 \pm 0,005$ to $0,07 \pm 0,017$ mg/kg. Cadmium concentration in tested samples was below the level of detectability $< 0,001$ mg/kg.

Nearly all investigated parameters of the semen quality, were within the range characteristic for bulls and no clear correlations were discovered between the metals content in feed, water and semen doses for AI.

Key words: bulls, cadmium, feed, lead, mercury, semen quality, water, zinc

Scientific field: Veterinary medicine

Specific scientific field: Gynecology and andrology

UDC: 636.2/085.1:546.47/49+81:618

SADRŽAJ

1. Uvod	1
2. Pregled literature	4
<i>2.1. Sastav sperme</i>	<i>4</i>
<i>2.2. Građa spermatozoida</i>	<i>9</i>
<i>2.3. Spermatogeneza</i>	<i>11</i>
<i>2.4. Patomorfološke promene na spermatozoidima</i>	<i>15</i>
<i>2.5. Biološke karakteristike sperme</i>	<i>17</i>
<i>2.6. Mineralne supstance u živom svetu i njihova podela</i>	<i>21</i>
2.6.1. Funkcija i uloga cinka	21
2.6.2. Resorpcija, distribucija i ekskrecija cinka	24
2.6.3. Uloga cinka u reprodukciji	25
2.6.4. Načini unošenja i uticaj olova, žive i kadmijuma na organizam	28
2.6.5. Uticaj olova, žive i kadmijuma na kvalitet sperme	30
3. Cilj i zadaci istraživanja	35
4. Materijal i metode rada	36
<i>4.1. Formiranje oglednih grupa bikova i kolekcija semena</i>	<i>36</i>
<i>4.2. Ocena kvaliteta duboko zamrznutog semena posle otapanja</i>	<i>36</i>
<i>4.3. Određivanje koncentracija cinka, olova, kadmijuma i žive u hranivima, vodi i duboko zamrznutom semenu bika</i>	<i>41</i>
4.3.1. Priprema uzoraka hraniva i semena	42
4.3.2. Instrumentalno određivanje sadržaja teških metala	42
<i>4.4. Određivanje ukupnog broja živih aerobnih mikroorganizama u duboko zamrznutom semenu bikova</i>	<i>44</i>
<i>4.5. Metode statističke obrade</i>	<i>45</i>

5. Rezultati	46
<i>5.1. Rezultati ocene kvaliteta duboko zamrznutog semena posle otapanja</i>	<i>46</i>
<i>5.2. Rezultati određivanja koncentracije teških metala u hranivima, vodi za piće i vodi za razređivač za seme</i>	<i>67</i>
<i>5.3. Rezultati određivanja koncentracije teških metala u duboko zamrznutom semenu bikova oglednih grupa</i>	<i>70</i>
<i>5.4. Ukupan broj živih aerobnih mikroorganizama u duboko zamrznutom semenu bikova</i>	<i>72</i>
6. Diskusija	73
<i>6.1. Ocena kvaliteta duboko zamrznutog semena posle otapanja</i>	<i>73</i>
<i>6.2. Analiza hrane, vode za piće i vode za razređivače za seme na količinu teških metala</i>	<i>93</i>
<i>6.3. Analiza koncentracije teških metala u duboko zamrznutom semenu bikova</i>	<i>95</i>
<i>6.4. Mikrobiološka analiza duboko zamrznutog semena</i>	<i>100</i>
7. Zaključci	101
8. Literatura	103
9. Biografija doktoranda	
10. Izjava o autorstvu, Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada, Izjava o korišćenju.	

1. Uvod

U živoj prirodi je do sada otkriveno ukupno 89 hemijskih elemenata, od kojih je 27 esencijalno, odnosno neophodno za odvijanje bioloških funkcija i izgradnju tkiva biljaka, životinja i ljudi. Mineralne materije se u organizam biljaka, životinja i ljudi unose vazduhom, vodom i hranom, i dele se na makro i mikroelemente. U makroelemente spadaju svi elementi koji se nalaze u količini većoj od 100 mg/kg telesne mase (Ca, P, Mg, Na, K, Cl i S), a u mikroelemente svi ostali, čiji je sadržaj u telu životinje manji od te granične vrednosti. Najmanje 30 elemenata pripada grupi mikroelemenata koji su neophodni za normalno funkcionisanje organizma i zdravlje životinja a posebno su značajni gvožđe, bakar, mangan, cink, jod i kobalt. Nacionalni Istraživački Savet (National Research Council, NRC), navodi da je, od ukupno 17 minerala, 10 mikroelemenata neophodno u ishrani domaćih životinja (Cr, Co, Cu, J, Fe, Mn, Mo, Ni, Se i Zn). Mineralne soli su važan sastojak svih ćelija i telesnih tečnosti, a svaki organ ima svoj karakterističan mineralni sastav, na koji se u izvesnoj meri može uticati ishranom. Fiziološka uloga mineralnih materija je višestruka. One su regulatori osmotskog pritiska, elektrohemijske reakcije krvi, limfe i telesnih tečnosti i propustljivosti ćelijskih membrana. Osim toga, predstavljaju sastavni deo kostiju i zuba, učestvuju u sintezi hormona, vitamina, enzima, a prisustvo pojedinih jona je nepohodno za funkcije mišića i nerava.

Danas je poznato više od 200 različitih enzima u biljnim i životinjskim organizmima, kao i u organizmu ljudi, za čije funkcije su vezani dvovalentni joni cinka koji, pre svega, ima značajnu ulogu u sintezi nukleinskih kiselina. Učestvujući u specifičnim enzimskim reakcijama, on olakšava iskorišćavanje aminokiselina i fosfora i ugradnju timidina u DNK i uridina u RNK. Ovej element je neophodan kao kofaktor za aktivnost DNK- i RNK-polimeraza. Poznato je da cink igra esencijalnu ulogu u transkripciji polinukleotida i samim tim u procesu genske ekspresije. On učestvuje u stabilizaciji ćelijske membrane, molekula DNK, RNK i ribozoma. Takođe, cink je neophodan za sintezu kolagena, glutaciona i tkivnih proteina i ulazi u sastav metaloenzima kao što su fosfataza, karboanhidraza, alkohol dehidrogenaza, superoksid dismutaza i karboksipeptidaza.

Značaj cinka u reprodukciji proizilazi iz činjenice da se on javlja kao osnovna komponenta ili aktivator enzima koji su uključeni u genuzu polnih steroida. Cink je bitan za biosintezu testosterona i utiče na aktivnost folikulostimulirajućeg i luteinizirajućeg hormona, što znači da je u uskoj vezi sa procesom spermatogeneze.

Brojnim istraživanjima je dokazano da cink ima ulogu u metabolizmu prostaglandina i sinergističko dejstvo sa esencijalnim masnim kiselinama, kao i da učestvuje u metabolizmu vitamina A. Dokazano je da resorpciju cinka inhibiraju velike količine kalcijuma, kao i fitinske kiseline, koja gradi nerastvorljive soli fitate sa kalcijumom, cinkom i gvoždem i na taj način sprečava njihovu resorpciju. Nedostatak cinka kod svih životinja se manifestuje gubitkom apetita ili njegovim izopačenjem, smanjenim rastom, promenama na koži i njenim derivatima, prolivom, oslabljenim imunološkim odgovorom, kasnijim polnim sazrevanjem, kao i usporenim rastom testisa i potpunim prekidom spermatogeneze.

Prirodni faktori životne sredine kao i različiti antropogeni zagađivači, utiču na funkcije reproduktivnog trakta i na kvalitet sperme životinja i ljudi. Veliki značaj za pro-oksidativni efekat imaju metali kadmijum (Cd), olovo (Pb), živa (Hg), hrom (Cr), nikal (Ni), ali i biometali, kao što su bakar (Cu), gvožđe (Fe), cink (Zn), mangan (Mn), kobalt (Co) i selen (Se). Toksično dejstvo teških metala se zasniva na tome što stimulišu formiranje slobodnih radikala i reaktivnih kiseoničnih vrsta i biomolekula u organizmu. Ovo uzrokuje oksidativni stres i dovodi do lipidne peroksidacije ćelijskih membrana čime se narušava njena funkcionalnost i selektivnost pri transportu materija. Na taj način, teški metali mogu da izazovu oštećenje ćelija ili genetičkog materijala (DNK) i poremete funkcije enzima.

Olovo je metal sa kumulativnim dejstvom i ono deluje konkurentno esencijalnim metalima (gvožđu, kalcijumu, bakru i cinku) za njihove brojne funkcije u organizmu, a posebno na one koje su vezane za prisustvo slobodnih –SH grupa u delovima molekula proteina i enzima. Prema fizičko-hemijskim osobinama Pb^{++} jon može lako da zameni Ca^{++} jon u kalcifikovanim tkivima (kostima i zubima). Dugotrajna izloženost uticaju olova dovodi do promena u kvalitetu semena i hromatinskoj strukturi. Internacionalna agencija za istraživanje kancera IARC (*International Agency For Research on Cancer*) je još 1987. godine svrstala olovo u kancerogene materije.

Visoko toksičan efekat kadmijuma je rezultat njegovih interakcija sa esencijalnim mikro i makro elementima, posebno sa gvoždem, kalcijumom, bakrom i cinkom. Metil-živa se resorbuje gotovo u potpunosti (100%), i to može da bude razlog zabrinutosti nakon povećane konzumacije mesa ribe, školjki, rakova i njihovih proizvoda, ukoliko sadrže povećane količine ovog metala. Metil-živa je snažan otrov, koji u prvom redu napada centralni nervni sistem. Jedinjenja žive ometaju steroidogenezu, uključujući sintezu polnih hormona, narušavaju plodnost mužjaka i ženki i ometaju hipotalamo-hipofizno-tireoidnu osovinu i hipotalamo-hipofizno-adrenalnu osovinu. Svi nabrojani teški metali uneti u organizam putem hrane, vode ili vazduha mogu dovesti do promena u kvalitetu sperme

priplodnjaka, koje se manifestuju povećanim brojem patološki promenjenih spermatozoida. Svaki ejakulat sadrži određeni procenat patomorfološki promenjenih spermatozoida, a poremećaji fertiliteta nastaju pri znatnom povećanju njihovog broja. Defekti u morfologiji spermatozoida mogu biti primarni, ako nastaju u toku spermatogeneze. Kao uzroci se mogu navesti svi uticaji koji vode ka smetnjama u proliferaciji ćelija kao i njihovoj diferencijaciji. To mogu da budu: citostatici, toksini, hormoni, jonizujuća zračenja, trauma, toksična jedinjenja i zapaljenski procesi. Sekundarni defekti nastaju pri prolasku spermatozoida u lumen *tubula contorti* u toku transporta, epididimalnog sazrevanja i nagomilavanja u repu pasemenika. Tercijarne promene u morfologiji nastaju posle izlaska spermatozoida u spoljnu sredinu i najčešće su posledica pogrešne manipulacije ejakulatom.

Sagledavajući iznete činjenice, istraživanja sprovedena u okviru ove doktorske disertacije su bila preduzeta sa ciljem da se utvrdi, da li pri pravilnim uslovima eksploatacije priplodnih bikova simentalne rase, različite količine teških metala u hranivima i vodi imaju uticaja na njihovu koncentraciju i parametre kvaliteta semena.

2. Pregled literature

2.1. Sastav sperme

Sperma je specifična telesna tečnost koja se sastoji od semene plazme i spermatozoida. Semena plazma je smeša sekreta akcesornih polnih žlezda i sprovodnih puteva muškog genitalnog trakta. Osnovna karakteristika semene plazme su veoma složen sastav i izražena varijabilnost u prisustvu i koncentraciji pojedinih sastojaka. Variranja u sastavu postoje između životinjskih vrsta, u okviru iste vrste kod različitih rasa, a i u okviru iste rase kod različitih jedinki. Koncentracija pojedinih sastojaka varira i kod iste životinje u zavisnosti od godišnjeg doba i perioda seksualne aktivnosti. Sekretorna aktivnost akcesornih polnih žlezda direktno je zavisna od koncentracije testosterona u cirkulaciji (Mann, 1974). Jedna od glavnih karakteristika semene plazme sisara je da se u njenom sastavu nalaze u visokim koncentracijama supstance koje se u drugim telesnim tečnostima zastupljene samo tragovima. Tu se ubrajaju limunska kiselina, alkalna fosfataza, fruktoza, fosforilholin, argotinin, inozitol i gliceril-fosforil-holin (Mann, 1974). Semena plazma predstavlja prirodnu sredinu za spermatozoide i njen zapremski udeo iznosi 50-90%. Kod bika, semena plazma je beličaste do blede žute boje, specifične težine 1,024-1,033, pH 6,9-7,0 i sastoji se od 91% vode i 9% rastvorenih supstanci. U formiranju semene plazme učestvuju sekreti testisa i epididimisa sa 5-10%, pri čemu je sekret testisa slabo bazan (pH 7,1-7,8) a epididimisa kiseo i iznosi pH 6. Od organskih sastojaka najznačajniji su albumini, polni hormoni i glutaminska kiselina. Sekret semenih kesica čini 10-45% zapremine ejakulata sa kiselom elektrohemijom reakcijom (pH 6-6,4). On sadrži proteine, fruktozu, limunsku kiselinu, askorbinsku kiselinu, ergotinin, jone K i Ca, kao i flavin, od čijeg prisustva zavisi boja semene plazme. Od enzima su zastupljene alkalna fosfataza i nukleozidaza. Sekret prostate je zastupljen je samo sa 4 do 6% ukupne zapremine semene plazme i sastoji se od proteina, slobodnih aminokiselina, limunske kiseline, Na, K, Ca, jona hlora i bikarbonata, kao i enzima fosfataze. Sekret bulbouretralnih žlezdi učestvuje sa 10-20% ukupne zapremine i svojim alkalnim sadržajem neutrališe kiselost u izvodnim kanalima genitalnog trakta.

Od neorganskih sastojaka plazme bika kojih ima oko 0,9%, dokazano je prisustvo Na, K, Mg, Ca, Zn, Mn, Cu, Cl, Fe, sulfata, fosfata i bikarbonata (Mann, 1974). Bikarbonati i fosfati imaju ulogu pufera.

Od organskih sastojaka u seminalnoj plazmi se nalaze šećeri, proteini, masti i enzimi. Osnovni izvor energije za spermatozoide je fruktoza koja se stvara u semenim kesicama i

njena koncentracija se kreće od 1,5 do 9,0 g/L (Andrabi, 2009). Limunska kiselina je normalan sastojak semene plazme bika i nalazi se u koncentraciji od 3,40 do 11,5 g/L što zavisi od koncentracije testosterona (Andrabi, 2009). Ona se stvara u semenim kesicama i ampulama *ductus deferens-a*, a ima ulogu u vezivanju jona Ca i održavanju pH (Mann, 1974). U semenoj kesici bika prisutan je i sorbitol u koncentraciji od 1,0 do 1,36 g/L i on predstavlja izvor energije. U manjoj koncentraciji se može naći i inozitol (0,25-0,46g/L) (Hartree, 1957). Lipidi sperme su pretežno sastavni deo strukture spermatozoida i u semenoj plazmi ih ima malo. Prosečna koncentracija lipida u semenoj plazmi iznosi 4,29 g/L (Andrabi, 2009). Još 1936. godine je von Euler otkrio prostaglandine u semenoj plazmi ljudi i pretpostavio da se sintetišu u prostati po čemu su i dobili ime. Dvadeset godina kasnije, Eliasson (1959) je dokazao da su glavni izvori prostaglandina semene kesice, što je i potvrđeno kasnije od strane Hamborga (1976). Kod bikova je dokazano prisustvo prostaglandina (PG E₁ i PG E₂) u koncentraciji od 50 do 100 mg/L (Andrabi, 2009). U semenoj plazmi bika se nalazi u proseku 5,7 μmol/L slobodnih aminokiselina i to: glutaminske kiseline, glicina, serina, alanina i asparaginske kiseine. Osim pomenutih aminokiselina, u sastavu semene plazme bika se mogu naći i tirozin, treonin, valin i arginin (Mann, 1974). Proteini u semenoj plazmi bika su zastupljeni u količini od 30 do 80 g/L i karakteristična je dominacija globulina. Sastav proteina semene plazme je sledeći: albumini 2,52%, α globulini 66,5%, β globulini 19,6% i γ globulini 10,4% (Szumowski, 1959).

Proteini semen plazme omogućavaju lakše prodiranje spermatozoida u oocite (El Hau Ghoui i sar. 2007) i podstiču fagocitozu mrtvih spermatozoida aktiviranjem polimorfonuklearnih ćelija sa proteaznom aktivnošću (Dacheux i sar. 2003). Dokazano je da se u epididimisu bika sintetiše glikoprotein koji ima uticaja na pokretljivost spermatozoida (engl. *forward motility protein*) (Acott i Hoskins, 1978; White i sar. 1987). Komponente semene plazme pomažu bržem oporavku površinskih proteina spermatozoida (Dominguez i sar. 2008), kao i ukupnom poboljšanju parametara kvaliteta sperme nakon otapanja (Maxwell i sar. 2007). Nekoliko faktora semene plazme uključujući proteine, citokine, polne hormone i prostaglandine učestvuju u migraciji spermatozoida kroz reproduktivni trakt ženki i poseduju biološki kapacitet u zaštiti spermatozoida od različitih patogena (Maegawa i sa. 2002). Iz semene plazme bika, Reddy i Bhargava su 1979. godine, izolovali su protein sa izraženim antibakterijskim delovanjem i nazvali ga *seminal plasmin*. Godinu dana ranije Chari i sar. su u sastavu semene plazme otkrili jedan inhibitorski protein koji deluje na gonadotropine i nazvali ga inhibin. U radu Jobim-a i sar, (2004) opisuju se kiseli proteini (13-16kDa) u semenoj plazmi koji se mogu koristiti kao markeri sperme koja dobro podnosi zamrzavanje i

proteini od 25 do 26 kDa kao markeri sperme koja loše podnosi duboko zamrzavanje u tečnom azotu. Četiri proteina semene plazme bika (BSP) su devedestih godina identifikovani kao BSP-A1, BSP-A2, BSP-A3 i BSP-30 kDa i oni čine značajan deo ukupnih proteina semene plazme (70 do 80%). Oni se nalaze na površini akrozoma, zatim na post-akrozomskom delu kao i u srednjem delu spermatozoida što je bitno u početnoj fazi pokretljivosti posle ejakulacije (Manjunath i sar. 1994). Takođe je poznato da oni učestvuju u kapacitaciji goveđih spermatozoida (Manjunath i Therien, 2002). U semenoj plazmi se nalazi i veliki broj enzima među kojima je od velikog značaja fibrinolizin čija je osnovna uloga u održavanju ejakulata u tečnom stanju i olakšavanju prolaska spermatozoida kroz cerviks (Miljković, 1966). Od drugih enzima treba navesti: aminopeptidazu, glutamat oksalacetat transaminazu (GOT) i glutamat piruvat transaminazu (GPT) (Flipse, 1960). Indikatori dobrog kvaliteta sperme bika su alkalna fosfataza (ALP) i laktat dehidrogenaza (LDH) (Sirat i sar. 1996). U semenoj plazmi bika otkrivene su i α manozidaza, β manozidaza, α glukozidaza, β galaktozidaza, β N acetilglukaminidaza i β glukoronidaza (Conchie i Mann, 1957). Pored njih postoje i nukleolitički enzimi i to 5 nukleozidaza, nukleotid fosfodiesteraza, nukleotid pirofosfataza, nukleotid fosforilaza, piridin nukleozidaza i adenzin 3,5 mono fosfat fosfodiesteraza (Mann i Lutwak-Mann, 1981), kao i enzimi o kojima se manje zna: arilsulfataza, α 1-4 glukozidaza i prostaglandin H2D izomeraza (Gadella i sar. 1991). U semenoj plazmi bika dokazano je i prisustvo superoksidismutaze (SOD) i glutation peroksidaze (GPX) koje imaju ulogu da zaštite spermatozoide od reaktivnih kiseoničkih grupa (ROS) (Goncalves i sar. 2010). Transaminaze su deponovane u srednjem delu spermatozoida (Mann i Lutwak-Mann, 1981), dok je LDH u citozolu i mitohondrijama (Burgos i sar. 1995). U semenoj plazmi postoje još dva antioksidativna enzima: glutation reduktaza (GR) i katalaza (CAT) (Zubkova i Robaire, 2004). Selvaraju (2009), u svom radu ukazuje da dodavanje faktora rasta sličnog insulinu (IGF-1) u spermu utiče na smanjenje stepena lipidne peroksidacije i povećava motilitet spermatozoida.

Semena plazma sadrži samo 5 % sekreta iz proksimalnih partija sprovodnih kanala muškog genitalnog trakta, a 95% njene zapremine predstavljaju produkti lučenja semenih vezikula, prostate i bulbouretralnih žlezda. Uvođenjem savremenih biohemijskih metoda, sredinom prošlog veka, prikupljeni su brojni podaci o sastavu ove telesne tečnosti i budući da se smatralo, da se radi o sekretu sa relativno jednostavnim fiziološkim ulogama, naučnike je zbunjivala izuzetna složenost sastava semene plazme, posebno njenih proteinskih komponenti. Osnovne funkcije semene plazme su: održavanje optimalnog pH, obezbeđivanje hranljivih materija (fruktoza), zaštita od oksido-redukcionih procesa i postizanje određenog

volumena ejakulata, ali je njen sastav izuzetno kompleksan. Puni smisao složenosti sastava semene plazme postao je jasan posle oglada u kojima je dokazan njen uticaj na ćelije (Stites i Erickson, 1975), a kasnije i na efektorske molekule (Witkin i Toth, 1983) imunološkog sistema.

Imunosupresivno delovanje semene plazme je dokazano kod svih do sada ispitivanih vrsta sisara, a iz podataka dobijenih ispitivanjem ove telesne tečnosti ljudi, vidi se da je ono pretežno usmereno na limfocite, NK ćelije (engl. *natural killer*) i sistem komplementa. Pojedini sastojci su čak aktivni i kod nesrodnih životinjskih vrsta. Semena plazma ljudi, inhibira proliferativni odgovor goveđih limfocita stimuliranih mitogenima u *in vitro* uslovima, a semena plazma bika inhibira proliferaciju limfocita ljudi. Ovo delovanje je veoma izraženo što dokazuje podatak da u finalnoj koncentraciji od 1%, semena plazma gotovo u potpunosti (98-99%), inhibira proliferaciju limfocita, a da pri tome ne ispoljava citotoksične efekte (Lazarević i sar. 1995). Ova telesna tečnost je u visokim koncentracijama citotoksična zbog prisustva relativno malih molekula koji se lako uklanjaju dijalizom ili se efekat citotoksičnosti prevazilazi upotrebom visokih razređenja (Lazarević, 1991).

Zbirni prikaz inhibitornog djelovanja semene plazme sisara na ćelije i molekule imunološkog sistema izneli su još 1999. godine James i Skibinski kao i Vukotić 1986. Ovi autori navode da sastojci semene plazme mogu da učestvuju u regulaciji brojnih imunoloških procesa u organizmu ženki, sa ciljem da se izbegne ili redukuje odgovor na antigene spermatozoida. Zanimljivo je ovde napomenuti da semena plazma može delovati i stimulatивно na funkcije pojedinih elemenata imunološkog sistema. U ove efekte, koje je teško objasniti, spadaju: stimulacija aktivnosti T supresorskih ćelija, stimulacija B ćelijskog odgovora pri infekciji Epstein-Barrovim virusom i stimulacija hemotakse neutrofila. Neki drugi rezultati govore takođe tome u prilog (Lazarević i sar. 1994). Pri tome su kod različitih životinjskih vrsta aktivni različiti molekuli, ali sa istim krajnjim efektom - da se spreči prepoznavanje i destrukcija spermatozoida. Najbolje je upoznata imunosupresivna aktivnost komponenti semene plazme ljudi, prvenstveno zbog značaja ovog fenomena u etiopatogenezi AIDS-a. Prisustvo imunosupresivnih molekula u blizini ovog virusa svakako ima značaja u nastanku oboljenja.

Danas se smatra da su u tom pogledu kod ljudi najaktivniji i prema tome i najvažniji prostaglandini serije E i to PG E₁ i E₂ (Quayle i sar. 1987). Sasvim je sigurno da oni nisu i jedine imunosupresivne supstance, jer i semena plazma oslobođena od prostaglandina ispoljava imunosupresivne efekte, ali u manjoj meri. Ne postoji ni jedna telesna tečnost u kojoj je koncentracija prostaglandina tako visoka kao u semenoj plazmi. Dokazano je da je

kod bikova sinteza prostaglandina u semenim vezikulama na visokom nivou, ali je njihova koncentracija u semenoj tečnosti relativno mala. To je dovelo do pretpostavke da se prostaglandini kod ove životinjske vrste, ili resorbuju ili ostaju adsorbovani na površini spermatozoida. Ova pretpostavka još uvek nije potvrđena. Kod nerasta i ovna, glavna imunosupresivna komponenta semene plazme je seminalna ribonukleaza (s-RNase), koja ispoljava i embriotoksično delovanje, a sprečava i rast nekih tumora (Matoušek, 1985). Kod bikova su, po svemu sudeći, u ovom pogledu najaktivnije dve proteinske frakcije koje još uvek nisu potpuno definisane. Jedna od njih ima molekulsku masu manju od 50 kDa, a druga veću od 150 kDa (Fahmi i sar. 1985b).

Dokazano je da imunosupresivno djelovanje ispoljavaju i ekstracelularne organele iz semene plazme ljudi - prostazomi, čije uloge nisu još uvek u dovoljnoj meri poznate. Oni smanjuju stepen prezentacije antigena spermatozoida imunokompetentnim ćelijama zbog toga što ih antigen prezentujuće ćelije lako fagocituju, pa je na taj način njihova aktivnost usmerena protiv sporednih antigena (Skibinsky i sar. 1992). Osim toga, Lazarević i saradnici (1995) su dokazali da i vezikulozomi iz semene plazme kesica bika, takođe inhibiraju proliferativni odgovor humanih i goveđih limfocita stimulisanih mitogenom Con A u *in vitro* ulovima. U istoj seriji ogleđa je utvrđeno da i prostazomi (iz semene plazme ljudi) sprečavaju proliferaciju goveđih limfocita. Ovaj unakrsni efekat potvrđuje da se radi o univerzalnom principu i ispitivanja na drugim životinjskim vrstama bi verovatno dala slične rezultate. To samo potvrđuje koliko je lokalna blokada imunološkog sistema značajna i snažna.

Još jedna karakteristika semene plazme je da ona sprečava aktivaciju sistema komplementa i u klasičnom i u alternativnom putu (Petersen i sar. 1980). To praktično znači da su spermatozoidi, sve dok na sebi nose omotač od semene plazme, zaštićeni od delovanja MAC (engl. *membrane attacking complex*) komplementa. Međutim, danas se zna da u blizini mesta oplodnje, pošto izgube svoj proteinski omotač, spermatozoidi mogu da dovedu do aktivacije sistema komplementa alternativnim putem. Ova reakcija je izgleda značajna za otpočinjanje akrozomske reakcije i oslobađanje enzima, koji razlažu zonu pelucidu i prethodi činu same oplodnje (Fahmi i Hunter, 1985a). U sastavu folikularne tečnosti se, pred ovulaciju, nalaze sve komponente sistema komplementa i to u znatno većoj koncentraciji nego u serumu. Ako se u laboratorijskim uslovima semena plazma odvoji višestrukim ispiranjem i centrifugovanjem pri malim brzinama, lako se može dokazati da „isprani“ spermatozoidi mogu da aktiviraju komplement. Ako su ove hipoteze tačne, moglo bi se tvrditi da sistem komplementa ima i druge - ne-imunološke uloge. To bi verovatno izmenilo naše poglede na ovaj kompleksni sistem belančevina za koji se smatra da je nastao kao

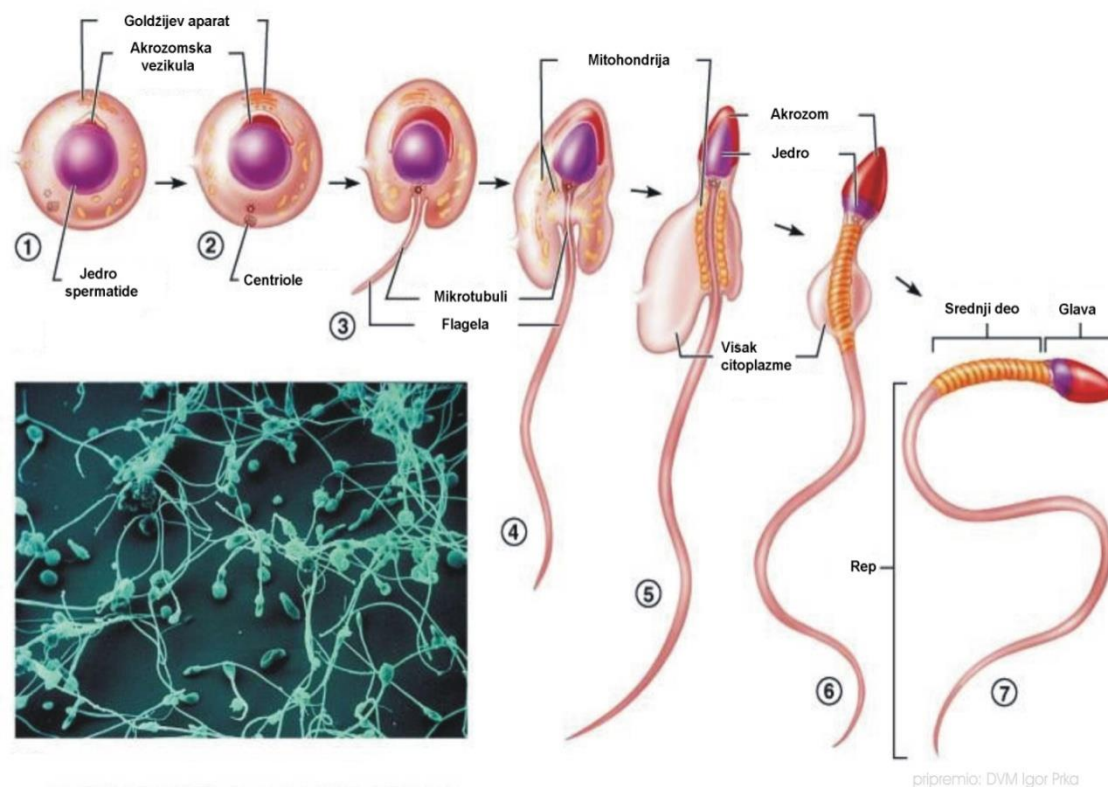
efektorski deo imunološkog sistema. U istraživanjima početkom devedesetih godina, dokazano je da osim semene plazme čoveka i glodara, semena plazma bika ispoljava snažnu antikomplementarnu aktivnost (Lazarević, 1991). Daljim istraživanjima je utvrđeno da, semena plazma čoveka i bika dovodi do inhibicije precipitacije imunih kompleksa u *in vitro* uslovima. Fiziološki značaj ove pojave nije sasvim jasan, ali ako se napravi analogija sa tom osobinom komplementa, inhibicija precipitacije sprečava taloženje imunih kompleksa u tkivima genitalnih organa (Lazarević 1991. i Lazarević i sar. 1995).

2.2. Građa spermatozoida

Spermatozoidi su ćelije jedinstvene po svojoj građi, ali i po tome da su tokom formiranja izgubili skoro svu citoplazmu. Uz jedro ostaju samo akrozom, koji sadrži enzime neophodne tokom oplodjenja i mitohondrije koje obezbeđuju energiju neophodnu za pokretanje kroz reproduktivne kanale mužjaka i ženki. Zreli spermatozoid se sastoji od glave i repa.

Glavna komponentna glave je jedro, a oko 2/3 prednje strane jedra prekriva akrozom u kome se nalaze enzimi. Osnovu jedra okružuje postakrozomski omotač, koji se kod mrtvih spermatozoida boji eozinom ili bromfenol plavim, što je važno prilikom pregleda sperme tokom pripreme za veštačko osemenjavanje (Eurell, 2006). U postakrozomskom delu membrane spermatozoida nalaze se transmembranski proteini koji tokom oplodjenja prepoznaju receptore u membrani ovocita. Haploidno jedro spermatozoida je manje od jedra somatskih ćelija i sadrži visoko kondenzovani protaminski DNK - kompleks. U zavisnosti od prisustva jednog X ili jednog Y hromozoma govorimo o gino- ili andro-spermatozoidima (Gledić, 2012).

Akrozom se stvara iz Goldži aparata i sadrži proteolitičke enzime koji omogućavaju prodiranje u jajnu ćeliju. On se sastoji se iz dva segmenta: akrozomalne kape (anteriorni akrozom) i ekvatorijalnog segmenta (posteriorni akrozom) (slika 2.1). U toku akrozomalne reakcije fuzioniše se spoljna akrozomalna membrana sa plazma membranom. Unutrašnja akrozomalna membrana i ekvatorijalni segment kod većine vrsta ostaju očuvani sve do spajanja sa jajnom ćelijom.



Slika 2.1. Građa spermatozoida (preuzeto iz Vuković i Perković, 2012).

Akrozom sadrži specifične enzime: akrozin, hijaluronidazu, kiselu fosfatazu, arilamidazu, arilsulfatazu A i aspartat-arilamidazu. Glavni funkcionalni delovi repa su aksonema, mitohondrijski procep, prateća vlakna (ogrtaci) i fibrilarna ovojnica. Aksonema se proteže celom dužinom repa i sastavljena je od dva centralna mikrotubulusa, okružena sa devet parova mikrotubula. Aksonema je odgovorna za pokretljivost spermatozoida talasastim udarima repa (Gledić, 2012).

Spermatozoidi stižu u epididimis iz *ductula efferentes*, cevstog organa klupčastog oblika, dužine 50 cm. Njihov unutrašnji zid je obložen dvoslojnim epitelom sa sekretornim i apsorbirajućim ćelijama. U pasemeniku je dokazano prisustvo androgenih i estrogenih receptora (Hess, 2000) od kojih zavise procesi resorpcije, sekrecije, transport i metabolizam. Proces resorpcije počinju pod uticajem estrogena, a transport spermatozoida zavisi od androgena. Uticaj na transport imaju još i kateholamini i oksitocin. Vreme potrebno za prolaz spermatozoida celom dužinom kroz epididimus zavisi od učestalosti ejakulacije i traje u proseku od 2 do 3 nedelje. Prolazom kroz pasemenik dolazi do koncentrovanja spermatozoida usled resorpcije vode i pojedinih sastojaka sekreta testisa i sprovodnih kanala. Uporedo sa povećanjem koncentracije, spermatozoidi podležu procesu sazrevanja. Proces sazrevanja spermatozoida u pasemeniku je završen onda kada ove ćelije stignu u oblast repa pasemenika. U repu pasemenika oni leže tesno zbijeni, a iz sekreta se uglavnom preuzima glukoza. Zbog

gustog pakovanja, spermatozoidi su skoro nepokretni a potrošnja energije je mala.

Pokretljivost spermatozoida omogućava relativno jednostavnu procenu njihovog fiziološkog statusa, ali motilitet sam po sebi, ne predviđa tačno njihovu potencijalnu oplodnu sposobnost. Energija potrebna za kretanje se crpi iz intracelularnih skladišta ATP-a (adenozin trifosfat). Korišćenje ATP je regulisano od strane endogenog nivoa cAMP koji ima direktan uticaj na pokretljivost sperme (Hafez, 1987). Spermatozoidi su metabolički aktivni zato što poseduju enzime potrebne za biohemijske reakcije glikolize, ciklus trikarbonskih kiselina, oksidaciju masnih kiselina, transport elektrona i heksozno monofosfatnog puta. U anaerobnim uslovima, spermatozoidi razlažu fruktozu, glukozu ili manozu u mlečnu kiselinu. Ova glikolitička ili fruktolitička aktivnost, omogućava spermatozoidima da prežive u anaerobnim uslovima i važna je tokom njihovog skladištenja za upotrebu u veštačkom osemenjavanju. Spermatozoidi koriste različite supstrate u prisustvu kiseonika. Posle razlaganja fruktoze, nastaju laktat ili piruvat a njihovim razlaganjem ugljen dioksid i voda. Korišćenjem ovih kataboličkih procesa, spermatozoidi pretvaraju veći deo energije u ATP. Iako se većina ATP molekula koristi za proces kretanja, jedan deo energije se koristi i za procese aktivnog transporta kroz membranu spermatozoida. Ovi procesi sprečavaju gubitak pojedinih jona iz spermatozoida. U odsustvu egzogenih supstrata, spermatozoidi koriste svoja intracelularna skladišta plazmalogena da obezbede energiju na kraći vremenski rok (Hafez, 1987).

2.3. Spermatogeneza

Razviće polnih organa mužjaka se odvija vrlo rano i usko je povezano sa razvićem urinarnog sistema. Ovi organi se razvijaju iz intermedijalnog mezoderma u predelu koji se označava kao urogenitalna ploča. Tokom razvića gonada, razlikujemo nekoliko faza i to su : naseljavanje klicinih ćelija u gonadne nabore, formiranje indiferentnih gonada, formiranje nizova blastema koji okružuju primordijalne klicine ćelije i diferenciranje indiferentnih gonada u semenike. Izvodni polni kanali mužjaka se razvijaju od glavnog (Volfvog – *Wolff*) kanala i odgovarajućih kanalića mezonefrosa (Gledić 2012). Spermatogeneza je proces stvaranja spermatozoida koja se odvija tokom cele godine. Ovaj proces se odvija kod polno zrelih mužjaka u semenim kanalićima testisa kojih ima dve vrste: izuvijani (*tubuli seminiferi contorti*) i pravi (*tubuli seminiferi recti*). Izuvijani semeni kanalići su obloženi klicinim epitelom sa dve vrste ćelija i to Sertolijevim ćelijama i germinativnim ćelijama, koje nizom deoba i transformacija proizvode spermatozoide. Sertolijeve ćelije su prave epitelne ćelije i pružaju se od bazalne membrane do lumena kanalića. U vreme puberteta i one prestaju da se dele i zauzimaju trajni položaj u semenom epitelu. Jedro Sertolijevih ćelija je euhromatično,

ovoidno ili trouglasto i smešteno u proširenom bazalnom delu ćelije, a ćelijska membrana sa susednim Sertolijevim ćelijama formira sve vrste međućelijskih veza. Sertolijeve ćelije imaju nekoliko važnih uloga u semenom epitelu, a to su: potporna, formiranje odeljaka, nutritivna, sekretorna i fagocitna. Spojne zone između Sertolijevih ćelija omogućavaju regulisano pomeranje klicinih ćelija tokom spermatogeneze od bazalnog do apikalnog dela. Formiranjem odeljaka, susedne Sertolijeve ćelije se međusobno povezuju i tako obezbeđuju odgovarajuću mikrosredinu za diferencijaciju klicinih ćelija. Sertolijeve ćelije obezbeđuju odgovarajuće supstance klicinim ćelijama, luče regulatorne supstance i fagocituju rezidualna tela nastala tokom spermiogeneze (Gledić, 2012).

Klicine ćelije su smeštene između Sertolijevih ćelija i to, od bazalnog dela do površine semenog epitela i označavaju se kao spermatogene ćelije. Uz bazalnu membranu se nalaze matične ćelije (spermatogonije) koje se dele mitozom. Jedan deo ovih ćelija i dalje ostaje kao matične ćelije (zadržavaju sposobnost samoobnavljanja), a ostale se diferenciraju u primarne spermatocite. Primarni spermatociti ulaze u mejozu i posle prve deobe, od njih nastaju sekundarni spermatociti, a od njih posle druge deobe, spermatide. Spermatide se nalaze u površnom delu semenog epitela i ne dele se već se transformišu u spermatozoide (spermiogeneza). Visina klicinog epitela kojim su obloženi *tubuli seminiferi contorti* je 61 - 80 μm i okruženi su sa laminom proprijom debljine 7 - 10 μm . Do polne zrelosti, semeni kanalići, ili *tubuli seminiferi contorti* predstavljaju kompaktne kanale u obliku vrpce sa dve ćelijske grupe, a sa početkom polne zrelosti spermatogonije se kreću između Sertolijevih ćelija u pravcu bazalne membrane sa kojom dolaze u kontakt. Deobom spermatogonija, započinje proces spermatogeneze. Tokom spermatogeneze, klicine ćelije su povezane intracelularnim mostovima, tako da ćelijske grupe imaju isti stadijum razvića i identičan genetski sadržaj tzv. klon. Sa izuzetkom spermatogonija koje naležu direktno na bazalnu membranu, svi ostali stadijumi razvitka su opkoljeni Sertolijevim, odnosno potpornim ćelijama. U bazalnom delu, Sertolijeve ćelije su specifičnom vrstom veza povezane jedna sa drugom u tzv. *zonule ocludentes*, koje čine osnovu barijere krv - testis. Time se stvara bazalni deo semenog epitela u kome se nalaze spermatogonije i preleptoteni spermatociti I reda. Tek se, neposredno pre stupanja u profazu, pasira desmozomalna zona i ćelije dospevaju u deo klicinog epitela koji ima lumen. Spermatociti se nalaze u profazi I i pomeraju se slažući se na spratove kao na merdevinama. Ćelije koje od njih nastaju su spermatide u fazi II (Gledić, 2012). Germinativne ćelije nastaju iz gonocita, izvornih semenih ćelija prisutnih u malom broju i u semenim kanalićima fetusa.

Sertolijeve ćelije nastaju iz potpornih ćelija oko četvrtog meseca po rođenju muškog teleta. Dva meseca po rođenju dolazi do diferencijacije gonocita u spermatogonije. Spermatogonije su male ćelije okruglog oblika, veličine 10-14 μm sa jedrom ispunjenim hromatinskim granulama. Spermatogeneza se odvija u izuvijanim semenim kanalićima i obično se deli u tri faze: spermatocitogeneza, mejoza i spermiogeneza. U procesu spermatocitogeneze razlikujemo tri tipa spermatogonija; A - spermatogonije, intermedijarne i B – spermatogonije (Gledić, 2012).

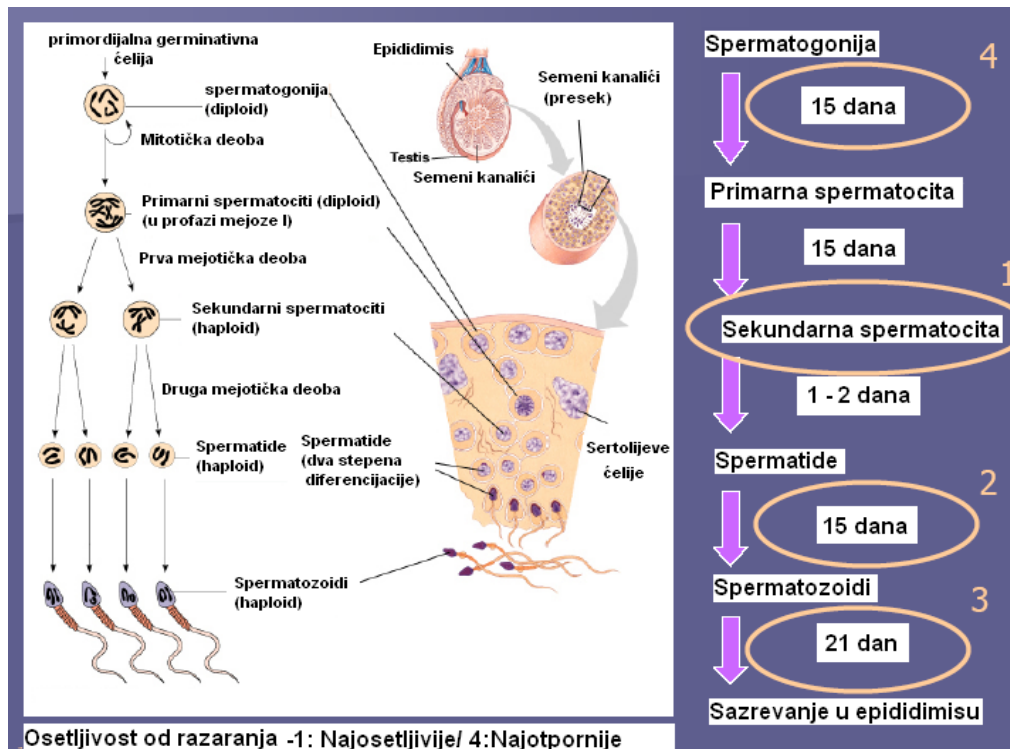
Spermatogonije se dele mitozom i imaju 60 hromozoma u obliku sitnih štapića. Ovom deobom nastaju A - spermatogonije i intermedijarne spermatogonije. Spermatogonije tipa A su heterogena populacija i opisana su dva tipa: tamne i svetle. Tamne su prave matične ćelije i dele se mitozom. Od njih nastaju dva tipa ćelija: jedne koje ostaju matične i miruju i druge koje se diferenciraju u intermedijarne, a one u spermatogonije tipa B (Gledić, 2012).

Intermedijarne spermatogonije su bogate hromatinom u jedru i od njih mitotičkom deobom nastaje prva generacija B - spermatogonija. One se dele mitozom i svaka od njih daje po dva primarna spermatocita.

Primarni spermatociti (spermatociti I reda) su veće ćelije od spermatogonija i okruglog su oblika. U njima se obrazuje dobro izražen Goldžijev aparat i mnogo sitnih bazofilnih granula koje čine hromatoidno telo.

Spermatociti I reda (primarni spermatociti) se dele mejozom - (redukciona deoba), gde se diploidni broj hromozoma (60 hromozoma), postavlja u ekvatorijalnu ravan i deli po dužini. Proizvod ove deobe su sekundarni spermatociti ili spermatociti II reda, sa 30 duplih hromozoma. Daljom mejotičkom deobom, od spermatocita II reda nastaju spermatide sa haploidnim brojem hromozoma. Tako od jedne spermatogonije nastaje 64 spermatida, koje se daljom metamorfozom preobraze u spermatozoide.

Sa nastankom spermatida, proces deobe je završen, a proces metamorfoze spermatida u spermatozoide traje više nedelja pa čak i meseci. Ovaj preobražaj se naziva spermiogeneza i tokom njega dolazi do značajne transformacije jedra, Goldžijevog sistema, centriola i mitohondrija. Od centriola se stvaraju aksijalna telašca, a od mitohondrija se obrazuju dve fibrile, jedna spiralna koja prolazi kroz telo i centralna koja prolazi kroz telo i rep spermatozoida.



Slika 2.2. Prikaz spermatogeneze (preuzeto od Vuković i Perković, 2012)

Stvaranje spermatozoida je stalan proces, nezavisan od bika i on teče neprekidno. Od jedne spermatogonije deobom nastaju dve spermatogonije: A1 koja se ne menja i A2 koja se deli i pretvara u dve intermedijarne spermatogonije. Od ovih nastaju 4 B1 spermatogonije i 8 B2 spermatogonija. Spermatogonije B2 se dele i nastaje 16 primarnih spermocita (spermociti I reda). Od 16 spermocita I reda redukcionom deobom (mejozom) nastaju 32 dupla sekundarna spermocita (spermocita II reda). Ponovnom deobom (mejozom) nastaje 64 "singl" ćelija.

Vremenski posmatrano, spermatogeneza kod bika i drugih muških životinja može da se podeli u četiri faze. Prva faza je mitotička deoba spermatogonija koje se dele četiri puta u vremenu od 15 do 17 dana i daju po 16 primarnih spermocita. Ova faza se naziva i spermocitogeneza. Druga faza je mejotička deoba spermocita koja traje oko 20 dana. Ovom deobom se prepolovi broj hromozoma i nastaju 32 sekundarna spermocita. Treća faza je deoba sekundarnih spermocita (II mejotička deoba) koja liči na mitozu pri čemu nastaju spermatide i traje od nekoliko časova do jednog dana. Četvrta faza je metamorfoza, transformacija spermatida u spermatozoide (64) koje se ne dele i traje oko 15 do 18 dana, a naziva se spermioogeneza (Gledić, 2012).

Spermatogeneza kod mladih bikova započinje sa 6-9 meseci života i zavisi od mnogih faktora kao što su ishrana i rasna pripadnost, a kompletna je u uzrastu od 10 do 12 meseci. Spermatogeneza kod polno zrelih mužjaka teče ravnomerno tokom celog života sve do senilnog stadijuma kada postepeno prestaje usled atrofije semenog epitela. Kapacitet testisa za proizvodnju sperme je hereditarno određen i u toku života zavisi od hormona prednjeg režnja hipofize i faktora spoljašnje sredine (ishrane, načina držanja, temperature, polnog režima i drugih faktora).

Barijera krv-testis odvaja bazalni i adluminalni odeljak semenog epitela, a sastav tečnosti u semenim kanalićima (joni, aminokiseline, ugljeni hidrati, proteini) se značajno razlikuju od krvne plazme. Barijera omogućava da se u adluminalnom odeljku održava visoka koncentracija ABP (engl. *androgen binding protein*), a time i koncentracija testosterona neophodnog za normalnu spermatogenezu. Barijera krv-testis ima i ulogu imunološke barijere koja štiti ćelije tokom mejoze od negativnog uticaja makromolekula koji bi mogli dospeti iz krvi (antigeni ili antitela), ali i da spreči eventualne autoimune reakcije organizma (Hafez, 1974).

2.4. Patomorfološke promene na spermatozoidima

Svaki ejakulat sadrži i određeni procenat patomorfološki promenjenih spermatozoida i smanjena plodnost nastaje pri znatnom povećanju njihovog broja patoloških formi. Tada se govori o terato-zoospermiji, a promenjeni spermatozoidi nisu sposobni za oplodnju. Prema Leidl-u i sar. (1971) etiološki postoje sledeće vrste promena:

1. **Primarni defekti** koji nastaju u toku spermatogeneze u klicinom epitelu pri čemu treba praviti razliku između nespecifičnih i specifičnih promena. Specifični primarni defekti su retki i po pravilu urođeni tj. genetski uslovljeni, a ovakve životinje treba isključiti iz priploda. Nespecifični primarni defekti su posledica smetnji u spermatogoniogenezi, spermatocitogenezi i spermatohistogenezi. Kao uzroci se mogu uzeti svi uticaji koji vode ka smetnjama proliferacije ćelija kao i diferecijacije npr. citostatici, toksini, hormoni, jonizujuća zračenja, traume i zapaljenja i dr. Promene oblika glave mogu nastati zbog nedovoljne kondenzacije hromatina, ali i zbog smetnji pri deljenju ćelija (poliploidija; suviše male ili suviše velike glave). Promene vrata, nastavka repa su posledica poremećaja u kretanju centriola.

2. **Sekundarni defekti** nastaju pri prolasku spermatozoida u lumen *tubula contorti* u toku transporta i epididimalnog sazrevanja i nagomilavanja u repu pasemenika. Tipične promene

su: odvojene glave, prelomljivi repovi spermatozoida na mestima gde je smeštena kapljica plazme koja se nije pravovremeno rastopila.

3. Tercijarne promene nastaju posle izlaska spermatozoida u spoljašnju sredinu i najčešće su posledica pogrešne manipulacije ejakulatom. Ove promene su slične sekundarnim.

Prema Barth i Oko (1989), na spermatozoidima postoje samo primarni i sekundarni defekti.

Defekti za koje je dokazano da izazivaju smanjen fertilitet nazivaju se defekti od većeg značaja za sterilitet, dok su promene koje generalno ne dovode do značajnih posledica po fertilitet defekti manjeg značaja (Tabela 2.1). Kriterijumi za definiciju defekta većeg značaja podrazumevaju dobro izražene primarne defekte, koji se pojavljuju u značajnom procentu (minimalno kod 10-15%) od ukupnog broja spermatozoida, u svakom ejakulatu, izazivaju sterilitet mužjaka i nasledni su (Blom 1972).

Tabela 1. Defekti većeg i manjeg značaja na spermatozoidima (Blom 1972)

Defekti većeg značaja	Defekti manjeg značaja
Nedovoljno razvijeni spermatozoidi	Šiljate glave
Duple strukture (repa, glave)	Umanjene glave
Defekt akrozoma (kljunasti akrozom)	Velika i kratka proširena glava
Nepostojanje glave (aktivni repovi)	Odvojena glava bez repa
Diadem defekt (različita udubljenja na glavi)	Odvojene membrane akrozoma
Defekt kruškolike glave	Abaksijalna implantacija
Sužena baza glave	Distalna kapljica
Abnormalni oblici	Savijen rep
Male abnormalne glave	Terminalno uvijen rep
Abnormalne glave bez repa	Prisustvo drugih ćelija
Spiralno uvijen rep	Epitelijalne ćelije
Defekti srednjeg dela (patrljak defekt)	Eritrociti
Proksimalna kapljica	Agregacije ćelija
Pseudokapljica	
Jako uvijen rep ("Dag" defekt)	

Promenjeni spermatozoidi mogu uticati na fertilitet tako što ne stižu do mesta oplodnje ili zbog nemogućnosti oplodjenja jajne ćelije. Od naslednih defekata sperme, česte su promene na akrozomu. Defekt poznat kao "kljunasti akrozom" (engl. *knobbed acrosome*) prvi put je opisan kod sterilnog bika frizijske rase i klasifikovan je kao autozomno recesivno oboljenje. Osim kod bikova, opisan je i kod nerastova i jarčeva. Kod bikova, ovaj poremećaj

karakteriše stanjen akrozomalni vrh i udubljen (uvučen) vrh spermatozoida. Elektronskom mikroskopijom se zapažaju cistični regioni (cistična apikalna telašca) koja sadrže vezikule sa inkluzijama kao i abnormalno slepljivanje akrozomalnih membrana. Povećan broj spermatozoida sa kljunastim akrozomom u semenu bikova može nastati usled delovanja faktora spoljašnje sredine ili naslednih faktora. Poremećaji izazvani delovanjem faktora spoljašnje sredine su obično prolaznog karaktera i javljaju se zajedno sa drugim znacima poremećaja spermatogeneze (povećan broj ukupno patološki promenjenih spermatozoida uključujući i prisustvo jedarnih vakuola). U slučajevima stalnog prisustva, i velikog broja spermatozoida sa defektom kljunastog akrozoma, uz odsustvo drugih poremećaja spermatozoida postavlja se sumnja na naslednu osnovu (Chenoweth, 2005). Naborani akrozomi su opisani kod subfertilnih bikova gde su već bili prisutni defekti kljunastog akrozoma (Saacke, 1968). Razlike u gustini i kvalitetu DNK spermatozoida postoje ne samo između različitih životinja iste vrste, nego i između spermatozoida istog ejakulata (Salisbury, 1977). Nepravilnost u kondenzaciji DNK je teško uočljiva rutinskim tehnikama koje se koriste u proceni morfologije spermatozoida. Danas je metoda protočne citometrije veoma efikasna u detektovanju stepena heterogenosti hromatinske strukture spermatozoida (Chenoweth, 2005). Odvajanje glave i repa spermatozoida može biti prouzrokovano različitim faktorima koji štetno utiču na spermatogenezu ili sazrevanje spermatozoida (Barth, 1989) U većini slučajeva (80-100%) rep je i dalje pokretan. "Dag" efekat karakteriše jako uvijanje i pucanje repa (sa ili bez citoplazmatske kapljice) i pretpostavlja se da postoji veza između sadržaja cinka u ishrani i ovog defekta (Blom, 1976). Postojanje pseudokapljice se obično smatra naslednim oboljenjem i procenat ovakvih spermatozoida se obično povećava sa starošću bika. Pojava izrazito kratkog repa (patrljka) kod više od 25% ovakvih spermatozoida u ejakulatu, ukazuje na naslednu osnovu ovog defekta (Barth, 1989). Primarna cilijarna diskinezija može biti slaba ili potpuna nepokretljivost usled poremećaja u lokomotornom aparatu (cilijama). Ona spada u grupu poremećaja karakterisanu strukturnim i opštim poremećajima motornog aparata spermatozoida (Chenoweth, 2005).

2.5. Biološke karakteristike sperme

Osnovne fiziološke i morfološke karakteristike, na osnovu kojih se vrši ocena fertilizacione sposobnosti sperme, su: izgled, volumen ejakulata, pokretljivost i broj živih spermatozoida, koncentracija spermatozoida u ejakulatu, kao i neke biohemijske odlike sperme (Hafez, 1974).

Izgled ejakulata se ocenjuje na osnovu njegove boje, prisustva prljavštine, dlaka, krvi, gnoja i slično. Ejakulat bika je mlečno bele ili boje slonovače, ređe žućkaste (Miljković, 1990). Volumen ejakulata zavisi od doba života, telesne mase, rase, nege, individualnog polnog režima priplodnjaka, kao i od frekvence uzimanja sperme. Stariji bikovi daju veću količinu sperme od mlađih (Miljković, 1990). Količina ejakulata bikova se kreće od 1,5 do 15 mL, odnosno u proseku oko 6 mL (Hafez, 1974; Kumar i sar. 2006). Volumen drugog ejakulata je uvek manji od volumena prvog, ako se uzimaju neposredno jedan za drugim (Stančić, 1994). Koncentracija spermatozoida (broj spermatozoida u mL sperme - gustina sperme), takođe je važan pokazatelj kvaliteta sperme. Na osnovu koncentracije spermatozoida određuje se stepen razređenja ejakulata, odnosno broj proizvedenih doza semena za osemenjavanje. Koncentracija spermatozoida u spermi bika iznosi oko $1,2 \times 10^9/\text{mL}$ (Hafez, 1974), a može da se kreće od $0,7 \times 10^9/\text{mL}$ do $1,4 \times 10^9/\text{mL}$ (Kumar i sar. 2006). Prema Thibieru (1975) ukupan broj spermatozoida u ejakulatu bikova francusko-frizijske rase u dobi od 9, 12 i 15 meseci iznosi $1,13 \pm 0,69$; $2,75 \pm 1,31$ i $3,29 \pm 1,31 \times 10^9/\text{mL}$. U jednoj novijoj studiji (Vakanjac, 2013) je određivana koncentracija spermatozoida u 1mL duboko zamrznutog semena bika kod 83 uzoraka metodom hemocitometrije. Koncentracija spermatozoida može da varira i u semenu spremljenom za VO i autor navodi da se ona kretala u intervalu od $10,5$ do $15,5 \times 10^6/\text{mL}$ semena kod 21 uzorka (25,3%), $15,6$ - $20,5 \times 10^6/\text{mL}$ kod 16 uzoraka (19,3%), $20,6$ - $25,5 \times 10^6/\text{mL}$ kod 21 uzorka (25,3%), $25,6$ - $30,5 \times 10^6/\text{mL}$ kod 17 uzoraka (20,5%), dok je u najmanjem broju uzoraka (8 uzoraka, odnosno 9,6%) ustanovljena koncentracija spermatozoida od preko $30 \times 10^6/\text{mL}$ ($30,6$ - $35,5 \times 10^6/\text{mL}$)

Pokretljivost spermatozoida je osnovni kriterijum za ocenjivanje kvaliteta i upotrebljivosti sperme za osemenjavanje. Postoji nekoliko tipova kretanja spermatozoida. To su: progresivno, cirkulatorno (kružno) i kretanje u mestu (lebdenje). Za ocenu stepena oplodne sposobnosti ejakulata uzima se broj, odnosno procenat progresivno pokretljivih spermatozoida. Tako se sperma u kojoj je progresivna pokretljivost spermatozoida ocenjena sa 80 - 100% smatra vrlo dobrom i ima numeričku vrednost 5 (Vale, 1998). Ejakulati koji se koriste za duboko zamrzavanje ne bi trebalo da imaju manje od 60% progresivno pokretljivih spermatozoida (Miljković, 1990; Vale, 1998). Prema Thibieru (1975) pokretljivost spermatozoida u spermi bikova francusko-frizijske rase u dobi od 9, 12 i 15 meseci iznosi $48,0 \pm 13,1$; $60,3 \pm 16,8$ i $63,5 \pm 15,7\%$. Kumar i sar. (2006) navode da se procenat progresivno pokretnih spermatozoida bikova kretao od $72,58 \pm 0,462\%$ do $88,04 \pm 0,641\%$. Morfologija spermatozoida, je takođe veoma bitna u proceni kvaliteta sperme. Sperma bika može da sadrži manji broj deformisanih (patoloških) spermatozoida. Kvalitetna sperma obično nema

patoloških spermatozoida ili ih sadrži najviše 5-10% (Miljković, 1990). Kumar i sar. (2006) navode da sperma bika u proseku sadrži $13,17 \pm 0,322\%$ patološki promenjenih spermatozoida, a $76,06 \pm 0,48\%$ spermatozoida sa očuvanim akrozomom. Analizom 400 uzoraka duboko zamrznutog semena, utvrđeno je da u najvećem broju uzoraka (76%, 303 uzorka) nakon otapanja, progresivna pokretljivost spermatozoida bila između 55% - 60%. Na granici prihvatljivosti upotrebe za V.O, odnosno sa progresivnom pokretljivošću od 50% bio je samo jedan uzorak (0,25%), dok je kod 24% uzoraka progresivna pokretljivost spermatozoida bila u intervalu od 65% do 75% (Vakanjac, 2013). Isti autor opisuje da se u uzorcima duboko zamrznutog semena bika nakon odmrzavanja, procenat patološki izmenjenih spermatozoida kreće od 15-20%, od čega je najveći procenat spermatozoida bez repa (1-6%), spermatozoida sa malom glavom (2-3%), bez glave (3-5%) i sa savijenim repovima 2-4% uzoraka.

Milovanović i sar. (2015) su analizom duboko zamrznutog semena CASA metodom (engl. *Computer Assisted Sperm Analyses*) nakon otapanja pajeta utvrdili parametre kod kojih su doze proglašavane „van klase“ i odbacivane i ako doza ima manje od 30% ukupno pokretljivih spermatozoida, progresivno pokretnih manje od 20%, ukupno pokretnih spermatozoida u dozi manje 4×10^6 po dozi, a progresivno pokretnih manje od 3×10^6 po dozi. Takođe, seme mora da ima najmanje 4×10^5 živih spermatozoida sa intaktnim akrozomom i manje od 40% abnormalnih formi.

Minimalni uslovi koje sveža sperma bika mora da ispuni po pravilniku koji je kod nas u primeni (Sl.glasnik RS 38/2014) su sledeći: zapremina 2 mL, mlečna boja, konzistencija mleka, miris specifičan za vrstu, progresivna pokretljivost minimalno 65%, najmanje 500×10^6 spermatozoida u mL, pH od 6,5 do 7,0, morfološki promenjenih spermatozoida do 20% i ukupan broj bakterija u spermi do 5000 CFU/mL. Seme bika nakon odmrzavanja treba da ispunjava sledeće minimalne uslove: progresivna pokretljivost spermatozoida najmanje 50%, procenat morfološki promenjenih spermatozoida do 30%, progresivna pokretljivost posle testa otpornosti najmanje 40%, broj progresivno pokretnih i morfološki normalnih spermatozoida u dozi posle odmrzavanja mora da bude najmanje 1×10^6 , a ukupan broj bakterija do 500 CFU/mL.

Poslednjih dvadesetak godina, u razvijenim zemljama, a u novije vreme i kod nas, uvedena je u primenu analiza kvaliteta semena domaćih životinja čiji je akronim CASA (engl. *Computer Assisted Semen Analysis*). Ovaj kompjuterski sistem omogućava analizu velikog broja parametara kvaliteta sveže sperme, ohlađene sperme i duboko zamrznutog semena. Zbog visoke cene samog uređaja, ova metodologija nije još uvek uvedena u rutinsku

praksu, ali je zbog velike potrebe za preciznim analizama kvaliteta semena samo pitanje vremena kada će se to dogoditi. Trenutno se u brojnim istraživanjima ulažu naponi da se odrede standardi za kvalitet sperme bika CASA metodom. Broj podataka koji se mogu pronaći u literaturi je mnogo veći za bikove holštajn-frizijske rase dok je o semenu simentalskih bikova publikovano svega nekoliko radova. Tako su nedavno, Kaka i sar. (2015) CASA analizama utvrdili da je pokretljivost spermatozida bikova simentalske rase posle otapanja iznosila $38\pm 0,7\%$ a procenat morfološki nepromenjenih spermatozoida je bio $64\pm 2,3\%$, Procenat spermatozoida sa neoštećenom membranom akrozoma je iznosio $69\pm 1,2\%$, a održivost semena (engl. *viability*) je bila $66\pm 0,9\%$. Isti autor navodi da je VAP (prosečna brzina, engl. *average path velocity*) iznosila $39,25\pm 0,25 \mu\text{m/s}$, VCL (krivolinijska brzina, engl. *curvilinear velocity*) $51,45\pm 0,55 \mu\text{m/s}$, a VSL (pravolinijska brzina, engl. *straight-line velocity*) $7,8\pm 0 \mu\text{m/s}$. Frekvencija prelaska pravolinijske putanje u sekundi (BCF, engl. *beat-cross frequency*) bila je $0,25\pm 0,05 \text{ Hz}$, STR (pravolinijski indeks, engl. *straightness*) $76\pm 1\%$, LIN (indeks linearnosti, engl. *linearity*) $57\pm 0,0 \%$ i progresivna pokretljivost $33,6\pm 0,3\%$.

Sariozkan i sar. (2010) su CASA metodom utvrdili da pokretljivost spermatozoida simentalskih bikova iznosi $43,6\pm 1,64\%$, progresivna pokretljivost $9,6\pm 0,80\%$, VAP $101\pm 3,29 \mu\text{m/s}$, VSL $69,1\pm 5,96 \mu\text{m/s}$, VCL $207\pm 6,55 \mu\text{m/s}$, ALH (amplituda lateralnog otklona - pomeranja glave u odnosu na prosečnu putanju kretanja (engl. *amplitude of lateral head displacement*) $7,8\pm 0,60 \mu\text{m}$ i LIN $32,2\pm 1,94\%$. Oni su registrovali prosečnu vrednost abnormalnosti akrozoma u $11,3\pm 0,65 \%$ slučajeva, a druge abnormalnosti u $15,6\pm 0,58 \%$ slučajeva. Procenat ćelija sa očuvanom membranom je bio $43,8\pm 0,46$.

Kvalitet semena bikova simentalske rase posle otapanja ispitivali su i Celeghini i sar. (2008). Ovi autori navode sledeće vrednosti: ukupna pokretljivost $79,9\pm 1,3\%$, progresivna pokretljivost $60,3\pm 1,9\%$, oštećenja akrozoma $2,2\pm 0,2\%$, VAP $173,5\pm 1,8 \mu\text{m/s}$, VCL $193,9\pm 2,9 \mu\text{m/s}$, VSL $121,1\pm 1,7 \mu\text{m/s}$, BCF $36,2\pm 0,4 \text{ Hz}$, STR $86,9\pm 0,4\%$ i LIN $64,2\pm 0,6\%$.

Različito u vrednostima pojedinih parametara kvaliteta otopljenog semena bika zapažena je i kod holštajn frizijske (HF) rase goveda. Tako Shojaei i sar. (2012) navode sledeće vrednosti: pokretljivost $52,6\pm 9,4\%$, progresivna pokretljivost $45,6\pm 11,0\%$, VAP $51,8\pm 9,6 \mu\text{m/s}$, VSL $41,6\pm 6,4 \mu\text{m/s}$, VCL $86,6\pm 22,1 \mu\text{m/s}$, ALH $3,6\pm 1,1 \mu\text{m}$, LIN $0,4\pm 0,0 \%$, STR $0,8\pm 0,0\%$ i BCF $24,6\pm 2,6 \text{ Hz}$. Contri i sar. (2010) su CASA metodom kod HF rase bikova registrovali sledeće vrednosti: ukupnu pokretljivost $75,6\pm 6,5\%$, progresivnu pokretljivost $45,0\pm 5,0\%$, VAP $134,0\pm 9,3 \mu\text{m/s}$, VSL $107,4\pm 8,3 \mu\text{m/s}$, VCL $225,3\pm 22,0 \mu\text{m/s}$, ALH $10,0\pm 1,2 \mu\text{m}$, LIN $50,1\pm 4,2\%$, BCF $23,2\pm 4,0 \text{ Hz}$, LIN $50,1\pm 4,2\%$ i STR $79,8\pm 1,8\%$.

Hu i sar. (2009) navode vrednosti parametara za kvalitet semena bikova HF rase koje se razlikuju od gore navedenih. Pokretljivost spermatozoida je iznosila $46,86 \pm 1,53\%$, VAP $26,79 \pm 1,44 \mu\text{m/s}$, VSL $20,32 \pm 1,13 \mu\text{m/s}$, VCL $36,41 \pm 1,36 \mu\text{m/s}$, ALH $2,16 \pm 1,23 \mu\text{m}$, LIN $56,63 \pm 1,22\%$, BCF $13,33 \pm 1,12 \text{ Hz}$ i STR $76498 \pm 2,43\%$. Kod $54,92 \pm 2,32\%$ spermatozoida membrana akrozoma je bila očuvana a membrana ćelija je bila bez oštećenja kod $39,04 \pm 2,38\%$ ćelija.

2.6. Mineralne supstance u živom svetu i njihova podela

Do sada je u živoj prirodi opisano ukupno 89 hemijskih elemenata i od tog broja, 27 su esencijalni elementi, neophodni za odvijanje bioloških funkcija i izgradnju tkiva biljaka, životinja i ljudi (Kolarski, 1995). Oni su neophodni za normalno funkcionisanje organizma i zdravlje životinja. Mineralne materije se u organizam biljaka, životinja i ljudi unose vazduhom, vodom i hranom i dele se na makro- i mikroelemente (Obračević, 1990). U makroelemente spadaju svi elementi koji se nalaze u količini većoj od 100 mg/kg telesne mase životinje (Ca, P, Mg, Na, K, Cl i S), a u mikroelemente se svrstavaju svi ostali čiji je sadržaj u telu životinja manji od te granične vrednosti. Mihailović i sar. (1989) ističu 16 fiziološki značajnih mikroelemenata (Co, Cu, Fe, J, Mn, Mo, Ni, Se, As, Cd, Cr, Si, Sn, Zn, V i F), dok Nacionalni Istraživački Savet (National Research Council - NRC, 1996), od ukupno 17 minerala, navodi 10 mikroelemenata neophodnih u ishrani domaćih životinja (Cr, Co, Cu, J, Fe, Mn, Mo, Ni, Se i Zn).

2.6.1. Funkcija i uloga cinka

Cink je u Zemljinoj kori, najčešće u formi sulfata, zastupljen u koncentraciji od 70 do 130 ppm, a količina u biljkama se prosečno kreće od 10 do 60 mg/kg. Cink je relativno podjednako raspoređen u pojedinim tkivima, a prosečan sadržaj cinka u telu životinja se kreće u rasponu od 20 do 30 mg/kg TM (Kastori, 1990). Biološka uloga cinka vezana je za normalan rast, razvitak, polno sazrevanje i održavanje reproduktivne funkcije jedinke. Raulin je bio prvi koji je još 1869. godine (Underwood, 1971) dokazao da je cink potreban za rast gljivice *Aspergillus niger*. Neophodnost cinka i njegove uloge u organizmu životinja dokazane su 1934. godine od strane Todd-a i Elvehjema (Ku i sar., 1970) u ogleđima na laboratorijskim životinjama.

Istraživanja navedenih autora podstakla su na proučavanje potreba i uloge cinka u ishrani domaćih životinja i čoveka. Šezdesetih godina prošlog veka, Miller i Miller (1960), kao i Ott i sar. (1965) su opisali značaj cinka u ishrani goveda. Keilen i Mann su 1949. godine, prvi put izolovali i prečistili enzim koji sadrži cink (karboanhidraza izolovana iz pankreasa vola) i time potvrdili značaj cinka za normalne funkcije organizma (Kolarski, 1995). Danas je poznato više od 200 različitih enzima u biljnim i životinjskim vrstama, kao i u organizmu ljudi, za čije funkcije su neophodni dvovalentni joni Zn (Hurley i Doane, 1989; Smith, 2000, Keen i sar. 2003). Cink ima veoma značajnu ulogu u sintezi nukleinskih kiselina (Ku i sar., 1970; Smith, 2000). Učestvujući u specifičnim enzimskim reakcijama, on olakšava iskorišćavanje aminokiselina i fosfora i ugradnju timidina u DNK i uridina u RNK (Pavlović-Trajković i sar., 1996), odnosno neophodan je kao kofaktor za aktivnost DNK- i RNK-polimeraza (Hidiroglou, 1984; Prentice, 1993; Kumar, 2006). Poznato je da cink ima esencijalnu ulogu u transkripciji polinukleotida, a samim tim i u procesu genetske ekspresije (Underwood, 1996; Kumar, 2006). Ovaj element učestvuje u stabilizaciji ćelijske membrane, molekula DNK, RNK i ribozoma (Keen i sar. 2003). Takođe je neophodan za sintezu kolagena, glutationa i tkivnih proteina, a zbog nedostatka cinka u hrani iz organizma teladi se urinom izlučuju povećane količine azota i sumpora, što ukazuje na poremećaj u metabolizmu proteina (Hicks i Wallwork, 1987; Kolarski, 1995). Cink ulazi u sastav metaloenzima kao što su fosfataza, karboanhidraza, alkohol dehidrogenaza (Cheah and Yang 2011), superoksid dismutaza i karboksipeptidaza (Keen i sar. 2003).

Značaj cinka u reprodukciji proizilazi iz činjenice da je on, ili osnovna komponenta, ili aktivator enzima koji su uključeni u sintezu polnih steroida. Cink je bitan za biosintezu testosterona (Martin i sar., 1994) i utiče na aktivnost folikulostimulirajućeg i luteinizirajućeg hormona (Root i sar., 1979), tako da je u uskoj vezi sa procesom spermatogeneze (Bedwal i Bahuguna, 1994; Björndahl i Kvist, 1982).

Rezultati nekih istraživanja su ukazali da cink ima ulogu u metabolizmu prostaglandina i sinergističko dejstvo sa esencijalnim masnim kiselinama (Pavlović-Trajković i sar., 1996), kao i sa metabolizmom vitamina A (Apgar, 1985). Brandao-Neto i sar. (1995), ukazuju na usku vezu Zn^{++} sa insulinom, parathormonom i hormonima hipofize i posebno, prolaktinom (PRL). Joni cinka mogu da inhibiraju sekreciju PRL, unutar opsega fiziološki i farmakološki relevantnih koncentracija, što otvara mogućnost njegove kliničke aplikacije. Potrebe u cinku zavise od fiziološkog stanja i proizvodne kategorije životinje (Madsen, 1991). Dokazano je da resorpciju cinka inhibiraju velike količine kalcijuma, kao i fitinske

kiseline koja gradi nerastvorljive fitate sa kalcijumom, cinkom i gvožđem i na taj način sprečava njihovu resorpciju (Kolarski, 1995).

Koncentracija cinka u serumu većine životinja iznosi od 0,5 µg/mL do 1,5 µg /mL (7,6 do 22,9 µmol/L) dok je u punoj krvi, ona i do deset puta veća (Keen i sar. 2003). Potrebe u cinku, za sve rase i kategorije mlečnih goveda, se kreću oko 40 ppm, ali se smatra da bi količina cinka u hrani trebala da iznosi 50–60 ppm, a ponekad i do 100 ppm (Obračević, 1990). Potrebe u cinku za tovne rase goveda iznose 30 ppm (NRC, 1996) i 40 ppm za priplodna grla (NRC, 1989), odnosno 70-80 ppm za priplodne bikove (*Dairy Reference Manual*, 1995).

Količina cinka u hrani varira i svakako zavisi od količine cinka koja se tom periodu nalazi u zemljištu, ali i od vrste i od dela biljke koje se koriste u ishrani životinja. Smatra se da se, količina cinka u biljnim hranivima u proseku kreće od 25 do 50 mg/kg VSM (Obračević, 1990). Trave prosečno sadrže 30 do 50 mg Zn/kg SM, dok leguminozne biljke sadrže 20 do 30 mg/kg (Spears, 2003). Koncentracija cinka u uljanim sačmama se kreće od 50 do 70 ppm, ali je njegova dostupnost smanjena zbog visokog sadržaja fitinske kiseline. Soja i proizvodi od soje, kao i kikiriki sadrže dosta cinka i u njima njegova koncentracija takođe iznosi od 50 do 70 mg/kg (Spears, 2003). Proteinska hraniva animalnog porekla su znatno bogatija u cinku. Mesno i riblje brašno sadrže od 80 do 120 ppm Zn, a iskoristivost cinka iz ovih hraniva je veća (Obračević, 1990). Ostali proizvodi iz mora sadrže 20-50 mg/kg a meso riba čak do 100 mg/kg (Spears, 2003).

Nedostatak cinka se kod svih životinjskih vrsta manifestuje gubitkom apetita, izopačenim apetitom, smanjenim rastom, promenama na koži i njenim derivatima (dlaka, vuna, perje) (Obračević, 1990), prolivom i oslabljenim imunološkim odgovorom (Keen i sar. 2003). Kod svinja je posebno karakteristična pojava parakeratoze koja je posledica nedovoljne količine ili poremećaja resorpcije cinka (Ševković i sar., 1983). Nedostatak cinka se kod pilića manifestuje zaostajanjem u rastu i razvoju, slaboj operjanosti, dermatitisom i kasnijim polnim sazrevanjem (Kolarski, 1995). Kod jagnjadi se, kao simptomi deficita cinka, navode: izopačeni apetit (jedenje sopstvene vune) i smanjen prirast (Obračević, 1990; Keen i sar. 2003), crvenilo kože iznad papaka i oko očiju (Ott i sar., 1965; Keen i sar. 2003), kao i usporen rast testisa i potpuni prekid spermatogeneze (Underwood i Somers, 1969; Keen i sar. 2003).

Kod konja se nakon ishrane obrocima deficitarnim u cinku javljaju lezije oko usta i nozdrva, a ždrebad prestaju da rastu ili im je rast jako usporen. Mogu se pojaviti i lezije na kopitama i koži nogu (Radovanović i sar., 1997; Keen i sar. 2003).

Nutritivna širina između neophodne količine cinka u ishrani životinja i toksičnih nivoa je veoma visoka (NRC, 1996), jer su životinje tolerantne na povećanje količine cinka u obroku i prema nekim autorima dobro podnose količine koje iznose oko 1000 ppm (Obračević, 1990). Tolerancija zavisi od sastava osnovnog obroka i posebno od sadržaja minerala koji utiču na resorpciju i iskorišćavanje cinka, kao što su bakar, gvožđe i kadmijum (Underwood, 1971). Smatra se da je maksimalno dozvoljena količina cinka u hrani za goveda 500 mg/kg obroka (NRC, 1989).

Apsolutno velike količine cinka u hrani izazivaju kod životinja različite simptome kao što su: smanjen apetit, dijareja i anemija zbog poremećenog metabolizma bakra i gvožđa (Kolarski, 1995).

2.6.2. Resorpcija, distribucija i ekskrecija cinka

U najvećem broju naučnih studija se ističe da je tanko crevo glavno mesto resorpcije cinka, pri čemu je u duodenumu ona veća nego u nižim partijama (Miller i Cragle, 1965; Underwood, 1971). Resorpcija cinka se podjednako odvija pasivnom difuzijom i aktivnim transportom (Lee i sar. 1989). Jedan deo resorbovanog cinka se brzo transportuje kroz ćelije mukoze, a deo se zadržava u mukozi iz koje se polako oslobađa u toku narednih nekoliko časova (Gordon i sar. 1981). Kod monogastričnih životinja, cink se podjednako resorbuje iz duodenuma, jejunuma i ileuma, dok se kod preživala jedna trećina cinka resorbuje iz abomazusa (Cousins i sar. 2006; Sekler i sar. 2007).

U transportu cinka kroz crevnu mukozu značajnu ulogu ima metalotionen (MT), protein citosola male molekulske mase, koji za sebe, osim cinka, vezuje još i bakar i kadmijum. Koncentracija MT-Zn u jetri i citosolu crevne mukoze se brzo menja (Cousins i sar. 2006) i ta promena je proporcionalna promeni sadržaja cinka u obroku. Sam transport cinka do bazalne membrane enterocita se odvija pomoću Zn transportera 1 (ZnT-1), a zatim se pomoću ZnT-2 i ZnT-4, koji su regulatori intracelularne količine cinka, on transportuje u endosome (Cousins, 2006; Sekler i sar. 2007). Dokazano je da se ZnT-1 nalazi celom dužinom ileuma, dok se ZnT-2 nalazi u duodenumu i jejunumu, a ZnT-4 celom dužinom tankih creva (Cousins, 2006; Sekler i sar. 2007). Rastvorljive organske supstance male molekulske mase, kao što su amino i hidroksilne kiseline, vezuju za sebe cink i time

olakšavaju njegovu resorpciju (Underwood, 1996). Resorpciju cinka poboljšavaju metionin, cistein, redukovani glutation i citrati, dok fitati, hemiceluloza i lignin deluju inhibitorno na ovaj proces (Pavlović-Trajković i sar., 1996). Resorpciju cinka i njegov transport mogu ograničiti kompetitivne interakcije cinka sa jonima koji imaju slične fizičko-hemijske karakteristike, kao što su kadmijum, bakar, kalcijum i gvožđe (Underwood, 1996; Radovanović i sar., 1997). Prekomerna akumulacija ili toksičnost većine antagonističkih elemenata može biti tretirana dodavanjem cinka kao specifična terapija kod trovanja, posebno toksičnim metalima kao što su olovo (Pb), kadmijum (Cd) i živa (Hg) (Watts, 1988).

Powell i sar. su još 1964.godine dokazali da kadmijum pojačava simptome deficita cinka kod teladi, ali i da cink može da ublaži ili odloži toksične efekte kadmijuma. Izgleda da između kadmijuma i cinka postoji kompeticija oko vezivanja za određena mesta na crevnom epitelu.

Resorpcija cinka kod preživara iznosi 20 - 40% od ukupno unetog cinka u organizam (Kolarski, 1995), a nakon resorpcije u crevima, cink ulazi u portalnu cirkulaciju i vezan za albumine dolazi do tkiva (Gordon i sar., 1981).

2.6.3. Uloga cinka u reprodukciji

Cink ima značajnu ulogu u reproduktivnim procesima životinja, zbog višestrukog delovanja na metabolizam androgenih hormona, estrogena i progesterona, zajedno sa prostaglandinima. Dodavanje cinka ima pozitivno dejstvo u nekim slučajevima steriliteta mužjaka, kao i u smanjivanju komplikacija za vreme graviditeta (Favier, 1992). Cink u procese reprodukcije može biti uključen kao esencijalna komponenta ili kao aktivator enzima neophodnih za sintezu steroidnih hormona. On može da deluje i indirektno, preko hipofize na sintezu gonadotropnih hormona ili direktno preko kompleksa sa specifičnim ligandima u gonadama i prostati (Apgar, 1985).

Deficit cinka izaziva smetnje u razvoju testisa uz vidnu atrofiju tubularnog epitela i istovremeno smanjen sadržaj cinka u testisima, epididimusu i prostati (Hidiroglou, 1984). U cilju ispitivanja uticaja deficita cinka na reproduktivne osobine Pitts i sar., 1966. su izveli ogled na 17 mladih bikova holštajn rase u trajanju od 21 nedelje. Bikovi su bili hranjeni obrokom deficitarnim u cinku (4 ppm) i obrokom sa preporučenim količinama (40 ppm) koji je davan po volji ili u ograničenim količinama. Rezultati su ukazali da je cink neophodan za razvoj testisa, jer je u grupi bikova hranjenih obrokom deficitarnim u cinku, rast testisa bio znatno sporiji.

Između hormona i mikroelemenata, posebno cinka, postoji međusobna interakcija. Hormoni regulišu homeostazu mikroelemenata regulacijom sinteze proteina vezanih za deponovanje, prolazak kroz membranske sisteme ili transport elemenata u krvnoj plazmi. Mikroelementi predstavljaju strukturne ili aktivne komponente endokrinih žlezda, hormona i ciljnih ćelija. Cink ima važnu ulogu u pravilnom funkcionisanju prostate, epididimisa i testisa, stabilnosti membrane spermatozoida i dokazano je da se u muškom reproduktivnom traktu i semenu nalazi u visokim koncentracijama (Kumar, 2006).

Cink je kofaktor većeg broja enzima uključenih u anabolizam i katabolizam hormona. Vezivanjem za hormone peptidne prirode, on stvara aktivnu prostornu konfiguraciju, a modifikovanjem oblika receptora na površini ćelijskih membrana ili u jedru ćelije, obezbeđuje biološku aktivnost hormona (Favier, 1992).

Bedwal i Bahuguna, (1994) ističu da deficit cinka ima za posledicu smanjenje aktivnosti angiotenzin pretvarajućeg enzima (ACE) što izaziva smanjenje koncentracije testosterona i inhibiciju spermatogeneze. Ćelije testisa su pri deficitu cinka sposobne da koriste holesterol i neutralne lipide kao prekursore steroidnih polnih hormona, ali ne i da ih pretvore u polne hormone. Kumar i sar. (2006) su utvrdili da se dodavanjem 25 ppm cink-propionata u hranu priplodnih bikova, količina testosterona povećala sa $2,18 \pm 0,46$ na $3,52 \pm 0,58$ ng/mL. Smatra se da hipogonadizam, vezan za deficit cinka, nastaje usled promena u genezi steroida u testisima, odnosno zbog poremećene funkcije Lajdigovih ćelija (Mansour i sar., 1989). Om i Chung, (1996) navode da deficit cinka ne izaziva promene u koncentraciji FSH, ali smanjuje koncentraciju testosterona u cirkulaciji, menja metabolizam steroida u jetri i modifikuje receptore polnih steroidnih hormona, čime učestvuje u patogenezi reproduktivnih poremećaja mužjaka. Kumar i sar. (2006) su ispitivali uticaj različitih doza preparata cinka i preparata organskog cinka dodvanih u hrani u toku 6 meseci. U ovaj eksperiment su bile uključene četiri grupe bikova: prva grupa je bila kontrolna, drugoj grupi je u hranu dodavano 35 ppm cink sulfata, trećoj grupi 70 ppm cink sulfata i četvrtoj 35 ppm organskog cink-propionata. Autori su pratili: zapreminu sperme, broj spermatozoida, pokretljivost, procenat živih i promenjenih spermatozoida kao i količinu testosterona u krvnom serumu. Četvrta ispitivana grupa, kojoj je dodavan organski cink, je u svim ispitivanim parametrima bila značajno bolja, u odnosu na ostale grupe. Janicki (2008) je ispitivao količinu cinka u tri centra za veštačko osemenjavanje. Centar A se nalazio u industrijskoj zoni, B u zoni poljoprivrednih oranica i C u području šuma i jezera. Količina cinka u semenu bikova iz centra A iznosila je 527,81 mg/L; centra B 847,49 mg/L i centra C 796,01 mg/L. Razlika u srednjim vrednostima količine cinka u semenu bikova je

statistički bila značajna između priplodnjaka iz centra A i B. Progresivna pokretljivost spermatozoida bikova iz centra A je iznosila $74,67 \pm 4,81$ %, centra B $69,67 \pm 2,97$ % i centra C $76,67 \pm 2,58$ %, ali ove razlike nisu bile statistički značajne.

Sperma je zajednički proizvod testisa, pasemenika i dopunskih polnih žlezda, a stvara se počev od polne zrelosti do senilnog stadijuma i izlučuje se pri ejakulaciji (Miljković, 1990). Sperma predstavlja visoko specifičan sekret organizma, koji se sastoji iz semene plazme i uobličених ćelijskih elemenata (spermatozoida). Semena plazma transportuje, hrani, štiti i aktivira spermatozoide, a složenim sastavom predstavlja prirodnu sredinu za spermatozoide i posle napuštanja muških polnih organa. Sastav sperme može znatno da varira između pojedinih vrsta životinja (Stančić, 1994), ali i između individua iste rase. Pored toga, mogu da se zapaze i dnevne varijacije u sastavu i karakteristikama sperme iste jedinke (Mann, 1964), jer na karakteristike sperme utiče veliki broj spoljašnjih i unutrašnjih faktora.

Sperma i semena plazma sadrže znatne količine cinka. Treba istaći da koncentracija cinka varira između životinjskih vrsta, kao i između individua iste rase. Arver i Eliason, (1980) izveštavaju da se koncentracija cinka u semenoj plazmi i spermatozoidima bikova kreće oko $0,4 \pm 0,05$ mmol ($26 \mu\text{g/mL}$) i $30,6 \pm 6,6$ nmol/ 10^8 ćelija ($1,989 \mu\text{g}/10^8$ ćelija). Bhavsar i sar. (1989) smatraju da je prosečan sadržaj cinka u semenoj plazmi, odnosno spermatozoidima $3,367 \pm 0,801$ mg/100 mL, odnosno $0,0460 \pm 0,0048$ mg/100mL respektivno. Massonyi i sar. (2004a) navode da prosečna količina cinka u semenu bika iznosi $83,15 \pm 61,61$ mg/kg, i preporučuje da se za normalno funkcionisanje reproduktivnog trakta mužjaka mora obezbediti neophodna količina cinka od 35 do 40 ppm. Analiziranjem količine cinka u semenoj plazmi 30 bikova, ustanovljeno je da prosečna količina ovog elementa iznosi $235,9 \pm 20,5$ mg/L, a u spermatozoidima $94,0 \pm 11,0$ mg/L, što je dovoljno za normalno odvijanje spermatogeneze (Tvrda i sar. 2013a). Ispitivanjem masenom spektrofotometrijom mikroelemenata u bikovskom semenu je ustanovljena količina cinka od $1,2 \pm 0,03 \mu\text{g/L}$ i ovaj metod se preporučuje za analizu mikroelemenata u semenu u okviru programa unapređenja reprodukcije na farmama (Aguiar i sar. 2012b).

Sörensen i sar. (1998) su utvrdili prisustvo jona cinka u spermatogonijama, primarnim i sekundarnim spermatocitima i u kasnim spermatidima. Prisustvo jona cinka u spermatogonijama i u citoplazmi kasnih spermatida ukazuje na specifičnu ulogu slobodnog cinka u početku mejoze i u spermioogenezi.

Hidiroglou i Knipfel, (1984) ukazuju da je cink koncentrovan u repu i da je uključen u kontrolu pokretljivosti spermatozoida preko ATP-sistema. Osim značaja za morfologiju repa

i pokretljivost spermatozoida, smatra se da je cink značajan za stabilnost plazma membrane i mehaničke osobine citoskeletnih proteina, kao i za stabilnost hromatina (Suzuki i sar., 1995).

S obzirom na lokalizaciju, u veznom delu (glava-rep), Björndahl i Kvist, (1982) u svom radu ukazuju da cink sprečava razdvajanje veze "glava-rep" reverznim vezivanjem za SH-grupe i sprečavanjem njihove oksidacije. Blom i Wolstrup, (1976) pretpostavljaju da je količina cinka u repu proporcionalna pojavi "Dag" defekata (izraženo uvijenih repova) kod bikova rase danski džersezj.

Yamaguchi i sar. (2009) su bojenjem tkiva testisa ustanovili (fluorescentnom bojom specifičnom za cink), da se on akumulira u mitohondrijama spermatogonija i spermatozoida. Povećane doze cinka smanjuju stepen oštećenja tkiva testisa izazvanih stresom, teškim metalima ili toplotom (Boran 2004). Pitts i sar. (1966) navode, da je kada su bikovi bili hranjeni po volji obrocima koji su sadržavali 4 i 40 ppm cinka ili ograničenom količinom hrane sa 40 ppm Zn, koncentracija spermatozoida u ispitivanim ejakulatima bila 825, 985 i 1128 x10⁶/mL. Pokretljivost spermatozoida je iznosila 49,4%; 58,6% i 61,2% respektivno.

2.6.4. Načini unošenja i uticaj olova, žive i kadmijuma na organizam

Prirodni faktori životne sredine, kao i različiti antropogeni zagađivači, utiču na funkcije reproduktivnog trakta i na kvalitet sperme životinja i ljudi. Hemijski elementi predstavljaju važne ekofiziološke faktore životne sredine, a neki od njih su neophodni za osnovne fiziološke procese u organizmu, uključujući i one vezane za reprodukciju. Termin „metali u tragovima“ podrazumeva koncentraciju u tkivima nižu od koncentracije gvožđa. Veliki značaj za prooksidativni efekat imaju metali: kadmijum (Cd), olovo (Pb), živa (Hg), hrom (Cr), nikal (Ni), ali i takozvani biometali, kao što su bakar (Cu), gvožđe (Fe), cink (Zn), mangan (Mn), kobalt (Co) i selen (Se). Toksično dejstvo teških metala je najčešće posledica stimulacije nastanka slobodnih radikala i reaktivnih kiseoničnih vrsta u organizmu što uzrokuje oksidativni stres i dovodi do lipidne peroksidacije membrane. Time se u velikoj meri narušavaju njena funkcionalnost i selektivnost pri transportu materija. Na taj način, teški metali mogu da izazovu oštećenja ćelija, poremećaj funkcije enzima ili promene u genetičkom materijalu (DNK) (David, 2001, Mathur i sar. 2010).

U prirodi se **olovo** pretežno nalazi u obliku sulfidnih i karbonatnih jedinjenja i minerala galenita, cerusita i anglezita i vrlo često se pojavljuje u rudama zajedno s cinkom. Prosečne koncentracije olova u zemljištu su između 15 i 25 mg/kg (Radojević i sar.,1999). Olovo se kao polutant može detektovati u svim segmentima životne sredine i biološkim

sistemima. Od davnina je poznato toksično dejstvo olova u životnoj i radnoj sredini. Olovo nije esencijalni metal, a uneto u organizam se može naći u gotovo svim tkivima i organima sisara. Nakon unošenja, olovo ispoljava toksični efekat na jetru, bubrege i mozak, koji se i smatraju njegovim ciljnim organima (Jarup 2003.). Olovo je metal sa kumulativnim dejstvom i deluje konkurentno prema nekim esencijalnim metalima (gvožđu, kalcijumu, bakru i cinku). Tako utiče na njihove brojne funkcije u organizmu, a posebno na one koje su povezane sa prisustvom slobodnih –SH grupa u proteinima i enzimima. Prema fizičko-hemijskim osobinama, Pb^{++} jon može lako da zameni Ca^{++} jon u kalcifikovanim tkivima (kostima i zubima). Olovo u kostima doprinosi razvoju osteoporoze, smanjenju koštane mase, promeni strukture i povećanoj resorpciji kostiju kod starijih osoba (Kaličanin i sar., 2004a; Kaličanin i sar., 2004b). Olovo ima visok afinitet za S–vezujuća mesta u tkivima, pa lako gradi nerastvorne sulfide i stupa u interakcije sa delovima bioloških molekula sa slobodnim –SH grupama. Primer blokade –SH grupa je i u sintezi hema gde dolazi do povišene koncentracije delta-amino levulinske kiseline (D-ALA) protoporfirina u eritrocitima, krvnoj plazmi i urinu. Olovo ometa normalan metabolizam gvožđa sprečavajući njegov ulazak u eritroblaste i retikulocite (Popović i sar., 1983). Štetni efekat olova je posledica njegove sposobnosti da se vezuje za sulfhidrilne grupe proteina i ono je kompetitivno sa Ca^{++} jonima. Olovo doprinosi stvaranju reaktivnih vrsta kiseonika *in vivo*, što dovodi do slabljenja unutrašnje antioksidativne odbrane i izaziva poremećaje u razmeni jona kroz ćelijske membrane (Flora i Flora, 2006; Ercali i sar., 1996). Na molekularnom nivou, dejstvo olova se ogleda u povećanoj produkciji reaktivnih kiseoničnih vrsta (Gurer i sar., 2000) i stimulaciji lipidne peroksidacije (Patrick, 2006). Olovo se akumulira u tkivu i može da izazove brojne neurološke, hematološke i reproduktivne poremećaje (Massanyi i sar. 2004). Dugotrajna izloženost uticaju olova dovodi do promene u kvalitetu semena i promena hromatinske strukture (Janicki, 2008). Internacionalna agencija za istraživanje kancera IARC (*International Agency For Research on Cancer*) je još 1987. godine svrstala olovo u kancerogene materije (Steenland i Boffetta, 2000).

Kadmijum je označen kao jedan od 126 najvećih zagađivača životne sredine od strane Agencije za zaštitu životne sredine u Americi, a njegovo biološko vreme poluraspada je kod ljudi između 10 i 30 godina (Arabi, 2006). Kadmijum se unosi u organizam u obliku para i čestica prašine kao oksid, hlorid, fluorid, sulfid, karbonat i acetat. Apsorpcija se uglavnom odvija respiratornim putem i manjim delom preko digestivnog trakta, dok je resorpcija preko kože neznatna. Preko industrijskog otpada, kadmijum ulazi u sastav površinskih voda. Zagađeno zemljište i voda, kao i biljke su polazna karika ishrane i osnovni

izvor kadmijuma za životinje i ljude. Oko 90% kadmijuma dolazi u biljke iz zemljišta, a svega 10% iz vazduha. Najveća količina kadmijuma se unosi putem kontaminirane hrane (pirinač, iznutrice, gljive). Koncentracija kadmijuma u vodi za piće treba da bude manja od $1\mu\text{g}/\text{L}$ (ATSDR, *Agency for Toxic Substances and Disease Registry* 1999.), a u zemljištu mora biti manja od 85 mg/kg . Visoko toksičan efekat kadmijuma je rezultat njegovih interakcija sa esencijalnim mikro i makro bioelementima, posebno sa gvožđem, kalcijumom, bakrom i cinkom (Brzoska i sar., 1997). Izlučivanje kadmijuma iz organizma je sporo, a odvija se preko bubrega, jetre, mleka i pljuvačkom (Popović i Tričković, 1983; Jarup 2003.). Kadmijum veoma malo učestvuje, ili ne učestvuje, u direktnoj metaboličkoj razmeni, već se vezuje za različite biološke komponente, kao što su proteini, tiolne ($-\text{SH}$) grupe i anjonske grupe 25 različitih makromolekula. Na taj način, ovaj element ostvaruje svoj toksičan efekat (ATSDR - *Agency for Toxic Substances and Disease Registry*, 1989).

Živa je široko rasprostranjena u prirodi gde se može naći u elementarnom, neorganskom i organskom obliku. Opšta populacija ljudi i životinja je izložena živi uglavnom putem konzumiranja kontaminirane hrane, posebno ribe, u kojoj se živa akumulira u obliku metilne žive (Bayen i sar. 2005; Bhan i Sarkar, 2005). Trovanje elementarnom živom nastaje udisanjem i ona se dobro resorbuje u plućima, a zadržava se u centralnom nervnom sistemu ili ostaje u eritrocitima. Kada dospe u digestivni trakt, elementarna živa ne predstavlja opasnost jer se teško resorbuje iz creva. Neorganska živa je prisutna i u nekim pesticidima, baterijama, pigmentima i konzervansima pojedinih medicinskih preparata. Neorganske soli žive, unete u organizam, mogu izazvati tremor, neuropsihijatrijske poremećaje, gingivitis i stomatitis (Bhan i Sarkar, 2005; Jarup 2003). Organska živa se u organizam unosi isključivo hranom. Njeni organski proizvodi se rastvaraju u mastima i dobro se resorbuju iz digestivnog trakta. Metil-živa se resorbuje gotovo potpuno i to je razlog zabrinutosti nakon povećane konzumacije ribe, školjki, rakova i njihovih proizvoda. Metil-živa je snažan otrov, koji u prvom redu oštećuje centralni nervni sistem. Jedinjenja žive ometaju steroidogenezu, uključujući sintezu polnih hormona, narušavaju plodnost mužjaka i ženki i ometaju osovine hipotalamus-hipofiza-tireoidea i hipotalamus-hipofiza-nadbubreg (Tan i Mahaffey 2003).

2.6.5. Uticaj olova, žive i kadmijuma na kvalitet sperme

Reproduktivni epitel spada u osetljiva tkiva koja reaguju na promene pojedinih hemijskih faktora i parametara okoline. Kako navode Marzec-Wroblewska i sar. (2012), svi hemijski elementi se, u ovom pogledu, mogu podeliti u tri grupe. U prvu spadaju esencijalni

hemijski elementi (K, Na, Ca, Mg i Fe) koji čine 2 do 5 % ukupne težine tela životinje i imaju ključnu ulogu kao gradivni elementi i u metaboličkim procesima. Oni ulaze u sastav koenzima, antioksidativnih enzima i aktivatora hormona, učestvuju u transportu kiseonika, regulaciji osmotskog pritiska i regulaciji acido-bazne ravnoteže. Drugoj grupi pripadaju mikroelementi koji se nalaze u tragovima (Zn, Cu, Mn, Co i Se). Njihovo prisustvo u spermi je neophodno za funkcije spermatozoida ali u većoj količini mogu biti toksični. Treću grupu čine toksični teški metali (Pb, Cd, Hg, Ni) čije i najmanje količine u spermi, oštećuju spermatozoide. Njih karakteriše dobra elektroprovodljivost, a u hemijske reakcije ulaze kao pozitivni joni, odnosno katjoni. Mikroelementi koji pripadaju drugoj i trećoj grupi, dovode u spermi bika do smanjenja pokretljivosti i broja spermatozoida, utiču negativno na proces kapacitacije i akrozomsku reakciju, smanjuju aktivnost enzima koji učestvuju u odbrani od oksidativnog stresa i dovode do promena u tkivu testisa.

Toksični metali se u tragovima mogu naći i u spermi bikova a dospevaju u organizam preko hraniva i vode za piće. Pravilnik o higijenskoj ispravnosti vode za piće (Sl. list SRJ, br 42/98 i 44/99) propisuje da je maksimalna dozvoljena koncentracija kadmijuma u vodi 0,003mg/L, dok Evropska regulativa 98/83EC dozvoljava 0,005 mg/L. Dozvoljena količina olova i žive u vodi za piće je na osnovu našeg i evropskog pravilnika 0,01 mg/L za olovo i 0,001 mg/L za živu (Sl. list SRJ, br 42/98 i 44/99,98/83EC).

Pravilnik o kvalitetu hrane za životinje i Evropski pravilnik EC2002/32 su u saglasnosti o najvećoj dozvoljenoj količini kadmijuma koja iznosi 1 mg/kg, olova 10 mg/kg i žive 0,1 mg/kg u hrani za životinje. Neki metali mogu ispoljavati toksične efekte i kada se u vrlo malim količinama pređe nivo praga toksičnosti. *National Research Council* definiše maksimalnu tolerantnu koncentraciju metala kod "životinja koje su hranjene u ograničenom periodu, a ta količina minerala neće uticati na životinje i ne bi trebalo da ostanu rezidue u proizvodima za ljudsku ishranu koji potiču od tih životinje". Maksimalna tolerantna količina iznosi za kadmijum 0,5 ppm, olovo 30 ppm, živu 2 ppm i cink 500 ppm (NRC 2000).

Massany i sar. (2004a) su utvrdili da je u semenu bika koncentracija cinka $83,15 \pm 61,61$, kadmijuma $0,10 \pm 0,14$ i olova $0,06 \pm 0,04$ mg/kg. Prosečan procenat patološki promenjenih spermatozoida iznosio je $11,79 \pm 4,88$. Najčešće je zapažano odvajanje glave od repa spermatozoida ($3,85 \pm 2,25\%$), a zatim kljunasta glava u $2,04 \pm 1,26$ % slučajeva.

Tvrda i sar. (2012) su analizirali uticaj olova i kadmijuma na pokretljivost spermatozoida, kao i na aktivnost antioksidativnih sistema u semenoj plazmi bika. Koncentracija olova je iznosila $0,57 \pm 0,01$ $\mu\text{g/mL}$, a kadmijuma $0,11 \pm 0,01$ $\mu\text{g/mL}$. Sperma je bila razvrstana u tri kategorije: odlična, dobra i osrednja. Rezultati njihovih istraživanja

ukazuju na rizik od povećanja aktivnosti enzima oksidativnog stresa i mogućeg smanjenja parametara kvaliteta semena bika. Najmanje koncentracije kadmijuma i olova su bile utvrđene u spermi koja je ocenjena kao odlična.

Godinu dana kasnije isti autori (Tvrda i sar. 2013b) su ispitivali koncentraciju olova i kadmijuma u semenoj plazmi i spermatozoidima bika. U semenoj plazmi je bilo $0,23 \pm 0,02$ $\mu\text{g/mL}$ olova, a u spermatozoidima $0,41 \pm 0,07$ $\mu\text{g/mL}$ što je statistički značajno više ($P < 0,05$). Koncentracij kadmijuma je u semenoj plazmi bila $0,09 \pm 0,01$ $\mu\text{g/mL}$, a u spermatozoidima $0,23 \pm 0,02$ $\mu\text{g/mL}$, ali ova razlika nije bila statistički značajna. Analizom aktivnosti enzima oksidativnog stresa autori su zaključili da ovi teški metali dovode do njihove povećane aktivnosti što može da utiče na fertilitet mužjaka.

Uticao kadmijuma u koncentracijama od 50 do 750 $\mu\text{mol/L}$ na spermatozoide je ispitavao Arabi (2006a), pri čemu je utvrđeno da je samo koncentracija kadmijuma od 750 $\mu\text{mol/L}$ imala toksičan efekat na spermatozoide. Prisustvo kadmijuma u navedenoj koncentraciji u semenoj plazmi dovelo je do smanjene progresivne pokretljivosti, oštećenja akrozoma i smanjene akrozomalne reakcije, kao i povećanja aktivnosti enzima oksidativnog stresa (malondialdehid peroksidaze). Već naredne godine, Arabi (2007) je ispitivao uticaj većih koncentracija kadmijuma u semenoj plazmi i to u količini od 1000 $\mu\text{mol/L}$. Ova količina kadmijuma dovodi do smanjene progresivne pokretljivosti spermatozoida, povećane aktivnosti enzima oksidativnog stresa, a analiza DNK spermatozoida „komet” testom ukazuje da je 93% dvolančane DNK oštećeno. Dobijeni rezultati ukazuju na statistički značajno smanjenje oplodne moći spermatozoida.

Smanjena progresivna pokretljivost spermatozoida, povećanje aktivnosti enzima lipidne peroksidacije i 90% oštećenja dvolančane DNK spermatozoida su dokazani i ispitivanjima semena bika gde je utvrđena količina živinog hlorida od 300 μM (Arabi 2005a). Kao zaključak, autor navodi da je živa, koja spada u faktore iz okruženja, potencijalni oksidant koji dovodi do steriliteta muških jedinki.

Teški metali se nalaze u prirodi i utiču na kvalitet sperme divljih životinja. Ispitivanja koncentracije olova, kadmijuma, nikla i cinka i njihov uticaj na kvalitet sperme lisaca vršio je Massanyi (2005). Ovaj autor je utvrdio da koncentracija cinka u spermi lisaca iznosi $13,09 \pm 5,22$ mg/kg , kadmijuma $0,07 \pm 0,05$ mg/kg , olova $0,08 \pm 0,06$ mg/kg i nikla $0,35 \pm 0,24$ mg/kg , i da ove količine teških metala dovode do oštećenja repa spermatozoida i zadržavanja parotoplazmatskih kapljica. Utvrđena je negativna korelacija između cinka i slomljenih repova spermatozoida i kadmijuma i zadržavanja protoplazmatske kapljice. Analizu

elemenata u tragovima u duboko zamrznutom semenu bika dao je Aguiar (2012a). On je analizirao koncentracije kalcijuma, bakra, gvožđa, magnezijuma cinka, joda, molibdena, astata, selena, kobalta, cezijuma, mangana, olova, barijuma i nikla. Koncentracija cinka u ispitivanim uzorcima duboko zamrznutog semena je bila $0,9\pm 0,3$ mg/L a olova $1,0\pm 0,9$ μ g/L. Cilj ovih analiza je bio procena kvaliteta ejakulata na osnovu količine elemenata u tragovima.

Živa je veoma toksičan element za ljude i životinje i efekat na spermatozoide ispitivao je Arabi (2006b) koji je uzorke duboko zamrznutog semena podelio u pet grupa. Prva grupa je bila kontrolna, drugoj grupi je dodao 50 μ M živinog hlorida, trećoj 150 μ M, četvrtoj 350 μ M i petoj 550 μ M. Nakon bojenja po Blomu, analiziran je procenat živih i mrtvih spermatozoida u uzorku. Kontrolna grupa je imala $78\pm 34,88$ % živih spermatozoida, druga grupa $65\pm 4,12$ %, treća grupa $60\pm 3,56$ %, četvrta $60\pm 4,11$ % i peta $59\pm 3,06$ %. Rezultati ovog autora ukazuju da se paralelno sa povećanjem količine živinog hlorida u uzorku, statistički značajno smanjivao procenat živih spermatozoida.

Gvožđe u semennoj plazmi bika povoljno utiče na progresivnu pokretljivost spermatozoida, smanjenje broja patološki promenjenih ćelija i povoljniji odnos živih i mrtvih spermatozoida (Eghbali, 2010). Ovaj autor je spermu podelio na odličnu (progresivna pokretljivost $92,24\pm 0,51$ %), dobru (progresivna pokretljivost $81,66\pm 0,62$ %) i osrednju (progresivna pokretljivost $71,66\pm 1,05$ %). Koncentracije gvožđa i olova u odličnoj spermi su iznosile $44,19\pm 0,48$ mg/L i $0,022\pm 0,0007$ mg/L, u dobroj spermi $36,40\pm 1,37$ mg/L, i $0,03331\pm 0,0018$ mg/L, a u osrednjoj $34,12\pm 1,22$ mg/L i $0,03331\pm 0,0018$ mg/L. Kako se smanjuje količina gvožđa u spermi a povećava količina olova, statistički značajno raste broj patološki promenjenih spermatozoida kod odlične, dobre i osrednje sperme ($6,06\pm 0,36$ %; $6,81\pm 0,62$ % i $8,45\pm 1,17$ %) i smanjuje se procenat progresivno pokretnih spermatozoida.

Veoma interesantan rad je objavio Janicki (2008), koji je vršio ispitivanja u tri centra za veštačko osemenjavanje. Centar A se nalazio u industrijskoj zoni, B u zoni poljoprivrednih zemljišta i C u okruženju šuma i jezera. Osim, već spomenutog ispitivanja koncentracije cinka ovaj autor je razmatrao i uticaj olova i žive na spermatozoide bika. Koncentracija olova u semenu bikova centra A je iznosila 18,212 μ g/dL, centra B 23,423 μ g/dL i centra C 31,686 μ g/dL. Razlike između vrednosti registrovanih kod bikova iz centara A i C su bile statistički značajne. Zanimljivo je da su bikovi iz centra C, koji se nalazio u šumskom okruženju, imali najveće koncentracije olova u semenu, ali nisu dokazane statistički značajne razlike u progresivnoj pokretljivosti spermatozoida između grupa A, B i C. Arabi (2005b) je u *in vitro* uslovima ispitivao uticaj žive u količinama od 600 i 1200 μ M i

nikotina ($0,75 \mu\text{M}$) na integritet membrane spermatozoida, pokretljivost i akrozomalnu reakciju. Njegovi rezultati ukazuju na smanjenu pokretljivost spermatozoida kao i na smanjeni antioksidativni kapacitet semena u koje su dodati živa i nikotin.

3. Cilj i zadaci istraživanja

Cilj istraživanja

Osnovni cilj istraživanja, sprovedenih u okviru ove doktorske disertacije, je bio određivanje koncentracija cinka, olova, kadmijuma i žive u hrani i vodi za priplodne bikove, određivanje koncentracije ovih elementa u duboko zamrznutom semenu bikova i analiza njihovog uticaja na parametre koji određuju kvalitet sperme.

Zadaci istraživanja

Radi realizacije ovih ciljeva formulisani su sledeći istraživački zadaci:

- Odabir i formiranje četiri grupe bikova za ispitivanje duboko zamrznute sperme.
- Uzorkovanje duboko zamrznutog semena bikova uzgajanih na tri različita lokaliteta u regionu i jednom lokalitetu u Nemačkoj i njihovo dopremanje do laboratorija u kontejnerima sa tečnim azotom
- Uzorkovanje hrane (sena i potpune krmne smeše za priplodne bikove) i vode i dopremanje do laboratorija u kojima će se vršiti ispitivanja.
- Ispitivanje parametara kvaliteta semena bikova sve četiri grupe.
- Određivanje koncentracije olova, kadmijuma, cinka i žive u hrani i vodi za bikove sve četiri grupe.
- Određivanje koncentracije olova, kadmijuma, cinka i žive u vodi za pripremu razređivača sa seme bikova.
- Određivanje koncentracije olova, kadmijuma, cinka i žive u duboko zamrznutom semenu bikova sve četiri grupe.
- Statistička obrada rezultata i poređenje vrednosti dobijenih određivanjem koncentracije teških metala u hrani i duboko zamrznutom semenu i analiza njihovog uticaja na kvalitet semena

4. Materijal i metode rada

U okviru ove disertacije je analizirano 40 uzoraka duboko zamrznutog semena bikova, podeljenih prema lokalitetu centara u četiri grupe (A, B, C i D). U njima su određivane vrednosti parametara koji definišu kvalitet otopljenog semena i ove analize su vršene u Odeljenju za reprodukciju Naučnog instituta za veterinarstvo „Novi Sad“ i na Katedri za porodiljstvo, sterilitet i v.o. Fakulteta veterinarske medicine, Univerziteta u Beogradu. Koncentracije olova, cinka, kadmijuma i žive u uzorcima duboko zamrznutog semena bikova, kao i u uzorcima, hrane i vode za piće određivane su u laboratoriji Katedre za ishranu i botaniku, Fakulteta veterinarske medicine, Univerziteta u Beogradu.

4.1. Formiranje oglednih grupa bikova i kolekcija semena

Bikovi uključeni u ova ispitivanja su bili simentalske rase, starosti od 6 do 8 godina i držani su pojedinačno u slobodnom sistemu, a kolekcija semena je vršena dva puta nedeljno u skladu sa režimom eksploatacije u centru. Svi priplodnjaci su bili hranjeni sa 8 do 12 kg sena lucerke dobijenog sa lokalnih terena i sa 4 – 6 kg koncentrata dnevno (I AM 163 DEWA – Krafftuttwerk Georg & Co. Wagner GmbH KG, Nemačka) uz dodatak mineralno vitaminskog premiksa (Mineralfuttermittel für Rinder Hoveler Spezialfutterwerke GmbH & Co KG, Nemačka) prema preporuci proizvođača i u količinama zavisnim od njihove telesne mase. Sastav koncentrata i vitaminsko mineralnog premiksa su bili u skladu sa normativima predviđenim za priplodne bikove. Korišćeni premiks je sadržavao cink oksid u koncentraciji od 16,52 g/kg i tu vrednost ističemo zbog toga što je u disertaciji ispitivan sadržaj ovog metala.

Seme je uzimano veštačkom vaginom za bikove posle pripreme u vidu probnog skoka na drugog bika. Svi ejakulati su bili razređivani u zavisnosti od koncentracije spermatozoida razređivačem Andromed (Minitube, Nemačka) i pakovani u prethodno obeležene pajete zapremine 0,25 mL (Minitube, Nemačka). Posle ekvibracije na +4 °C, pajete su zamrzavane standardnim postupkom i čuvane u tečnom azotu na – 196 °C.

4.2. Ocena kvaliteta duboko zamrznutog semena posle otapanja

Uzorci 40 doza duboko zamrznutog semena bikova sa različitih lokacija dostavljeni u laboratoriju radi detaljnijih analiza i ocene kvaliteta i podeljeni su u četiri grupe od po 10.

Priprema uzoraka semena bika

Otapanje semena

Duboko zamrznute pajete su otapane u vodenom kupatilu na 38°C u toku 30 sekundi. Pajete su brisane filter papirom, nakon čega je očitavano ime bika i datum proizvodnje. Vrh pajete je odsečen makazama i seme je istisnuto u sterilne ependorf epruvete zapremine 1,5 mL. Stalak sa otopljenim semenom jedrжан na sobnoj temperaturi do momenta vršenja analiza.

Citološko ispitivanje

Citološko ispitivanje je obuhvatalo kompletnu citološko-morfološku analizu. Preparati za direktnu mikroskopiju su bili pripremljeni supravitalnim bojenjem po Henkoku (Hancock 2: tripan plavo/eozin-nigrozin). Boja je pravljena prokuvavanjem 0,67 g eozina, 0,2 g tripan plavog i 10 g nigrozina u 100 mL vode. Seme i boja su, u podjednakim količinama, bili pomešani u ependorf epruveti, homogenizovani i inkubirani u termomikseru tokom pet minuta (Thermomixer comfort, Eppendorf, Nemačka) na 37 °C sa 300 obrtaja/min. Jedna kap homogenata ukoličini od 10 µL je zatim bila preneti mikropipetom na zagrejanu mikroskopsku pločicu veličine 76×26 mm. Pomoću staklenog štapića, jednim potezom je obezbeđivan ravnomeran raspored spermatozoida duž čitave ploče. Ovako napravljeni razmazi su zatim osušeni na grejaču ploča (Slide Warmer, General Medic, Srbija). Supravitalno obojeno seme analizirano je na fazno kontrastnom svetlosnom mikroskopu (Olympus, Japan) sa imerzijom, pod uveličanjem od 1000 puta. Analizom je određivan odnos živih i mrtvih ćelija, nalaz intaktnih i oštećenih akrozoma, protoplazmatskih kapljica, kao i primarnih, sekundarnih i ukupnih patoloških formi spermatozoida (Barth i Oko, 1989).

CASA (Computer Assisted Sperm Analyses)

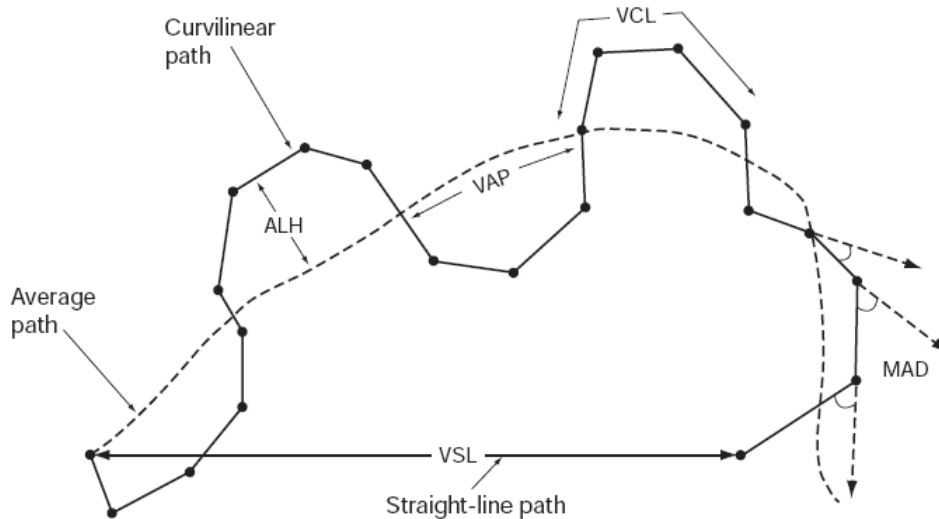
Sistemom CASA (ISAS Proiser, model V.1.2., Španija, eng. *ISAS integrated sperm analysis system*, srp. Integrirani sistem za analizu sperme) određivani su: koncentracija spermatozoida, pokretljivost i brojni brzinski parametri. Za potrebe CASA korišćen je poduzorak od 5 µL koji je nanet na leja-komorice (Proiser D4C20, Valensija, Španija), dubine 20 µm, postavljene na grejnoj ploči mikroskopa. Nakon prestanka pasivnog kretanja

spermatoida, izvršeno je snimanje svih 7 definisanih polja komorice. Broj analiziranih spermatozoida po uzorku je iznosio od 1500-5000, odnosno 150-250 spermatozoida po snimku. Program je bio podešen tako, da analizira 25 slika u sekundi, a ekspozicija snimka je bila 2 sekunde (ukupno 50 sekvenci).

Nakon obrade slike dobijeni su sledeći parametri:

- koncentracija spermatozoida ($\times 10^6$ u mL i u dozi);
- procentualna zastupljenost pojedinih klasa spermatozoida prema pokretljivosti (progresivno pokretni, neprogresivno pokretni i nepokretni), kao i prema brzini (brzi, srednje brzi, spori i statični spermatozoidi).
- Vrednosti parametara brzine koji istovremeno podrazumevaju standardnu CASA terminologiju i specifičnu analizu kinetike spermatozoida za:
 - krivolinijsku brzinu (engl. *VCL-curvilinear velocity*), izraženu u $\mu\text{m}/\text{sec}$. Ona označava prosečnu brzinu spermatozoida na njegovoj istinskoj putanji;
 - pravolinijsku brzinu (engl. *VSL-straight-line velocity*), izraženu u $\mu\text{m}/\text{sec}$. Ona označava prosečnu brzinu spermatozoida na pravolinijskoj putanji koja spaja prvu i poslednju slikanu poziciju spermatozoida;
 - prosečnu brzinu (engl. *VAP-average path velocity*), izraženu u $\mu\text{m}/\text{sec}$, koja označava prosečnu brzinu spermatozoida na njegovoj prosečnoj putanji. Ova putanja se kompjuterski obračunava preko algoritma CASA instrumenta, kojom se „ispravlja“ krivolinijsko kretanje spermatozoida;
 - amplitudu lateralnog otklona-pomeranja glave u odnosu na prosečnu putanju kretanja (engl. *ALH-amplitude of lateral head displacement*), izraženu u μm ;
 - indeks linearnosti (engl. *LIN-linearity*), izražen u % koji se odnosi na linearnost krivolinijske eputanje i dobija se odnosom VSL/VCL ;
 - Indeks oscilacije (eng. *WOB-wobble*), izražen u %. Ovaj indeks se odnosi na stepen oscilacije istinske putanje u odnosu na prosečnu putanju i dobija se odnosom VAP/VCL ;
 - pravolinijski indeks (eng. *STR-straightness*), izražen u % koji se odnosi na linearnost na prosečnoj putanji i dobija se odnosom VSL/VAP ;

- frekvencu prelaska pravolinijske putanje u sekundi (engl. *BCF-beat-cross frequency*), izražen u hercima (Hz). Frekvencija predstavlja prosečan broj prelazaka krivolinijske putanje preko pravolinijske putanje.



Slika 4.1. Prikaz standardne terminologije izraza merenih CASA sistemom (WHO laboratory manual for the Examination and processing of human semen, 5. izdanje, str. 138-139, World Health Organization 2010).

Protočna citometrija

Za određene strukturne i fiziološke karakteristike spermatozoida korišćene su analitičke sposobnosti protočnog citometra („Guava EasyCyte“, Guava Technologies Inc, Hayward, Kalifornija, SAD). Aparat je opremljen softverom podešenim za analizu semena i obradu podataka (IMV Technologies, L’Aigle, Francuska). Protočnom citometrijom su određivani sledeći parametri kvaliteta duboko-zamrznutog semena: kapacitacija spermatozoida, integritet membrane spermatozoida i akrozoma, vijabilitet spermatozoida, oštećenje-kondenzacija hromozoma

Test kapacitacije

Test kapacitacije je izvođen na osnovu procene nivoa kalcijumovih jona u citoplazmi glave spermatozoida. Čelije sa slobodnim kalcijumom u citoplazmi se boje zeleno. U zavisnosti od količine slobodnog kalcijuma u citoplazmi intenzitet zelene boje je veći ili manji.

U ispitivanju je korišćen Fluo-4 NW calcium kit (F36206, Molecular Probes,

Invitrogen, SAD). Test se sastoji od 3 komponente: a) Fluo-4 NW dye mix (Komponenta **A**); b) probenecid rastvorljiv u vodi (Komponenta **B**) i c) pufer-Komponenta **C** (rastvor 1× HBSS, 20 mM HEPES).

Komponente su pripremane i korišćene prema preporuci proizvođača. Nakon inkubiranja uzorka na 37 °C u mraku tokom 30 minuta, analizirano je oko 2000 čestica u triplikatu, u programu „Calcium setup“ (IMV, Francuska). Za dalju obradu su uzimane srednje vrednosti.

Test integriteta membrane spermatozoida i akrozoma

Lektin poreklom iz kikirikija (*Arachis hypogea*), povezan sa FITC-om, boji akrozom spermatozoida ukoliko je membrana akrozoma oštećena ili je akrozom reagovao zbog vezivanja za karbohidratne grupe glikoproteina. Oštećeni akrozom se intenzivnije boji nego netaknuti akrozom. Propidijum jodid (PI) ulazi u spermatozoide i boji spermatozoide sa oštećenom membranom. Zbog toga, spermatozoidi sa neoštećenom membranom i neoštećenim akrozomom, ne reaguju na zeleno ili crveno. Spermatozoidi sa neoštećenom membranom ali oštećenim akrozomom, su osetljivi na zeleno ali ne reaguju na crveno. Spermatozoidi sa oštećenom membranom ali neoštećenim akrozomom su osetljivi na crveno a neosetljivi na zeleno. Spermatozoidi sa oštećenom membranom i akrozomom su osetljivi i na zeleno i na crveno.

Za ovaj test su korišćeni: propidijum jodid 2.4 mM (Live/dead sperm viability kit, L7011, Invitrogen, SAD), PNA-FITC (Lectin FITC labeled from *Arachis Hypogea* - peanut, L7381 Sigma Aldrich, SAD) i Easy Buffer (IMV, Francuska).

U ependorf epruvete je dodavano po 2 µL PJ, 1µl PNA-FITC, 97 µL EasyBuffera i 4µL semena. Ovaj rastvor je dodatno razređivan sa 296 µL EasyBuffer-a, tako da je ukupna količina smeše iznosila 400 µL. Uzorci su inkubirani u mrakutokom 10 minuta na 37°C. Ukupno je analizirano 5000 čestica u programu „Viability Acrosome setup“ (IMV, Francuska).

Vijabilitet – odnos živih i mrtvih spermatozoida

Za test permeabiliteta membrane koriste se SYBR14 i propidijum jodid. Živi spermatozoidi se boje u zeleno (SYBR-14 prolazi kroz neoštećene membrane i te ćelije

fluoresciraju zelenom bojom, dok PJ prodire kroz oštećene membrane spermatozoida i one fluoresciraju crvenom bojom.

Za ove analize je korišćen Live/dead sperm viability kit (L7011, Invitrogen) tako što je SYBR 14 razređen do koncentracije od 1 mM u DMSO, a PJ do 2,4 mM u vodi. Za dalja razređenja korišćen je EasyBuffer razređivač (IMV, Francuska)

U ependorf epruveti su 2 μ L PJ i 2 μ L SYBR-14 bili razređeni sa 96 μ EasyBuffer razređivača, a zatim je dodavano 4 μ L semena bika. Dodatno razređenje je izvršeno sa 296 μ L EasyBuffer-a, tako da je ukupna količina smeše iznosila 400 μ l. Inkubacija je sprovedena tokom 10 minuta na 37°C u mraku. Ukupno je analizirano 5000 čestica u programu „Viability setup“ (IMV, Francuska).

Oštećenje - kondenzacija hromozoma

Ovaj test je označen kao SCSA (*Sperm Chromatin Structure Assay*) i sprovodi se pomoću boje akridin oranž. Procena strukturne stabilnosti hromatina nukleusa na denaturaciju se vrši posle delovanja kiseline. Akridin oranž (AN) menja boju u crveno ako se veže za raskinute fragmente DNK ili u zeleno ako se veže za neraskinutu DNK.

Za ovaj test se koriste sledeće komponente: TNE razređivač (mešavina 0.15M NaCl, 0,01M Tris i 1mM EDTA), kiseli deterdžent (0,1% Triton X-100 i 0,08N HCl, pH 1,2) i akridin oranž u konačnom rastvoru od 6 μ g/ml.

U prvom koraku se 4 μ l semena bika pomeša sa 196 μ L TNE razređivača i 0,4ml kiselog reagensa. Posle 30 sekundi, dodaje se 1,2 mL rastvora akridin oranž. Očitavanje se vrši tačno 3 minuta nakon dodavanja kiselog deterdženta. Analizirano je ukupno 2000 čestica u triplikatu u programu „Viability setup“ (IMV, Francuska). Za dalju obradu su uzete srednje vrednosti.

4.3. Određivanje koncentracija cinka, olova, kadmijuma i žive u hranivima, vodi i duboko zamrznutom semenu bika

U postupku određivanja sadržaja teških metala sve korišćene hemikalije su bile p.a. čistoće proizvođača J. T. Baker (SAD), a dejonizovana voda (specifične otpornosti od 18M Ω) dobijena je iz dejonizatora vode Heming PO 2a + LD3M (Srbija). Za pripremu uzoraka korišćeni su analitička vaga KERN ABS-220-4 (Nemačka), i mikrotalasna peć Anton Paar MW 3000 (sa kivetama oznake MF 100) (Austrija).

Koncentracije teških metala su određivane na atomskom apsorpcionom spektrometru

Perkin Elmer Analyst 700 sa MHS sistemom (SAD), uz korišćenje lampi istog proizvođača.

4.3.1. Priprema uzoraka hraniva i semena

Za pripremu uzoraka korišćena je mikrotalasna digestija. Na analitičkoj vagi, u kivete za pripremu uzoraka, odmereno je oko $1 \pm 0,0001$ g usitnjenog i homogenizovanog uzorka. Tokom procesa digestije, korišćena je smeša od 65% HNO₃ (6 mL) i 30% H₂O₂ (1 mL). Proces digestije je sproveden programom za razlaganje uzoraka hrane, sa opsegom od 250 do 630 W u četiri koraka.

1. Prvi korak	250 W	3:00 min
2. Drugi korak	630 W	8:00 min
3. Treći korak	500 W	22:00 min
4. Četvrti korak	0 W	30:00 min

Zajedno sa uzorkom, pripremana je i slepa proba (bez dela uzorka za ispitivanje). Posle hlađenja do sobne temperature, pripremljeni uzorci su kvantitativno preneti u odmerni sud. Za određivanje sadržaja cinka, kadmijuma, olova i žive odmerni sud je dopunjen do označenog podeoka 0,1 mol/L HNO₃.

4.3.2. Instrumentalno određivanje sadržaja teških metala

Sadržaj teških metala u uzorcima ($\mu\text{g/L}$) je određivan metodom atomske apsorpcione spektrometrije (AAS), tehnikama plamene atomizacije (Zn), elektrotermalne atomizacije grafitnom kivetom (Pb i Cd) i tehnikom hladnih para (Hg).

Određivanje sadržaja cinka – metoda atomske apsorpcione spektrometrije (AAS) – SRPS EN 14084 (2008)

Za određivanje sadržaja ispitivanog elemenata u uzorcima, korišćena je metoda atomske apsorpcione spektrometrije (AAS), tehnika plamene atomizacije (FAAS). Na aparatu je instalirana lampa sa šupljom katodom za određivanje odgovarajućeg elementa, kao i deuterijumska lampa za korekciju pozadinskog zračenja, a zatim je izabrana odgovarajuća talasna dužina karakteristična za cink ($\lambda_{\text{Zn}} = 213,8$ nm) uz podešavanje odgovarajućih uslova za analizu (širina proreza, položaj plamenika, protok acetilena i vazduha).

Rastvor uzorka je prenet u odmerni sud od 50 mL i dopunjen 0,1 M rastvorom HNO₃. Pripremljena je serija standardnih rastvora koji su razblaženi vodenim 1,5 M rastvorom HNO₃, kako bi koncentracija kiseline u uzorcima i standardima bila što približnija.

Nakon stabilizacije plamena, u plamen je prvo raspršena dejonizovana voda, zatim standardni rastvori i na kraju slepa proba i ispitivani rastvor. Na osnovu izmerene apsorpcije standardnih rastvora nacrtana je kalibraciona kriva. Sadržaj cinka je određen na osnovu kalibracione krive, uzimajući u obzir mase uzoraka i primenjena razblaženja.

Određivanje sadržaja olova i kadmijuma – metoda atomske apsorpcione spektrometrije (AAS) – SRPS EN 14084 (2008)

Sadržaj kadmijuma i olova u uzorcima, usled niske koncentracije ovih elemenata, određen je metodom atomske apsorpcione spektrometrije (AAS), tehnikom elektrotermalne atomizacije grafitnom kivetom (GFAAS).

Na aparatu je instalirana grafitna kiveta, lampa sa šupljom katodom za određivanje odgovarajućeg elementa, kao i deuterijumska lampa za korekciju pozadinskog zračenja. Izabrana je odgovarajuća talasna dužina karakteristična za svaki element ($\lambda_{Pb} = 283,3$ nm; $\lambda_{Cd} = 228,8$ nm) i podešeni su odgovarajući uslovi za analizu (autosempler, širina proreza, acetilen, vazduh, protok argona i ostali instrumentalni parametri) koji su prikazani u tabeli 4.1. Prema uputstvu proizvođača korišćeni su različiti modifikatori, rastvor primarnog amonijum-fosfata za olovo i rastvor paladijum-hlorida i magnezijum-nitrata za kadmijum.

Tabela 4.1. Parametri prilikom određivanja sadržaja metala (Pb, Cd) u grafitnoj kiveti

Metal	Talasna dužina (nm)	Parametar	Korak 1	Korak 2	Korak 3	Korak 4
Pb	283,3	Temp. (°C)	130	450	1900	2500
		Rampa (s)	10	15	0	2
		Vreme (s)	30	10	4	2
Cd	228,8	Temp. (°C)	130	350	1200	2500
		Rampa (s)	10	15	0	2
		Vreme (s)	30	10	4	2

Nakon podešavanja grafitne peći, u kiveti su najpre tretirani standardni rastvori zatim slepa proba i na kraju ispitivani rastvor. Na osnovu izmerene apsorpcije standardnih rastvora, nacrtana je kalibraciona kriva. Sadržaj svakog elementa (Pb i Cd) određen je na osnovu kalibracione krive, uzimajući u obzir mase uzoraka i eventualna primenjena razblaženja.

Određivanje žive – metoda atomske apsorpcione spektrometrije (AAS) – metoda SRPS EN 13806 (2008)

Za određivanje sadržaja žive u uzorcima, korišćena je metoda atomske apsorpcione spektrometrije (AAS), tehnika hladnih para (CVAAS) koja se zasniva na osobini žive da je njena para stabilna na sobnoj temperaturi. Na aparatu je instalirana EDL lampa za određivanje žive, kao i deuterijumska lampa za korekciju pozadinskog zračenja, a zatim je izabrana odgovarajuća talasna dužina karakteristična za živu ($\lambda_{\text{Hg}} = 253,7 \text{ nm}$) uz podešavanje odgovarajućih uslova za analizu (širina proreza, položaj plamenika, acetilen, vazduh i protok azota).

Iz pripremljenog rastvora, za analizu je uzimano 10 mL uzorka. Kao redukciono sredstvo upotrebljen je 3% rastvor natrijum-bor hidrida u 1% natrijum-hidroksidu koji redukuje živu do elementarne žive. Elementarna živa u struji inertnog gasa (azota) je uneta u atomizer, gde je meren njen apsorpcioni signal. Na osnovu izmerene apsorpcije standardnih rastvora nacrtana je kalibraciona kriva. Sadržaj žive određen je na osnovu kalibracione krive, uzimajući u obzir mase uzoraka i primenjena razblaženja.

4.4. Određivanje ukupnog broja živih aerobnih mikroorganizama u duboko zamrznutom semenu bikova

Ukupan broj živih aerobnih mikroorganizama određivan je standardnom metodom ISO TR 8607 ISO (TR 8607;1991(E)). Svi uzorci duboko zamrznutog semena su bili otopljeni u uređaju za otapanje semena na temperaturi od 37 °C i posle toga su od 1 mL semena pravljeni razređenja. Na Petri šolju je prenet 1 mL razređenog semena finalnog razređenja 10^{-4} . Inokulum je zatim pažljivo pomešan sa hranljivim agarom (Torlak, Srbija) i Petri šolje su ostavljane na hladnoj horizontalnoj površini tako da podloga očvrstne. Zasejane ploče su inkubirane na temperature od 37 ± 1 °C u toku 72 sata. Broj mikroorganizama u 1 mL uzorka duboko zamrznutog semena određivan je brojanjem izraslih kolonija posle 72h inkubacije. Kolonije se broje golim okom na svakoj ploči koja sadrži ispitujući uzorak. U obzir su uzimane samo dobro prepoznatljive kolonije, izrasle u podlozi. Posle inkubacije i brojanja kolonija, izračunava se aritmetička sredina broja kolonija nađenih na dve ploče pomnoženog sa $1/d$; gde je d faktor finalnog razređenja ($d=10^{-4}$) i izražava se kao broj mikroorganizama u 1 mL ispitanog uzorka.

4.5. Metode statističke obrade

U statističkoj analizi dobijenih rezultata, korišćeni su deskriptivni statistički pokazatelji koji omogućavaju opisivanje dobijenih eksperimentalnih rezultata i njihovo tumačenje. Od deskriptivnih statističkih pokazatelja izračunavani su: mera centralne tendencije, standardna devijacija, standardna greška aritmetičke sredine i koeficijent varijacije. Dalja statistička analiza je vršena u zavisnosti od toga da li su analizirani podaci normalno distribuirani ili ne. Testiranje na normalnost izvedeno je pomoću Kolmogorov-Smirnov (Kolmogorov-Smirnov) testa. U slučaju normalne distribucije podataka za poređenje signifikantnih razlika između ispitivanih grupa korišćena je parametarska analiza varijanse (*one way analysis of variances*). U slučaju kada distribucija podataka nije bila normalna upotrebljavana je ne-parametarska Kruskal - Vallisova analiza varijanse (*Kruskal Wallis Analysis of Variance on Ranks*). U slučaju da postoje statistički signifikantne razlike između grupa, parovi grupa su poređeni između sebe na osnovu parametarskog Tukievog testa, odnosno ne-parametarskog *Dunn's Multiple Comparison* testa. Signifikantnost razlika ustanovljava se na nivoima značajnosti od 5 i 1 %. Svi dobijeni rezultati su prikazani tabelarno i grafički. Statistička analiza je urađena upotrebom programskih paketa GraphPad Prism version 5.00 for Windows, GraphPad Software, San Diego, California USA, www.graphpad.com i MS Excel-u.

5. Rezultati

Radi bolje preglednosti, rezultati dobijeni u ovim istraživanjima su podeljeni u četiri podpoglavlja: 5.1. Rezultati ocene kvaliteta duboko zamrznutog semena posle otapanja; 5.2. Rezultati određivanja koncentracije teških metala u hranivima, vodi za piće i vodi korišćenoj za razređivač za seme; 5.3. Rezultati određivanja koncentracije teških metala u duboko zamrznutom semenu i 5.4. Rezultati mikrobiološke analize duboko zamrznutog semena.

5.1. Rezultati ocene kvaliteta duboko zamrznutog semena posle otapanja

U tabelama od 5.1.1. do 5.1.35. su prikazani rezultati dobijeni određivanjem parametara kvaliteta duboko zamrznutog semena bikova i njihovom statističkom analizom. Ukupno je ispitano seme 40 bikova podeljenih u 4 grupe od po deset bikova sa različitih geografskih područja, kao što je opisano u poglavlju Materijal i metode.

Tabela 5.1.1. Deskriptivni statistički parametri dobijeni određivanjem broja spermatozoida $10^6/\text{mL}$ (CASA)

Grupe bikova	n	\bar{x}	SD	Sy	CV (%)	X max	X min
A	10	96,118	44,145	13,960	45,93	206,536	53,700
B	10	92,314	16,902	5,345	18,31	127,671	73,001
C	10	104,235 ^A	15,649	4,949	15,01	128,410	79,813
D	10	68,324 ^A	13,534	4,280	19,81	94,703	50,837

Statistička signifikantnost razlika u srednjim vrednostima je prikazana istim slovima: A, $p < 0,05$

Analiza prosečnih vrednosti koncentracije spermatozoida ($10^6/\text{mL}$), je ukazala da je najveće vrednosti ovog parametra imala grupa C ($104,235 \pm 15,649$), dok je najmanji broj spermatozoida zabeležen u grupi D ($68,324 \pm 13,534$). Signifikantne razlike ($p < 0,05$) su ustanovljene samo između ove dve grupe, dok ih, između ostalih grupa, nije bilo ($p > 0,05$). Najveće variranje, koje izlazi izvan granica homogenosti statističke serije (45,93%), je zabeleženo u grupi A (tabela 5.1.1).

U tabeli 5.1.2. su prikazani deskriptivni statistički parametri dobijeni izračunavanjem prosečnog broja spermatozoida po jednoj pajeti (0,25 mL).

Tabela 5.1.2. Deskriptivni statistički parametri dobijeni izračunavanjem broja spermatozoida 10^6 /dozi (CASA)

Grupe bikova	n	\bar{x}	SD	Sy	CV (%)	X max	X min
A	10	24,029	11,036	3,490	45,93	51,634	13,425
B	10	23,078	4,225	1,336	18,31	31,918	18,250
C	10	26,802 ^a	4,195	1,327	15,65	32,102	19,953
D	10	17,081 ^a	3,383	1,070	19,81	23,676	12,709

Statistička signifikantnost razlika u srednjim vrednostima je prikazana iistim slovima: a, $p < 0,01$

Analiza prosečnih vrednosti broja spermatozoida u jednoj dozi semena (u milionima), ukazala je da je najveće vrednosti ovog parametra imala grupa C ($26,802 \pm 4,195$), dok je najmanji broj spermatozoida registrovan u grupi D ($17,081 \pm 3,383$). Kao i u prethodnom slučaju, statistički signifikantne razlike ($p < 0,01$) su ustanovljene samo između ove dve grupe, ali ne i između ostalih ($p > 0,05$). Najveće variranje, koje izlazi izvan granica homogenosti statističke serije (45,93%), registrovano je u grupi A (tabela 5.1.2).

Analizirajući prosečne vrednosti procenta ukupno pokretljivih spermatozoida u jednoj dozi semena (%), ustanovljeno je da je najveće vrednosti imala grupa C ($54,14 \pm 10,95\%$), dok je najmanji procenat pokretnih spermatozoida zabeležen u grupi A ($42,95 \pm 12,23\%$). Između ispitivanih grupa nisu ustanovljene statistički signifikantne razlike ($p > 0,05$). Najveća variranja, koje izlaze izvan granica homogenosti statističke serije, zabeležena su u grupama D (38,46%) i B 36,38% (tabela 5.1.3).

Tabela 5.1.3. Deskriptivni statistički parametri dobijeni određivanjem procenta ukupno pokretljivih spermatozoida u dozi (CASA)

Grupe bkova	n	\bar{x} (%)	SD	Sy	CV (%)	X max	X min
A	10	42,95	12,23	3,868	28,48	67,50	20,40
B	10	49,10	17,86	5,649	36,38	71,40	14,70
C	10	54,14	10,95	3,464	20,23	70,10	40,50
D	10	51,66	19,87	6,283	38,46	73,30	16,60

Deskriptivni statistički parametri dobijeni određivanjem broja ukupno pokretljivih spermatozoida (10^6 /dozi) prikazani su u tabeli 5.1.4.

Tabela 5.1.4. Deskriptivni statistički parametri dobijeni određivanjem broja ukupno pokretljivih spermatozoida 10⁶/dozi (CASA)

Grupe bikova	n	\bar{x}	SD	Sy	CV (%)	X max	X min
A	10	11,303	8,896	2,813	78,70	34,873	2,736
B	10	11,457	4,948	1,565	43,19	20,178	3,163
C	10	14,337	4,665	1,475	32,54	22,106	9,066
D	10	9,028	4,545	1,437	50,34	17,356	3,209

Grupa C je imala najveće prosečne vrednosti broja ukupno pokretljivih spermatozoida u jednoj dozi semena (14,337±4,665), dok je najmanji broj pokretnih spermatozoida zabeležen u grupi D (9,028±4,545). Između ispitivanih grupa bikova nisu ustanovljene signifikantne razlike ($p>0,05$). U svim grupama zapaženo je visoko variranje, koje je bilo najveće kod grupe A (78,70%) a najmanje u grupi C (32,54%). Ovako visoko variranje podataka i relativno mala dubina statističkih serija, doprinelo je izostanku signifikantnih razlika (tabela 5.1.4).

U tabeli 5.1.5. su prikazani deskriptivni statistički parametri dobijeni izračunavanjem procenta progresivno pokretljivih spermatozoida u dozi (CASA)

Tabela 5.1.5. Deskriptivni statistički parametri dobijeni izračunavanjem procenta progresivno pokretljivih spermatozoida u dozi (CASA)

Grupe bikova	n	\bar{x}	SD	Sy	CV (%)	X max	X min
A	10	24,70	7,69	2,430	31,12	36,90	13,50
B	10	29,18	12,81	4,050	43,89	46,10	8,30
C	10	32,88	8,67	2,741	26,36	47,40	22,00
D	10	28,89	11,73	3,709	40,60	40,50	6,60

Analiza prosečnih vrednosti procenta progresivno pokretljivih spermatozoida ukazala je da je najveće vrednosti imala grupa C (32,88±8,67%), dok je najmanja pokretljivost spermatozoida zabeležena u grupi A (24,70±7,69%). Između ispitivanih grupa nisu ustanovljene statistički signifikantne razlike ($p>0,05$). Najveća variranja, koja izlaze izvan granica homogenosti statističke serije, zabeležena su u grupama B (43,89%) i D (40,60%) kao što je prikazano u tabeli 5.1.5.

Deskriptivni statistički parametri dobijeni određivanjem broja progresivno pokretljivih spermatozoida (10^6 /dozi) dati su u tabeli 5.1.6.

Tabela 5.1.6. Deskriptivni statistički parametri dobijeni određivanjem broja progresivno pokretljivih spermatozoida 10^6 /dozi (CASA)

Grupe bikova	n	\bar{x}	SD	Sy	CV (%)	X max	X min
A	10	6,351	4,883	1,544	76,88	19,029	2,170
B	10	6,769	3,185	1,007	47,05	12,121	1,801
C	10	8,679	3,141	0,993	36,19	15,203	5,379
D	10	5,012	2,557	0,808	51,02	9,523	1,281

Analizom prosečnih vrednosti broja progresivno pokretljivih spermatozoida u dozi (10^6) ustanovljeno je da je najveće vrednosti imala grupa C ($8,679 \pm 3,141$), dok je najmanje progresivno pokretljivih spermatozoida bilo u grupi D ($5,012 \pm 2,557$). Između ispitivanih grupa nisu ustanovljene signifikantne razlike ($p > 0,05$). U svim grupama je zabeleženo visoko variranje vrednosti ovog parametra, koje je bilo najveće u grupi A (76,88%) a najmanje u grupi C (36,19%). Visok stepen varijacija podataka i relativno mala dubina statističkih serija su doprineli izostanku statističke značajnosti razlika (tabela 5.1.6).

U tabeli 5.1.7. su prikazani deskriptivni statistički parametri dobijeni izračunavanjem procenta brzih spermatozoida u jednoj dozi semena CASA metodom.

Tabela 5.1.7. Deskriptivni statistički parametri dobijeni izračunavanjem procenta brzih spermatozoida u jednoj dozi (CASA)

Grupe bikova	n	\bar{x}	SD	Sy	CV (%)	X max	X min
A	10	29,46	10,16	3,214	34,50	49,10	16,20
B	10	33,92	15,94	5,040	46,99	53,60	7,70
C	10	39,27	11,77	3,721	29,96	60,80	25,10
D	10	35,47	17,05	5,391	48,06	56,30	6,50

Analiza prosečnih vrednosti procenta brzih spermatozoida u dozi, ukazala je da je najveće vrednosti imala grupa C ($39,27 \pm 11,77\%$), dok je najmanje brzih spermatozoida

zabeleženo u grupi A ($29,46 \pm 10,16\%$). Između ispitivanih grupa nisu utvrđene statistički signifikantne razlike ($p > 0,05$). U svim grupama bikova je uočeno visoko variranje vrednosti ovog parametra, koje je bilo najveće kod bikova grupe D ($48,06\%$) a najmanje kod bikova grupe C ($29,96\%$). Visok stepen variranja i mala dubina statističkih serija su usloveli izostanak statistički signifikantnih razlika (tabela 5.1.7).

Tabela 5.1.8. Deskriptivni statistički parametri za procenat živih spermatozoida u dozi (CASA)

Grupe bikova	n	\bar{x}	SD	Sy	CV (%)	X max	X min
A	10	55,00	10,07	3,183	18,30	74,00	39,00
B	10	57,90	20,11	6,359	34,73	85,00	17,00
C	10	59,80	12,25	3,875	20,49	76,00	43,00
D	10	61,40	13,68	4,326	22,28	78,00	34,00

Bikovi grupe su D imali najveći prosečni procenat živih spermatozoida ($61,40 \pm 13,68\%$) dok je najmanje živih spermatozoida registrovano u grupi A ($55,00 \pm 10,07\%$). Između ispitivanih grupa nisu ustanovljene statistički signifikantne razlike ($p > 0,05$), a najveće variranje ($34,73\%$), koje izlazi izvan granica homogenosti statističke serije, zabeleženo je kod bikova grupe B (tabela 5.1.8.).

Deskriptivni statistički parametri, dobijeni analizom procenta živih spermatozoida sa intaktnim akrozomom u dozi (CASA), prikazani su u tabeli 5.1.9. Njihova analiza ukazuje da su najveće prosečne vrednosti procenta živih spermatozoida sa intaktnim akrozomom ustanovljene u grupi C ($47,40 \pm 14,45\%$), dok je najmanje živih spermatozoida sa intaktnim akrozomom registrovano kod bikova grupe D ($46,80 \pm 14,73\%$).

Tabela 5.1.9. Deskriptivni statistički parametri dobijeni analizom procenta živih spermatozoida sa intaktnim akrozomom u dozi (CASA)

Grupe	n	\bar{x}	SD	Sy	CV (%)	X max	X min
A	10	46,90	8,94	2,826	19,06	64,00	36,00
B	10	47,30	17,55	5,550	37,10	75,00	14,00
C	10	47,40	14,45	4,571	30,49	70,00	18,00
D	10	46,80	14,73	4,659	31,48	66,00	19,00

Između ispitivanih grupa bikova nisu ustanovljene statistički signifikantne razlike u srednjim vrednostima ovog parametra ($p > 0,05$). Najveće variranje, koje izlazi izvan granica homogenosti statističke serije, zabeleženo u grupi B (37,10%) (tabela 5.1.9).

U tabeli 5.1.10. su izneti deskriptivni statistički parametri dobijeni određivanjem procenta živih spermatozoida sa oštećenim akrozomima u dozi (CASA).

Tabela 5.1.10. Deskriptivni statistički parametri dobijeni određivanjem procenta živih spermatozoida sa oštećenim akrozomima u dozi (CASA)

Grupe bikova	n	\bar{x}	SD	Sy	CV (%)	X max	X min
A	10	3,40 ^A	3,27	1,035	96,26	10,00	1,00
B	10	4,20	2,39	0,7572	57,01	9,00	0,00
C	10	2,70 ^a	2,83	0,8950	104,83	8,00	0,00
D	10	7,40 ^{Aa}	3,27	1,035	44,23	15,00	4,00

Statistička signifikantnost razlika u srednjim vrednostima prikazana je istim slovima: A, $p < 0,05$; a, $p < 0,01$

Analizom prosečnih vrednosti procenta živih spermatozoida sa oštećenim akrozomom ustanovljeno je da je u uzorcima semena bikova grupe D, bilo najviše ovih ćelija ($7,40 \pm 3,27\%$). Ovaj procenat je bio veoma signifikantno veći od procenta u grupi C ($2,70 \pm 2,83\%$) ($p < 0,01$) i značajno veći ($p < 0,05$) u odnosu na procenat registrovan u grupi A ($3,40 \pm 3,27\%$). Između ostalih grupa bikova nisu ustanovljene signifikantne razlike u srednjim vrednostima ovog parametra ($p > 0,05$). U svim ispitivanim grupama je zabeleženo visoko variranje procenta živih spermatozoida sa oštećenim akrozomima, koje je bilo najveće u grupi C (104,83%), a najmanje u grupi D (44,23%). Ovako visoko variranje podataka i relativno mala dubina statističkih serija su imali za posledicu izostanak statistički signifikantnih razlika između ostalih grupa (tabela 5.1.10).

Deskriptivni statistički parametri dobijeni izračunavanjem procenta ukupno oštećenih akrozoma u dozi semena (CASA) prikazani su u tabeli 5.1.11.

Tabela 5.1.11. Deskriptivni statistički parametri za procenat ukupno oštećenih akrozoma u dozi semena (CASA)

Grupe bikova	n	\bar{x}	SD	Sy	CV (%)	X max	X min
A	10	25,20	6,91	2,185	27,42	33,00	11,00
B	10	24,50	13,30	4,206	54,29	47,00	6,00
C	10	17,00	5,38	1,700	31,62	26,00	8,00
D	10	24,00	11,29	3,571	47,06	47,00	12,00

Analiza prosečnih vrednosti ukupnog procenta spermatozoida sa oštećenim akrozomom u dozi semena, ukazala je da su najveće vrednosti registrovane u j grupi A ($25,20 \pm 6,91\%$), dok je najmanji procenat spermatozoida sa oštećenim akrozomom zabeležen u grupi C ($17,00 \pm 5,37\%$). Između ispitivanih grupa nisu ustanovljene statističke signifikantne razlike ($p > 0,05$). Najveća variranja, koja izlaze izvan granica homogenosti statističke serije, zabeležena su u grupama B (54,29%) i D (47,06%) (tabela 5.1.11).

U tabeli 5.1.12. su prikazani deskriptivni statistički parametri dobijeni izračunavanjem procenta spermatozoida sa protoplazmatskom kapljicom.

Tabela 5.1.12. Deskriptivni statistički parametri dobijeni izračunavanjem procenta spermatozoida sa protoplazmatskom kapljicom (CASA)

Grupe bikova	n	\bar{x}	SD	Sy	CV (%)	X max	X min
A	10	1,70	2,00	0,6333	117,81	6,00	0,00
B	10	1,90	2,38	0,7520	125,17	8,00	0,00
C	10	1,80	1,32	0,4163	73,14	4,00	0,00
D	10	1,00	1,33	0,4216	133,33	4,00	0,00

Prosečne vrednosti procenta spermatozoida sa protoplazmatskom kapljicom su bile najveće u grupi B ($1,90 \pm 2,38\%$), dok je najmanja vrednost zabeležena u grupi D ($1,00 \pm 1,33\%$). Između ispitivanih grupa nisu ustanovljene statistički signifikantne razlike ($p > 0,05$). U svim grupama je uočljivo visoko variranje vrednosti ovog parametra, koje je bilo najveće u grupi A (117,81%) a najmanje u C grupi (73,14%). Visoke vrednosti koeficijenta varijacije i relativno mala dubina statističkih serija, imali su za posledicu izostanak statističke značajnosti razlika u srednjim vrednostima ovog parametra (tabela 5.1.12).

Deskriptivni statistički parametri dobijeni izračunavanjem procenta primarno abnormalnih, patološki promenjenih spermatozoida u dozi semena izneti su u tabeli 5.1.13.

Tabela 5.1.13. Deskriptivni statistički parametri dobijeni izračunavanjem procenta primarno abnormalnih, patološki promenjenih spermatozoida u dozi semena (CASA)

Grupe bikova	n	\bar{x}	SD	Sy	CV (%)	X max	X min
A	10	6,80	4,98	1,576	73,30	19,00	2,00
B	10	8,30	4,17	1,317	50,18	15,00	3,00
C	10	11,60	6,31	1,996	54,40	24,00	3,00
D	10	9,70	5,27	1,667	54,35	22,00	4,00

Prosečne vrednosti procenta primarno abnormalnih, odnosno patološki promenjenih spermatozoida su bile najveće u grupi C (11,60±6,31%), a najmanje u grupi A (6,80±4,98%). Između ispitivanih grupa bikova nisu ustanovljene statistički signifikantne razlike u srednjim vrednostima ovog parametra ($p>0,05$). Najveća variranja, izvan granica homogenosti statističke serije, su zabeležena u grupama A (73,30%) i C (54,40%) (tabela 5.1.13).

U tabeli 5.1.14, su prikazani deskriptivni statistički parametri za procenat sekundarno abnormalnih, patološki promenjenih spermatozoida u dozi semena.

Tabela 5.1.14. Deskriptivni statistički parametri za procenat sekundarno abnormalnih, patološki promenjenih spermatozoida u dozi semena (CASA)

Grupe bikova	n	\bar{x}	SD	Sy	CV (%)	X max	X min
A	10	3,50	1,96	0,6191	55,94	6,00	1,00
B	10	6,30	4,86	1,535	77,06	18,00	0,00
C	10	4,30	3,34	1,055	77,56	11,00	0,00
D	10	5,30	5,52	1,745	104,13	16,00	1,00

Analiza prosečnih vrednosti procenta sekundarno abnormalnih, odnosno patološki promenjenih spermatozoida u dozi, ukazala je da su one najveće u grupi B (6,30±4,86%), dok je najmanja vrednost zabeležena u grupi A (3,50±1,96%). Između ispitivanih grupa bikova nisu ustanovljene signifikantne razlike ($p>0,05$). U svim grupama bikova je zabeleženo

visoko variranje, koje je bilo najveće u grupi D (104,13%) a najmanje u grupi A (55,94%). Ovako visoko variranje podataka i relativno mala dubina statističkih serija su usloveli izostanak statistički signifikantnih razlika (tabela 5.1.14).

Deskriptivni statistički parametri za procenat ukupno patološki promenjenih spermatozoida prikazani su u tabeli 5.1.15. Iz prikazanih podataka se zapaža da su prosečne vrednosti procenta ukupno patološki promenjenih spermatozoida bile najveće u grupi C (15,90±7,80%), dok je najmanji broj promenjenih spermatozoida registrovan u grupi A (10,30±6,13%).

Tabela 5.1.15. Deskriptivni statistički parametri za procenat ukupno patološki promenjenih spermatozoida (CASA)

Grupe bikova	n	\bar{x}	SD	Sy	CV (%)	X max	X min
A	10	10,30	6,13	1,938	59,51	25,00	3,00
B	10	14,60	5,10	1,614	34,95	24,00	9,00
C	10	15,90	7,80	2,465	49,03	28,00	3,00
D	10	15,00	5,87	1,856	39,13	25,00	8,00

Usled visokih vrednosti koeficijenta varijacije i relativno male dubine statističkih serija, nisu ustanovljene statistički signifikantne razlike u srednjim vrednostima ($p>0,05$) procenta ukupno patološki promenjenih spermatozoida (tabela 5.1.15). U svim grupama bikova je zabeleženo visoko variranje, koje je bilo najveće u grupi A (59,51%), a najmanje u grupi B (34,95%).

U tabeli 5.1.16. su prikazani deskriptivni statistički parametri za procenat ćelija sa neoštećenim hromatinom u dozi, određen metodom protočne citometrije.

Tabela 5.1.16. Deskriptivni statistički parametri za procenat ćelija sa neoštećenim hromatinom u dozi (protočna citometrija)

Grupe bikova	n	\bar{x}	SD	Sy	CV (%)	X max	X min
A	10	90,15 ^a	6,39	2,020	7,09	97,26	76,86
B	10	63,97 ^a	22,18	7,013	34,67	85,01	22,32
C	10	79,56	13,53	4,279	17,01	93,33	58,55
D	10	77,66	10,52	3,327	13,55	87,09	53,53

Statistička signifikantnost razlika u srednjim vrednostima je prikazana istim slovima: a, $p<0,01$

Analizom prosečnih vrednosti statusa hromatina kod neoštećenih spermatozoida ustanovljeno je da je najveće vrednosti ovog parametra imala grupa A ($90,15 \pm 6,39\%$) i one su bile veoma signifikantno veće od najmanjih vrednosti ($63,97 \pm 22,18\%$) koje su zabeležene u grupi B ($p < 0,01$). Između ostalih ispitivanih grupa nisu ustanovljene statistički signifikantne razlike ($p > 0,05$). Najveće variranje, koje izlazi izvan granica homogenosti statističke serije ($34,67\%$), zabeleženo je u grupi B (tabela 5.1.16).

Deskriptivni statistički parametri za procenat ćelija sa oštećenim hromatinom u dozi određivanih metodom protočne citometrije prikazani su u tabeli 5.1.17.

Tabela 5.1.17. Deskriptivni statistički parametri za procenat ćelija sa oštećenim hromatinom u dozi (protočna citometrija)

Grupe bikova	n	\bar{x}	SD	Sy	CV (%)	X max	X min
A	10	9,93 ^a	6,47	2,046	65,17	23,14	2,74
B	10	35,14 ^a	21,30	6,737	60,64	77,68	14,99
C	10	19,94	12,95	4,094	64,93	41,45	6,67
D	10	22,34	10,52	3,327	47,10	46,47	12,91

Statistička signifikantnost razlika u srednjim vrednostima prikazana je istim slovima: a, $p < 0,01$

Analiza prosečnih vrednosti vrednosti procenta spermatozoida sa oštećenim hromatinom, ukazala je su najveće vrednosti registrovane u grupi B ($35,14 \pm 21,30$), dok je najmanji broj oštećenih spermatozoida imala grupa A ($9,93 \pm 6,47$). Samo su između ove dve grupe ustanovljene statistički signifikantne razlike ($p < 0,01$). U svim grupama bikova je uočljivo visoko variranje ovog parametra. Ono je bilo najveće u grupi A ($65,17\%$), a najmanje u grupi D ($47,10\%$). Ovako visoko variranje podataka i relativno mala dubina statističkih serija su usloveli izostanak statistički signifikantnih razlika u srednjim vrednostima između ostalih grupa (tabela 5.1.17).

U tabeli 5.1.18. su prikazani deskriptivni statistički parametri za procenat živih spermatozoida u dozi, određivani metodom protočne citometrije.

Tabela 5.1.18. Deskriptivni statistički parametri za procenat živih spermatozoida u dozi semena (protočna citometrija)

Grupe bikova	n	\bar{x}	SD	Sy	CV (%)	X max	X min
A	7	37,79 ^{Aa}	16,58	6,268	43,89	74,18	23,82
B	8	62,47 ^A	19,43	6,869	31,10	79,78	28,20
C	10	43,86 ^B	8,78	2,777	20,02	60,30	32,36
D	10	64,23 ^{aB}	16,36	5,175	25,48	85,74	30,10

Statistička signifikantnost razlika u srednjim vrednostima prikazana je istim slovima: A, B, $p < 0,05$; a, $p < 0,01$

Analizom prosečnih vrednosti procenta živih spermatozoida u dozi semena, ustanovljeno je da su one bile najmanje u grupi A ($37,79 \pm 16,58\%$) i bile su signifikantno manje od najvećih vrednosti procenta živih spermatozoida koji je zabeležen u grupi D ($64,23 \pm 16,36\%$); ($p < 0,01$). Takođe je procenat živih spermatozoida bio značajno manji u C grupi ($43,86 \pm 8,78\%$) u odnosu na grupu D ($64,23 \pm 16,36\%$) ($p < 0,05$). Vrednosti registrovane u grupi A su bile statistički signifikantno manje od vrednosti u grupi B ($62,47 \pm 19,43\%$) ($p < 0,05$). Između ostalih ispitivanih grupa nisu ustanovljene statistički signifikantne razlike u srednjim vrednostima ($p > 0,05$). U svim grupama bikova je uočljivo povećano variranje, koje je bilo najveće u grupi A (43,89%) a najmanje (20,02%) u C grupi (tabela 5.1.18).

Deskriptivni statistički parametri za procenat živih spermatozoida sa intaktnim akrozomom (ŽIA) u dozi semena određivanog protočnom citometrijom prikazani su u tabeli 5.1.19.

Tabela 5.1.19. Deskriptivni statistički parametri za procenat živih spermatozoida sa intaktnim akrozomom (ŽIA) u dozi semena (protočna citometrija)

Grupe bikova	n	\bar{x}	SD	Sy	CV (%)	X max	X min
A	7	36,27 ^{AB}	16,31	6,163	44,95	72,02	23,08
B	8	58,08 ^A	18,18	6,426	31,30	74,72	24,68
C	10	42,55	8,83	2,791	20,74	58,10	30,10
D	10	59,11 ^B	17,11	5,411	28,95	83,44	24,40

Statistička signifikantnost razlika u srednjim vrednostima prikazana je istim slovima: A, B, $p < 0,05$

Prosečne vrednosti procenta živih spermatozoida sa intaktnim akrozomom su bile najmanje u grupi A ($36,27 \pm 16,31\%$) i bile su statistički signifikantno manje od najvećih vrednosti procenta živih spermatozoida koji je zabeležen u grupi D ($59,11 \pm 17,11\%$) ($p < 0,05$). Procenat živih spermatozoida sa intaktnim akrozomom je bio značajno manji kod bikova grupe A ($36,27 \pm 16,31$) u odnosu na B grupu ($58,08 \pm 18,18\%$) ($p < 0,05$). Između ostalih ispitivanih grupa nisu ustanovljene statistički signifikantne razlike ($p > 0,05$). Najveći koeficijent varijacije ($44,95\%$), koji izlazi izvan granica homogenosti statističke serije, zabeležen je u grupi A (tabela 5.1.19).

U tabeli 5.1.20. su prikazani deskriptivni statistički parametri za procenat mrtvih spermatozoida sa intaktnim akrozomom (MIA) u dozi, određivani metodom protočne citometrije.

Tabela 5.1.20. Deskriptivni statistički parametri za procenat mrtvih spermatozoida sa intaktnim akrozomom (MIA) u dozi (protočna citometrija)

Grupe bikova	n	\bar{x}	SD	Sy	CV (%)	X max	X min
A	7	27,81	8,95	3,383	32,19	39,62	15,94
B	8	17,27 ^a	7,13	2,521	41,30	32,02	10,24
C	10	33,69 ^{ab}	7,53	2,381	22,35	45,02	20,84
D	10	19,14 ^b	8,57	2,709	44,75	37,28	7,320

Statistička signifikantnost razlika u srednjim vrednostima je prikazana istim slovima: a, b, $p < 0,01$

Prosečne vrednosti procenta mrtvih spermatozoida sa intaktnim akrozomom u dozi semena bika su bile najmanje u grupi B ($17,27 \pm 7,13\%$) i bile su statistički signifikantno manje ($p < 0,01$) od najvećih vrednosti procenta mrtvih spermatozoida sa intaktnim akrozomom zabeleženim u grupi C ($33,69 \pm 7,53\%$). Takođe je procenat mrtvih spermatozoida sa intaktnim akrozomom, bio značajno manji ($p < 0,01$) u grupi D ($19,14 \pm 8,57\%$) u odnosu na C grupu ($33,69 \pm 7,53\%$). Između ostalih ispitivanih grupa nisu ustanovljene statistički signifikantne razlike ($p > 0,05$). Najveće variranje, koje izlazi izvan granica homogenosti statističke serije, zabeleženo je u grupama D ($44,75\%$) i B $41,30\%$ (tabela 5.1.20).

Deskriptivni statistički parametri dobijeni izračunavanjem procenta živih spermatozoida sa oštećenim akrozomom (ŽOA) u dozi semena metodom protočne citometrije prikazani su u tabeli 5.1.21.

Tabela 5.1.21. Deskriptivni statistički parametri za procenat živih spermatozoida sa oštećenim akrozomom (ŽOA) u dozi (protočna citometrija)

Grupe bikova	n	\bar{x}	SD	Sy	CV (%)	X max	X min
A	7	1,51 ^{ab}	0,74	0,2797	48,96	2,50	0,74
B	8	4,39 ^{ac}	2,95	1,042	67,15	10,86	1,18
C	10	1,31 ^{cd}	0,57	0,1803	43,66	2,26	0,62
D	10	5,12 ^{bd}	1,17	0,3711	22,90	6,24	2,30

Statistička signifikantnost razlika u srednjim vrednostim prikazana je istim slovima: a, b, c, d, $p < 0,01$

Analiza prosečnih vrednosti živih spermatozoida sa oštećenim akrozomom ukazuje da je grupa C imala najmanje vrednosti ovog parametra ($1,31 \pm 0,57\%$) i one su bile statistički veoma signifikantno manje od najvećih vrednosti procenta živih spermatozoida sa oštećenim akrozomom koji je zabeležen u grupi D ($5,12 \pm 1,17\%$) ($p < 0,01$). Procenat ŽOA ćelija je bio veoma značajno manji u grupi C ($1,31 \pm 0,57\%$) u odnosu na B grupu ($4,39 \pm 2,95$) ($p < 0,01$). Grupa A ($1,51 \pm 0,74\%$) je imala statistički signifikantno manji procenat živih spermatozoida sa oštećenim akrozomom od grupe D ($5,12 \pm 1,17\%$) ($p < 0,01$). Na kraju, procenat živih spermatozoida sa oštećenim akrozomom je bio veoma značajno manji kod A grupe ($1,51 \pm 0,74\%$) u odnosu na grupu B ($4,39 \pm 2,95\%$) ($p < 0,01$). Između ostalih ispitivanih grupa nisu ustanovljene statistički signifikantne razlike ($p > 0,05$). Kod svih ispitivanih grupa je zabeleženo visoko variranje, koje je bilo najveće u grupi B (67,15%), a najmanje (22,90%) u D grupi (tabela 5.1.21).

U tabeli 5.1.22. su prikazani deskriptivni statistički parametri za procenat mrtvih spermatozoida sa oštećenim akrozomom (MOA) u dozi semena bika određeni metodom protočne citometrije.

Tabela 5.1.22. Deskriptivni statistički parametri za procenat mrtvih spermatozoida sa oštećenim akrozomom (MOA) u dozi (protočna citometrija)

Grupe bikova	n	\bar{x}	SD	Sy	CV (%)	X max	X min
A	7	37,91 ^{ABa}	10,19	3,853	26,89	51,16	23,94
B	8	20,23 ^A	14,96	5,289	73,96	47,48	9,04
C	10	22,45 ^B	10,12	3,199	45,05	46,80	14,42
D	10	16,61 ^a	7,92	2,506	47,70	32,62	6,94

Statistička signifikantnost razlika u srednjim vrednostima prikazana je istim slovima: A, B, $p < 0,05$; a, $p < 0,01$

Prosečne vrednosti mrtvih spermatozoida sa oštećenim akrozomom su bile najmanje u grupi D ($16,61 \pm 7,92\%$) i bile su statistički veoma signifikantno manje ($p < 0,01$) od najvećih vrednosti ovog parametra koji je zabeležen u grupi A ($37,91 \pm 10,19\%$). Grupa B ($20,23 \pm 14,96\%$) je imala signifikantno manji procenat mrtvih spermatozoida u odnosu na vrednosti grupe A ($p < 0,05$). Procenat mrtvih spermatozoida sa oštećenim akrozomom je bio značajno manji u C grupi ($22,45 \pm 10,12\%$) u odnosu na grupu A ($37,91 \pm 10,19$) ($p < 0,05$). Između ostalih ispitivanih grupa nisu ustanovljene statistički signifikantne razlike ($p > 0,05$). Kod svih grupa bikova je zabeleženo visoko variranje, koje je bilo najveće u grupi B ($73,96\%$) a najmanje u grupi A ($26,89\%$). Ovako visoko variranje podataka i relativno mala dubina statističkih serija su doprinele izostanku statistički signifikantnih razlika između ostalih grupa (tabela 5.1.22).

Deskriptivni statistički parametri dobijeni izračunavanjem ukupnog procenta spermatozoida sa oštećenim akrozomom u dozi semena, metodom protočne citometrije, prikazani su u tabeli 5.1.23.

Tabela 5.1.23. Deskriptivni statistički parametri za ukupan procenat spermatozoida sa oštećenim akrozomom u dozi semena (protočna citometrija)

Grupe bikova	n	\bar{x}	SD	Sy	CV (%)	X max	X min
A	7	$39,06^{AB}$	9,91	3,747	25,38	51,90	24,70
B	8	24,66	13,70	4,842	55,55	48,98	14,02
C	10	$23,76^A$	10,45	3,303	43,96	49,06	15,32
D	10	$21,74^B$	8,68	2,745	39,93	38,32	9,24

Statistička signifikantnost razlika u srednjim vrednostima prikazana je istim slovima: A, B, $p < 0,05$

Prosečne ukupne vrednostiprocenta mrtvih spermatozoida sa oštećenim akrozomom bile su najmanje u grupi D ($21,74 \pm 8,68\%$) i bile su statistički signifikantno manje ($p < 0,05$), od najvećih vrednosti procenta mrtvih spermatozoida koji je zabeležen u grupi A ($39,06 \pm 9,91\%$). Procenat mrtvih spermatozoida sa oštećenim akrozomom je bio značajno manji $p < 0,05$ u C grupi ($23,76 \pm 10,45\%$) u odnosu na grupu A ($39,06 \pm 9,91\%$). Između ostalih ispitivanih grupa nisu ustanovljene statistički signifikantne razlike ($p > 0,05$). Kod svih grupa je zabeleženo visoko variranje, koje je bilo najveće u grupi B ($55,55\%$), a najmanje u grupi A ($25,38\%$). Visoko variranje podataka i relativno mala dubina statističkih serija doprinelo je izostanku statistički signifikantnih razlika između srednjih vrednosti ovog

parametra registrovanih u ostalim grupama (tabela 5.1.23).

U tabeli 5.1.24. su prikazani deskriptivni statistički parametri za procenat spermatozoida sa neoštećenom membranom u dozi semena, određivani metodom protočne citometrije.

Tabela 5.1.24. Deskriptivni statistički parametri za procenat spermatozoida sa neoštećenim membranama u dozi (protočna citometrija, test permeabiliteta membrane spermatozoida, engl.viability assay)

Grupe bikova	n	\bar{x}	SD	Sy	CV (%)	X max	X min
A	10	41,46	10,20	3,226	24,60	63,75	31,13
B	10	49,23	21,20	6,703	43,06	77,30	10,32
C	10	45,11	9,50	3,005	21,07	61,81	33,42
D	10	47,80	18,04	5,704	37,73	74,44	12,49

Analizom prosečnih vrednosti procenta spermatozoida sa neoštećenom membranom ustanovljeno je da je najveće vrednosti imala grupa B ($49,23 \pm 21,20\%$), dok je najmanji procenat ovih spermatozoida zabeležen u grupi A ($41,46 \pm 10,20\%$). Između ispitivanih grupa nisu ustanovljene statistički signifikantne razlike u srednjim vrednostima ($p > 0,05$). Najveće variranje, koje izlazi izvan granica homogenosti statističke serije, zabeleženo je u grupama B (43,06%) i C (21,07%) (tabela 5.1.24).

Deskriptivni statistički parametri dobijeni određivanjem procenta spermatozoida sa oštećenom membranom u dozi semena metodom protočne citometrije, prikazani su u tabeli 5.1.25.

Tabela 5.1.25. Deskriptivni statistički parametri za procenat spermatozoida sa oštećenom membranom u dozi semena (protočna citometrija)

Grupe bikova	n	\bar{x}	SD	Sy	CV (%)	X max	X min
A	10	58,64	10,26	3,243	17,49	68,87	36,25
B	10	50,78	21,20	6,703	41,75	89,68	22,70
C	10	54,88	9,48	2,998	17,28	66,42	38,19
D	10	52,20	18,04	5,704	34,56	87,51	25,56

Analizom prosečnih vrednosti procenta spermatozoida sa oštećenom membranom ustanovljeno je da je grupa A imala najveće srednje vrednosti ovog parametra ($58,64 \pm 10,26\%$), dok je najmanji broj spermatozoida sa oštećenim membranama registrovan u grupi B ($50,78 \pm 21,20\%$). Između ispitivanih grupa nisu ustanovljene statistički signifikantne razlike u srednjim vrednostima ($p > 0,05$). Najveće variranje, koje izlazi izvan granica homogenosti statističke serije, zabeleženo je u grupama B (41,75%) i C (34,56%) (tabela 5.1.25).

U tabeli 5.1.26. su prikazani deskriptivni statistički parametri za krivolinijsku brzinu (engl. *curvilinear velocity* - VCL) spermatozoida izraženu u $\mu\text{m}/\text{sec}$.

Tabela 5.1.26. Deskriptivni statistički parametri krivolinijske brzine (VCL) spermatozoida ($\mu\text{m}/\text{sec}$)

	n	\bar{x}	SD	Sy	CV (%)	X max	X min
A	10	79,80	14,31	4,5240	17,93	98,96	53,25
B	10	73,12	17,51	5,5380	23,95	103,70	52,42
C	10	89,28 ^A	16,49	5,2140	18,47	123,20	66,15
D	10	69,46 ^A	10,64	3,3640	15,32	81,67	51,58

Statistička signifikantnost razlika u srednjim vrednostima prikazana je istim slovima: A, $p < 0,05$

Ovaj parametar označava prosečnu brzinu spermatozoida na njegovoj istinskoj putanji. Analiza prosečnih vrednosti VCL ukazala je da je najveće vrednosti imala grupa C ($89,28 \pm 16,49 \mu\text{m}/\text{sec}$), dok je najmanja vrednost zabeležena kod grupe D ($69,46 \pm 10,64 \mu\text{m}/\text{sec}$). Samo su između ove dve grupe ustanovljene su statistički signifikantne razlike u srednjim vrednostima ($p < 0,05$), dok to nije bio slučaj između ostalih grupa ($p > 0,05$). Najveće variranje, koje se nalazi u granicama homogenosti statističke serije, zabeleženo je u grupi B (23,95%).

Pravolinijska brzina (engl. *VSL-straight-line velocity*) označava prosečnu brzinu spermatozoida na pravolinijskoj putanji koja spaja prvu i poslednju slikanu poziciju spermatozoida i izražava se u $\mu\text{m}/\text{sec}$. Rezultati dobjeni određivanjem vrednosti ovog parametra prikazani su u tabeli 5.1.27.

Tabela 5.1.27. Deskriptivni statistički parametri pravolinijske brzine (VSL) spermatozoida ($\mu\text{m}/\text{sec}$)

	n	\bar{x}	SD	Sy	CV (%)	X max	X min
A	10	39,22	11,53	3,6460	29,40	55,25	20,03
B	10	41,98	13,28	4,2000	31,64	62,88	24,47
C	10	48,85	9,27	2,9320	18,98	62,85	36,24
D	10	36,25	6,64	2,1000	18,32	43,39	21,88

Rezultati analize prosečne linearne brzine spermatozoda ukazuju da je najveće vrednosti ovog parametra imala grupa C ($48,85 \pm 9,27 \mu\text{m}/\text{sec}$), dok je najmanja srednja vrednost VSL zabeležena u grupi D ($36,25 \pm 6,64 \mu\text{m}/\text{sec}$). Između ispitivanih grupa nisu ustanovljene statistički signifikantne razlike u srednjim vrednostima ($p > 0,05$). Najveće variranje, koje se nalazilo u granicama homogenosti statističke serije, zabeleženo je u grupi B (31,64%).

Prosečna brzina (engl. VAP - *average path velocity*), izražena u $\mu\text{m}/\text{sec}$ označava prosečnu brzinu spermatozoida na njegovoj prosečnoj putanji. Ova putanja se kompjuterski obračunava preko algoritma CASA instrumenta, kojom se „ispravlja“ krivolinijsko kretanje spermatozoida. Rezultati određivanja vrednosti ovog parametra i njihova statistička analiza su prikazani u tabeli 5.1.28.

Tabela 5.1.28. Deskriptivni statistički parametri prosečne brzine (VAP) spermatozoida ($\mu\text{m}/\text{sec}$)

	n	\bar{x}	SD	Sy	CV (%)	X max	X min
A	10	49,14	10,71	3,3860	21,79	62,75	30,66
B	10	51,46	14,44	4,5680	28,07	74,66	33,33
C	10	60,32 ^A	10,55	3,3360	17,49	78,28	45,52
D	10	46,86 ^A	8,01	2,5330	17,10	57,21	30,93

Statistička signifikantnost razlika u srednjim vrednostima prikazana je istim slovima: A, $p < 0,05$

Prosečne vrednosti VAP su bile najveće u grupi C ($60,32 \pm 10,55 \mu\text{m}/\text{sec}$), a najmanje u grupi D ($46,86 \pm 8,01 \mu\text{m}/\text{sec}$). Samo je između ove dve grupe ustanovljena statistički

signifikantna razlika u srednjim vrednostima ($p < 0,05$). Najveće variranje, koje se nalazilo u granicama homogenosti statističke serije, zabeleženo je u grupi B (28,07%).

Amplituda lateralnog otklona (engl. ALH - *amplitude of lateral head displacement*) predstavlja pomeranja glave u odnosu na prosečnu putanju kretanja izraženu u μm . Ovi rezultati su prikazani u tabeli 5.1.29.

Tabela 5.1.29. Deskriptivni statistički parametri za amplitudu lateralnog otklona (ALH) spermatozoida (μm)

	n	\bar{x}	SD	Sy	CV (%)	X max	X min
A	10	3,53 ^{AB}	0,32	0,1016	9,09	3,98	2,97
B	10	3,01 ^{AC}	0,49	0,1566	16,46	3,94	2,34
C	10	3,62 ^{aC}	0,54	0,1701	14,84	4,71	3,02
D	10	2,94 ^{aB}	0,29	0,0931	10,02	3,34	2,48

Statistička signifikantnost razlika u srednjim vrednostima prikazana je istim slovima: a, $p < 0,01$; A, B, C $p < 0,05$

Analizom prosečnih vrednosti ALH ustanovljeno je da je grupa D imala najmanju srednju vrednost ovog parametra ($2,94 \pm 0,29 \mu\text{m}$), što je statistički vrlo značajno manje ($p < 0,01$) od prosečne vrednosti grupe C ($3,62 \pm 0,54 \mu\text{m}$), a značajno manje ($p < 0,05$) od one u grupi A ($3,53 \pm 0,32 \mu\text{m}$). Grupa B ($3,01 \pm 0,49 \mu\text{m}$) je imala vrednosti koje su značajno ($p < 0,05$) manje nego u grupama A ($3,53 \pm 0,32 \mu\text{m}$) i C ($3,62 \pm 0,54 \mu\text{m}$). Između ostalih grupa nisu ustanovljene statistički signifikantne razlike ($p > 0,05$). Najveće variranje, koje je bilo u granicama homogenosti statističke serije, zabeleženo je u grupi B (16,46%).

Indeks linearnosti (engl. LIN-*linearity*), se izražava u procentima i odnosi se na linearnost krivolinijske putanje. On se dobija izračunavanjem odnosa VSL/VCL.

Tabela 5.1.30. Deskriptivni statistički parametri dobijeni izračunavanjem indeksa linearnosti (%)

	n	\bar{x}	SD	Sy	CV (%)	X max	X min
A	10	48,19 ^A	7,14	2,2560	14,81	60,31	37,62
B	10	56,50 ^A	6,64	2,1000	11,75	64,78	43,24
C	10	54,80	4,60	1,4550	8,39	64,34	50,25
D	10	52,03	4,56	1,4410	8,76	57,59	42,41

Statistička signifikantnost razlika u srednjim vrednostima prikazana je istim slovima: A, $p < 0,05$

Prosečne vrednosti indeksa linearnosti su bile najveće u grupi B ($56,50 \pm 6,64\%$), a najmanje u grupi A ($48,19 \pm 7,14\%$). Statistički signifikantne razlike u srednjim vrednostima su dokazane samo između ove dve grupe ($p < 0,05$), ali ne i između ostalih ($p > 0,05$). Najveće variranje, koje se nalazilo u granicama homogenosti statističke serije, zabeleženo je u grupi A (14,81%).

Indeks oscilacije (engl. WOB - *wobble*) se izražava u procentima i odnosi se na stepen oscilacije istinske putanje u odnosu na prosečnu putanju i dobija se odnosom VAP/VCL. Rezultati dobijeni određivanjem ovog parametra prikazani su u tabeli 5.1.31.

Tabela 5.1.31. Deskriptivni statistički parametri indeksa oscilacije (%)

	n	\bar{x}	SD	Sy	CV (%)	X max	X min
A	10	61,18abc	3,58	1,1320	5,85	68,50	55,68
B	10	69,74a	4,74	1,4980	6,79	75,77	60,63
C	10	67,73b	3,95	1,2470	5,82	74,68	63,57
D	10	67,32c	3,74	1,1830	5,56	71,97	59,96

Statistička signifikantnost razlika u srednjim vrednostima prikazana je istim slovima: a, b, c, $p < 0,01$

Analizom prosečnih vrednosti indeksa oscilacije (WOB) je ustanovljeno da je grupa A imala najmanju vrednost ovog parametra ($61,18 \pm 3,58\%$), što je statistički vrlo značajno manje ($p < 0,01$) od prosečnih vrednosti registrovanih u ostalim ispitivanim grupama B ($69,74 \pm 4,74\%$), C ($67,73 \pm 3,95\%$) i D ($67,32 \pm 3,74\%$). Između ostalih grupa nisu ustanovljene statistički signifikantne razlike ($p > 0,05$). U svim oglednim grupama su koeficijenti varijacija bili veoma niski (tabela 5.1.31).

Pravolinijski indeks (engl. STR - *straightness*), se takođe izražava u procentima i odnosi se na linearnost na prosečnoj putanji i dobija se izračunavanjem odnosa VSL/VAP. Rezultati dobijeni određivanjem ovog parametra su prikazani u tabeli 5.1.32.

Tabela 5.1.32. Deskriptivni statistički parametri pravolinijskog indeksa (%) STR

	n	\bar{x}	SD	Sy	CV (%)	X max	X min
A	10	78,44	7,72	2,4400	9,84	88,05	65,34
B	10	80,77	4,75	1,5020	5,88	85,49	71,31
C	10	80,82	2,44	0,7707	3,02	86,16	76,83
D	10	77,18	3,17	1,0020	4,11	81,22	70,73

Analizom prosečnih vrednosti pravolinijskog indeksa (STR) ustanovljeno je da je najveće srednje vrednosti ovog parametra imala grupa C ($80,82 \pm 2,44\%$), a najmanje grupa D ($77,18 \pm 3,17\%$). Između ispitivanih grupa nisu ustanovljene statistički signifikantne razlike ($p > 0,05$). Variranja podataka su, u svim grupama bikova, bila mala.

Frekvencija prelaska pravolinijske putanje u sekundi (engl. BCF - *beat-cross frequency*), se izražava u hercima (Hz). Ona zapravo predstavlja prosečan broj prelazaka krivolinijske putanje preko pravolinijske putanje. Rezultati dobijeni određivanjem ovog parametra prikazani su u tabeli 5.1.33.

Tabela 5.1.33. Deskriptivni statistički parametri frekvence prelaska pravolinijske putanje (Hz)

	n	\bar{x}	SD	Sy	CV (%)	X max	X min
A	10	10,51	1,87	0,5919	17,82	12,62	7,27
B	10	10,24	0,79	0,2492	7,70	11,40	8,74
C	10	10,21	0,56	0,1767	5,47	10,95	9,18
D	10	9,61	0,93	0,2950	9,71	10,47	7,37

Najveće prosečne vrednosti ovog parametra (BCF) su ustanovljene u grupi A ($10,51 \pm 1,87$ Hz), dok su najmanje srednje vrednosti zabeležene u grupi D ($9,61 \pm 0,93$ Hz). Između ispitivanih grupa nisu ustanovljene statistički signifikantne razlike ($p > 0,05$). Najveće variranje, koje se nalazilo u granicama homogenosti statističke serije, zabeleženo je u grupi A (17,82%).

U tabeli 5.1.34. su prikazani rezultati dobijeni registrovanjem stepena manježnog kretanja spermatozida

Tabela 5.1.34. Deskriptivni statistički parametri dobijeni određivanjem stepena manježnog kretanja spermatozoida

	n	\bar{x}	SD	Sy	CV (%)	X max	X min
A	10	23,88	9,08	2,8720	38,04	38,97	8,17
B	10	21,91	7,82	2,4720	35,68	32,84	6,47
C	10	25,31	5,83	1,8420	23,02	37,66	19,89
D	10	26,23	10,64	3,3660	40,58	38,29	11,07

Analizom prosečnih vrednosti procenta manježnog kretanja spermatozoida, ustanovljeno je da su one bile najveće u grupi D ($26,23 \pm 10,64\%$), dok je najmanja vrednost zabeležena kod grupe B ($21,91 \pm 7,82\%$). Između ispitivanih grupa nisu ustanovljene signifikantne razlike ($p > 0,05$). Kod svih grupa je zabeleženo visoko variranje, koje je bilo najveće u grupi D (40,58%), a najmanje u grupi C (23,02%). Ovako visoko variranje podataka i relativno mala dubina statističkih serija imali su za posledicu izostanak statistički signifikantnih razlika u srednjim vrednostima.

Na kraju ovog podpoglavlja, prikazani su rezultati dobijeni određivanjem prosečne površine glave spermatozoida (μm^2).

Tabela 5.1.35. Deskriptivni statistički vrednosti dobijeni izračunavanjem površine glave spermatozoida (μm^2)

	n	\bar{x}	SD	Sy	CV (%)	X max	X min
A	10	25,62 ^{abA}	1,39	0,4405	5,44	27,31	23,37
B	10	27,60 ^{cAB}	1,38	0,4371	5,01	30,33	25,43
C	10	30,73 ^{ac}	1,23	0,3903	4,02	33,41	29,32
D	10	29,32 ^{bB}	1,36	0,4305	4,64	31,52	27,24

Statistička signifikantnost razlika u srednjim vrednostima prikazana je istim slovima: a, b, c, $p < 0,01$; A, B, $p < 0,05$

Analizom prosečnih vrednosti površine glave spermatozoida ustanovljeno je da je najmanju srednju vrednost imala grupa A ($25,62 \pm 1,39 \mu\text{m}^2$), što je bilo statistički vrlo značajno manje ($p < 0,01$) od prosečne vrednosti u grupama C ($30,73 \pm 1,23 \mu\text{m}^2$) i D ($29,32 \pm 1,36 \mu\text{m}^2$), a značajno manje ($p < 0,05$) od onih u grupi B ($27,60 \pm 1,38 \mu\text{m}^2$). Grupa B ($27,60 \pm 1,38 \mu\text{m}^2$) je imala vrednost koja je statistički vrlo značajno manja ($p < 0,01$) od

vrednosti grupe C ($30,73 \pm 1,23 \mu\text{m}^2$), a značajno manja ($p < 0,05$) od vrednosti grupe D ($29,32 \pm 1,36 \mu\text{m}^2$). Između prosečnih vrednosti registrovanih u grupama C i D, nisu ustanovljene statistički signifikantne razlike ($p > 0,05$). U svim grupama bikova su ustanovljena minimalna variranja.

5.2. Rezultati određivanja koncentracije teških metala u hranivima, vodi za piće i vodi za razređivač za seme

U tabelama (5.2.1. – 5.2.4) su prikazani rezultati analize količine teških metala u senu i koncentrovanim hranivima, vodi za piće i vodi za izradu razređivača za seme bikova.

U tabeli 5.2.1. su prikazani rezultati dobijeni određivanjem koncentracije teških metala u uzorcima sena (mg/kg) kojim su hranjeni bikovi tokom prethodnih 6 meseci od momenta uzimanja semena za duboko zamrzavanje.

Tabela 5.2.1. Koncentracija teških metala u uzorcima sena (mg/kg)

Grupe bikova	Zn	Hg	Pb	Cd
A	12	0,12	5,4	0,16
B	16	0,52	2,8	0,16
C	17	0,11	3,8	0,19
D	16	0,41	2,2	0,11

Kao što se može videti iz podataka prikazanih u tabeli 5.2.1, najmanja koncentracija **cinka** je utvrđena u senu kojim je hranjena grupa bikova A i iznosila je 12 mg/kg, dok su kod ostalih grupa vrednosti za koncentraciju cinka bile približno iste. Koncentracija **žive** je bila najveća u grupama B i D (0,52 i 0,41 mg/kg) dok su ostalim grupama vrednosti bile četverostruko niže. Koncentracija **olova** u senu je bila najveća u grupi A i iznosila je 5,4 mg/kg, a najniža u grupi D (2,2 mg/kg). Koncentracija **kadmijuma** je bila najniža u grupi D i iznosila je 0,11 mg/kg, dok je kod ostalih grupa bila za 50 do 80% viša. Kako je određivanje koncentracije teških metala vršeno u samo jednom uzorku sena, nije rađena statistička analiza.

Rezultati dobijeni određivanjem koncentracije teških metala u koncentrovanim hranivima (mg/kg) kojima su hranjeni bikovi tokom prethodnih šest meseci do momenta uzimanja semena za duboko zamrzavanje, prikazani su u tabeli 5.2.2.

Tabela 5.2.2. Koncentracija teških metala u koncentrovanim hranivima (mg/kg)

Grupe bikova	Zn	Hg	Pb	Cd
A	50	0,08	1,3	0,22
B	78	0,65	1,8	0,18
C	84	0,14	1,6	0,14
D	51	0,62	2,5	0,15

Iz podataka prikazanih u tabeli 5.2.2. se zapaža, da je koncentracija **cinka** u koncentrovanim hranivima bila najviša u grupama C i B (84 i 78 mg/kg), a niža u ostalim grupama (50 i 51 mg/kg). Koncentracija **žive** je bila veća u grupama B i D (0,65 i 0,62 mg/kg) u odnosu na grupe A i C (0,08 i 0,14 mg/kg). Koncentracija **olova** je bila najveća u grupi D i iznosila je 2,5 mg/kg, dok je količina **kadmijuma** bila najveća u grupi A i iznosila je 0,22 mg/kg. Kako je određivanje koncentracije teških metala vršeno u samo jednom uzorku koncentrovanog hraniva, korišćenog za ishranu bikova, nije rađena statistička analiza.

U Tabeli 5.2.3. su prikazani rezultati dobijeni određivanjem koncentracije teških metala u vodi kojom su napajani bikovi .

Tabela 5.2.3. Koncentracija teških metala u vodi za piće (mg/L)

Grupe bikova	Zn	Hg	Pb	Cd
A	0,18	<0,001	0,012	< 0,001
B	0,03	<0,001	0,020	0,0013
C	0,04	<0,001	0,022	0,0014
D	0,74	<0,001	0,020	0,0010

Koncentracija **cinka** u vodi za piće (tabela 5.2.3) je bila najveća u grupi D u odnosu na sve ostale grupe i iznosila je 0,74 mg/L. Koncentracija **žive** je u svim ispitivanim grupama bila je manja od 0,001 mg/L što je u isto vreme i granica osetljivosti metode. Koncentracija **olova** u vodi za piće je bila najmanja u grupi A i iznosila je 0,012 mg/L, dok je u ostalim ispitivanim grupama bila približno ista (0,20 – 0,22 mg/mL). Koncentracija **kadmijuma** u vodi za piće je bila najmanja u grupi A i bila je manja od 0,001 mg/L, dok su u ostalim grupama vrednosti bile nešto veće i približno iste. Kako je određivanje koncentracije teških

metala vršeno u samo jednom uzorku vode kojom su napajani bikovi, nije rađena statistička analiza.

U tabeli 5.2.4. su izneti podaci dobijeni određivanjem koncentracije teških metala u vodi za pripremu razređivača za seme (mg/L).

Tabela 5.2.4. Koncentracija teških metala u vodi za pripremu razređivača za seme (mg/L)

Grupe bikova	Zn	Hg	Pb	Cd
A	0,006	<0,001	0,004	< 0,001
B	0,002	<0,001	0,003	< 0,001
C	< 0,001	<0,001	0,003	< 0,001
D	0,002	<0,001	0,004	< 0,001

Kao što vidi iz podataka prikazanih u tabeli 5.2.4, koncentracije **žive, olova i kadmijuma** u vodi koja je korišćena za pripremu razređivača za seme, bile su približno iste u svim ispitivanim grupama. Jedino je koncentracija **cinka** bila veća u uzorku vode korišćene u centru A. Kako je određivanje koncentracije teških metala vršeno u samo jednom uzorku vode za pripremu razređivača za seme, nije rađena statistička analiza.

3. Rezultati određivanja koncentracije teških metala u duboko zamrznutom semenu bikova oglednih grupa

U tabelama od 5.3.1 do 5.3.4. su prikazani rezultati dobijeni određivanjem koncentracije teških metala u duboko zamrznutom semenu bikova.

U tabeli 5.3.1. su prikazani deskriptivni statistički parametri izračunati posle određivanja koncentracije cinka u duboko zamrznutom semenu bikova oglednih grupa.

Tabela 5.3.1. Deskriptivni statistički parametri za koncentraciju cinka u semenu ispitivanih grupa bikova ($\mu\text{g/mL}$)

Grupe bikova	n	\bar{x}	SD	Sy	CV (%)	X max	X min
A	10	6,44 ^a	0,57	0,1790	8,79	7,50	5,80
B	10	3,15 ^{aA}	2,74	0,8675	87,08	8,60	1,00
C	10	6,08 ^A	1,25	0,3958	20,58	9,40	4,90
D	10	3,84	3,12	0,9864	81,17	8,90	0,81

Statistička signifikantnost razlika u srednjim vrednostima prikazana je istim slovima: A, B, $p < 0,05$; a, $p < 0,01$

Statističkom analizom koncentracije cinka u dozama semena ispitivanih grupa bikova je ustanovljeno da su najnižu koncentraciju imali bikovi grupe B ($3,15 \pm 2,74 \mu\text{g/mL}$). Ona je bila vrlo značajno manja ($p < 0,01$) u odnosu na koncentraciju u grupi A ($6,44 \pm 0,57 \mu\text{g/mL}$) i značajno manja ($p < 0,05$) u odnosu na grupu C ($6,08 \pm 1,25 \mu\text{g/mL}$). Između srednjih vrednosti, registrovanih u ostalim grupama, nisu ustanovljene statistički signifikantne razlike ($p > 0,05$). Koeficijenti varijacije su bili veoma visoki u grupama B (87,08%) i D (81,17%), dok su na zadovoljavajućem nivou bili u grupama A (8,79%) i C (20,58). Ovako veliki koeficijenti varijacija predstavljaju jedan od razloga za izostanak statistički signifikantnih razlika u srednjim vrednostima između ostalih ispitivanih grupa (tabela 5.3.1).

Deskriptivni statistički parametri izračunati posle određivanja koncentracije žive ($\mu\text{g/mL}$) u duboko zamrznutom semenu bikova ispitivanih grupa prikazani su u tabeli 5.3.2

Tabela 5.3.2. Deskriptivni statistički parametri za koncentraciju žive u duboko zamrznutom semenu bikova ($\mu\text{g/mL}$)

Grupe bikova	n	\bar{x}	SD	Sy	CV (%)	X max	X min
A	10	0,07 ^{ab}	0,01	0,0035	16,73	0,088	0,053
B	10	0,04 ^{ac}	0,01	0,0023	17,94	0,054	0,030
C	10	0,06 ^{cd}	0,01	0,0045	23,20	0,082	0,040
D	10	0,03 ^{bd}	0,01	0,0020	19,61	0,042	0,024

Statistička signifikantnost razlika u srednjim vrednostima prikazana je istim slovima: A, B, $p < 0,05$; a, b, c, d, $p < 0,01$

Statističkom analizom koncentracije žive u duboko zamrznutom semenu bikova ustanovljeno je da su najmanje koncentracije registrovane u grupama D ($0,03 \pm 0,01 \mu\text{g/mL}$) i B ($0,04 \pm 0,01 \mu\text{g/mL}$) i one su bile vrlo značajno manje ($p < 0,01$) u odnosu na koncentracije u grupama A ($0,07 \pm 0,01 \mu\text{g/mL}$) i C ($0,06 \pm 0,01 \mu\text{g/mL}$). Između ostalih grupa nisu ustanovljene statistički signifikantne razlike u srednjim vrednostima ($p > 0,05$). Koeficijenti varijacije su bili u granicama homogenosti statističkih serija (tabela 5.3.2).

U tabeli 5.3.3. su prikazani deskriptivni statistički parametri dobijeni nakon određivanja koncentracije olova ($\mu\text{g/mL}$) u duboko zamrznutom semenu bikova.

Tabela 5.3.3. Deskriptivni statistički parametri za koncentraciju olova u duboko zamrznutom semenu bikova ($\mu\text{g/mL}$)

Grupe bikova	n	\bar{x}	SD	Sy	CV (%)	X max	X min
A	10	0,02 ^{ab}	0,005	0,0016	23,43	0,029	0,014
B	10	0,04 ^{ac}	0,009	0,0027	20,57	0,059	0,029
C	10	0,07 ^{bcd}	0,017	0,0055	23,87	0,095	0,041
D	10	0,03 ^d	0,018	0,0056	64,40	0,065	0,011

Statistička signifikantnost razlika u srednjim vrednostima prikazana je istim slovima: A, B, $p < 0,05$; a, $p < 0,01$

Statističkom analizom koncentracije olova u duboko zamrznutom semenu bikova, ustanovljeno je da je njegova najveća koncentracija u grupi C ($0,07 \pm 0,017 \mu\text{g/mL}$) i ona je bila vrlo značajno veća ($p < 0,01$) u odnosu na sve ostale ispitivane grupe. Vrlo značajna razlika ($p < 0,01$) je ustanovljena i između grupe A ($0,02 \pm 0,005 \mu\text{g/mL}$) i grupe B ($0,04 \pm 0,009$

$\mu\text{g/mL}$). Između ostalih grupa nije ustanovljena statistički signifikantna razlika ($p>0,05$). Koeficijenti varijacije su bili u granicama homogenosti statističkih serija izuzev u grupi D u kojoj je vrednost ovog parametra iznosila 64,40% (tabela 5.3.3).

Tokom određivanja koncentracije kadmijuma u duboko zamrznutom semenu bikova utvrđeno je da su sve ispitivane vrednosti bile ispod granica osetljivosti metode.

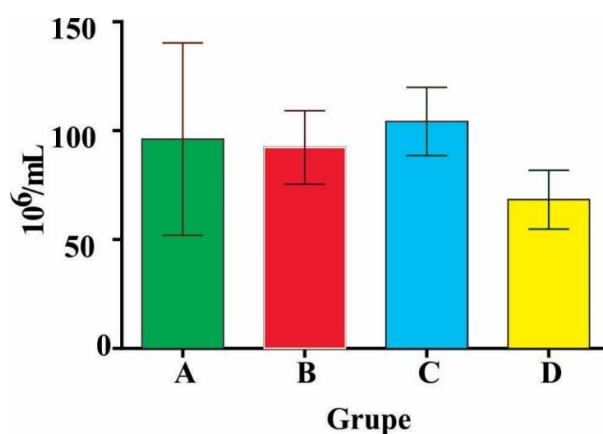
5.4. Ukupan broj živih aerobnih mikroorganizama u duboko zamrznutom semenu bikova

Analizom 40 uzoraka duboko zamrznutog i zatim otopljenog semena bikova nisu izolovani aerobni mikroorganizmi.

6. Diskusija

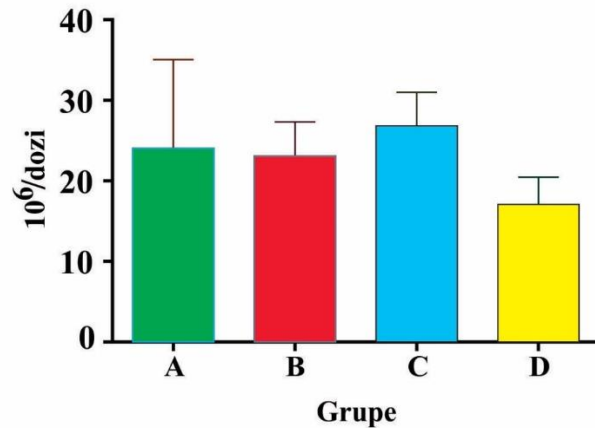
U skladu sa postavljenim ciljevima i prikazanim rezultatima poglavlje Diskusija je takođe podeljeno u sledeća podpoglavlja: 6.1. Ocena kvaliteta duboko zamrznutog semena posle otapanja; 6.2. Analiza hrane, vode za piće i vode za razređivač za seme na količinu teških metala; 6.3. Analiza koncentracije teških metala u duboko zamrznutom semenu bikova i 6.4. Mikrobiološka analiza duboko zamrznutog semena.

6.1. Ocena kvaliteta duboko zamrznutog semena posle otapanja



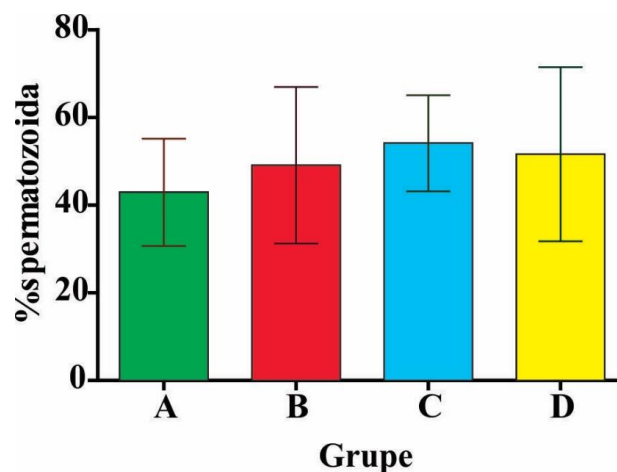
Grafikon 6.1.1. Prosečne vrednosti koncentracije spermatozoida ($10^6/\text{mL}$)

Kao što je izneto u prethodnom poglavlju, najveća koncentracija spermatozoida ($10^6/\text{mL}$) ustanovljena je u grupi C ($104,235 \pm 15,649$), a najmanja u grupi D ($68,324 \pm 13,534$) (Grafikon 6.1.1). Statistički signifikantne razlike su ustanovljene samo između ove dve grupe ($p < 0,05$).



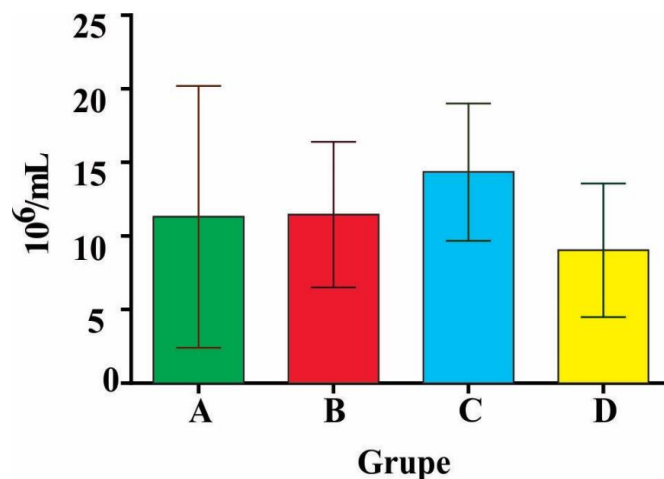
Grafikon 6.1.2. Prosečne vrednosti broja spermatozoida u dozi ($10^6/\text{mL}$)

Najveće prosečne vrednosti broja spermatozoida u jednoj dozi semena ($10^6/\text{mL}$) su ustanovljene u grupi C ($26,802 \pm 4,195$), a najmanje u grupi D ($17,081 \pm 3,383$) (Grafikon 6.1.2). Statistički signifikantne razlike su ustanovljene samo između ove dve grupe ($p < 0,01$). Međutim, ova razlika je bila posledica različitih normativa koji se primenjuju za punjenje pajeta u centima A, B i C i centru D.



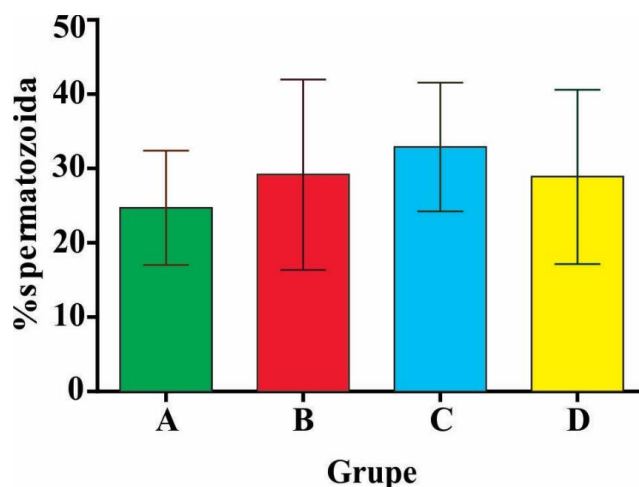
Grafikon 6.1.3. Prosečne vrednosti procenta ukupno pokretnih spermatozoida u dozi

Najveće vrednosti procenta ukupno pokretnih spermatozoida u jednoj dozi ($54,14 \pm 10,95$) registrovane su u grupi C, a najmanje u grupi A ($42,95 \pm 12,23$) (Grafikon 6.1.3). Između grupa bikova nisu ustanovljene statistički signifikantne razlike ($p > 0,05$).



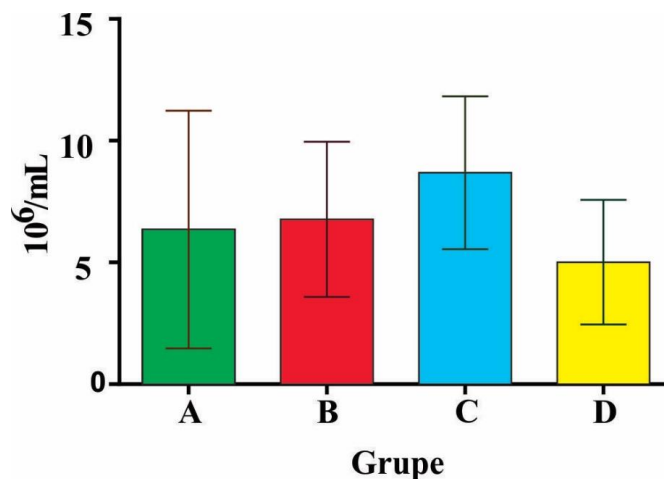
Grafikon 6.1.4. Prosečne vrednosti broja ukupno pokretljivih spermatozoida u dozi (10⁶/mL)

Najveće prosečne vrednosti broja ukupno pokretljivih spermatozoida u jednoj dozi semena ustanovljene su u grupi C (14,337±4,665 x 10⁶/mL), dok je najmanji broj zabeležen u grupi D (9,028±4,545 x 10⁶/mL) (Grafikon 6.1.4). Između ispitivanih grupa nisu ustanovljene statistički signifikantne razlike (p>0,05).



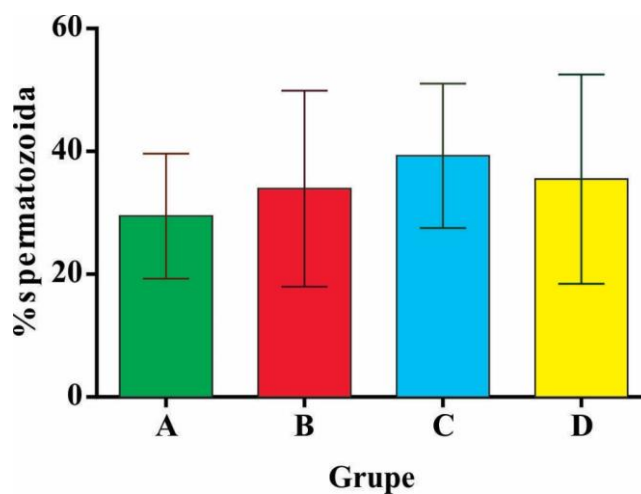
Grafikon 6.1.5. Prosečne vrednosti procenta progresivno pokretljivih spermatozoida u dozi

Grupa C je imala najveće vrednosti procenta progresivno pokretljivih spermatozoida (32,88±8,67), dok je najmanja vrednost ovog parametra zabeležena u grupi A (24,70±7,69) (Grafikon 6.1.5). Između ispitivanih grupa nisu ustanovljene statistički signifikantne razlike (p>0,05).



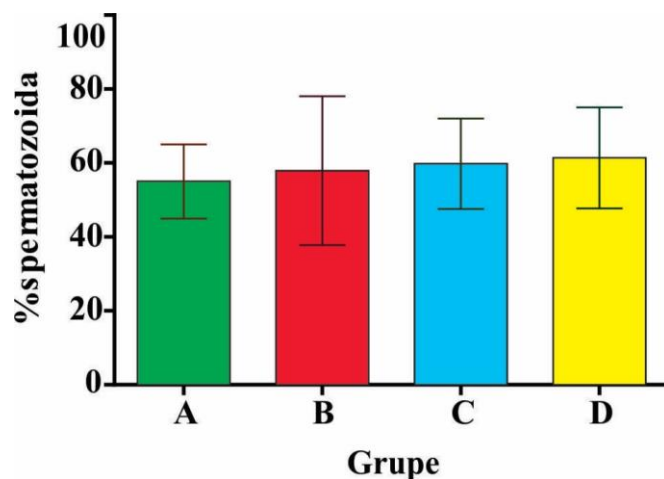
Grafikon 6.1.6. Prosečne vrednosti broja progresivno pokretljivih spermatozoida u dozi (10⁶/mL)

Najveće prosečne vrednosti broja progresivno pokretljivih spermatozoida u dozi, registrovane su u grupi C (8,679±3,141 x 10⁶/mL), dok je najmanji prosečan broj zabeležen u grupi D (5,012±2,557 x 10⁶/mL) (Grafikon 6.1.6). Između ispitivanih grupa nisu ustanovljene signifikantne razlike (p>0,05).



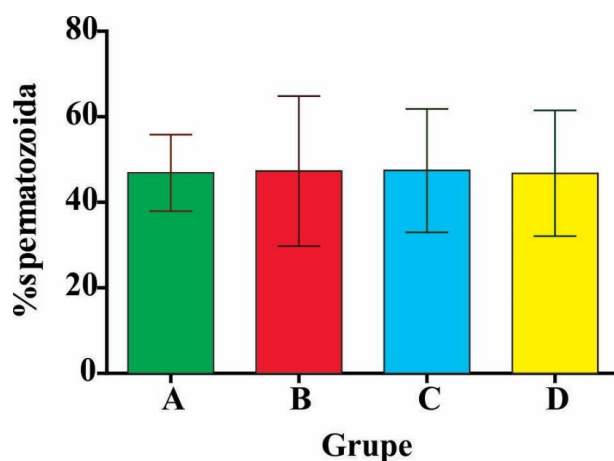
Grafikon 6.1.7. Prosečne vrednosti procenta brzih spermatozoida u dozi

Prosečne vrednosti procenta brzih spermatozoida u dozi su bile najveće u grupi C (39,27±11,77), dok je najmanje brzih spermatozoida registrovano u grupi A (29,46±10,16) (Grafikon 6.1.7). Između ispitivanih grupa nisu ustanovljene statistički signifikantne razlike (p>0,05).



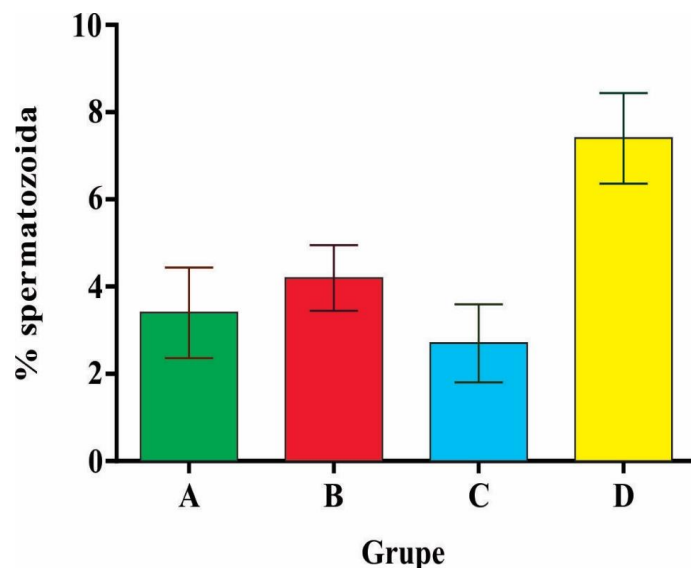
Grafikon 6.1.8. Prosečne vrednosti procenta živih spermatozoida u dozi

Grupa D je imala najveće prosečne vrednosti procenta živih spermatozoida ($61,40 \pm 13,68$), dok je najmanji procenat živih spermatozoida zabeležen u grupi A ($55,00 \pm 10,07$) (Grafikon 6.1.8). Između ispitivanih grupa nisu ustanovljene statistički signifikantne razlike ($p > 0,05$).



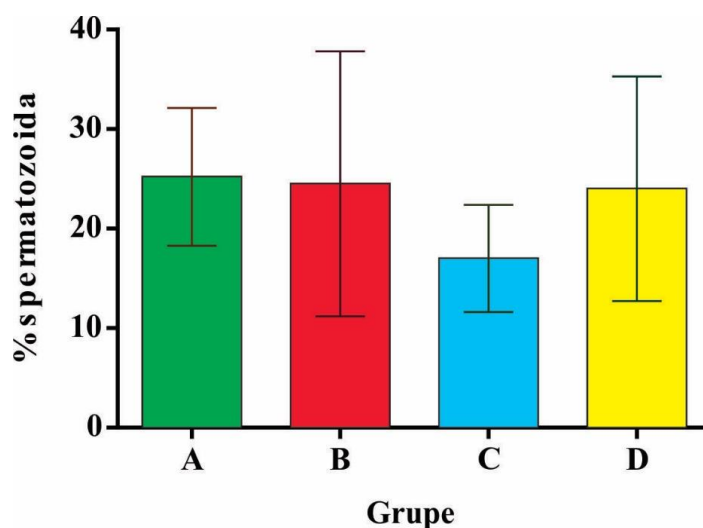
Grafikon 6.1.9. Prosečne vrednosti procenta živih spermatozoida sa intaktnim akrozomom u dozi

Prosečne vrednosti procenta živih spermatozoida sa intaktnim akrozomom su bile najveće u grupi C ($47,40 \pm 14,45$), dok je najmanji procenat ovih ćelija zabeležen u grupi D ($46,80 \pm 14,73$) (Grafikon 6.1.9). Između ispitivanih grupa nisu ustanovljene statistički signifikantne razlike ($p > 0,05$).



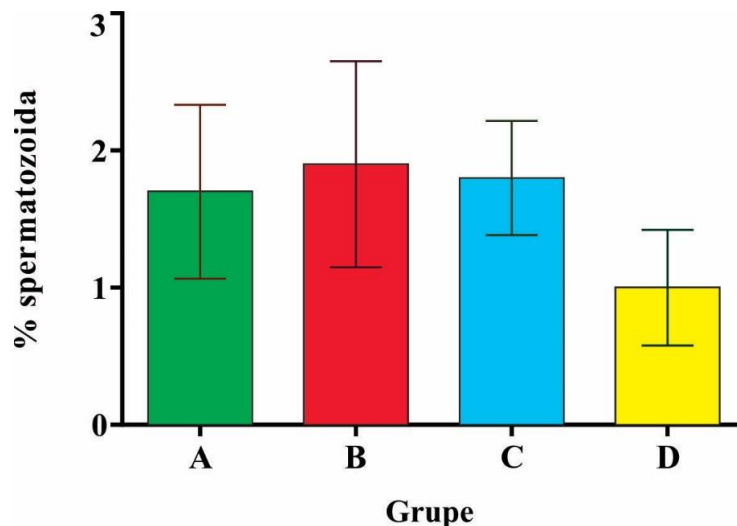
Grafikon 6.1.10. Prosečne vrednosti procenta živih spermatozoida sa oštećenim akrozomom u dozi

Prosečne vrednosti procenta živih spermatozoida sa oštećenim akrozomom (Grafikon 6.1.10) su bile najveće u grupi D ($7,40 \pm 3,27$) i ovaj procenat je bio statistički signifikantno veći nego u grupi C ($2,70 \pm 2,83$) ($p < 0,01$), a značajno veći u odnosu na procenat u grupi A ($3,40 \pm 3,27$) ($p < 0,05$). Između ostalih grupa nisu ustanovljene statistički signifikantne razlike ($p > 0,05$).



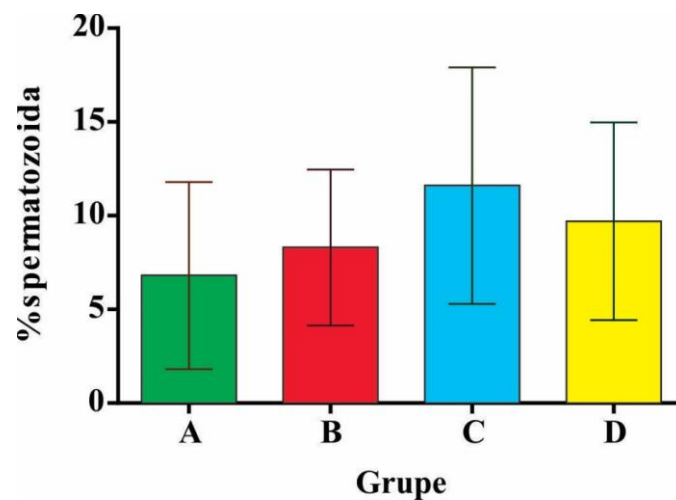
Grafikon 6.1.11. Prosečne vrednosti ukupnog procenta spermatozoida sa oštećenim akrozomom u dozi

Prosečne vrednosti ukupnog procenta spermatozoida sa oštećenim akrozomom u dozi (Grafikon 6.1.11) su bile najveće u grupi A ($25,20 \pm 6,91$), dok je najmanja vrednost zabeležena u grupi C ($17,00 \pm 5,37$). Između ispitivanih grupa nisu ustanovljene statistički signifikantne razlike ($p > 0,05$).



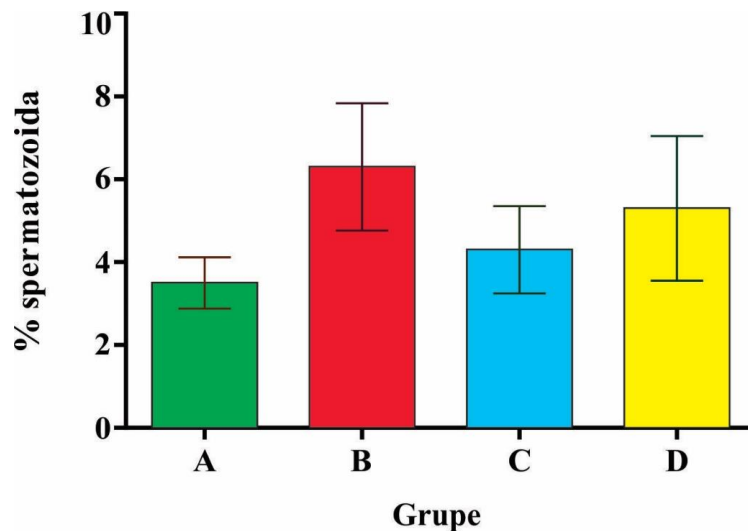
Grafikon 6.1.12. Prosečne vrednosti procenta spermatozoida sa protoplazmatskom kapljicom

U grupi B su utvrđene najveće vrednosti procenta spermatozoida sa protoplazmatskom kapljicom ($1,90 \pm 2,38$), dok je najmanja vrednost zabeležena u grupi D ($1,00 \pm 1,33$) (Grafikon 6.1.12). Između ispitivanih grupa nisu ustanovljene statistički signifikantne razlike ($p > 0,05$).



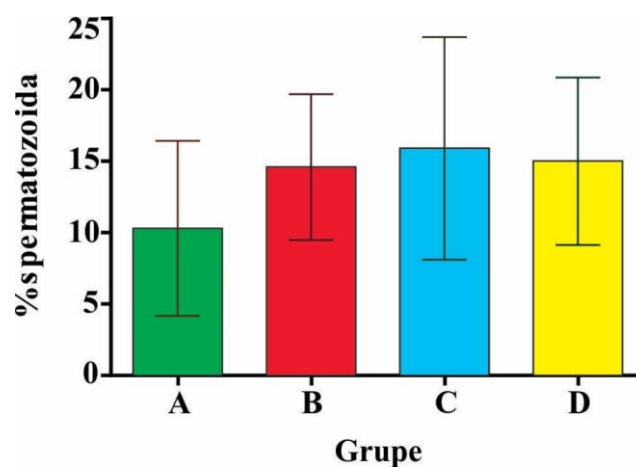
Grafikon 6.1.13. Prosečne vrednosti procenta primarno abnormalnih, patološki promenjenih spermatozoida u dozi

Prosečne vrednosti procenta primarno abnormalnih, odnosno patološki promenjenih spermatozoida su bile najveće u grupi C ($11,60 \pm 6,31$), dok su najmanje vrednosti zabeležene u grupi A ($6,80 \pm 4,98$) (Grafikon 6.1.13). Između ispitivanih grupa nisu ustanovljene statistički signifikantne razlike ($p > 0,05$).



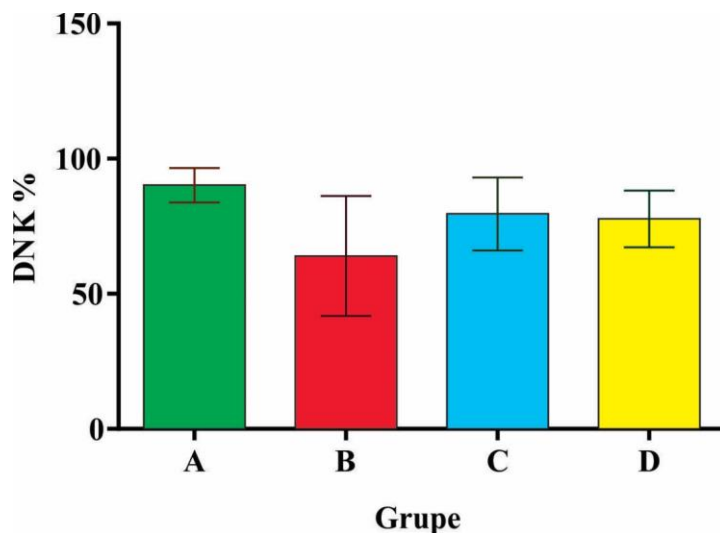
Grafikon 6.1.14. Prosečne vrednosti procenta sekundarno abnormalnih, patološki promenjenih spermatozoa u dozi

Najveće vrednosti procenta sekundarno abnormalnih, odnosno patološki promenjenih spermatozoa u dozi (Grafikon 6.1.14), imala je grupa B ($6,30 \pm 4,86$), dok je najmanja vrednost zabeležena u grupi A ($3,50 \pm 1,96$). Između ispitivanih grupa nisu ustanovljene statistički signifikantne razlike ($p > 0,05$).



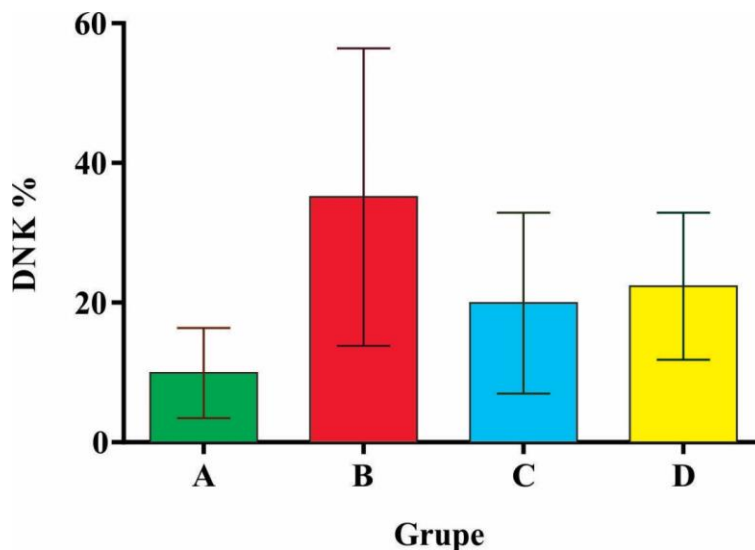
Grafikon 6.1.15. Prosečne vrednosti procenta ukupno patološki promenjenih spermatozoa

Prosečne vrednosti procenta ukupno patološki promenjenih spermatozoa (Grafikon 6.1.15) su bile najveće u grupi C ($15,90 \pm 7,80$), dok je najmanji procenat promenjenih spermatozoa zabeležen u grupi A ($10,30 \pm 6,13$). Između ispitivanih grupa nisu ustanovljene statistički signifikantne razlike ($p > 0,05$).



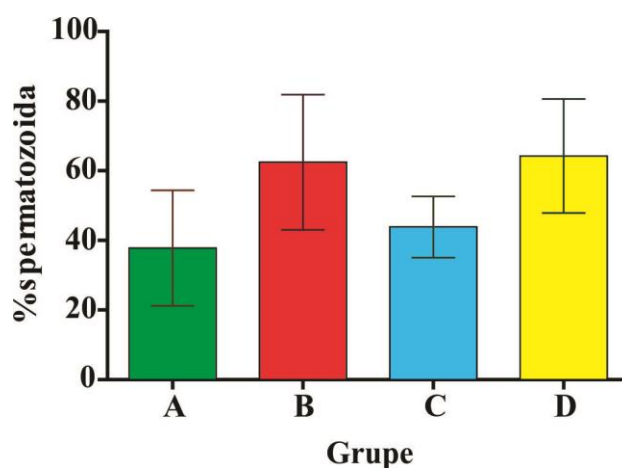
Grafikon 6.1.16. Prosečne vrednosti procenta spermatozoida sa neoštećenim hromatinom u dozi

Najveće prosečne vrednosti procenta spermatozoida sa neoštećenim hromatinom (Grafikon 6.1.16) registrovane su u grupi A ($90,15 \pm 6,39$) i one su bile statistički signifikantno veće od najmanjih vrednosti, zabeleženih u grupi B ($63,97 \pm 22,18$) ($p < 0,01$). Između ostalih grupa nisu ustanovljene statistički signifikantne razlike ($p > 0,05$).



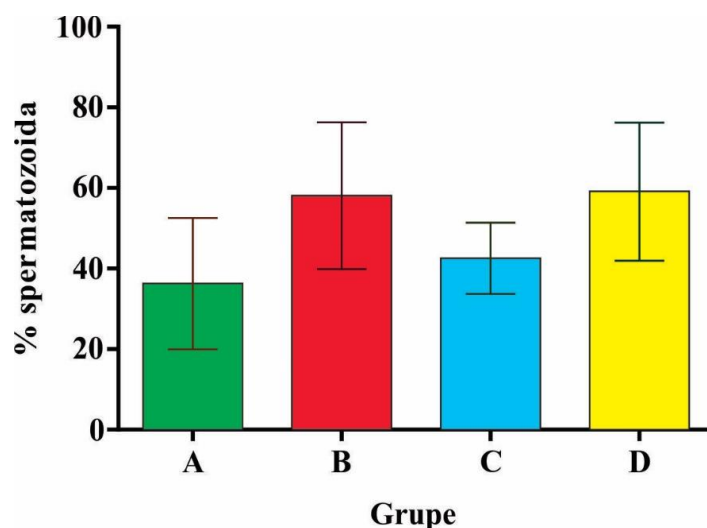
Grafikon 6.1.17. Prosečne vrednosti procenta spermatozoida sa oštećenim hromatinom u dozi

Prosečne vrednosti procenta spermatozoida sa oštećenim hromatinom u dozi (Grafikon 6.1.17) bile su najveće u grupi B ($35,14 \pm 21,30$), a najmanje u grupi A ($9,93 \pm 6,47$). Samo je između ove dve grupe ustanovljena statistički vrlo značajna razlika ($p < 0,01$).



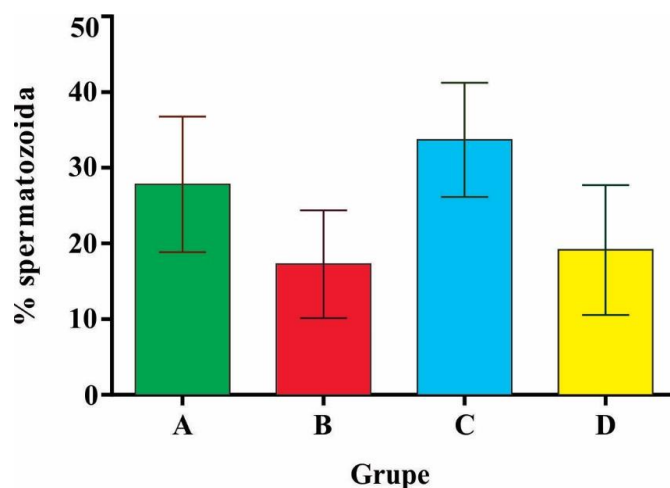
Grafikon 6.1.18. Prosečne vrednosti procenata živih spermatozoa u dozi (test statusa membrane spermatozoa i akrozoma (PNA-FITC/PJ test, protočnom citometrijom)

Najmanje prosečne vrednosti procenta živih spermatozoa (Grafikon 6.1.18) su registrovane u grupi A ($37,79 \pm 16,58$) i one su bile statistički signifikantno manje od najvećih vrednosti procenta živih spermatozoa koji je zabeležen u grupi D ($64,23 \pm 16,36$) ($p < 0,01$). Procenat živih spermatozoa je bio značajno manji u grupi C ($43,86 \pm 8,78$) u odnosu na grupu D ($64,23 \pm 16,36$) ($p < 0,05$). Grupa A je imala najmanje vrednosti ovog parametra ($37,79 \pm 16,58$) i one su bile statistički signifikantno manje od vrednosti u grupi B ($62,47 \pm 19,43$) ($p < 0,05$). Između ostalih grupa nisu ustanovljene statistički signifikantne razlike ($p > 0,05$).



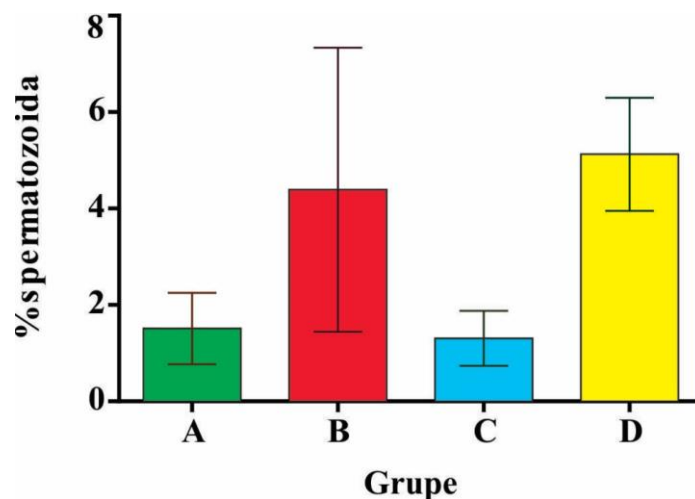
Grafikon 6.1.19. Prosečne vrednosti procenta živih spermatozoa sa intaktnim akrozomom u dozi (test statusa membrane spermatozoa i akrozoma (PNA-FITC/PJ test, protočnom citometrijom)

Grupa A je imala najmanje prosečne vrednosti procenta živih spermatozoida sa intaktnim akrozomom ($36,27 \pm 16,31$) (Grafikon 6.1.19) koje su bile statistički signifikantno manje od najvećih vrednosti zabeleženih u grupi D ($59,11 \pm 17,11$) ($p < 0,05$). Takođe je procenat živih spermatozoida sa intaktnim akrozomom bio značajno manji u A grupi ($36,27 \pm 16,31$) u odnosu na B grupu ($58,08 \pm 18,18$) ($p < 0,05$). Između ostalih grupa nisu ustanovljene statistički signifikantne razlike ($p > 0,05$).



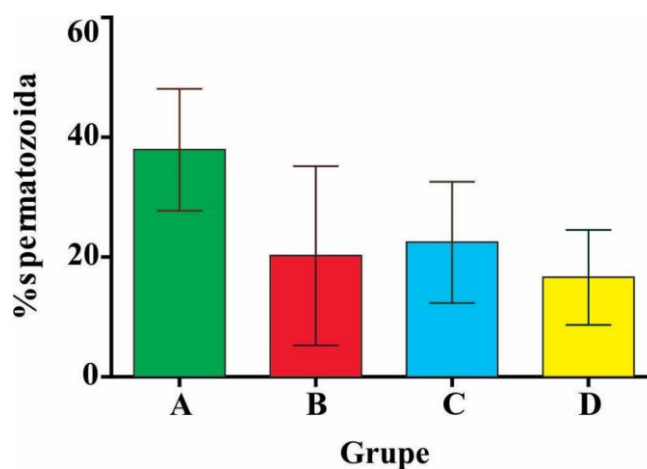
Grafikon 6.1.20. Prosečne vrednosti procenta mrtvih spermatozoida sa intaktnim akrozomom u dozi (test statusa membrane spermatozoida i akrozoma (PNA-FITC/PJ test, protočnom citometrijom)

Prosečne vrednosti procenta mrtvih spermatozoida sa intaktnim akrozomom u dozi (Grafikon 6.1.20) su bile najmanje u grupi B ($17,27 \pm 7,13$) i one su bile signifikantno manje od najvećih vrednosti procenta mrtvih spermatozoida sa intaktnim akrozomom zabeleženog u grupi C ($33,69 \pm 7,53$) ($p < 0,01$). Takođe je procenat mrtvih spermatozoida sa intaktnim akrozomom bio značajno manji u D grupi ($19,14 \pm 8,57$) u odnosu na grupu C ($33,69 \pm 7,53$) ($p < 0,01$). Između ostalih grupa nisu ustanovljene statistički signifikantne razlike ($p > 0,05$).



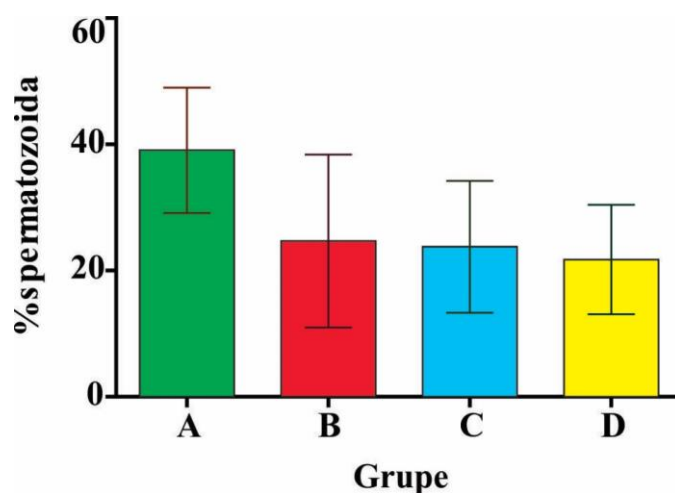
Grafikon 6.1.21. Prosečne vrednosti procenta živih spermatozoida sa oštećenim akrozomom u dozi (test statusa membrane spermatozoida i akrozoma (PNA-FITC/PJ test, protočnom citometrijom)

Grupa C je imala najmanje prosečne vrednosti procenta živih spermatozoida sa oštećenim akrozomom ($1,31 \pm 0,57$) koje su bile statistički signifikantno manje od najvećih vrednosti ovog parametra zabeleženim u grupi D ($5,12 \pm 1,17$) ($p < 0,01$). Procenat živih spermatozoida sa oštećenim akrozomom je bio značajno manji u grupi C ($1,31 \pm 0,57$) u odnosu na B grupu ($4,39 \pm 2,95$) ($p < 0,01$). Grupa A ($1,51 \pm 0,74$) je imala signifikantno manji procenat živih spermatozoida sa oštećenim akrozomom od grupe D ($5,12 \pm 1,17$) ($p < 0,01$). Takođe je procenat živih spermatozoida sa oštećenim akrozomom bio značajno manji u A grupi ($1,51 \pm 0,74$) u odnosu na grupu B ($4,39 \pm 2,95$) ($p < 0,01$). Između ostalih grupa nisu ustanovljene statistički signifikantne razlike ($p > 0,05$) (Grafikon 6.1.21).



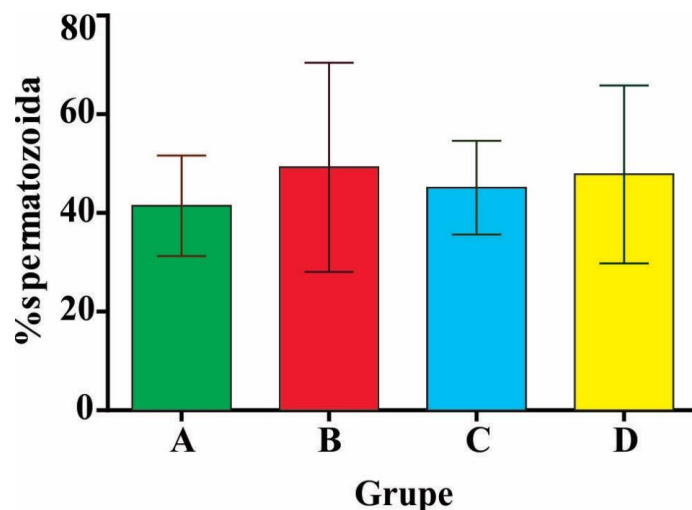
Grafikon 6.1.22. Procenat mrtvih spermatozoida sa oštećenim akrozomom u dozi (test statusa membrane spermatozoida i akrozoma (PNA-FITC/PJ test, protočnom citometrijom)

Prosečne vrednosti procenta mrtvih spermatozoida sa oštećenim akrozomom (Grafikon 6.1.22) su bile najmanje u grupi D ($16,61 \pm 7,92$) što je statistički signifikantno manje od najvećih vrednosti koje su zabeležene u grupi A ($37,91 \pm 10,19$) ($p < 0,01$). Grupa B ($20,23 \pm 14,96$) je imala statistički signifikantno manji procenat mrtvih spermatozoida od najvećih vrednosti registrovanih u grupi A ($37,91 \pm 10,19$) ($p < 0,05$). Takođe je procenat mrtvih spermatozoida sa oštećenim akrozomom bio značajno manji u C grupi ($22,45 \pm 10,12$) u odnosu na grupu A ($37,91 \pm 10,19$) ($p < 0,05$). Između ostalih grupa bikova nisu ustanovljene statistički signifikantne razlike ($p > 0,05$).



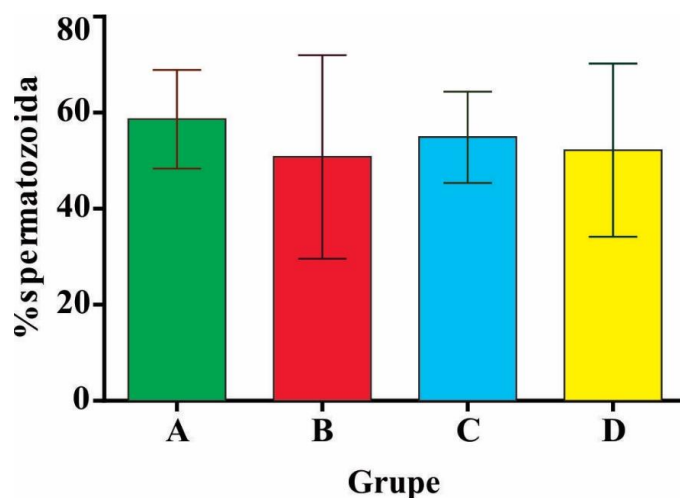
Grafikon 6.1.23. Ukupni procenat spermatozoida sa oštećenim akrozomom u dozi (test statusa membrane spermatozoida i akrozoma (PNA-FITC/PJ test, protočnom citometrijom)

Ukupne prosečne vrednosti procenta mrtvih spermatozoida sa oštećenim akrozomom (Grafikon 6.1.23) su bile najmanje u grupi D ($21,74 \pm 8,68$) i bile su statistički signifikantno manje od najvećih vrednosti ovog parametra koje su zabeležene u grupi A ($39,06 \pm 9,91$) ($p < 0,05$). Takođe je prosečni procenat mrtvih spermatozoida sa oštećenim akrozomom bio statistički značajno manji u C grupi ($23,76 \pm 10,45$) u odnosu na grupu A ($39,06 \pm 9,91$) ($p < 0,05$). Između ostalih grupa bikova nisu ustanovljene statistički značajne razlike ($p > 0,05$).



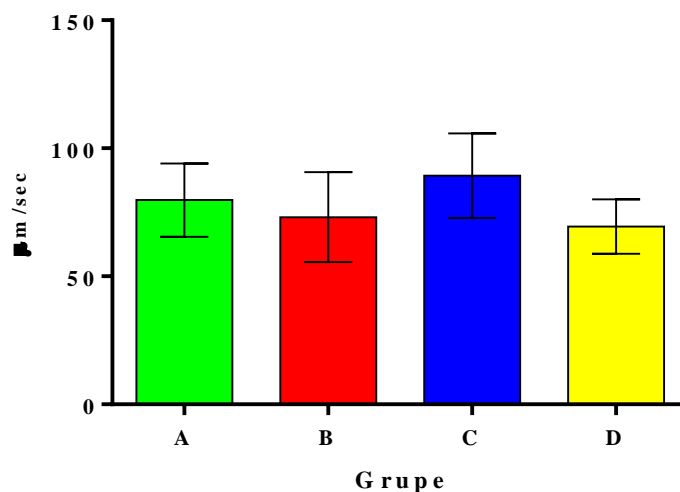
Grafikon 6.1.24. Prosečne vrednosti procenta spermatozoa sa neoštećenom membranom (test vitalnosti spermatozoa; Sybr-14/PJ test, protočnom citometrijom)

Prosečne vrednosti procenta spermatozoa sa neoštećenom membranom (Grafikon 6.1.24) su bile najveće u grupi B ($49,23 \pm 21,20$), a najmanje u grupi A ($41,46 \pm 10,20$). Između grupa bikova nisu ustanovljene statistički značajne razlike ($p > 0,05$).



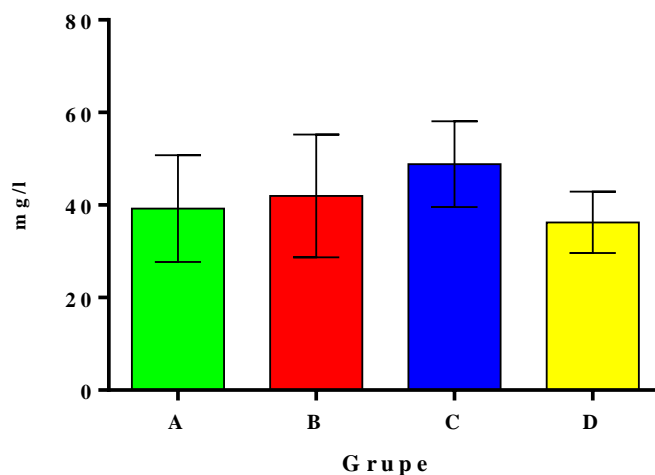
Grafikon 6.1.25. Prosečne vrednosti procenta spermatozoa sa oštećenom membranom (test vitalnosti spermatozoa; Sybr-14/PJ test, protočnom citometrijom)

Prosečne vrednosti procenta spermatozoa sa oštećenom membranom (Grafikon 6.1.25) su bile najveće u grupi A ($58,64 \pm 10,26$), dok je najmanji broj ovih ćelija zabeležen u grupi B ($50,78 \pm 21,20$). Između ispitivanih grupa nisu ustanovljene statistički značajne razlike u srednjim vrednostima ($p > 0,05$).



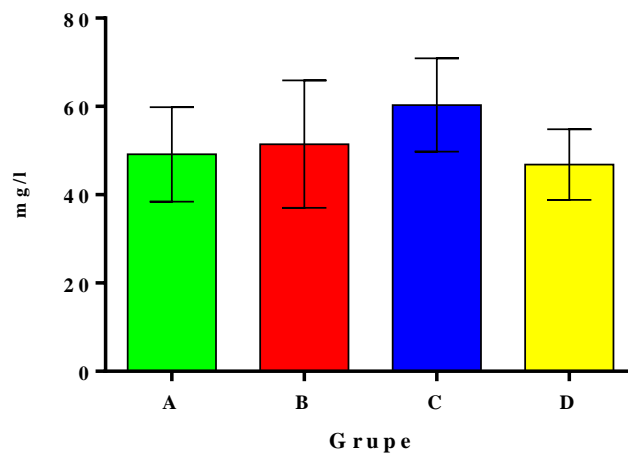
Grafikon 6.1.26. Prosečne vrednosti krivolinijske brzine (VCL) spermatozoida ($\mu\text{m}/\text{sec}$); $n = 10$

Najveće vrednosti krivolinijske brzine (VCL- $\mu\text{m}/\text{sec}$) spermatozoida (Grafikon 6.1.26) je imala grupa C ($89,28 \pm 16,49 \mu\text{m}/\text{sec}$), dok je najmanja vrednost zabeležena u grupi D ($69,46 \pm 10,64 \mu\text{m}/\text{sec}$). Samo su između ove dve grupe ustanovljene statistički signifikantne razlike u srednjim vrednostima ($p < 0,05$), dok to nije bio slučaj između ostalih grupa ($p > 0,05$).



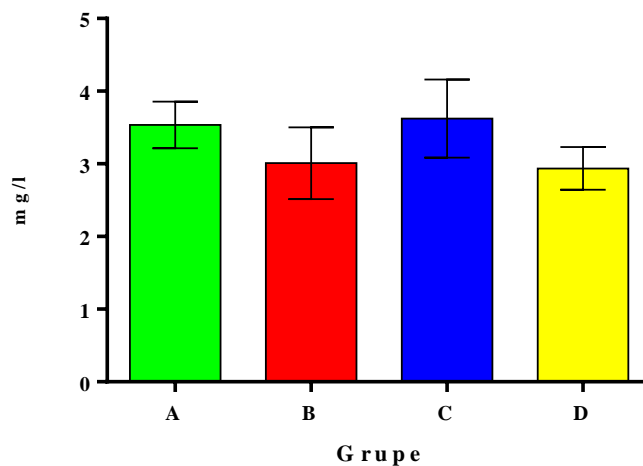
Grafikon 6.1.27. Prosečne vrednosti pravolinijske brzine (VSL) spermatozoida ($\mu\text{m}/\text{sec}$); $n = 10$

Rezultati analize prosečne linearne brzine spermatozoda (VSL) ukazuju da je najveće vrednosti imala grupa C ($48,85 \pm 9,27 \mu\text{m}/\text{sec}$), dok je najmanja srednja vrednost VSL zabeležena u grupi D ($36,25 \pm 6,64 \mu\text{m}/\text{sec}$) (Grafikon 6.1.27). Između ispitivanih grupa nisu ustanovljene statistički signifikantne razlike u srednjim vrednostima ($p > 0,05$).



Grafikon 6.1.28. Prosečna brzina (VAP) spermatozoida (μm/sec); n = 10

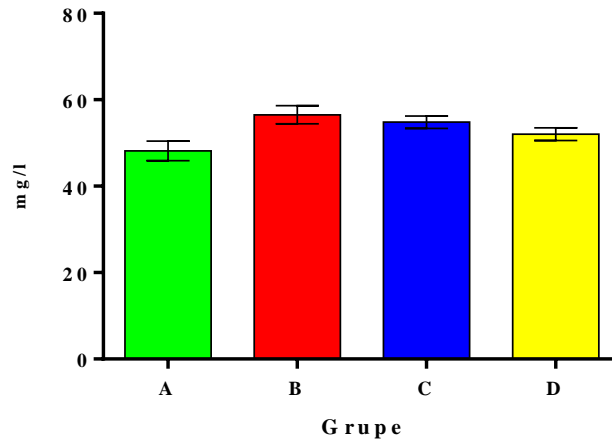
Rezultati određivanja vrednosti prosečne brzine spermatozoida na njihovoj prosečnoj putanji i njihova statistička (VAP) (Grafikon 6.1.28) su dokazali da je ona bila najveća u grupi C ($60,32 \pm 10,55$ μm/sec), a najmanja u grupi D ($46,86 \pm 8,01$ μm/sec). Samo je između ove dve grupe ustanovljena statistički signifikantna razlika u srednjim vrednostima ($p < 0,05$).



Grafikon 6.1.29. Srednje vrednosti amplitude lateralnog otklona (ALH) spermatozoida (μm); n = 10

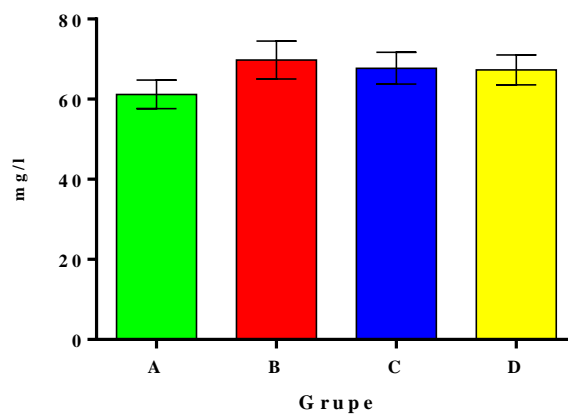
Amplituda lateralnog otklona (ALH) (Grafikon 6.1.29) je bila najmanja u grupi D ($2,94 \pm 0,29$ μm), što je statistički vrlo značajno manje ($p < 0,01$) od prosečne vrednosti registrovane u grupi C ($3,62 \pm 0,54$ μm), a značajno manje ($p < 0,05$) od one u grupi A ($3,53 \pm 0,32$ μm). Grupa B ($3,01 \pm 0,49$ μm) je imala vrednosti koje su značajno ($p < 0,05$) manje

nego u grupama A ($3,53 \pm 0,32 \mu\text{m}$) i C ($3,62 \pm 0,54 \mu\text{m}$). Između ostalih grupa bikova nisu ustanovljene statistički signifikantne razlike u srednjim vrednostima ($p > 0,05$).



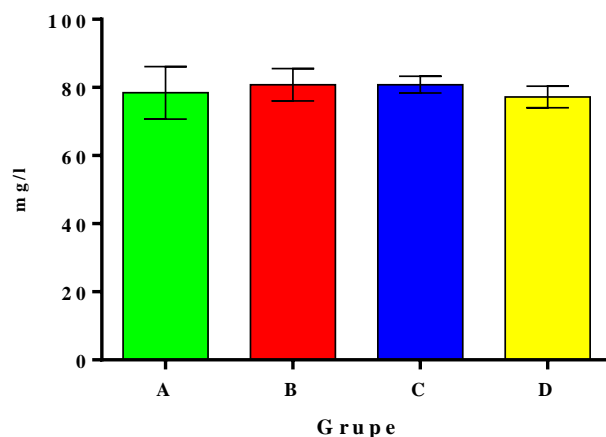
Grafikon 6.1.30. Srednje vrednosti indeksa linearnosti (%); n = 10

Prosečne vrednosti indeksa linearnosti (Grafikon 6.1.30) su bile najveće u grupi B ($56,50 \pm 6,64\%$), a najmanje u grupi A ($48,19 \pm 7,14\%$). Statistički signifikantne razlike su dokazane samo između ove dve grupe ($p < 0,05$), ali ne i između ostalih ($p > 0,05$).



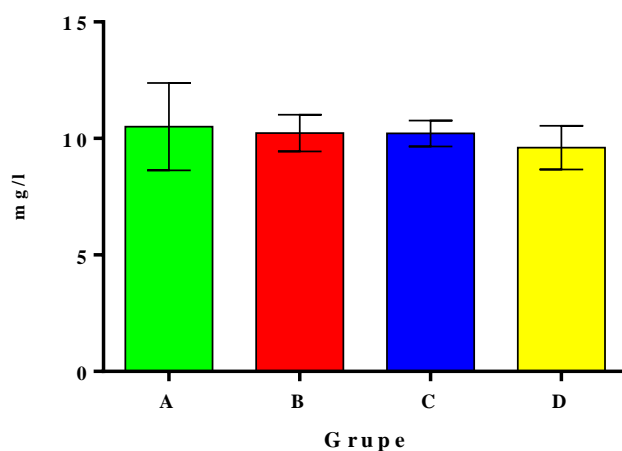
Grafikon 6.1.31. Srednje vrednosti indeksa oscilacije (%); n = 10

Srednje vrednosti indeksa oscilacije (WOB) (Grafikon 6.1.31) su bile najmanje u grupi A ($61,18 \pm 3,58\%$), što je statistički vrlo značajno manje ($p < 0,01$) od prosečnih vrednosti registrovanih u ostalim grupama: B ($69,74 \pm 4,74\%$), C ($67,73 \pm 3,95\%$) i D ($67,32 \pm 3,74\%$). Između ostalih grupa nisu ustanovljene statistički signifikantne razlike ($p > 0,05$).



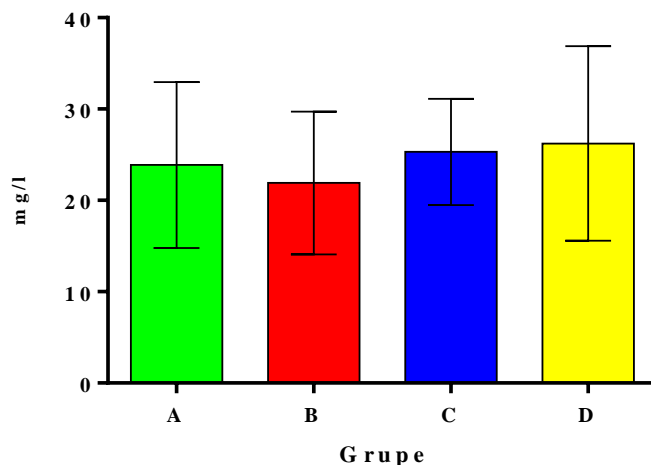
Grafikon 6.1.32. Prosečne vrednosti pravolinijskog indeksa (%); n = 10

Analizom prosečnih vrednosti pravolinijskog indeksa (STR) (Grafikon 6.1.32) ustanovljeno je da je najveće vrednosti imala grupa C ($80,82 \pm 2,44\%$), a najmanje grupa D ($77,18 \pm 3,17\%$). Između ispitivanih grupa nisu ustanovljene statistički signifikantne razlike u srednjim vrednostima ($p > 0,05$).



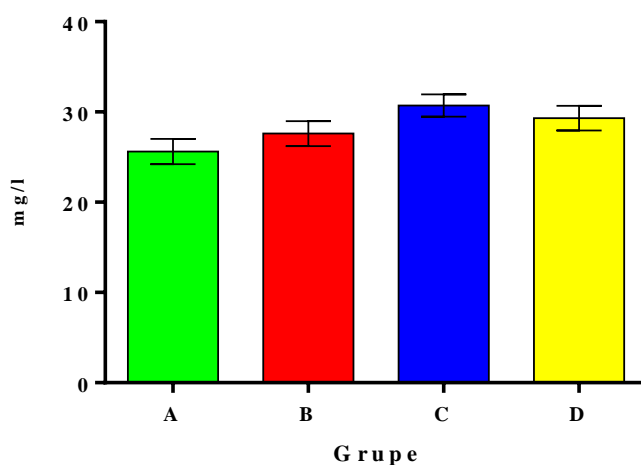
Grafikon 6.1.33. Srednje vrednosti frekvence prelaska pravolinijske putanje (Hz); n = 10

Najveća prosečna frekvencija prelaska pravolinijske putanje u sekundi (BCF) (Grafikon 6.1.33) je ustanovljena u grupi A ($10,51 \pm 1,87$ Hz), dok su najmanje srednje vrednosti zabeležene u grupi D ($9,61 \pm 0,93$ Hz). Između ispitivanih grupa nisu ustanovljene signifikantne razlike ($p > 0,05$).



Grafikon 6.1.34. Prosečne vrednosti manježnog kretanja (%); n = 10

Prosečne vrednosti manježnog kretanja spermatozoida (Grafikon 6.1.34), su bile najveće u grupi D (26,23±10,64%), a najmanje u grupi B (21,91±7,82%). Između ispitivanih grupa nisu ustanovljene signifikantne razlike u srednjim vrednostima ($p > 0,05$).



Grafikon 6.1.35. Prosečne vrednosti površine glave spermatozoida (µm²); n = 10

Prosečne vrednosti površine glave spermatozoida (Grafikon 6.1.35) su bile najmanje u grupi A (25,62±1,39 µm²), što je bilo statistički vrlo značajno manje ($p < 0,01$) od prosečne vrednosti u grupama C (30,73±1,23 µm²) i D (29,32±1,36 µm²), a značajno manje ($p < 0,05$) od onih u grupi B (27,60±1,38 µm²). Grupa B (27,60±1,38 µm²) je imala vrednost koja je statistički vrlo značajno manja ($p < 0,01$) od vrednosti grupe C (30,73±1,23 µm²), a značajno manja ($p < 0,05$) od vrednosti grupe D (29,32±1,36 µm²). Između prosečnih vrednosti

registrovanih u grupama C i D, nisu ustanovljene statistički signifikantne razlike ($p > 0,05$).

Zbog činjenice da u literaturi nismo pronašli ni jedan rad sa tako detaljnim analizama pokretljivosti i morfologije spermatozoida simentalskih bikova, na ovom mestu ćemo izneti njihov zbirni prikaz. Osim toga, podaci koji se navode od strane drugih autora se značajno razlikuju i to u tolikoj meri da se njihovom analizom stiče utisak o izuzetnoj heterogenosti vrednosti pojedinih parametara.

Kaka i sar. (2015) su CASA analizama utvrdili da je pokretljivost spermatozida bikova simentalske rase posle otapanja iznosila $38 \pm 0,7\%$, a procenat morfološki nepromenjenih spermatozoida je bio $64 \pm 2,3\%$, Procenat spermatozoida sa neoštećenom membranom akrozoma je iznosio $69 \pm 1,2\%$, a održivost semena (engl. *viability*) je bila $66 \pm 0,9\%$. Isti autor navodi da je VAP (prosečna brzina, engl. *average path velocity*) iznosila $39,25 \pm 0,25 \mu\text{m/s}$, VCL (krivolinijska brzina, engl. *curvilinear velocity*) $51,45 \pm 0,55 \mu\text{m/s}$, a VSL (pravolinijska brzina, engl. *straight-line velocity*) $7,8 \pm 0 \mu\text{m/s}$. Frekvencija prelaska pravolinijske putanje u sekundi (BCF, engl. *beat-cross frequency*) bila je $0,25 \pm 0,05 \text{ Hz}$, STR (pravolinijski indeks, engl. *straightness*) $76 \pm 1\%$, LIN (indeks linearnosti, engl. *linearity*) $57 \pm 0,0 \%$ i progresivna pokretljivost $33,6 \pm 0,3\%$.

Sariozkan i sar. (2010) su CASA metodom utvrdili da pokretljivost spermatozoida simentalskih bikova iznosi $43,6 \pm 1,64\%$, progresivna pokretljivost $9,6 \pm 0,80\%$, VAP $101 \pm 3,29 \mu\text{m/s}$, VSL $69,1 \pm 5,96 \mu\text{m/s}$, VCL $207 \pm 6,55 \mu\text{m/s}$, ALH (amplituda lateralnog otklona - pomeranja glave u odnosu na prosečnu putanju kretanja (engl. *amplitude of lateral head displacement*) $7,8 \pm 0,60 \mu\text{m}$ i LIN $32,2 \pm 1,94\%$. Oni su registrovali prosečnu vrednost abnormalnosti akrozoma u $11,3 \pm 0,65 \%$ slučajeva, a druge abnormalnosti u $15,6 \pm 0,58 \%$ slučajeva. Procenat ćelija sa očuvanom membranom je bio $43,8 \pm 0,46$.

Kvalitet semena bikova simentalske rase posle otapanja ispitivali su i Celeghini i sar. (2008). Ovi autori navode sledeće vrednosti: ukupna pokretljivost $79,9 \pm 1,3\%$, progresivna pokretljivost $60,3 \pm 1,9\%$, oštećenja akrozoma $2,2 \pm 0,2\%$, VAP $173,5 \pm 1,8 \mu\text{m/s}$, VCL $193,9 \pm 2,9 \mu\text{m/s}$, VSL $121,1 \pm 1,7 \mu\text{m/s}$, BCF $36,2 \pm 0,4 \text{ Hz}$, STR $86,9 \pm 0,4\%$ i LIN $64,2 \pm 0,6\%$.

6.2. Analiza hrane, vode za piće i vode za razređivač za seme na količinu teških metala

Najmanja koncentracija cinka u **senu** ustanovljena je kod grupe A i iznosila je 12 mg/kg, dok su kod ostalih grupa vrednosti bile približno iste i iznosile su 16-17 mg/kg. Koncentracije žive su bile najveće u grupama B i D (0,52 mg/kg i 0,41 mg/kg) dok su u ostalim grupama bile niže (0,11 – 0,12 mg/kg). Koncentracija olova u senu je bila najveća u grupi A i iznosila je 5,4 mg/kg, a najniža je bila u grupi D (2,2 mg/kg). Koncentracija kadmijuma je bila najniža u grupi D i iznosila je $0,11 \pm 0,02$ mg/kg, dok je kod ostalih grupa bila viša (0,16 – 0,19 mg/kg). Ovi podaci su prikazani u tabeli 5.2.1.

Pravilnik o kvalitetu hrane za životinje i Evropski pravilnik EC2002/32 su u saglasnosti o najvećoj dozvoljenoj količini kadmijuma - 1 mg/kg, olova - 10 mg/kg i žive - 0,1 mg/kg u hrani za životinje. Naši rezultati su ukazali da je u svim uzocima sena koncentracija ispitivanih metala bila višestruko niža od dozvoljenih vrednosti. Ovo je značajno zbog toga što pojedini minerali mogu ispoljavati toksičan efekat i kada se u vrlo malim količinama pređe preko nivoa praga toksičnosti. National Research Council definiše maksimalnu tolerantnu koncentraciju minerala kod "životinja koje su hranjene u ograničenom periodu, a ta količina minerala neće uticati na životinja i ne bi trebalo da ostanu rezidue u proizvodima za ljudsku ishranu koji potiču od tih životinje". Maksimalna tolerantna količina minerala iznosi za kadmijum 0,5 ppm, olovo 30 ppm i živu 2 ppm (NRC 2000). Smatra se da je maksimalno dozvoljena količina cinka u hrani za goveda 500 mg/kg obroka (NRC, 1980: NRC 2000). Ova vrednost je takođe značajno veća od one koja je registrovana u našim ispitivanjima.

Koncentracija cinka u hrani koja je proizvedena na zemljištu se u proseku kreće između 25 i 50 mg/kg VSM (Obračević, 1990), dok trave prosečno sadrže 30 do 50 mg Zn/kg SM, a leguminoze 20 do 30 μ /g (Spears, 2003). Ove vrednosti za koncentraciju cinka u navedenim hranivima su više od onih koje su registrovane u našim ispitivanjima. Internacionalna agencija za istraživanje kancera IARC (International Agency For Research on Cancer) je još 1987. godine svrstala olovo u kancerogene materije (Steenland and Boffetta 2000), tako da je neophodno poštovanje odredbi Pravilnika o dozvoljenim koncentracijama olova i drugih toksičnih metala u hranivima.

U našim ispitivanjima je utvrđeno da je koncentracija cinka u koncentrovanoj hrani bila najviša u grupama C i D (84 mg/kg i 78 mg/kg), a niža u ostalim grupama (50 – 51 mg/kg). Koncentracija žive je bila veća u grupama B i D (0,65 mg/kg i 0,62 mg/kg) u odnosu

na grupe A i C gde je iznosila 0,08 i 0,14 mg/kg. Koncentracija olova je bila najveća u grupi D u odnosu na ostale grupe i iznosila je 2,5 mg/kg, dok je količina kadmijuma bila najveća u grupi A i iznosila je 0,22 mg/kg. Kao i pri analizi sadržaja metala u senu, ove vrednosti su bile višestruko niže od onih koje su dozvoljene odgovarajućim normativima.

Soja i proizvodi od soje, kao i kikiriki često se nalaze kao dadanci u koncentrovanim smešama, sadrže dosta cinka i on iznosi od 50 do 70 µg/g (Spears, 2003). Proteinska hraniva animalnog porekla su znatno bogatija u cinku. Mesno i riblje brašno sadrže 80 do 120 ppm Zn, a iskoristivost cinka iz ovih hraniva je veća (Obračević, 1990), dok ostali proizvodi iz mora sadrže 20-50 mikrograma/g a riba čak do 100 µg/g (Spears, 2003). Organska živa se u organizam unosi isključivo hranom a njena jedinjenja su rastvorljiva u mastima i dobro se resorbuju iz digestivnog trakta. Metil-živa se resorbuje gotovo u potpunosti i to može da bude razlog za zabrinutost nakon povećane konzumacije ribe, školjki, rakova i njihovih proizvoda, kao mogućih dodataka koncentrovanoj hrani u ishrani domaćih životinja.

Koncentracija cinka u vodi za piće je bila najveća je u grupi D u odnosu na ostale grupe i iznosila je 0,74 mg/L. Koncentracija žive je u svim ispitivanim grupama je bila približno ista (<0,001 mg/L). Koncentracija olova u vodi za piće je bila najmanja u grupi A i iznosila je 0,012 mg/L, dok u ostalim ispitivanim grupama je približno ista (0,020 – 0,022 mg/L). Slični rezultati su dobijeni i ispitivanjem koncentracije kadmijuma koja je bila najmanja u grupi A (<0,001 mg/L), dok je u ostalim grupama vrednosti približno iste (0,0010 - 0,0014 mg/L).

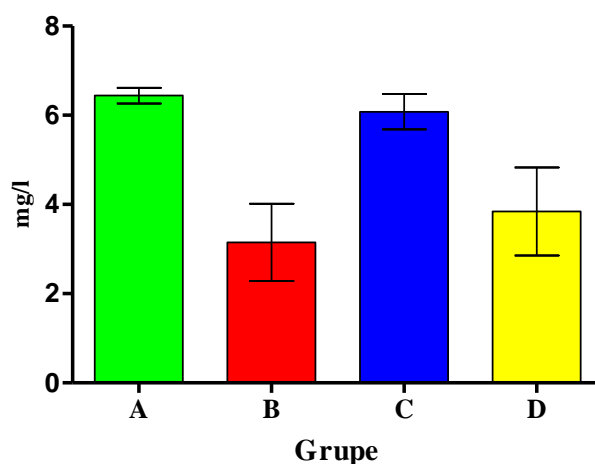
Naši rezultati ukazuju da su registrovane vrednosti značajno manje od onih koje su dozvoljene Pravilnikom o higijenskoj ispravnosti vode za piće (Sl. list SRJ, br 42/98 i 44/99). Ovaj Pravilnik propisuje maksimalno dopuštenu koncentraciju **kadmijuma u vodi** iznosi 0,003mg/L, dok Evropska regulativa 98/83EC dozvoljava 0,005 mg/L. Dozvoljena količina **olova i žive u vodi za piće** na osnovu našeg i evropskog pravilnika, iznosi 0,01 mg/L za olovo i 0,001 mg/L za živu. (Sl. list SRJ, br 42/98 i 44/99, 98/83EC).

Koncentracije cinka, žive, olova i kadmijuma u vodi koja se koristila za izradu razređivača za seme, su bile približno iste u svim ispitivanim grupama. U većini slučajeva, one su bile ispod donje granice osetljivosti metode (<0,001 mg/L) i manje od vrednosti dopuštenih navedenim pravilnicima o sadržaju mikroelemenata u vodi za piće.

6.3. Analiza koncentracije teških metala u duboko zamrznutom semenu bikova

U ovom podpoglavlju su prikazani rezultati korelacione analize pojedinih parametara kvaliteta semena i koncentracije pojedinih mikroelemenata. Poređenja su vršena samo za one parametere kod kojih je ustanovljena statistička značajnost razlika u srednjim vrednostima. Analize su vršene CASA metodom i protočnom citometrijom (FC). Analizirani su sledeći parametri kvaliteta otopljenog semena: broj ukupno pokretljivih spermatozoida posle otapanja, procenat progresivno pokretljivih spermatozoida posle otapanja, procenat živih spermatozoida sa intaktnim akrozomom (ŽIA – CASA), procenat živih spermatozoida sa oštećenim akrozomom (ŽOA – CASA), procenat ćelija sa oštećenim hromatinom (status hromatina), procenat živih spermatozoida sa oštećenim akrozomom (ŽIA – FC), procenat živih spermatozoida u dozi (Ž - FC), procenat mrtvih spermatozoida sa oštećenim akrozomom (ŽOA – FC), prosečna brzina spermatozoida (VAP) i krivolinijska brzina spermatozoida (VCL).

Statističkom analizom koncentracije **cinka** u semenu ispitivanih grupa bikova, ustanovljeno je, da je njegova koncentracija bila najmanja u semenu bikova grupe B ($3,15 \pm 2,74 \mu\text{g/mL}$), vrlo značajno manja ($p < 0,01$) u odnosu na koncentraciju u grupi A ($6,44 \pm 0,57 \mu\text{g/mL}$) i značajno manja ($p < 0,05$) u odnosu na grupu C ($6,08 \pm 1,25 \mu\text{g/mL}$). Između ostalih grupa nisu ustanovljene statistički signifikantne razlike ($p > 0,05$). Koeficijenti varijacije su bili vrlo visoki u grupama B (87,08%) i D (81,17%), dok su na zadovoljavajućem nivou u grupama A (8,79%) i C (20,58%). Ovako veliki koeficijenti varijacija predstavljaju jedan od razloga izostanka statistički signifikantnih razlika između ostalih grupa (tabela 5.3.1. i grafikon 6.3.1).



Grafikon 6.3.1. Prosečne vrednosti koncentracije cinka u otopljenom semenu bikova (μg/mL)

Sa ciljem da se ustanovi jačina zavisnosti promene nekih analiziranih parametara u zavisnosti od koncentracije cinka u semenu izvršena je korelaciona analiza. U sledeće dve tabele su prikazane p vrednosti, odnosno signifikantnost jačine zavisnosti. Ustanovljena je signifikantnost u promeni ŽOA u odnosu na koncentraciju cinka ($p < 0,01$), dok kod ostalih parametara nije ustanovljena veza između promene vrednosti analiziranih parametara u odnosu na koncentraciju cinka u semenu. Naši rezultati, dobijeni određivanjem koncentracije cinka su nešto niži od onih koji se navode u literaturi: 0,83 $\mu\text{g/mL}$ (Massany i sar. 2004) i 0,9 $\mu\text{g/mL}$ (Aguiar i sar. 2012a).

Tabela 6.3.1a. Vrednosti parametra p u korelacionoj analizi odabranih parametara kvaliteta otopljenog semena i sadržaja cinka

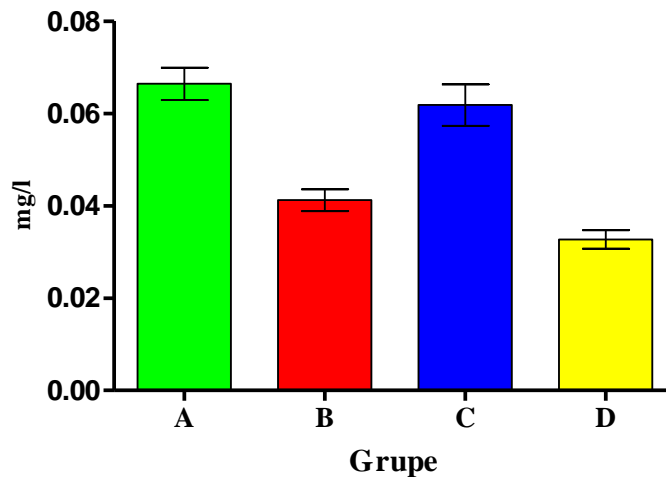
Grupe bikova	Ukupno pokretljivi spermatozidi	Progresivno pokretljivi spermatozidi	ŽIA - FC	ŽOA - CASA	Status hromatina FC
A	0,8984	0,9911	0,8965	0,3842	0,5705
B	0,2461	0,2174	0,3960	0,6919	0,4200
C	0,7485	0,2650	0,4397	0,7786	0,6169
D	0,2653	0,1894	0,1228	0,0089	0,6002

Tabela 6.3.1b. Vrednosti parametra p u korelacionoj analizi odabranih parametara kvaliteta otopljenog semena i sadržaja cinka

Grupe bikova	ŽOA - FC	Ž - FC	MOA - FC	VAP - CASA	VCL - CASA
A	0,0894	0,6363	0,9050	0,9042	0,8557
B	0,7209	0,1086	0,2012	0,1459	0,1712
C	0,5245	0,9301	0,4192	0,1498	0,3927
D	0,7572	0,6679	0,5231	0,3516	0,3053

Analizirajući p vrednosti ustanovljeno je da ne postoji signifikantna razlika u posmatranim vrednostima, ali je u grupi A vrednost parametra ŽOA ($p = 0,0894$) bila približna signifikantnoj vrednosti $p < 0,05$.

Statističkom analizom koncentracije žive u otopljenom semenu bikova, ustanovljeno je da je njena najmanja koncentracija zabeležena u grupama D ($0,03\pm 0,01$), i B ($0,04\pm 0,01$). Ona je bila ststistički vrlo značajno manja ($p<0,01$) u odnosu na koncentraciju u grupama A ($0,07\pm 0,01$) i C ($0,06\pm 0,01$). Između ostalih grupa nisu ustanovljene statistički signifikantne razlike ($p>0,05$). Koeficijenti varijacije su bili u granicama homogenosti statističkih serija (tabela 5.3.2. i grafikon 6.2.3).



Grafikon 6.3.2. Prosečne vrednosti koncentracije žive u otopljenom semenu bikova ($\mu\text{g/mL}$)

Jačina zavisnosti promene nekih analiziranih parametara u zavisnosti od koncentracije žive u semenu utvrđivana je korelacionom analizom. U sledeće dve tabele su prikazane p vrednosti, odnosno signifikantnost jačine zavisnosti. Nije ustanovljena signifikantnost ($p>0,05$) u promeni ni jednog analiziranog parametra kvaliteta semena u zavisnosti od koncentracije žive, ali su ustanovljene zavisnosti kod D grupe, u promeni kod ukupno i progresivno pokretljivih spermatozoida, kao i kod ŽIA i ŽOA koje su vrlo blizu signifikantnosti.

Tabela 6.3.2a. Vrednosti parametra p u korelacionoj analizi odabranih parametara kvaliteta otopljenog semena i sadržaja žive

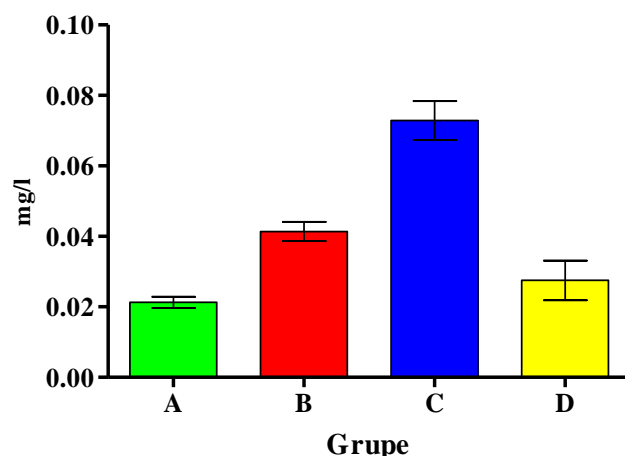
Grupe bikova	Ukupno pokretljivi spermatozidi	Progresivno pokretljivi spermatozidi	ŽIA - FC	ŽOA - CASA	Status hromatina FC
A	0,3536	0,2421	0,5249	0,9906	0,4135
B	0,7094	0,7206	0,6231	0,3831	0,7334
C	0,1326	0,4861	0,1027	0,4965	0,4345
D	0,0724	0,0907	0,0839	0,0584	0,8711

Tabela 6.3.2b. Vrednosti parametra p u korelacionoj analizi odabranih parametara kvaliteta otopljenog semena i sadržaja žive

Grupe bikova	ŽOA - FC	Ž - FC	MOA - FC	VAP - CASA	VCL - CASA
A	0,5566	0,7188	0,7874	0,3448	0,2206
B	0,3230	0,8104	0,9853	0,8617	0,9380
C	0,6373	0,1338	0,6389	0,8724	0,9982
D	0,4307	0,3020	0,1985	0,0463	0,0098

Statističkom analizom p vrednosti ustanovljene su signifikantne razlike $p < 0,05$ u grupi D kod dva parametra VAP, $p = 0,0463$ i VCL, $p = 0,0098$. U nama dostupnoj literaturi nismo pronašli podatke o određivanju koncentracije žive u otopljenom semenu bika, ali je poznato da njeno dodavanje u ejakulat bika pre zamrzavanja (u *in vitro* uslovima) dovodi do smanjenja broja živih ćelija (Arabi 2006b).

Statističkom analizom koncentracije olova u semenu grupa bikova ustanovljeno je da je najveća koncentracija bila u grupi C ($0,07 \pm 0,017 \mu\text{g/mL}$) i ona je vrlo značajno veća ($p < 0,01$) u odnosu na sve ostale grupe. Vrlo značajna statistička razlika ($p < 0,01$) ustanovljena je i između grupe A ($0,02 \pm 0,005 \mu\text{g/mL}$) i grupe B ($0,04 \pm 0,009 \mu\text{g/mL}$). Između ostalih grupa nije ustanovljena signifikantna razlika ($p > 0,05$). Koeficijenti varijacije su u granicama homogenosti statističkih serija izuzev kod D grupe gde je on iznosio 64,40% (tabela 5.3.3 i grafikon 6.3.3).



Grafikon 6.3.3. Prosečne vrednosti koncentracije olova u otopljenom semenu bikova ($\mu\text{g/mL}$)

Jačina zavisnosti promene nekih analiziranih parametara u zavisnosti od koncentracije olova u semenu utvrđivana je korelacionom analizom. U sledeće dve tabele su prikazane p vrednosti, odnosno signifikantnost jačine zavisnosti. Ustanovljena je signifikantnost u promeni $\check{Z}OA$ u odnosu na koncentraciju olova ($p < 0,01$), dok kod ostalih parametara nije ustanovljena ta veza.

Tabela 6.3.a. Vrednosti parametra p u korelacionoj analizi odabranih parametara kvaliteta otopljenog semena i sadržaja žive

Grupe bikova	Ukupno pokretljivi spermatozidi	Progresivno pokretljivi spermatozidi	$\check{Z}IA - FC$	$\check{Z}OA - CASA$	Status hromatina FC
A	0,6935	0,6253	0,3601	0,2101	0,3603
B	0,4196	0,2363	0,5423	0,7052	0,3014
C	0,8232	0,8881	0,6407	0,5270	0,7719
D	0,6673	0,5338	0,3711	0,0444	0,4898

Tabela 6.3.2b. Vrednosti parametra p u korelacionoj analizi odabranih parametara kvaliteta otopljenog semena i sadržaja olova

Grupe bikova	$\check{Z}OA - FC$	$\check{Z} - FC$	$MOA - FC$	VAP - CASA	VCL - CASA
A	1,0000	0,8837	0,1224	0,6241	0,5651
B	0,0448	0,8234	0,8529	0,1424	0,1629
C	0,8367	0,2028	0,2413	0,2872	0,2078
D	0,8327	0,4533	0,9236	0,6948	0,7753

Analizirajući p vrednosti ustanovljeno je da postoji signifikantna razlika $p < 0,05$ u grupi B kod parametra ZOA $p = 0,0448$. Naši rezultati dobijeni određivanjem koncentracije olova a u otopljenom semenu simentalskih bikova su bili u skladu sa vrednostima koje navode drugi autori: Massany (2004) – 0,06 mg/L, Tarda (2012) – 0,057 mg/L i Aguiar (2012a) – 1 $\mu\text{g/L}$.

Tokom određivanja koncentracije kadmijuma u duboko zamrznutom semenu simentalskih bikova, uključenih u naša ispitivanja, utvrđeno je da su sve registrovane vrednosti bile ispod granica osetljivosti metode. Massany (2004) navodi da je u semenu bikova utvrdio koncentraciju kadmijuma od 0,1 mg/L.

6.4. Mikrobiološka analiza duboko zamrznutog semena

Analizom 40 uzoraka duboko zamrznutog i zatim otopljenog semena bikova nisu izolovani aerobni mikroorganizmi. Ovaj nalaz ukazuje da eventualno prisistvo mikroorganizama u duboko zamrznutom semenu nije moglo imati uticaja na opisane promene u pokretljivosti i morfologiji spermatozoida.

7. Zaključci

Na osnovu rezultata postignutih u okviru ovedoktorske disertacije mogu da se izvedu sledeći zaključci:

1. Vrednosti dobijene određivanjem koncentracije spermatozoida i broja spermatozoida po dozi su bile u zadovoljavajućem opsegu, a statističke razlike koje postoje između grupa su posledica različitih standarda pakovanja pajeta u pojedinim centrima.
2. Prosečne vrednosti procenta ukupno pokretljivih spermatozoida, ukupnog broja pokretljivih spermatozoida u dozi, procenta i broja progresivno pokretljivih spermatozoida je bio u skladu sa usvojenim normativima i između grupa bikova nisu dokazane statistički značajne razlike u srednjim vrednostima. Prosečan broj brzih spermatozoida u dozi je bio manji u odnosu na standardne vrednosti u svim grupama bikova.
3. Srednje prosečne vrednosti procenta živih spermatozoida u dozi, živih spermatozoida sa inaktivnim akrozomom, ukupnog broja oštećenih ćelija u dozi, spermatozoida sa protoplazmatskom kapljicom, primarno i sekundarno abnormalnih formi ćelija i ukupno patološki promenjenih spermatozoida su bile u prihvatljivim granicama. Između grupa bikova nisu dokazane statistički značajne razlike u srednjim vrednostima.
4. Srednje prosečne vrednosti procenta živih spermatozoida sa oštećenim akrozomom su takođe bile u prihvatljivom opsegu, ali su između pojedinih grupa bikova utvrđene statistički značajne razlike u srednjim vrednostima.
5. Srednje prosečne vrednosti procenta spermatozoida sa neoštećenim hromatinom su bile niže, a sa oštećenim hromatinom više u odnosu na utvrđene standardne vrednosti. Između pojedinih grupa su utvrđene statistički značajne razlike u srednjim vrednostima.
6. Srednje prosečne vrednosti procenta živih spermatozoida u dozi i procenta živih spermatozoida sa intaktnim akrozomom su bile zadovoljavajuće u grupama B i D, a značajno manje u grupama A i C.
7. Procenat mrtvih spermatozoida sa intaktnim akrozomom u dozi je bio zadovoljavajući, a između pojedinih grupa su utvrđene statistički značajne razlike u srednjim vrednostima. Procenat mrtvih spermatozoida sa oštećenim akrozomom u dozi i ukupan broj ćelija sa oštećenim akrozomom je bio zadovoljavajući u grupama, B, C i D, a značajno veći u grupi A.

8. Procenat spermatozoida sa neoštećenim ili oštećenim membranama je bio zadovoljavajući, a između grupa nisu utvrđene statistički značajne razlike u srednjim vrednostima.
9. Srednje vrednosti krivolinijske brzine spermatozoida su bile u poželjnim granicama, a pravolinijska i prosečna brzina su bile značajno manje u grupama A, B i C u odnosu na grupu D. Vrednosti za amplitudu lateralnog otklona se nisu značajno razlikovale između grupa i skladu su sa navodima iz literature.
10. Srednje vrednosti indeksa lineranosti su bile niske u svim grupama dok je indeks oscilacije bio zadovoljavajući. Između pojedinih grupa su utvrđene statistički značajne razlike u srednjim vrednostima. Srednje vrednosti pravolinijskog indeksa, frekvence prelazaka pravolinijske putanje i ćelija koje ispoljavaju manježno kretanje su bile u dozvoljenim granicama i nisu se statistički značajno razlikovale između grupa.
11. Koncentracija cinka u senu je iznosila 12 mg/kg do 17 mg/kg, a u koncentrovanj hrani od 50 mg/kg do 84 mg/kg, što je znatno niže od koncentracija koje dozvoljavaju NRC, Pravilnik o kvalitetu hrane za životinje i Evropski pravilnik EC2002/32.
12. Koncentracija cinka u vodi za piće je bila u opsegu od 0,03 mg/L do 0,74 mg/L dok je koncentracija žive u svim grupama bila približno ista (<0,001 mg/L). Koncentracija olova je iznosila 0,012 - 0,022 mg/L, a kadmijuma 0,0010 - 0,0014 mg/L što je u skladu su propisanim granicama.
13. Koncentracije cinka, žive, olova i kadmijuma u vodi koja je korišćena za pravljenje razređivača za seme, su bile približno iste u svim ispitivanim grupama i bile su ispod donje granice osetljivosti metode (<0,001 mg/L).
14. Koncentracija cinka u semenu bikova simentalske rase je u našim ispitivanjima bila u opsegu od $3,15 \pm 2,74$ do $6,44 \pm 0,57$ mg/kg, žive od $0,03 \pm 0,01$ do $0,07 \pm 0,01$ mg/kg i olova od $0,02 \pm 0,005$ mg/kg do $0,07 \pm 0,017$ mg/kg. Koncentracija kadmijuma je u ispitivanim uzorcima bila ispod nivoa detekcije metode (< 0,001 mg/kg).
15. Skoro svih ispitivani parametri kvaliteta semena su u bili u opsegu vrednosti karakterističnih za vrstu a korelacionom analizom nije utvrđena njihova povezanost sa sadržajem teških metala u hranivima i semenu pripremljenon za VO.

8. Literatura

1. Acott JR, Hoskinns DD, Bovine sperm forward motility protein, Partial purification and characterization, *J Biol Chem*, 1978, 253, 6744-50.
2. Aguiar MGF, Batista BL, Rodrigues LRS, Campiglia AD, Barbosa RM, Barbosa F, Determination of trace element in bovine semen samples by inductively coupled plasma mass spectrometry and data mining techniques for identification of bovine class, *J Dairy Sci*, 2012a, 95, 12, 7066-73.
3. Aguiar MGF, Batista BL, Rodrigues LRS, Luccas PO, Barbosa F, Evaluation of Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry for Determining Ca, Cu, Fe, Mn, Se and Zn in Bovine Semen Samples using a Simple Sample Dilution Method, *J Braz Chem Soc*, 2012b, 23, 3, 573-80.
4. Apgar J, Zinc and reproduction, *Ann Rev Nutr*, 1985, 5, 43-68.
5. Arabi M, Bull spermatozoa under mercury stress, *Reprod Domest Anim*, 2005a, 40, 5, 454-9.
6. Arabi M, Mohammadpour AA, Mercury and Nicotine-induce Oxidative Stress Changes in Bull Spermatozoa: Modulation by Manganese and Albumin, *J Reprod Infert*, 2005b 6, 2, 22, 153-62.
7. Arabi M, Mohammadpour AA, Adverse effect of cadmium on bull spermatozoa, *Vet Res Commun*, 2006a, 30, 8, 943-51.
8. Arabi M, The role of Mercury in the etiology of Sperm Dysfunction in Holstain Bulls, *Asian Aust J Anim*, 2006b, 19, 3, 335-40.
9. Arabi M, Heydamejad MS, Mechanism of the dysfunction of the bull spermatozoa treated with cadmium, *Zhonghua Nan Ke Xue*, 2007, 13, 4, 291-6.
10. Arver S, Eliason R, Zinc and magnesium in bull and boar spermatozoa, *J Reprod Fert*, 1980, 60, 481-4.
11. ATSDR, Agency for Toxic Substances and Disease Registry: Toxicological profile for ATSDR, Toxicological profile for cadmium, Atlanta, GA, Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 1999.
12. ATSDR. Toxicological profile for cadmium. Public Health Service, ATSDR/TP-8808/08, 1989.
13. Barth AD, Oko RJ, Abnormal Morphology of Bovine Spermatozoa, Iowa State University Press, Ames, IA, US, 1989, 8-17.

14. Bayen S, Koroleva E, Lee HK, Obbard JP, Persistent organic pollutants and heavy metals in typical seafoods consumed in Singapore, *J Toxicol Environ Health A*, 2005, 68, 151–66.
15. Bedwal RS, Bahuguna A, Zinc, copper and selenium in reproduction, *Experientia*, 1994, 50, 626-40.
16. Bhan A., Sarkar NN. Mercury in the environment: Effect on health and Reproduction, *Rev Environ Health*, 2005, 20, 39–56.
17. Bhavsar KB, Vadodaria PV, Dhani JA, Kodagali BS, Seminal trace elements with reference to freezability and fertility of Mehsana buffalo bulls, *Ind J of Anim Sci*, 1989, 59, 566-9.
18. Björndahl L, Kvist U, Importance of zinc for human sperm head-tail connection, *Acta Physiol Scand*, 1982, 116, 51-5.
19. Blom E, The ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of the bull spermogram, *Atti del VII Simposio Int di Zootechnia Milan*, 1972, 125-39.
20. Blom E, Wolstrup C, Zinc as a possible causal factor in the sterilizing sperm tail defect, the "Dag-defect" in Jersey bulls, *Vet Bull*, 1976, 47, 1647.
21. Boran C, Ozkan KU, The effect of zinc therapy on damaged testis in pre-pubertal rats, *Pediatric Surgery International*, 2004, 20, 444-8.
22. Brandao-Neto J, Medureira G, Mendonca BB, Bloise W, Castro VB, Endocrine interaction between zinc and prolactin, *Biol Trace Elem Res*, 1995, 49, 139-49.
23. Brzoska MM, Moniuszko-Jakoniuk J, Calcium deficiency as on the risk factors for osteoporosis, *Post Hig Med Dosw*, 1997, 51, 55-74.
24. Burgos C, Maldonado C, Gerez De Burgos NM, Aoki A, Blanco A, Intracellular localization of the testicular and sperm-specific lactate dehydrogenase isoenzyme C₄ in mice, *Biol Reprod*, 1995, 53, 84-92.
25. Celeghini ECC, de Arruda RP, de Andrade AFC, Nascimento J, Raphael CF, Rodrigues PH, Effects that bovine sperm cryopreservation using two different extenders has on sperm membranes and chromatin, *Anim Reprod Sci*, 2008, 104, 119-31.
26. Chari S, Duraiswami S, Franchimont P, Isolation and characterization of inhibin from bull seminal plasma, *Acta Endocrinologica*, 1978, 87, 434-48.
27. Cheah Y, Yang W, Functions of essential nutrition for high quality spermatogenesis, *Adv Biosci Biotechnol*, 2011, 2, 182-97.

28. Chenoweth JP, Genetic sperm defects, *Theriogenology*, 2005, 64, 457-68.
29. Conchie J, Mann T, Glycosidases in mammalian sperm and seminal plasma, *Nature London*, 1957, 179, 1190.
30. Contri A, Valorz C, Faustini M, Wegher L, Carluccio A, Effect of semen preparation on CASA motility results in cryopreserved bull spermatozoa, *Theriogenology*, 2010, 74, 424-35.
31. Council Directive 98/83/EC of 3. November 1998, on the quality of water intended for human consumption, *Official Journal of the European Communities*, L330/32-330/54.
32. Cousins RJ, Liuzzi JP, Lichten LA, Mammalian zinc transport, trafficking and signals, *J Biol Chem*, 2006, 281, 24085-9.
33. Dacheux J, Gatti JL, Dacheux F, Contribution of epididymal secretory proteins for spermatozoa maturation, *Microsc Res Tech*, 2003, 61, 7-17.
34. David JF, Symptoms toxicity of heavy metals, *J American Med Ass*, 2001, 260, 1523 – 33.
35. Directive 2002/32/ec of the European Parliament and of the Council of 7 May 2002 on undesirable substances in animal feed (OJ L 140, 30.5.2002, p. 10) 2002L0032-EN-20.10.2006 -006.001- 1.
36. Dominguez MP, Falcinelli A, Hozbor F, Sanchez E, Cesari A, Alberio RH, Seasonal variations in the composition of ram seminal plasma and its effect on frozen-thawed ram sperm, *Theriogenology*, 2008, 69, 564-73.
37. Eghbali M, Mortaza SA, Asri-Rezaei S, Khadem Ansari M, Effect of the Seminal Plasma Iron and Lead Content on Semen Quality of water Buffalo (*Bubalus bubalus*) Bulls, *Veterinary Research Forum*, 2010, 1, 3, 142-8.
38. Eliason R, Studies on prostaglandin occurrence formation and biological action, *Acta Physiol Scand*, 1959, 46, 1-73.
39. Eurell JA, Frappier BL, *Textbook of Veterinary Histology*, Sixth Edition, Blackwell Publishing, Australia, 2006, 233-55.
40. Fahmi AH, Hunter GA, Effect of estrual stage on complement activity in bovine follicular fluid, *J Dairy Sci*, 1985a, 68, 2318-22.
41. Fahmi AH, Hunter GA, Markham F Jr, Sequine B, Identification of immunosuppressive protein in bovine seminal plasma with activity against bovine lymphocytes, *J Dairy Sci*, 1985b, 68, 2322-8.
42. Favier EA, The role of zinc in reproduction. Hormonal mechanisms, *Biol Trace Elem Res*, 1992, 32, 363-82.

43. Flipse JR, Metabolism of bovine semen, IX glutamic-pyruvic transaminase activities, *J Dairy Sci*, 1960, 43, 773-7.
44. Gledić D, Veterinarska histologija, 2012, VK Srbije, Beograd, 1-348.
45. Gadella BM, Colenbrander B, Lopes-Cardozo M, Arylsulfatases are present in seminal plasma of several domestic mammals, *Biol Reprod*, 1991, 45, 381-6.
46. Goncalves F, Barretto LSS, Arruda RP, Perri SHV, Mingoti GZ, Effect of antioxidants during bovine in vitro fertilization procedures on spermatozoa and embryo development, *Reprod Dom Anim*, 2010, 45, 129-35.
47. Gordon EF, Gordon RC, Passal DB, Zinc metabolism: basic, clinical and behavioral aspects, *J Pediatr*, Sep, 99, 3, 341-9.
48. Gurer H, Ercal N, Can antioxidants be beneficial in the treatment of lead poisoning, *Free Rad Biol Med*, 2000, 29, 927-45.
49. Hafez ESE, *Reproduction in Farm Animals*, 3rd ed, (Ed. Lea & Febiger), Philadelphia, 1974.
50. Hafez ESE, *Reproduction in Farm Animals*, 5rd ed, (Ed. Lea & Febiger), Philadelphia, 1987.
51. Hamberg M, Biosynthesis of prostaglandin E1 by human seminal vesicles, *Lipids*, 1976, 11, 249.
52. Hartree EF, Inositol in seminal plasma, *Biochem J*, 1957, 66, 131.
53. Hess RA, Oestrogen in fluid transport in efferent ducts of the male reproductive tract, *Reviews of Reproduction*, 2000, 5, 84-92.
54. Hicks ES, Wallwork CJ, Effect of dietary zinc deficiency on protein synthesis in cell-free systems isolated from rat liver, *J Nutr*, 1987, 117, 1234-40.
55. Hidiroglou M, Knipfel EJ, Zinc in mammalian sperm: A Review, *J Dairy Sci*, 1984, 67, 1147-56.
56. Hu JH, Li QW, Chen YL, Jiang ZL, Jia YH, Wang LQ, Ou BB, Effect of additional of vitamin B12 to the extender on post-thaw motility, acrosome morphology, and plasma membrane integrity in bull semen, *Turk J Vet Anim Sci*, 2009, 33, 5, 379-84.
57. Hurley WL, Doane RH, Recent developments in the roles of vitamins and minerals in reproduction, *J Dairy Sci*, 1989, 72, 1123-35.
58. James K, Skibinsky G, 1999, In: *Immunology of human reproduction*, Kurpisz M and Fernandez N. (eds), Ch. XV, Immunosuppressive factors in human seminal plasma: their effect, characterization and possible mode of action, Bios Scientific Publishers Ltd. Oxford,

59. Janicki B, Cygan-Szczegieniak D, Zn and Pb concentration in seminal plasma in reference to selected parameters of semiological assessment of bull semen, *Folia biologica*, 2008, 56, 1-2, 97-101.
60. Jarup L, Hazards of heavy metal contamination, *Bt Med Bull*, 2003, 68, 162-82.
61. Jombim MI, Obrest ER, Salbego CG, Souza DO, Wald VB, Tramontina F, Mattos RC, Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of bovine seminal plasma proteins and their relation with semen freezability, *Theriogenology*, 2004, 61, 255-66.
62. Kaka A, Wahid H, Rosnina Y, Yimer N, Khumran AM, Sarsaifi K, Behan AA, Kaka U, Ebrahimi M, α -Linolenic acid supplementation in BioXcell® extender can improve the quality of post-cooling and frozen-thawed bovine sperm, *Anim Reprod Sci*, 2015, 153, 1-7.
63. Kaličanin BM, Nikolić RS, Marjanović NJ, Application of potentiometric stripping analysis with constant inverse current for determining soluble lead in human teeth, *Anal Chim Acta*, 2004a, 525, 1, 114-9.
64. Kaličanin BM, Nikolić RS, Nikolić GM, Potentiometric stripping analysis of lead and cadmium leaching from dental prothetic materials and teeth, *J Serb Chem Soc*, 2004b, 69, 7, 575-80.
65. Kastori R, Neophodni mikroelementi. Fiziološka uloga i značaj u biljnoj proizvodnji, Naučna knjiga, Beograd, 1990.
66. Keen CL, Hanna LA, Lanoue L, Uriu-Adams JY, Rucker RB, Clegg MS, Developmental consequences of trace mineral deficiencies; acute and long-term effect, *J Nutr*, 2003, 133, 1477-80.
67. Kolarski D, Osnovi ishrane domaćih životinja, Naučna knjiga, Beograd, 1995.
68. Ku KP, Ullrey DE, Miller ER, Zinc deficiency and tissue nucleic acid and protein concentration, (Ed: CF Mills), E & S Livingstone, 1970.
69. Kumar N, Verma RP, Singh LP, Varshney VP, Dass RS, Effect of different levels and sources of zinc supplementation on quantitative and qualitative semen attributes and serum testosterone level in crossbred cattle (*Bos indicus* x *Bos Taurus*) bulls, *Reprod Nutr Dev*, 2006, Nov-Dec, 46, 6, 663-75.
70. Lee HH, Prasad SA, Brewer JG, Owyang C, Zinc absorption in human small intestine, *Am J Physiol*, 1989, 256, 687-91.
71. Lazarević M, Ispitivanje imunomodulatornih svojstava semene plazme bika u in vitro uslovima, Doktorska disertacija, Veterinarski fakultet, Beograd, 1991.

72. Lazarević M, Ejodus L, Hudina V, Miletić V, The influence of bovine seminal plasma fractions obtained by DEAE - Sephacel chromatography on bovine lymphocyte blastogenesis, *Acta Veterinaria*, 1994, 44, 2-3, 63-71.
73. Lazarević M, Skibinski G, Kelly WR, James K, Immunomodulatory effects of extracellular secretory vesicles isolated from bovine semen, *Vet Immunol Immunopathol*, 1995, 44, 235-50.
74. Leidl W, Schefels W, Stolla R, Metzger E, Differenzierung und Befruchtungsvermögen pathologischer Spermien, *Dtsch Tierärztl Wschr*, 1971, 78, 129-34.
75. Madsen CF, Disease and stress a reason to consider the use of organically complex trace elements, *Biotechnology in the Feed Industry, Proc. of 7th Ann Symp Alltech Technical Publications*, Nicholasville, Kentucky, 1991.
76. Mageawa M, Kamada M, Irahara M, Yamamoto S, Yoshikawa S, Kasai Y, Ohmoto Y, Gima H, Thaler CJ, Aono T, A repertoire of cytokines in humans seminal plasma, *J Reprod Immunol*, 2002, 54, 33-42.
77. Manjunath P, Chandonnet L, Lebond E, Desnoyers L, Major proteins of bovine seminal vesicles bind to spermatozoa, *Biol Reprod*, 1994, 50, 27-37.
78. Manjunath P, Therien I, Role of seminal plasma phospholipid-binding proteins in sperm membrane lipid modification that occurs during capacitation, *J Reprod Immunol*, 2002, 53, 109-19.
79. Mann T, Secretory function of the prostate, seminal vesicle and other accessory organs of reproduction, *J Reprod Fert*, 1974, 37, 179-88.
80. Mann T, Lutwak-Mann C, *Biochemistry of seminal plasma and main accessory fluids: Applications to andrological problems*, In T Mann and Lutwak Mann: Male reproductive function and semen, New York, Springer, 1981a, 269-336.
81. Mann T, Lutwak-Mann C, Male reproduction function and semen, In *Physiology, Biochemistry and Investigative Andrology*, Berlin, Germany, Springer-Verlag, 1981b, 495.
82. Mansour MMS, Hafiez AA, el-Kirdassy ZH, el-Malkh MN, Halawa FA, el-Zavat EMI, Role of zinc in regulating the testicular function. Part 2. Effect of dietary zinc deficiency on gonadotropins prolactin and testosterone levels as well as 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase activity in testes of male albino rats, *Nahrung*, 1989, 33, 941-7.

83. Martin GB, White CL, Markey CM, Blackberry MA, Effects of dietary zinc deficiency on the reproductive system of young male sheep: testicular growth and the secretion of inhibin and testosterone, *J Reprod Fert*, 1994, 101, 87-96.
84. Marzec-Wroblewska U, Kaminski P, Lakota P, Influence of Chemical Elements on Mammalian Spermatozoa, *Folia Biologica*, 2012, 58, 7-15.
85. Massanyi P, Tomon R, Trandzik J, Nad P, Skalicka M, Concentration of Copper, Zinc, Iron, Cadmium, Lead and Nickel in Bull, Ram, Boar, Stallion and Fox semen, *Trace Element Electrolyte*, 2004a, 21, 45-9.
86. Massanyi P, Trandzik J, Nad P, Korenekova B, Skalicka M, Toman R, Lukac N, Hali M, Strapak P, Concentration of Copper, Iron, Zinc, Cadmium, Lead and Nickel in Bull and Ram Semen and Relation to the Occurrence of Pathological Spermatozoa, *J Environ Sci Health A, Tox Hazard Subst Environ*, 2004b, 39, 11, 3005-14.
87. Massanyi P, Trandzik J, Nad P, Skalicka M, Korenkova B, Lukac N, Fabis M, Toman R, Seminal concentration of trace elements in fox and relationships to spermatozoa quality, *J Environ Sci Health A, Tox Hazard Subst Environ Eng*, 2005, 40, 5, 1097-105.
88. Mathur N, Pandey G, Jain GC, Male Reproductive Toxicity of Some Selected Metals: A Review, *J Biol Sci*, 2010, 10, 396-404.
89. Matoušek J, Biological and immunological roles of proteins in the sperm of domestic animals, *Anim Reprod Sci*, 1985, 8, 1-40.
90. Maxwell WM, de Graf SP, Ghaoui Rel-H, Evans G, Seminal plasma effects on sperm handling and female fertility, *Soc Reprod Fertil, Suppl*, 2007, 64, 13-38.
91. Mihailović M, Jovanović M, Živanov D, Panić B, Pardubski T, Cestnik V, Poremećaji mineralnog metabolizma sa posebnim osvrtom na mikroelemente, *Vet glasnik*, 1989, 43, 233-8.
92. Miljković V, Živanović D, Burić I, Elektroejakulacija kod nerčeva i nekih laboratorijskih životinja, *Acta veterinaria*, 1966, 16, 4, 363-71.
93. Miljković V, *Reprodukcija i veštačko osemenjavanje goveda*, Beograd, 1990.
94. Miller JK, Miller WJ, Development of zinc deficiency in Holstein calves fed a purified diet, *J Dairy Sci*, 1960, 43, 1854.
95. Miller JK, Cragle RG, Gastrointestinal sites of absorption and endogenous secretion of zinc in dairy cattle, *J Dairy Sci*, 1965, 48, 370-1.

96. Milovanović A, Barna T, Jovičin M, Apić J, Lazić S, Stojanov I, Lazarević M, Urošević M, Procedure, rezultati i efekti analize uzoraka uvoznog semena bikova pregledanih u "NIV-NS", 6. Naučni simpozijum Reprodukcijska domaćih životinja i bolesti mlečne žlezde, 8-11. oktobar, Divčibare, Srbija, 2015, 169-85.
97. National Research Council (1989): Nutrient Requirements of Dairy Cattle. Sixth Revised Edition. Update, 1989. National Academy Press Washington, D. C.
98. National Research Council (1996): Nutrient Requirements of Beef Cattle. Seventh Revised Edition, National Academy Press Washington, D. C.
99. National Research Council, 2000, Nutrient Requirements of Beef Cattle. 7th Revised Edition, 1996: Update 2000. National Academy Press. Washington, D. C.
100. Obračević Č, Osnovi ishrane domaćih životinja, Naučna knjiga, Beograd, 1990.
101. Om AS, Chung KW, Dietary zinc deficiency alters 5 alpha-reduction and aromatization of testosterone and androgen and estrogen receptors in rat liver, J Nutr, 1996, 126, 842-8.
102. Ott EA, Smith WH, Stob M, Parker HE, Beeson WM, Zinc deficiency syndrome in the young calf, J Anim Sci, 1965, 24, 735-41.
103. Patrick L, Lead toxicity part II: The role of free radical damage and the use of antioxidants in the pathology and treatment of lead toxicity, Altern Med Rev, 2006, 11, 114-27.
104. Pavlović-Trajković Lj, Gajić I, Pecelj-Gec M, Preporučeni dnevni unos hranljivih materija, Volumen 2. Mineralni sastojci, Savezni zavod za zaštitu i unapređenje zdravlja, Beograd, 1966.
105. Petersen BJH, Lammel CJ, Stides DI, Brooks GF, Human seminal plasma inhibition of complement, J Lab Clin Med, 1980, 96, 582-91.
106. Pitts WJ, Miller WJ, Fosgate TG, Morton DJ, Clifton MC, Effect of zinc deficiency and restricted feeding from two to five months of age on reproduction in Holstein bulls, J Dairy Sci, 1966, 49, 995-1000.
107. Popović V, Tričković K, Expert journal of the students of the University of Nis, Booklet for medical science, 1983, 93, 1-4.
108. Powell WG, Miller JW, Morton DJ, Clifton MC, Influence of dietary cadmium level and supplemental zinc on cadmium toxicity in the bovine, J Nutr, 1964, 84, 205-14.
109. Prentice A, Does mild zinc deficiency contribute to poor growth performance? Nutr Rev, 1993, 57, 268-70.

110. Quayle JA, Szymaniec TB, Hargreave BT, James K, Studies on the immunosuppressive effect of seminal plasma, *Br J Urol*, 1987, 60, 578-82.
111. Radojević M, Bashkin V, Practical Environmental Analysis, Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1999.
112. Radovanović T, Rajić I, Nadaždin M, Stojković J, *Ishrana domaćih životinj*, Opšti deo, Čačak, 1997.
113. Reddy ESP, Bhargava PM, Seminalplasmin – an antimicrobial protein from bovine seminal plasma which acts in *E. Coli* by specific inhibition of rRNA synthesis, *Nature*, London, 1979, 279, 725-8.
114. Root WA, Duckett G, Sweetland M, Reiter OE, Effects of zinc deficiency upon pituitary function in sexually mature and immature male rats, *J Nutr*, 1979, 109, 958-64.
115. Saacke RG, Amann RP, Marshall CE, Acrosomal cap abnormalities of sperm from subfertile bulls, *J Anim Sci*, 1968, 27, 1391-400.
116. Salisbury GW, Hart RG, Lodge JR, The spermatozoan genome and fertility, *Am J Obst Gyn*, 1977, 128, 342-50.
117. Sariozkan S, Tuncer PB, Bucak MN, Buyukleblebici S, Kinet H, Bilgen A, The effect of different egg yolk concentration used with soybean lecithin-based extender on semen quality to freeze bull semen, *Eurasian J Vet Sci*, 2010, 26, 1, 45-9.
118. Sekler L, Sensi SL, Hershinkel M, Silverman WF, Mechanism and regulation of cellular zinc transport, *Mol Med*, 2007, 13, 337-43.
119. Selvaraju S, Reddy IJ, Nandia S, Rao SBN, Ravindra JP, Influence of IGF-1 on buffalo (*Bubalus bubalus*) spermatozoa motility, membrane integrity, lipid peroxidation and fructose uptake in vitro, *Anim Reprod Sci*, 2009, 113, 60-70.
120. Ševković N, Pribičević S, Rajić I, *Ishrana domaćih životinja*, Naučna knjiga, Beograd, 1983.
121. Shojaei H, Kroetsch T, Wilde R, Blondin P, Kastelic JP, Thundathil JC, Moribund sperm in frozen-thawed semen, and sperm motion end points post-thaw and post-swim-up, are related to fertility in Holstein AI bulls, *Theriogenology*, 2012, 77, 940-51.
122. Sirat MP, Sinha AK, Singh BK, Prasad RL, Effects of cryoprotectants on release of various enzymes from buck spermatozoa during freezing, *Theriogenology*, 1996, 45, 405-16.

123. Skibinsky G, Kelly RW, Harkiss D, James K, Immunosuppression by human seminal plasma - extracellular organelles (prostasomes) modulate activity of phagocytic cells, *Am J Reprod Immunol*, 1992, 28, 97-103.
124. Službeni glasnik Republike Srbije br. 38/2014. O načinu obeležavanja sperme, načinu vođenja evidencije o proizvodnji sperme, kao i o uslovima koje mora da ispunjava sperma u pogledu kvaliteta.
125. Smith OB, Akinbamizo OO, Micronutrients and reproduction in farm animals, *Anim Reprod Sci*, 2000, 60-61, 549-560.
126. Sörensen MB, Stoltenberg M, Henriksen K, Ernst E, Danscher G, Parrinen M, Histochemical tracing of zinc ions in the rat testis, *Mol Hum Reprod*, 1998, 4, 423-8.
127. Spears JW, Trace mineral bioavailability in ruminants, *J Nutr*, 2003, 133,1506-9.
128. Stančić B, Reprodukcijska domaćih životinja, Univerzitet u Novom Sadu, 1994.
129. Steenland K, Boffetta P, Lead and cancer in humans; where are we now? *Am J Ind Med*, 2000, 38, 295-9.
130. Stites PD, Erickson PR, Suppressive effect of seminal plasma on lymphocyte activation, *Nature*, 1975, 253, 727-9,
131. Suzuki T, Nakajima K, Yamamoto A, Yamanaka H, Metallothionein binding zinc inhibits nuclear chromatin decondensation of human spermatozoa, *Andrologia*, 1995, 27, 164-7.
132. Szumovski P, L'electrophorese des protein du plasma seminal dans le recherché des troubles de la fertile du male, *Rec Med Vet Ecole Alfort*, 1959, 13, 937.
133. Tan S, Mahaffey K, Evidence for mercury as an endocrine disrupter: an overview of the literature, 2003, <http://www.scribd.com/doc/1790574>.
134. Thibier M, Peripheral plasma testosterone concentrations in bulls around puberty, *J Reprod Fert*, 1975, 42, 567-9.
135. Tvrda E, Knazicka Z, Lukac N, Selected heavy metals versus antioxidant parameters in bull seminal plasma - a comparative study, *J Environ Sci Health A, Tox Haz Subst Environ Eng*, 2012, 47, 9, 1261-6.
136. Tvrda E, Lukac N, Schneidgenova M, Lukacova J, Szabo C, Goc Z. Gren A, Massanyi P, Impact of seminal chemical elements on the oxidative balance in bovine seminal plasma and spermatozoa, *J Vet Med*, 2013a, Article ID 125096, 8 pages. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/125096>

137. Tvrda E, Knazicka Z, Lukacova J, Schneidgenova M, Goc Z, Gren A, Szabo C, Massanyi P, Lukac N, The impact of lead and cadmium on selected motility, prooxidant and antioxidant parameters of bovine seminal plasma and spermatozoa, *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng*, 2013b, 48, 10, 1292-300.
138. Underwood EJ, Somers M, Studies of zinc nutrition in sheep, *Austr J Agric Res*, 1969, 20, 889-97.
139. Underwood EJ, Trace elements in human and animal nutrition, Third edition, Academic Press, New York and London, 1971.
140. Underwood EJ, Trace elements in human nutrition and health, WHO, Geneva, 1996.
141. Vakanjac S, Pavlović V, Pavlović M, Nedić S, Procena citološkog i mikrobiološkog kvaliteta duboko zamrznutog semena bika, 4. Naučni simpozijum Reprodukcijska kvaliteta domaćih životinja, 10-13. oktobar, Divčibare, Srbija, 2013, 91-9.
142. Vale GW, News on reproduction biotechnology in Males, 1998, <http://www.inca.it/isz/convegno/vale.htm>
143. Voglemayr KJ, Prostaglandin F2 concentration in genital tract secretions of dairy bulls, *Prostaglandins*, 1973, 4, 5, 673-8.
144. Vukotić M, Današnje shvatanje imunološke uloge semene plazme s pogledom na VO i njegov odnos prema prirodnom parenju, *Crnogorska akademija nauka i umetnosti, Glasnik odeljenja prirodnih nauka*, 5, 1986.
145. Vuković D, Perković S, Veštačko osemenjavanje, plodnost i neplodnost goveda, II dopunjeno i prošireno izdanje, 2012, Naučna kMD, Beograd, 1-338.
146. Watts DL, The Nutritional Relationships of Zinc, *J Orthomol Med*, 1988, 3, 2, 63-7.
147. White IG, Gol P, Voglamayr JK, Effects of male reproductive tract fluids and proteins on the metabolism and motility of ram spermatozoa, *Arch Androl*, 1987, 19, 115-25.
148. WHO laboratory manual for the Examination and processing of human semen, 5. izdanje, World Health Organization 2010.
149. Witkin SS, Toth A, Relationship between genital tract infections, sperm antibodies in seminal fluid, and infertility, *Fertil Steril*, 1983, 40, 805- 8.
150. Yamaguchi S, Miura C, Kikuchi K, Cellino FT, Agusa T, Tanabr S, Miura T, Zinc is an essential trace element for spermatogenesis, *PNAS*, 2009, 106, 26, 10859-64.
151. Zubkova EV, Robaire B, Effects of glutathione depletion on antioxidant enzymes in the epididymis, seminal vesicles, and liver and on spermatozoa motility in the aging brown Norway rat, *Biol Reprod*, 2004, 71, 1002-8.

Biografija doktoranda

Goran Jakovljević je rođen 07.11.1965.godine u Kraljevu. Osnovnu školu je završio u Kruševici, a srednju medicinsku, opšteg smera u Kraljevu. Na Veterinarski fakultet u Beogradu se upisao 1985. godine i diplomirao 1992. godine. Poslediplomske magistarske studije je upisao 1993. god. Magistarski rad iz oblasti reprodukcije domaćih životinja pod naslovom „Ispitivanje fertilne sposobnosti semena mladih bikova pod uticajem paragenetskih faktora“, odbranio je na Veterinarskom fakultetu u Beogradu 2004 godine. Nalazio se na radnom mestu glavnog tehnologa u Centru za reprodukciju i embriotehnologiju PKB od 1993 do 1997 godine, a od 1997 do 2004. god je bio rukovodilac centra. U toku 1996. godine, proveo je na specijalizaciji iz oblasti tehnologije duboko zamrznutog semena, kao i u oblasti menadžmenta ishrane, držanja i nege priplodnih bikova 45 dana u Kanadi. Od 2004 do 2007 godine je bio zaposlen u Semex PK BB na distribuciji semena bikova uveženih iz Kanade, a od 2007 do 2009 godine radio je na distribuciji uveženog semena bikova iz Amerike WWS u kompaniji Citadela doo. Od 2009. godine do sada, nalazi se na mestu direktora Stočarsko veterinarskog Centra Velika Plana.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора: мр Горан Јаковљевић
Број индекса -

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом:

Утицај тешких метала из хране и воде на квалитет дубоко замрзнутог семена бика

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

Потпис аутора

У Београду, 30. 06. 2016.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора мр Горан Јаковљевић

Број индекса /

Студијски програм: докторске академске студије

Наслов рада: Утицај тешких метала из хране и воде на квалитет дубоко замрзнутог семена бика

Ментор: проф. др Слободанка Вакањац

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањена у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис аутора

У Београду, 30. 06. 2016.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Утицај тешких метала из хране и воде на квалитет дубоко замрзнутог семена бика

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.

Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, 30. 06. 2016.

1. **Ауторство.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. **Ауторство – некомерцијално – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. **Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. **Ауторство – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. Ауторство – делити под истим условима. Дозвољава се умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.