

UNIVERZITET U BEOGRADU
FAKULTET VETERINARSKE MEDICINE

Slobodan Z. Petrović

ISPITIVANJE EFEKATA DODAVANJA
ANTIOKSIDANASA U HRANI NA
KVALITET SEMENA PRIPLODNIH
BIKOVA U USLOVIMA TOPLOTNOG
STRESA

doktorska disertacija

Beograd, 2021

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE

Slobodan Z. Petrović

DETERMINATION OF EFFECTS OF
ANTIOXIDANTS ADDITION IN FOOD ON
BULL'S SPERM QUALITY PARAMETERS
IN HEAT STRESS CONDITION

doctoral dissertation

Belgrade, 2021

Mentori:

Dr Milan Maletić, docent

Fakultet veterinarske medicine

Univerziteta u Beogradu

Dr Branko Petrujkić, vanredni profesor

Fakultet veterinarske medicine

Univerziteta u Beogradu

Članovi komisije:

Dr Slobodanka Vakanjac, redovni profesor

Fakultet veterinarske medicine

Univerziteta u Beogradu

Dr Vladimir Magaš, vanredni profesor

Fakultet veterinarske medicine

Univerziteta u Beogradu

Dr Aleksandar Milovanović, viši naučni saradnik

Naučni institut za veterinarstvo „Novi Sad“

Datum odbrane: _____

Beograd

Zahvalnica

supruzi Marini, mentoru i prijatelju prof Milanu Maletiću, direktoru Goranu i kolegi Miši na neizmernoj podršci i razumevanju.

Ispitivanje efekta dodavanja antioksidanasa u hrani na kvalitet semena priplodnih bikova u uslovima toplotnog stresa

REZIME

Oksidativni stres rezultat je neravnoteže između proizvodnje reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS) i zaštitnog efekta antioksidativnog mehanizma odgovornog za njihovu neutralizaciju i uklanjanje. Prekomerno stvaranje ROS u organizmu negativno utiče na pokretljivost spermatozoida i oplodnu sposobnost. Sem toga, mnogobrojni uticaji okoline, fiziološki i genetski faktori mogu uticati na lošu funkciju spermatozoida i neplodnost. Značajnu ulogu u zaštiti spermatozoida od oksidativnog stresa imaju antioksidanti superoksid dismutaza (SOD) i glutation peroksidaza (GPx) te se stoga smatraju korisnim indikatorima antioksidativnog statusa.

Cilj ove doktorske disertacije je bio ispitivanje efekata dodavanja prirodnih antioksidanasa u hrani za priplodne bikove (inaktivisanih živih ćelija kvasca *Saccharomyces cerevisiae* [soj R397] sa visokim nivoom organski vezanog selena (izvor selen zavisne glutation-peroksidaze-Se-GPx) i liofilizovanog preparata pulpe dinje *Cucumis melo* (izvor superoksid dismutaze-SOD) na kvalitet ejakulata priplodnih bikova u uslovima toplotnog stresa. U ogled je bilo uključeno 15 bikova podeljenih u tri grupe (kontrolna grupa – C, ogledna grupa -M kojoj je dodavan izvor SOD – i ogledna grupa – A tretirana izvorom Se-GPx). Ispitivani su biohemijski parametri u krvnom serumu, parametri antioksidativne zaštite (SOD i Se-GPx) u seminalnoj plazmi kao i kvalitet semena u svim grupama. Takođe, ispitivana je povezanost između sredinskih faktora (temperatura i vlažnost), aktivnosti antioksidativnih enzima i kvaliteta sperme.

Kod tretiranih bikova uočeno je povećanje aktivnosti SOD i GPx u odnosu na kontrolnu grupu, što ukazuje da su oba dodatka hrani povećala antioksidativni kapacitet semene plazme. Sem toga, antioksidansi u hrani su imali pozitivan uticaj na ukupnu pokretljivost spermatozoida jer je zabeleženo značajno povećanje ukupne pokretljivosti kod tretiranih grupa. Analizom korelacije između aktivnosti svakog enzima i procenta ukupno pokretnih i progresivno pokrenih spermatozoida kod svakog bika ponaosob nije ustanovljena značajna povezanost. Ispitivanjem uticaja THI (temperature-humidity index) na aktivnost antioksidativnih enzima uočeno je da je sa porastom THI došlo do povećanja aktivnosti SOD i GPx, ali ne statistički značajnog. Pokazano je da ambijentalna temperatura i vlažnost nisu značajno uticali na kvalitet semena u svim oglednim grupama. Može se zaključiti da je kod sve tri grupe bikova došlo do povećanja aktivnosti oba enzima u semenoj plazmi, ali je povećanje značajno niže u kontrolnoj grupi nego u tretiranim grupama. Ovo nam govori da je antioksidativni kapacitet semene plazme netretiranih bikova bio niži nego kod tretiranih grupa bikova. Citomorfološke analize semena su sprovedene u cilju utvrđivanja odnosa živih/mrtvih ćelija, nalaza intaktnih i oštećenih akrozoma, protoplazmatskih kapljica, kao i primarnih, sekundarnih i ukupno patoloških formi spermatozoida specifičnim supravitalnim bojenjem po Blomu. Nije utvrđeno postojanje značajna razlika između ispitivanih grupa bikova prema prosečnom učešću živih i mrtvih spermatozoida.

Ključne reči: antioksidativni enzimi, bik, pokretljivost, seme

Naučna oblast: Veterinarska medicina

Uža naučna oblast: GINEKOLOGIJA SA ANDROLOGIJOM

UDK broj: 619:591.53:612.616

Determination of effect of antioxidants addition in food on bull's sperm quality parameters in heat stress condition

SUMMARY

Oxidative stress is a result of disbalance between reactive oxygen species (ROS) production and protection effect of antioxidative mechanism responsible for their neutralization and removal. Overproduction of ROS in body has negative influence on sperm motility and fertility. Besides, numerous effects of environment, physiological and genetic factors could impair function of sperm and cause infertility. Superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GPx) have key role in protection of oxidative stress and they are useful indicators of antioxidative stress.

The aim of the current research was to assess the effects of the feed additive made of lyophilized melon juice (source of superoxide dismutase, SOD) and inactivated live *Saccharomyces cerevisiae* (strain R397) cells added to feed via the product containing high levels of organically bound selenium (source of selenium-dependent glutathione peroxidase, Se-GPx) on the semen quality of bulls in heat stress conditions. The 15 bulls chosen for the experiment were assigned to three equal groups (control – group C; treated group E-I, given the source of SOD; and treated group E-II, treated with the source of Se-GPx). The biochemical parameters in blood serum and the parameters of antioxidative protection (SOD and Se-GPx) in seminal plasma were determined spectrophotometrically. Whilst semen quality parameters were determined by CASA (computer assisted sperm analysis) and by cytopatmorphological analyzes. Relationship between environmental factors (temperature and humidity), activity of antioxidative enzymes and semen quality were determined also.

The average SOD and GPx activity in the treated bulls was significantly higher than in control group and showed that both feed additives increased the antioxidative capacity of the seminal fluid. Besides, the antioxidative additives had positive influence on sperm motility because higher sperm motility was determined in treated groups. The analysis of relations between the activity of each enzyme and sperm motility and progressive motility in each of the bulls failed to detect significant correlation. The analysis of the relation between THI (temperature-humidity index) and the activity of the antioxidative enzymes revealed that the increase in THI coincided with the increase in the SOD and GPx activity but not significantly. Results showed that environmental temperature and humidity had no significant influence on semen quality in treated groups. It can be concluded that in all of the three groups of the bulls there was an increase in the activity of both enzymes in the seminal plasma, but the increase was significantly higher in the treated groups than in control group. Thus, the antioxidative capacity of the seminal plasma of treated bulls was proven to be higher (M and A groups). Cytomorphology analyzes of semen showed that there is no significant differences between groups according to the average of live and dead cells ratio.

Key words: antioxidative enzymes, bull, motility, sperm

Major Field of Study: Veterinary Medicine

Special Field of Study: GINECOLOGY WITH ANDROLOGY

UDK number: 619:591.53:612.616

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. PREGLED LITERATURE	2
Fiziologija spermatogeneze kod bikova	2
Oksidativni stres	6
Pozitivni i negativni efekti ROS.....	8
Mehanizmi zaštite od oksidativnog stresa.....	9
Uticaj povišene temperature i oksidativnog stresa na spermatozoide	11
Krioprezervacija semena i oksidativni stres	12
3. CILJ I ZADACI ISTRAŽIVANJA	16
4. MATERIJAL I METODE.....	17
4.1. MATERIJAL.....	17
4.2. METODE	17
4.2.1. Analiza smeše.....	17
4.2.2. Određivanje parametara antioksidativne zaštite	18
4.2.3. Biohemijske analize	18
4.2.4. Bioklimatske analize	19
4.2.5. Ispitivanje kvaliteta semena	19
4.2.6. Citomorfološke analize semena.....	20
4.2.7. Statistička obrada rezultata.....	21
5. REZULTATI.....	22
5.1. Hemijski sastav semeša.....	22
5.2. Parametri antioksidativne zaštite.....	23
5.2.1. Aktivnost superoksid dismutaze.....	23
5.2.2. Aktivnost glutation peroksidaze	24
5.3. Analiza metaboličkog profila	25
5.4. Analiza parametara brzine.....	33
5.4.1. Krivolinijska brzina.....	33

5.4.2. Pravolinijska brzina.....	34
5.4.3. Prosečna brzina kretanja.....	35
5.4.4. Indeks linearnosti	36
5.4.5. Pravolinijski indeks	37
5.4.6. Indeks oscilacije	38
5.4.7. Amplituda lateralnog otklona pomeranja glave	38
5.4.8. Frekvencija prelaska pravolinijske putanje	39
5.4.9. Površina glave spermatozoida	40
5.4.10. Manježno kretanje	41
5.5. Analiza učestalosti pokretnih spermatozoida po grupama	42
5.6. Uticaj THI na pokretljivost spermatozoida	44
5.7. Analiza korelacija između SOD, GPx i brzine kretanja spermatozoida.....	45
5.8. Citomorfologija	52
5.8.1. Učešće ukupno živih spermatozoida	52
5.8.2. Učešće živih spermatozoida sa IA.....	53
5.8.3. Učešće živih spermatozoida sa OA	54
5.8.4. Učešće mrtvih spermatozoida	55
5.8.5. Učešće mrtvih spermatozoida sa IA.....	56
5.8.6. Učešće mrtvih spermatozoida sa OA	57
6. DISKUSIJA.....	59
7. ZAKLJUČCI.....	64
8. LITERATURA.....	66

1. UVOD

Održivost i ekonomska isplativost u govedarskoj proizvodnji zavisi, između ostalog, i od indeksa plodnosti nakon veštačkog osemenjavanja (v.o.) krava. Uspešnost v.o. i optimalna upotreba genetski superiornih bikova uslovljena je kvalitetom i fertilnom sposobnošću duboko zamrznutog semena. Do sada je opisan veliki broj egzogenih i endogenih faktora koji imaju uticaja na kvalitet ejakulata. Kao najčešći razlozi lošeg kvaliteta semena navode se stresogeni faktori sredine (visoka temperatura i vlažnost, neadekvatni smeštaj, ishrana, itd) kao i endogeni (oksidativni stres, postojanje organskih oboljenja, metabolički poremećaji, prisustvo oboljenja lokomotornog aparata, itd). Tkivo reproduktivnog trakta bikova je izloženo dejstvu reaktivnih kiseoničnih vrsta (eng. reactive oxygen species-ROS) koje nastaju i kao proizvod normalnog metabolizma. Za razliku od niskih koncentracija ROS koje stimulišu hiperaktivnost spermatozoida, kapacitaciju i akrozomalnu reakciju, visoke koncentracije ROS dovode do patoloških promena na spermatozoidima intenzivirajući lipidnu peroksidaciju (LPO), što dovodi do smanjenja i/ili gubitka pokretljivosti i smanjene oplodne sposobnosti spermatozoida. Iskustva centara za proizvodnju bikovskog semena u našem regionu govore da su najlošiji rezultati u proizvodnji evidentirani u letnjem periodu (tokom meseca juna, jula i avgusta u zemljama severne hemisfere) što donosi ozbiljne gubitke u profitu. Sa tim u vezi cilj istraživanja u okviru ove doktorske disertacije bio je ispitivanje efekta dodavanja u hrani specifično inaktivisanih živih ćelija kvasca *Saccharomyces cerevisiae* (soj R397) sa visokim nivoom organski vezanog selena (izvor selen zavisne glutation-peroksidaze-Se-GPx) i liofilizovanog preparata pulpe dinje *Cucumis melo* (izvor superoksid dismutaze-SOD) na kvalitet ejakulata bikova u uslovima toplotnog stresa.

2. PREGLED LITERATURE

Gameti su osetljivi na uticaj reaktivnih kiseoničnih vrsta (eng. Reactive oxygen species-ROS). Prilikom manipulacije ovim ćelijama korišćenjem različitih tehnologija u reprodukciji, postoji rizik za stvaranje visokih koncentracija ROS, kojima su ove ćelije izložene (Du Plessis i sar., 2008). Poremećaji funkcija spermatozoida su najčešći uzroci neplodnosti muških jedinki i veoma su teški za lečenje (Anawalt, 2013). Mnogi uticaji okoline, fiziološki i genetski faktori mogu uticati na lošu funkciju spermatozoida i neplodnost (Sharlip i sar., 2002). Zato je vrlo važno utvrditi faktore koji negativno utiču na funkciju spermatozoida (Agrawal sar., 2008). Termin oksidativni stres (OS) se generalno primenjuje kada količina oksidanasa premaši količinu antioksidanasa (Du Plessis sar., 2008). Neuravnoteženost između proizvodnje ROS i sposobnosti biološkog sistema da neposredno izvrši detoksikaciju reaktivnih međuproizvoda ili lako sanira nastala oštećenja, je poznata kao oksidativni stres (Agrawal sar., 2003). Glavni aspekt oštećenja koja nastaju tokom OS je proizvodnja ROS, koje uključuju slobodne radikale i perokside (Valko sar., 2005).

Proizvodnja ROS od strane spermatozoida je normalan fiziološki proces, ali neuravnoteženost između proizvodnje ROS i sposobnosti njihove neutralizacije je štetna za spermatozoide i povezana sa neplodnošću (Agarwal i sar., 2008; Alahmar 2019). Fiziološki nivo ROS ima uticaj na gamete (Rivlin i sar., 2004; De Lamirande i Lamothe, 2009; Donà i sar., 2011) i posreduje u ključnim reproduktivnim procesima, kao što su interakcija između spermatozoida i jajne ćelije (Saleh i Agarwal, 2002), implatacija i rani embrionalni razvoj (Sakkas i sar, 1998).

Spermatozoidi poseduju efikasan odbrambeni sistem protiv štetnog dejstva ROS. Antioksidansi su glavni odbrambeni faktor protiv oksidativnog stresa izazvanog slobodnim radikalima.

Fiziologija spermatogeneze kod bikova

Testisi su organi gde se odvijaju dve glavne funkcije: egzokrina i endokrina. Egzokrina funkcija obuhvata proizvodnju visoko diferenciranih gameta, spermatozoida, koji se oslobađaju u lumen seminalnih kanalića, a zatim skladište u epididimisima. Endokrina funkcija se odvija uz pomoć Lejdigovih ćelija, koje su lokalizovane u intersticijumu, van tubula, čija je glavna uloga sinteza steroida.

Spermatogeneza je precizno regulisan proces umnožavanja i diferencijacije klicinih ćelija, koji dovodi do produkcije muških gameta. Spermatogeneza se može podeliti na tri dela: spermatocitogeneza, mejoza i spermiogeneza.

Tokom spermatocitogeneze, klicine ćelije podležu prvoj mitotičkoj deobi, što dovodi do stvaranja spermatogonija. Spermatogonije se kroz nekoliko uzastopnih mitotičkih podela proliferišu i dolazi do stvaranja preleptotenskih spermatocita. One

prolaze kroz krvno-testisnu barijeru i ulaze u profazu mejoze. Tokom profaze prve mejotičke deobe, klicine ćelije se diferenciraju i prolaze kroz različite stadijume (leptoten, zigoten, pahiten, diploten) pre ulaska u drugu mejotičku deobu. Prva mejotička deoba je redukciona (smanjuje se broj hromozoma, dolazi do odvajanja homologih hromozoma), dok je druga mejotička deoba ekvaciona (odvajanje ćerki hromatida), tako da mejoza dovodi do produkcije okruglih haploidnih spermatida. Spermioogeneza obuhvata diferencijaciju okruglih spermatida u spermatide različitog stepena izduženosti, koje se diferenciraju u spermatozoide. Spermatozoidi se oslobađaju u lumen seminalnih kanalića tokom završne faze spermijacije (O'Donnell i sar., 2011).

Epitel seminalnih kanalića se sastoji od nekoliko generacija klicinih ćelija. To je zbog činjenice da se aktivacija nove generacije ćelija i njihova diferencijacija od spermatogonija do spermatozoida odvija kroz unutrašnju površinu membrane seminalnih kanala, pre nego što je prethodna generacija istih ćelija završila diferencijaciju i spermatozoidi ušli u lumen kanalića. Sudbina određene generacije klicinih ćelija u određenom odeljku seminiferog kanalića je usko povezana sa razvojem drugih generacija komšijskih ćelija. Rezultat je prisustvo grupacije ćelija koje prate jedna drugu u vremenu, u datoj tački seminalnog tubula, po perfektno regulisanom redosledu, što se karakteriše kao ciklus seminalnog epitela. Kod bikova, trajanje ciklusa seminalnog epitela iznosi 13,5 dana. Trajanje kompletne spermatogeneze iznosi 61 dan, što je 4,5 puta duže od trajanja ciklusa seminalnog epitela. Deli se u tri faze, mitotska proliferacija (spermatocitogeneza), mejoza i citodiferencijacija (spermioogeneza), gde svaka od gore navedenih faza traje 21, 23 i 17 dana.

Nasuprot ciklusu seminalnog epitela, koji je histološki fenomen i koji se dešava na datom mestu u seminalnom kanaliću, u datom vremenu, talas spermatogeneze se opisuje kao prostorni raspored grupe ćelija duž seminalnog kanalića. Još je 1887. godine Benda ukazao na postojanje talasa spermatogeneze kod velikog broja vrsta sisara (miševa, zamorca, zečeva, ovnova, bikova, svinja, pasa i mačaka). Perey, Clermont i Leblond su 1961. godine pažljivo istražili talas spermatogeneze kod pacova i potvrdili da su grupacije ćelija smeštene duž seminalnog kanalića, tako da odgovaraju numeričkom nizu faza razvoja u ciklusu spermatogeneze, ali su uočili i neke nepravilnosti koje su nazvali "modulacije". Ove modulacije se sastoje od serija segmenata tubula koje imaju prvo rastući numerički niz, a zatim opadajući, pa je viđen opet rastući. Uprkos ovim nepravilnostima, delovi seminalnog kanalića na kojima se nalazi određena grupa ćelija u određenom stadijumu razvoja je uvek ograničena segmentima koji sadrže ćelije u prethodnoj i sledećoj fazi razvoja (Staub i Johnson, 2018).

Na osnovu klasifikacije koju je postavio Amann (1962), kod bikova postoji 8 faza spermatogeneze.

Faza I se karakteriše A spermatogonijama, B spermatogonijama ili primarnim spermatocitima u fazi leptotena i pahitena i Sb1 spermatidama.

Faza II se karakteriše A spermatogonijama, primarnim spermatocitima u fazi zigotena i pahitena i Sb2 spermatidama.

Faza III se karakteriše sa dve generacije A spermatogonija, primarnim spermatocitima u fazi zigotena i diplotena i Sc spermatidama.

Faza IV se karakteriše A spermatogonijama, intermedijalnim spermatogonijama, primarnim spermatocitima u fazi zigotena, sekundarnim spermatocitima i Sc spermatidama.

Faza V se karakteriše A spermatogonijama, intermedijalnim spermatogonijama, primarnim spermatocitima u fazi pahitena i sa dve generacije spermatida (Sa i Sd1).

Faza VI se karakteriše A spermatogonijama, intermedijalnim spermatogonijama, primarnim spermatocitima u fazi pahitena i sa dve generacije spermatida (Sa i Sd1).

Faza VII se karakteriše A spermatogonijama, B spermatogonijama, primarnim spermatocitima u fazi pahitena i sa dve generacije spermatida (Sa i Sd2).

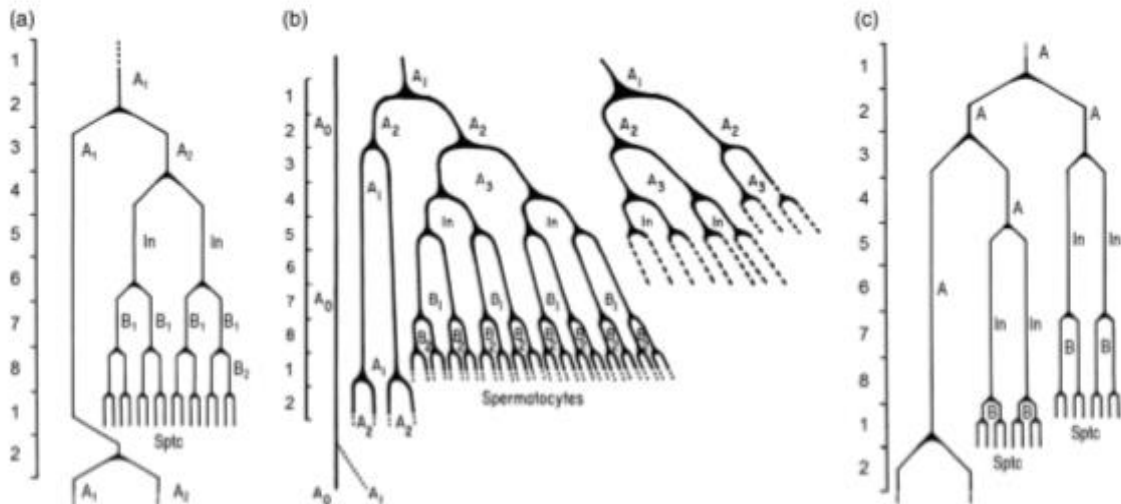
Faza VIII se karakteriše A spermatogonijama, sa dve generacije B spermatogonija (B1 i B2), primarnim spermatocitima u fazi pahitena i sa dve generacije spermatida (Sa i Sd2).

Sada kada je utvrđen osnovni model kinetike spermatogeneze, ostaje da se utvrditi tačan model obnavljanja spermatogonija u testisima bikova, što je veoma teško. Najmanje tri kriterijuma treba uzeti u obzir prilikom istraživanja procesa obnove spermatogonija: stopa njihove podele, stopa njihove degeneracije i prisustvo ćelija u mirovanju. Ova tri kriterijuma utiču na broj spermatogonija u procesu spermatogeneze.

Proces podele spermatogonija se sastoji iz šest faza uključujući fazu proliferacije spermatogonija, koja je sastavni deo spermatogeneze bikova, tri podele A spermatogonija, jedna intermedijalnih spermatogonija i dve B spermatogonija.

Bitna tačka oko koje se vodi debata je način na koji se vrši obnavljanje spermatogonije i/ili način na koji se uključuje u proces spermatogeneze. Postoje dve teorije koje se zasnivaju na prisustvu ili odsustvu asimetrične podele u populaciji spermatogonija. Asimetrična deoba je deoba kod koje dolazi do nastanka dve različite ćerke ćelije (Staub i Johnson, 2018). Prema modelu koji iznosi Ortavant (1959), prva mitotička deoba spermatogonija (od A_1 spermatogonije), dovodi do stvaranja A_1 spermatogonija i A_2 spermatogonija. Stoga, imamo obnavljanje A_1 populacije spermatogonija, dok sestre ćelije, A_2 spermatogonije nastavljaju dalji proces sazrevanja u spermatogenezi (Slika 1a). U modelu koji predlaže Hochereau-de Reviere (1970 i 1971), druga mitotička deoba spermatogonija (od A_2 spermatogonije), dovodi stvaranja A_1 spermatogonija i A_3 spermatogonija. Populacija A_1 spermatogonija služi za obnavljanje populacije, dok A_3 spermatogonija ulazi u dalje procese spermatogeneze. Dodatno, A_0 spermatogonije imaju mogućnost da produkuju A_1 spermatogonije, a takođe i održavaju rezervu A_0 spermatogonija tokom asimetrične deobe (Slika 1b).

Prema istraživanjima Kramera (1960) i Amanna (1962), asimetrična podela spermatogonija ne postoji. Stoga, proporcionalno jedan deo A_1 spermatogonija se deli da bi obnovio rezerve A_1 spermatogonija, a drugi deo A_1 se deli i prelazi u A_2 spermatogonije, koje ulaze u dalji process spermatogeneze. Oni čak predlažu model asinhrono spermatogonijalne podele (Slika 1c).



Slika 1. Model obnavljanja spermatogonija kod bikova predložen od strane a) Ortavanta (1959), b) Hochereau-de Reversia (1962) i c) Amanna (1962). Glavna razlika je prisustvo asimetrične mitotične deobe A_1 spermatogonija u modelu predloženom od strane Ortavanta (a), A_0 i A_2 spermatogonija u modelu Hochereau-de Reversia (b), dok asimetrična mitotička deoba ne postoji u modelu Amanna(c).

Efikasnost spermatogeneze je određena kvalitativno histološkim pregledom seminalnih kanalića i kvantitativno brojanjem ćelija. Dnevna produkcija spermatozoida po gramu dekapuliranog testisa je mera efikasnosti spermatogeneze i vrlo je korisna za upoređivanje efikasnosti spermatogeneze među vrstama (Amann i sar., 1976). Ljudi imaju mnogo manju efikasnost spermatogeneze ($4-6 \times 10^6/g$) (Johnson i sar., 1981) nego druge vrste, uključujući zečeve ($25 \times 10^6/g$), hrčkove ($24 \times 10^6/g$), pacove ($20-24 \times 10^6/g$), rezus majmune ($23 \times 10^6/g$), nerastove ($21 \times 10^6/g$), pastuve ($16-19 \times 10^6/g$) i bikove ($12 \times 10^6/g$) (Amann i sar., 1976; Amann, 1981; Johnson, 1986). Manja efikasnost spermatogeneze u testisima ljudi u odnosu na druge vrste dovodi se u vezu sa dugim trajanjem spermatogeneze, dužim trajanjem ciklusa i manjom koncentracijom klicinih ćelija (Johnson, 1986).

Kod različitih vrsta dolazi do degeneracije ćelija na različitom stadijumu razvoja u spermatogenezi. Kod ljudi dolazi 30-40 % do redukcije proizvodnje spermatozoida na kraju mejoze, dok kod bikova i pastuva nema značajnog gubitka i degeneracije spermatozoida tokom mejoze. Tokom sezone parenja pastuva, postoji značajna degeneracija B spermatogonija tokom spermatocitogeneze i na kraju mejoze (Johnson, 1985). Kod bikova je zabeležen značajan broj oštećenih ćelija tokom spermatocitogeneze. Značajan gubitak od oko 30% se dešava između faze A i intermedijalnih spermatogonija, druga faza degeneracije od oko 30% se dešava na nivou B_1 spermatogonija i između B_1 i B_2 spermatogonija (Hochereau-de Reversia, 1970; Berndston i Desjardins, 1974). Bez ovog gubitka klicinih ćelija u ranoj fazi spermatogeneze, bikovi bi imali dnevnu produkciju spermatozoida oko $30 \times 10^6/g$. Bikovi nemaju značajan gubitak ćelija tokom spermiogeneze (Johnson, 1986).

Fagocitozu oštećenih klicinih ćelija vrše Sertolijeve ćelije. One su glavna somatska komponenta seminalnih kanalića. Sertolijeve ćelije imaju multi-lobularno jedro, citoplazmu bogatu endoplazmatičnim retikulumom, glikoproteinima i citoplazmatičnim kapljicama, čija je količina suprotno proporcionalna razvoju spermatozoida. Slično

ovome, citoskelet Sertolijevih ćelija varira tokom ciklusa seminalnog epitela, što ukazuje na visok obim plastičnosti Sertolijevih ćelija, što je u skladu sa cikličnim razvojem klicinih ćelija (Russell i Griswold, 1993). Sertolijeve ćelije su velike piramidalne ćelije, čija je baza u kontaktu sa bazalnom membranom seminalnih kanalića. U pubertetu se između Sertolijevih ćelija formiraju čvrste veze, koje su bitne za formiranje krvno-testisne barijere (Dym i Fawcett, 1970). Ova barijera sprečava slobodan prolaz komponenti iz krvi do klicinih ćelija lokalizovanih u adluminalnim odeljcima testisa. Ovim se one štite od mogućih toksičnih ili mutagenih faktora i u slučaju autoimunih reakcija od autoantitela. Takođe, moguće je sprečiti smanjenje koncentracije androgen-vezujućeg protein (eng. Androgen-binding protein-ABP), inhibina, aktivina, enzimskih inhibitora u okviru luminalnih odeljaka sminifroznih kanalića.

Sertolijeve ćelije imaju ulogu u obradi adluminalne tečnosti i formiranju specifične jonske sredine, neophodne za diferencijaciju klicinih ćelija ka apikalnom delu seminalnih kanalića (Setchell, 1970). One ubrzavaju prolaz izvesnih jedinjenja, kao što su testosteron i glukoza, imaju ulogu ishrane klicinih ćelija, obezbeđujući im energetske supstrate, kao što su laktat i piruvat, koji su neophodni za njihov opstanak (Jutte i sar., 1982). Ove funkcije su pod kontrolom folikulostimulirajućeg hormona (FSH) (Jutte i sar., 1983).

Pod uticajem FSH i androgena Sertolijeve ćelije sintetišu veliki broj proteina, koji se luče u seminiferoznim kanalićima, ka klicinim ćelijama i intersticijalnom prostoru (Lejeune i sar., 1996). Neki od njih, kao što su inhibin i aktivin koji pored uloge u oslobađanju gonadotropina iz hipofize, imaju uticaj i na funkciju Lejdigovih ćelija u testisima; ABP se oslobađa pod uticajem FSH i androgena i ima uticaja na dostupnost androgena, reguliše spermatogenezu i produkciju spermatozoida (Ritzèn i sar., 1982); transferin je glikoprotein koji nosi gvožđe do ćelija, čija je koncentracija u seminalnoj plazmi direktno povezana sa proizvodnjom spermatozoida i oplodnom sposobnošću (Gilmont i sar., 1990; Ing i sar., 2018). Mnogi faktori rasta se stvaraju u organizmu, kao što je seminalni faktor rasta, koji ima ulogu u proliferaciji spermatogonija, nervni faktor rasta, koji ima ulogu u sintezi dezoksiribonukleinske kiseline (DNK) u fazi preleptotena spermatoocita i insulin-sličan faktor rasta 1 (IGF-1), koji ima ulogu u diferencijaciji klicinih ćelija (Mauduit i Benahmed, 1996).

Nakon intenzivne proliferacije Sertolijevih ćelija tokom fetalne faze života, one postepeno gube sposobnost za podelom. Kod bikova, ne postoji dalja podela Sertolijevih ćelija 6 meseci nakon rođenja (Attal i Courot, 1963), njihov broj dostiže maksimum sa 28 nedelja kod Holštajn bikova (Curtis i Amann, 1981). Produkcija spermatozoida je tako direktno povezana sa brojem Sertolijevih ćelija, koji je određen još pre puberteta (Berndston i sar., 1987).

Oksidativni stres

Jedan od najvažnijih faktora koji doprinosi lošem kvalitetu semena je oksidativni stres (Bucak i sar., 2010). Oksidativni stres je stanje koje prati oštećenje ćelija izazvano kiseonikom i oksidansima nastalim od kiseonika, koji se uobičajno nazivaju ROS (Sikka i sar., 1995). Priplodne životinje su izložene velikom broju bioloških faktora i faktora iz okruženja, kao što su varijacije u ishrani, klimatske promene, transport, pregrupisanje, terapijske i profilaktičke mere, različiti stresogeni faktori itd. (Brito i

sar., 2002; Majić-Balić i sar., 2012). Sposobnost priplodnih bikova da se izbore sa ovim faktorima je važna za očuvanje zdravlja i reproduktivnih sposobnosti (Rahal i sar., 2014). Svako narušavanje homeostaze dovodi do povećane proizvodnje ROS, u mnogo većim količinama nego što je detoksikacioni kapacitet lokalnog tkiva ili organizma (O'Flaherty, 2014). Nekontrolisana proizvodnja ROS, koja premašuje antioksidativni kapacitet seminalne plazme, izaziva OS, koji je štetan za spermatozoide (Desai i sar., 2010). Sve ćelijske komponente uključujući lipide, proteine, nukleinske kiseline i ugljene hidrate su potencijalne mete dejstva OS (Agarwal i sar., 2008). Spermatozoidi bikova su izuzetno osetljivi na oksidativna oštećenja izazvana ROS (Zanganeh i sar., 2013), koji dovodi do oksidacije lipida u membranama (Martinez i sar., 2007), proteina i DNK (Brouwers i Gadella, 2003; Bansal i Bilaspuri, 2011), što je povezano sa poremećajem u funkciji membrane, metabolizmu, morfologiji i pokretljivosti (O'Flaherty, 2014).

Reaktivne kiseonikove vrste nastaju kao sporedni proizvodi u enzimskim reakcijama, koje se odvijaju tokom unutra i međućelijske signalizacije. Spermatozoidi sisara su tipovi ćelija čiji kapacitet za proizvodnju ROS, kao što su hidrogen peroksid (H_2O_2), superoksidni anjon (O_2^-), hidroksilni radikal (OH) i hipohloridni radikal (OHCl), raste u anaerobnim uslovima. Zbog njihove reaktivne prirode, ROS mogu neposredno da stupe u reakciju sa drugim molekulima, što dovodi do oksidacije koja ima za posledicu strukturne i funkcionalne promene odgovorne za ćelijsko oštećenje (Guérin i sar., 2001; Agarwal i sar., 2005a). Ovi molekuli obuhvataju nekoliko kategorija molekula i to: slobodne radikale (hidroksilni jon, superoksid, azotni oksid, peroksil i td.), neradikale (ozon, pojedinačni kiseonik, lipid peroksid, hidrogen peroksid) i derivate kiseonika (Agarwal i Prabakaran, 2005). Slobodni radikali predstavljaju kratkoživeće hemijske međuproizvode, koji sadrže jedan ili više nesparenih elektrona (Kefer i sar., 2009). ROS izazivaju oštećenja ćelija koja nastaju kao posledica oksidacije lipida u membrani, amino kiselina u proteinima ili u okviru nukleinskih kiselina (Auten i Davis, 2009). Slobodni radikali su poznati kao neophodno zlo za unutraćelijsko prenošenje signala uključeno u procese proliferacije, diferencijacije i migracije (Ford, 2001; Agarwal i sar., 2004; Rhee, 2006). Proizvodnja slobodnih radikala u višku dovodi do poremećaja u spermatogenezi, što ima za rezultat otpuštanje spermatozoida iz germinativnog epitela sa abnormalno visokim nivoom zadržavanja citoplazme (Sanocka i Kurpisz, 2004).

Reaktivne azotne vrste (azotni oksid, peroksinitrit, nitroksilni jon) su slobodni azotni radikali koji se smatraju potklasom ROS (Sikka, 2001; Valko i sar., 2007). Dokazano je da azotni oksid ima štetan uticaj na funkciju spermatozoida, tako što inhibira pokretljivost i afinitet za vezivanje za zonu pelucidu (Agarwal i sar., 2008).

Kod muških jedinki postoje dva sistema koji proizvode ROS, NADH oksidaza na nivou membrane spermatozoida i spermatozoidna dijaforaza (mitohondrijalna NADH-zavisna oksidoreduktaza) (Gavella i sar., 1996). Kod bikovskog semena, ROS se primarno stvaraju u mrtvim spermatozoidima u reakciji koja je katalizovana aromatičnom aminokiselinskom oksidazom (Sariözkan i sar., 2009a). Leukociti i nezreli spermatozoidi su glavni izvor ROS (Garrido i sar., 2004). Leukociti, naročito neutrofili i makrofagi, su povezani sa velikom proizvodnjom ROS i poremećajem u funkciji spermatozoida. Dva glavna faktora koja dovode do nakupljanja ROS *in vitro* su odsustvo unutrašnjeg odbrambenog mehanizma i izlaganje gameta i embriona različitim reproduktivnim tehnikama i ambijentalnim faktorima, što uzrokuje OS (Du Plessis i sar., 2008). Koncentracija ROS u organizmu priplodnih jedinki može ponekad da varira, ali da bez uticaja na koncentraciju i pokretljivost spermatozoida. To se može

objasniti prisustvom adekvatnog antioksidativnog odbrambenog mehanizma kod zdravih jedinki. Ove varijacije koncentracije ROS mogu biti uslovljene prolaznim subkliničkim infekcijama ili poremećajima u spermatogenezi, kao što su zadržavanje citoplazme ili periodično prisustvo patoloških spermatozoida u semenu (Desai i sar., 2010).

Pozitivni i negativni efekti ROS

Proizvodnja ROS je fiziološki proces, ali neuravnoteženost između proizvodnje ROS i njihove razgradnje je štetna za spermatozoide i povezana sa neplodnošću mužijaka (Anawalt, 2013). Reaktivne kiseonikove vrste proizvedene od strane spermatozoida igraju važnu ulogu u fiziološkim procesima, kao što su kapacitacija spermatozoida, akrozomalna reakcija, održavanje oplodne sposobnosti i stabilizacija mitohondrijalne membrane spermatozoida bikova (Agarwal i sar., 2008, Desai i sar., 2009). Kontrolisana proizvodnja ROS ima ulogu u signalnim procesima (sekundarni glasnici) u različitim tipovima ćelija, oni su važni medijatori u funkcijama spermatozoida. Spermatozoidi sisara moraju proći kroz pripremni proces koji se naziva kapacitacija, da bi bili sposobni da oplode jajnu ćeliju. Ovaj proces je povezan sa promenama u plazma membrani i metaboličkim promenama, koje dovode do prolaznih promena u pokretljivosti spermatozoida (hiperaktivacija) i egzocitoze koja se naziva akrozomalna reakcija, veoma bitna faza u oplodnji jajne ćelije (Yanagimachi, 1994). Kapacitacija je neophodan proces za odvijanje akrozomalne reakcije, pošto je dokazano da spermatozoidi koji nisu podlegli procesu kapacitacije, nisu sposobni da uđu u proces akrozomalne reakcije (Parrish i sar., 1988). Kontrolisana količina ROS, kao što je O_2^- na površini zrelih spermatozoida ljudi, je neophodna za proces hiperaktivacije i kapacitacije spermatozoida (Saleh i Agarwal, 2002). Superoksid dismutaza inhibira kapacitaciju indukovanu heparinom, dok ksantin-ksantin oksidaza-katalaza sistem indukuje stvaranje O_2^- , koji indukuje kapacitaciju spermatozoida goveda (O'Flaherty i sar., 1999). U ovom procesu učestvuje i H_2O_2 , jer dodavanje egzogenog H_2O_2 indukuje kapacitaciju spermatozoida ljudi (Rivlin i sar., 2004). Dokazano je da je O_2^- neophodan za završnu fazu razvoja embriona, kao što su dva sloja germinativnih ćelija ili cilindar jajne ćelije (Dumollard i sar., 2009). Zato je održavanje odgovarajuće koncentracije ROS neophodno za adekvatno funkcionisanje spermatozoida. Reaktivne kiseonikove vrste imaju suprotan efekat na plazma membranu spermatozoida, DNK i fiziološke procese, što utiče na kvalitet spermatozoida. Akrozomi i pripadajuća gusta vlakna srednjeg dela spermatozoida su prekriveni mitohondrijama, koje proizvode energiju iz unutraćelijskih depoa adenozintrifosfata (ATP) (Bucak i sar., 2008). Povećana koncentracija ROS u organizmu negativno utiče na pokretljivost spermatozoida i oplodnu sposobnost. Membrana spermatozoida sisara je bogata nezasićenim masnim kiselinama (NMK) i osetljiva je na oštećenja izazvana kiseonikom, time i na dejstvo ROS kao posledica lipidne peroksidacije, što ima za posledicu smanjenu pokretljivost usled gubitka unutraćelijskog ATP. Ova pojava dovodi do oštećenja aksonema, pada oplodne sposobnosti spermatozoida i povećanja broja spermatozoida sa defektima na srednjem delu, što dovodi do štetnih efekata prilikom kapacitaciju i akrozomalne reakcije (Bansal i Bilaspuri, 2007). Prema tome, ROS predstavljaju markere neplodnosti kod muških jedinki (Agarwal i sar., 2006).

Mehanizmi zaštite od oksidativnog stresa

Spermatozoidi su zaštićeni od oksidativnih oštećenja različitim antioksidansima, koji se nalaze u semenoj plazmi i samim spermatozoidima (Walczak–Jedrzejowska i sar., 2013). Antioksidansi imaju ulogu u neutralizaciji i supresiji stvaranja ROS ili sprečavaju njihovu aktivnost. Mn^{2+} joni povećavaju pokretljivost i oplodnu sposobnost spermatozoida, podstiču kapacitaciju i akrozomalnu reakciju smanjujući oksidativni stres (Bansal i Bilaspuri, 2008a; Bilaspuri i Bansal, 2008). Vanćelijsko dodavanje Mn^{2+} jona podiže nivo cikličnog adenozinmonofosfata (cAMP) stimulacijom Ca^{2+} ili Mg^{2+} ATPaze, što dovodi do otvaranja kalcijumovih kanala i njegovog nagomilavanja u ćeliji, što stimuliše akrozomalnu reakciju (Bansal, 2013). Vitamin E može direktno inhibirati dejstvo slobodnih radikala, kao što su peroksil i alkosil, koji se stvaraju tokom LPO izazavane fero askorbatom, što nam ukazuje da je on glavni antioksidans koji prekida lanac reakcije (Bansal i Bilaspuri, 2009). Tiolne grupe, pored toga što održavaju unutraćelijski redoks status, takođe igraju bitnu ulogu u detoksikaciji i antioksidaciji ROS. Ove grupe služe kao odbranbeni mehanizam ćelija spermatozoida u borbi protiv OS (Bansal i Bilaspuri, 2008b).

Enzimski antioksidansi su takođe poznati kao prirodni antioksidansi, koji neutrališu višak ROS i sprečavaju oštećenja ćelijskih struktura. Ova grupa jedinjenja obuhvata superoksid dismutazu (SOD), katalazu (CAT), glutation peroksidazu (GPx) i glutation reduktazu (GR), koja redukuje vodonik peroksid u vodu i alkohol (Agarwal i sar., 2005a). SOD katalizuje pretvaranje superoksidnog anjona (O_2^-) u O_2 i H_2O_2 , dok CAT pretvara H_2O_2 u O_2 i H_2O . SOD štiti spermatozoide od spontane oksidacije i lipidne peroksidacije. SOD i CAT takođe uklanjaju O_2^- stvoren od strane NADPH oksidaze u neutrofilnim granulocitima i imaju glavnu ulogu u smanjenju obima LPO i zaštiti spermatozoida od oksidativnog oštećenja (Agarwal i sar., 2006). Enzimi antioksidansi uključeni u detoksikaciju ROS u spermatozoidima sisara su SOD, CAT i GPx (Agarwal i sar., 2005b). Zbog vrlo niske utvrđene koncentracije katalaze u spermatozoidima sisara i/ili semenoj plazmi, uloga GPx u zaštiti spermatozoida i muškog germinativnog tkiva od oštećenja peroksidacijom je vrlo važna (Bilodeau i sar., 2000), dok je SOD najefikasniji u odbrani spermatozoida bikova protiv ROS (Magnes i Li, 1980).

Neenzimski antioksidansi su još poznati i kao sintetski antioksidansi ili dodaci hrani. Telesni antioksidativni sistem je pod uticajem antioksidanasa koji se unose hranom, vitamina i minerala, kao što su vitamin C, vitamin E, cink, taurin, hipotaurin i glutation (Agarwal i sar., 2005a). Predominantno su prisutni u ekstracelularnoj tečnosti i imaju sposobnost da eliminišu slobodne radikale nastale u OS, a neki štite integritet membrane spermatozoida delujući interaktivno i sinergistički (Bansal i Bilaspuri, 2011).

Glutation (GSH) je molekul nađen u brojnim ćelijama (na nivou mM), koji je sposoban da reaguje sa ROS direktno. On je takođe kofaktor za glutation peroksidazu (GPX), koja katalizuje redukciju toksičnog H_2O_2 i drugih hidroperoksida, štiteći ćelije sisara od oksidativnog stresa (Bucak i sar., 2008). Glutamin (5 mM) poseduje krioprotektivni efekat poboljšavajući pokretljivost spermatozoida nakon otapanja, integritet membrane i enzimsku aktivnost u semenu ovnova (Bucak i sar., 2009).

Selen (Se) je esencijalni element koji igra bitnu ulogu u reprodukciji životinja (Kehr i sar., 2009; Brennan i sar., 2012; El- Sharawy i sar., 2017). Selen se može naći u telu kao deo najmanje 25 selenoproteina (Ursini i sar., 1997; Kryukov i sar., 2003). Smatra

se da su ovi selenoproteini uključeni u regulaciju različitih fizioloških procesa, uključujući antioksidativnu zaštitu, regulaciju ekspresije gena, metabolizam štitne žlezde i održavanju strukturnog integriteta spermatozoida (Surai, 2002). Kod mnogih životinja Se se nagomilava u visokim koncentracijama u endokrinim žlezdama i reproduktivnim organima (Kohrle i sar., 2005). Dokazano je da je Se sastavni deo spermatozoida i veoma bitan za spermatogenezu (Kehr i sar., 2009). Šta više, Se ima antioksidativne osobine na taj način što je uključen na aktivnim mestima enzima GPx, koja je prisutna i u seminalnoj plazmi i u spermatozoidima. Ovaj mikroelement je bitan za plodnost mužijaka (Boitani i Puglisi, 2009). Deficit Se u hrani može dovesti do smanjenog broja spermatozoida u ejakulatu, smanjenja njihove pokretljivosti, oplodne sposobnosti i kod sisara i kod ptica (Marin-Guzman i sar., 2000; Surai, 2002; Kaur i Bansal, 2005; Rayman, 2012). U stočarstvu je vrlo bitno obezbediti obroke sa dovoljno Se, da bi se očuvao kvalitet semena. Postoje dva glavna izvora Se u obroku: neorganski i organski Se (uglavnom selenometionin). Iz podataka koji su nastali u poslednjih nekoliko decenija se može zaključiti da postoje osnovne razlike između ove dve forme Se. Organski Se obezbeđuje više rezervi u telu (Surai, 2002). Glavni izvor selenometionina su biljke, koje absorbuju Se iz zemlje u formi selenita i sintetišu selenoamino kiseline (Whanger PD, 2002). Selenometionin je glavni sastojak u Se-obogaćenim kvascima (Połatajko i sar., 2005), koji se koristi kao organska forma Se za dodavanje hrani.

Dodavanje inozitola u razređivač za bikovsko seme može poboljšati pokretljivost spermatozoida. Inozitol ima krioprotektivni i antioksidativni efekat, što izaziva povećanu aktivnost GSH, štiti integritet akrozoma i morfologiju spermatozoida (Bucak i sar., 2010).

Cistein je amino kiselina male molekularne mase, koja sadrži tiol, prekursor unutraćelijskog glutaciona (Uysal i Bucak, 2007). Dokazano je da lako prolazi kroz ćelijsku membranu dovodeći do povećanja sinteze GSH u ćeliji *in vivo* i *in vitro*, štiteći lipide i proteine u membrani (Hendin i sar., 1999). Cistein ima krioprotektivni efekat na funkcionalni integritet akrozoma i mitohondrija, poboljšavajući pokretljivost spermatozoida nakon otapanja. Dokazano je da tioli, kao što su glutation i cistein, preveniraju gubitak pokretljivosti spermatozoida nakon otapanja bikovskog semenu. Cistein prevenira gubitak pokretljivosti spermatozoida nakon otapanja semenu bikova, ovnova i jarčeva i poboljšava oplodnu sposobnost, strukturu hromatina i integritet membrane semena nerasova tokom prezervacije (Uysal i Bucak, 2007).

Trehaloza (disaharid) ili taurin (amino kiselina sa sumporom), igraju važnu ulogu u zaštiti spermatozoida od ROS u slučaju njihovog izlaganja aerobnim uslovima i procesu zamrzavanja-otapanja (Reddy i sar., 2010). Nestabilni disaharidi imaju zaštitnu ulogu, koja je povezana sa osmotskim efektom i specifičnim interakcijama sa fosfolipidima membrane, čineći sredinu hipertoničnom, što izaziva ćelijsku osmotsku dehidraciju pre zamrzavanja i tako smanjuju broj ćelija koje se oštećuju kristalizacijom. Trehaloza pokazuje bolju krioprotektivnu ulogu, jer seme nakon otapanja ima bolju oplodnu sposobnost zbog manjeg prisustva mrtvih i oštećenih spermatozoida (Bucak i sar., 2007). Taurin pokazuje antioksidativne osobine podižući koncentraciju katalaze i SOD u semenu jarčeva, zečeva i bikova (Reddy i sar., 2010).

Hijaluronan, bitna komponenta ekstraćelijskog matriksa i nesulfatizovani glikozaminoglikan, ima važnu ulogu u fiziološkim funkcijama kao što su pokretljivost spermatozoida, kapacitacija spermatozoida, očuvanje oplodne sposobnosti spermatozoida nakon otapanja i održavanje stabilnosti membrana *in vitro*. Hijaluronan poboljšava pokretljivost spermatozoida, oplodnu sposobnost i integritet membrane nakon zamrzavanja i otapanja (Bucak i sar., 2007). Goveđi serum albumin eliminiše slobodne radikale nastale oksidativnim stresom i štiti integritet membrane spermatozoida pasa od toplotnog šoka tokom procesa zamrzavanja i otapanja.

Karotenoidi kao što su beta-karoten i likopen, su takođe važne komponente antioksidativne odbrane. Beta-karoteni štite plazma membranu spermatozoida pacova od štetnog dejstva LPO (Uysal i Bucak, 2007).

Dokazano je da brojni antioksidansi imaju zaštitnu ulogu od štetnog dejstva ROS na pokretljivost spermatozoida i od oksidativnog oštećenja (Yousef i sar., 2003; Walczak-Jedrzejowska i sar., 2013). Odavno je poznato da dodavanje antioksidanasa medijumima održava pokretljivost spermatozoida bikova nakon zamrzavanja i otapanja, ali se ukazuje i na to da je antioksidativna terapija efikasna ne samo *in vitro*, nego i *in vivo* (Patel i sar., 2016).

Uticaj povišene temperature i oksidativnog stresa na spermatozoide

Tkivo reproduktivnog trakta mužijaka je izloženo dejstvu ROS koje nastaju i kao proizvod normalnog metabolizma. U procesu oplodnje, spermatozoidi prolaze kroz oblasti sa visokom koncentracijom kiseonika (Fujii i sar., 2003). Za razliku od niskih koncentracija ROS koje stimulišu hiperaktivnost spermatozoida, kapacitaciju i akrozomalnu reakciju (Witte i Schäfer-Somi, 2007; Aitken, 2017), visoke koncentracije ROS dovode do patoloških promena na spermatozoidima intenzivirajući LPO, što dovodi do gubitka pokretljivosti i oplodne sposobnosti spermatozoida (Makker i sar., 2009). Srednji deo spermatozoida sadrži mitohondrije koje su posebno osetljive na LPO i smatra se da je elektronski lanac (niz) izvor povećane proizvodnje ROS (Koppers i sar., 2008). Negativativan uticaj ROS na funkciju spermatozoida je vidljiv kroz nagli gubitak unutraćelijskog ATP, oštećenja aksoneme i morfološke promene spojnog dela spermatozoida sa štetnim uticajem na kapacitaciju spermatozoida i akrozomalnu reakciju (Alahmar, 2019). Takođe, ROS stimulišu oksidaciju sulfhidrilne grupe u proteinskim molekulima i samim tim oksidaciju DNK, menjajući strukturu i funkciju spermatozoida (Agarwal i sar., 2003). Dokazano je da mnogi genetski i ambijentalni faktori mogu smanjiti kvalitet semena i dovesti do neplodnosti. Kao takav, stres nastao dejstvom visokih spoljašnjih temperatura, može dovesti do oštećenja velikog broja spermatozoida, a dugotrajno dejstvo visokih temperatura uz povećanu vlažnost može uzrokovati neplodnost mužjaka tokom dužeg vremenskog perioda (Brouwers i Gadella, 2003; Rao i sar., 2015). Štetan efekat visokih ambijentalnih temperatura na kvalitet semena i neplodnost mužjaka se može pripisati hipotalamus-hipofiza sprezi ili direktnom efektu temperature na tkivo testisa ili funkciju epididimisa (Pineda, 2003). Povećana temperatura okoline tokom leta može povećati temperaturu u testisima, ubrzati metabolizam i povećati zahteve za kiseonikom (Gadea i sar., 2004). Ako ubrzani metabolizam nije praćen povećanim dotokom krvi, nastaje hipoksija u tkivu testisa, što izaziva povećanu proizvodnju ROS i LPO, oksidativni stres i pad pokretljivosti spermatozoida (Nichi i sar., 2006; Kanter i sar., 2013). Majić-Balić i sar. (2012) su utvrdili da mlađi bikovi imaju intenzivnije oksidativne procese u seminalnoj plazmi i

spermatozoidima tokom leta i da su u pozitivnoj korelaciji sa THI indeksom (eng. Temperature Humidity Index). U isto vreme je utvrđena veća aktivnost selen zavisne glutation peroksidaze (Se-GPx) kod spermatozoida mladih bikova, što nije bilo dovoljno da se eliminiše uticaj intenzivnih oksidativnih procesa u seminalnoj plazmi i spermatozoidima, koji dovode do smanjene progresivne pokretljivosti spermatozoida. Selen zavisni enzimi imaju važnu ulogu u zaštiti spermatozoida od oštećenja izazvanih oksidacijom, pa deficit GPx može dovesti do pojave patomorfoloških promena na mitohondrijama spermatozoida (Stradaoli i sar., 2009; Nirupama i sar., 2013). Slične rezultate su dobili Nichi i sar. (2006), koji su utvrdili pozitivnu korelaciju između intenziteta lipidne peroksidacije i oštećenja spermatozoida kod Simentalskih bikova tokom leta. Ovi autori su utvrdili da povećana aktivnost GPx nije dovoljna da spreči oštećenja nastala povećanom proizvodnjom ROS. Ono što je karakteristika za većinu, ako ne za sve biološke membrane, je asimetrično oštećenje lipidnog dvosloja u membranama ćelije. Sastav lipida plazma membrane spermatozoida je značajno drugačiji od drugih somatskih ćelija. Membrana spermatozoida sisara je bogata fosfolipidima, sterolima i poluzasićenim masnim kiselinama, koje ih čine naročito osetljivim na oštećenja nastala lipidnom peroksidacijom. Povećana proizvodnja ROS može nadvladati zaštitni mehanizam ćelije i započeti kaskadu promena na lipidima i proteinima membrane spermatozoida (Singer i Granger, 2007; Beer-Ljubić i sar., 2009; Agarwal i sar., 2014).

Krioprezervacija semena i oksidativni stres

Unapređenje procesa krioprezervacije semena zahteva sveobuhvatno znanje o fiziologiji gameta i biohemijskim procesima koji se dešavaju tokom uzimanja semena, njegove obrade i zamrzavanja-otapanja. Proces otapanja zamrznutog semena se rutinski izvodi u cilju obavljanja veštačkog osemenjavanja. Poznato je da tokom ovih procedura dolazi do stvaranja ROS u uzorcima semena. Seme je tokom krioprezervacije izloženo hladnom šoku i atmosferskom kiseoniku, što povećava njegovu osetljivost na LPO i stvaranje veće količine ROS (Bucak i sar., 2008). Krioprezervacija i otapanje su udruženi sa porastom proizvodnje ROS i smanjenjem antioksidativnog kapaciteta. I kod procesa zamrzavanja i kod procesa otapanja dolazi do drastične promene u ćelijskom sadržaju vode. Spermatozoidi odbacuju značajan deo citoplazme tokom završne faze diferencijacije, što dovodi do nedostatka citoplazmatskih komponenti koje sadrže antioksidanse neophodne u borbi sa ROS i LPO. Zbog ovoga su spermatozoidi osetljivi na LPO tokom zamrzavanja i otapanja (Bucak i sar., 2007).

Kako je plazma membrana spermatozoida struktura koja je najviše pogođena krioprezervacijom (Agarwal i sar., 2004; Comizzoli i Wildt, 2014), krioprezervacija izaziva biofizičke i biohemijske promene u njoj, što smanjuje njihovu oplodnu sposobnost (Chatterjee i sar., 2001; Yeste, 2016). Proces krioprezervacije povećava procenat spermatozoida koji ranije ulaze u proces kapacitacije (Reddy i sar., 2010). Ove promene ne moraju da utiču na pokretljivost spermatozoida, ali smanjuju njihov životni vek, njihovu sposobnost za interakciju sa ženskim genitalnim traktom i oplodnu sposobnost. Zamrzavanje i otapanje spermatozoida dovodi do stvaranja ROS (Bucak i sar., 2008). Veća proizvodnja ROS tokom zamrzavanja je povezana sa smanjenjem pokretljivosti spermatozoida nakon otapanja, njihove lošije održivosti, poremećajem integriteta membrane i antioksidativnog statusa, smanjenjem oplodne sposobnosti i funkcije spermatozoida. Pokretljivost spermatozoida bivola nakon otapanja je bila loša i

procenat uspešnosti *in vitro* oplodnje je bio 10-20%, za razliku od bikovskog, gde je procenat *in vitro* oplodnje bio 30-35% (Uysal i Bucak, 2007). Zbog visokog sadržaja nezasićenih masnih kiselina u membrani spermatozoida sisara, oni su veoma osetljivi na LPO, koja se dešava kao rezultat oksidacije lipida membrane delimično redukovanim molekulima kiseonika, kao što su superoksid, hidrogen peroksid i hidroksilni radikal (Dandekar i sar., 2002; Asadpour i sar., 2012). Lipidna peroksidacija membrane spermatozoida dovodi do poremećaja u funkciji spermatozoida zbog dejstva ROS, poremećaja u pokretljivosti spermatozoida i integriteta membrane, oštećenja DNK i pada oplodne sposobnosti zbog oksidativnog stresa i proizvodnje citotoksičnih aldehida (Akbari i sar., 2010; dos Santos Hamilton i sar., 2016). Takođe, antioksidativni sistem seminalne plazme i spermatozoida je ugrožen tokom procesa obrade semena (Alvarez i Storey, 1992). Koncentracija antioksidanasa u semenu pada tokom procesa razređivanja semena i dolazi do povećane proizvodnje ROS molekula (Andrabi, 2009; Kumar i sar., 2011).

Prirodni i sintetski antioksidativni sistem se opisuju kao odbranbeni mehanizam protiv LPO u semenu (Shoae i Zamiri, 2008; Jayaganthan i sar., 2013). Prema tome, dodavanje prirodnih i sintetskih antioksidanasa može smanjiti uticaj oksidativnog stresa tokom procesa skladištenja semena (Perumal i sar., 2013a; Sariözkan i sar., 2013; Perumal i sar., 2013b). Superoksid dismutaza je antioksidans koji ubrzava pretvaranje superoksida u kiseonik i hidrogen peroksid. Neutralizacija vanćelijskog i untarćelijskog superoksidnog anjona sprečava lipidnu peroksidaciju plazma membrane. SOD takođe sprečava preranu hiperaktivaciju i kapacitaciju uzrokovanu superoksidnim radikalima pre ejakulacije. Dodavanje SOD bikovskom semenu je pokazalo zaštitni efekat protiv štetnog dejstva ROS i poboljšalo pokretljivost i integritet membrane razređenog nezamrznutog i zamrznutog semena (Asadpour i sar., 2012).

Analize različitih parametara semena kao što su progresivna pokretljivost, sposobnost preživljavanja, integritet akrozoma i plazma membrane, stabilnost DNK, su važni za primenu semena u veštačkom osemenjavanju. Koristan efekat SOD na proces prezervacije semena je zbog njegovog veoma velikog antioksidativnog kapaciteta (El-Sisy i sar., 2008; Cocchia i sar., 2011; Asadpour i sar., 2012).

Perumal (2014) je utvrdio da se dodavanjem SOD razređivaču za bikovsko seme smanjuje procenat mrtvih spermatozoida, patoloških spermatozoida i spermatozoida sa oštećenim akrozomom. SOD dodata u koncentraciji od 100 U/mL je značajno poboljšala kvalitet semena za razliku od SOD u koncentraciji od 50 ili 150 U/mL. Pokretljivost semena razređenog razređivačem koji je sadržao SOD u koncentraciji od 100 U/mL se smanjivala tokom vremena i ostala na preko 50% do 30 časova nakon razređenja. Nasuprot tome, stopa smanjenja pokretljivosti semena tretiranog sa SOD u koncentraciji od 150 U/mL ili bez dodavanja SOD je bila veća. Da SOD ispoljava različite efekte u zavisnosti od koncentracije govore i rezultati Shoae i Zamiri (2008) i Cocchia i sar. (2011) koji ukazuju da veća količina antioksidanasa izaziva visoku fluidnost plazma membrane, čineći spermatozoid osetljivijim na oštećenje akrozoma. Takođe, visoka koncentracija antioksidanasa može biti štetna za spermatozoide zbog promene fizioloških uslova u razređivaču. Visoka ekspresija SOD se može odraziti kroz poremećaj u razvoju i sazrevanju spermatozoida, kao i kroz ćelijsko oštećenje koje smanjuje oplodni potencijal (Zalata i sar., 1995; Gavella i sar., 1996). U isto vreme, manje doze SOD takođe utiču na parametre kvaliteta semena. Dodavanje SOD razređivaču, naročito u koncentraciji od 100 U/mL je povećalo procenat spermatozoida sa intaktnom DNK, intaktnom plazma membranom i boljim

preživljavanjem. Veći procenat spermatozoida sa intaktnom plazma membranom i intaktnom akrozomalnom membranom u SOD 100 U/mL grupi može biti razlog boljoj pokretljivosti. SOD pomaže u održavanju integriteta akrozoma (Silva i sar., 2011), stabilizuje plazmalemu spermatozoida i povećava njihovu pokretljivost. U spermatozoidima SOD ima sposobnost da direktno reaguje sa mnogim ROS, čime ih direktno štiti od oksidativnog stresa i time održava njihovu pokretljivost (Bilodeau i sar., 2001). Oksidativni stres može biti razlog neplodnosti, dovodeći do fragmentacije DNK spermatozoida (Wright i sar., 2014). U prilog tome, Permual (2014) je ukazao da dodavanje SOD (100 U/mL) smanjuje DNK oštećenja u spermi bikova.

Takođe, SOD održava integritet membrane mitohondrija i strukturu citoskeleta spermatozoida bikova. SOD održava nivo CAT, GPx i totalnog antioksidativnog kapaciteta (TAC) u razređivaču semena, što pomaže u održavanju transporta kroz membranu i očuvanju oplodne sposobnosti (Alvarez i Storey, 1992). Antioksidativni profil je pokazao značajno viši nivo CAT, GPx i TAC u grupi gde je dodat SOD (100 U/mL) nego u kontrolnoj grupi (Permual, 2014).

Superoksid dismutaza sprečava izlazak holesterola iz membrana i stvaranje malondialdehida (MDA), što sprečava preranu kapacitaciju i akrozomalnu reakciju (Asadpour i sar., 2012). Zajedno sa fosfolipidima, holesterol je neophodan za očuvanje integriteta ćelijske membrane i obezbeđuje njenu fluidnost (Srivastava i sar., 2013). Holesterol ima posebnu ulogu u membrani spermatozoida, jer njegovo oslobađanje iz membrane pokreće ključni korak u procesu kapacitacije i akrozomalne reakcije, što je neophodno za oplodnju (Witte i Schäfer-Somi, 2007). Dodavanje holesterola razređivačima pre procesa odmrzavanja, povećava otpornost spermatozoida na stres izazvan procesom zamrzavanja i odmrzavanja, što doprinosi očuvanju pokretljivosti i oplodne sposobnosti (Moore i sar., 2005). Permual (2014) je pokazao da je izlazak holesterola i proizvodnja MDA manja u tretiranoj grupi u poređenju sa kontrolnom i zaključio da seme tretirano SOD ima viši kriorezistentni kapacitet u odnosu na netretiranu grupu.

Enzimi kao što su AST i ALT u seminalnoj plazmi su vrlo važni za metabolizam spermatozoida i njihovu funkciju pošto obezbeđuju energiju za preživljavanje, pokretljivost i oplodnju, i aktivnost ovih transaminaza u semenu je dobar indikator kvaliteta semena, jer su oni pokazatelji stabilnosti membrane (Jalmeria i sar., 2018). Prema tome, povećan procenat patoloških spermatozoida tokom procesa prezervacije dovodi do pojave visoke koncentracije transaminaza u ekstracelularnoj tečnosti zbog oštećenja membrane spermatozoida i izlaska enzima iz spermatozoida (Gündoğan, 2006). Povećana aktivnost AST i ALT u seminalnoj plazmi i semenu tokom perioda čuvanja u tečnom azotu može biti zbog strukturne nestabilnosti spermatozoida (Buckland, 1971). Permual (2014) je utvrdio da je nivo AST i ALT bio niži kod semena kome je dodata SOD (100 U/mL) tokom različitog vremenskog perioda skladištenja, pošto SOD stabilise membranu akrozoma, mitohondrije i flagele.

U ovim istraživanjima je takođe utvrđeno da dodavanje GSH poboljšava parametre semena, enzimski i biohemijski profil, štiteći na taj način strukturu i funkciju spermatozoida. Glutation je najzastupljeniji neproteinski tiol u ćeliji sisara i uglavnom je prisutan u redukovanoj formi (GSH), a samo mala količina u oksigenizovanoj formi (GSSG). Glutation antioksidativni sistem se sastoji od redukovanog glutaciona (GSH), oksigenizovanog glutaciona (GSSG), glutation reduktaze (GRx), glutation peroksidaze (GPx) i glutation-s-transferaze. GRx stimuliše redukciju GSSG u GSH. Ovo osigurava

sigurno snabdevanje redukujućeg supstrata (NADPH) u GPx. Glukoza-6-fosfat dehidrogenaza (G6PD) je neophodna za pretvaranje NADP u NADPH u GSH oksidaciono-redukujućem ciklusu u spermatozoidima i seminalnoj plazmi. Perumal (2014) je utvrdio da je koncentracija GSH bila veća u seminalnoj plazmi semena bikova kome je dodata SOD.

Uloga GPx u zaštiti spermatozoida (i tkiva genitalnog trakta mužjaka) od peroksidnih oštećenja još je značajnija usled činjenice da katalaza nije prisutna u spermatozoidima i spermalnoj plazmi sisara u značajnoj količini. Utvrđeno je prisustvo vrlo niskog nivoa CAT u spermatozoidima ljudi i pacova (Alvarez i sar., 1987), dok njeno prisustvo uopšte nije utvrđeno u spermatozoidima zečeva, miševa i bikova (Holland i Storey, 1981; Alvarez i Storey, 1984; Bilodeau i sar., 2000). Tako, usled odsustva ili izuzetno niske koncentracije katalaze, GPx postaje najznačajniji zaštitnik spermatozoida (i tkiva testisa) od štetnog dejstva vodonik peroksida. Za razliku od katalaze, koja reaguje samo sa H_2O_2 (kao supstratom) i to kada je njegova koncentracija veoma visoka (preko 10^{-6} M), GPx omogućava veoma fino regulisanje koncentracije H_2O_2 (pod normalnim fiziološkim uslovima). Pored ovoga GPx omogućava reparaciju kompleksnih molekula (npr. lipida ćelijske membrane) koji su oštećeni curenjem H_2O_2 u *Fenton/Haberweiss* kuplovanj reakciji (koja za rezultat ima stvaranje veoma reaktivnog hidroksilnog radikala). Specifična građa plazma membrane spermatozoida, odnosno njeno bogatstvo u PUFA, koje su meta dejstva velikog broja slobodnih radikala, dodatno naglašavaju značaj GPx u zaštiti od oštećenja izazvanih peroksidima. U epididimisu sisara, zreli spermatozoidi su dobro zaštićeni dejstvom GPx. Prisustvo GPx je utvrđeno u svim razvojnim oblicima spermatozoida. GPx5 je utvrđena u spermalnoj plazmi, subakrozomalnom delu spermatozoida (Jimenez i sar., 1992; Vernet i sar., 1997) a postoje i dokazi da se može naći i u jedru spermatozoida, što je slučaj i sa GPx4 (Roedel-Drevet i sar., 1998). Pored ovoga GPx5 prisutna je u citoplazmi epitelnih ćelija *caput epididimis*-a (Vernet i sar., 1997) kao i u apikalnim ćelijama *epididimis*-a (Rejraji i sar., 2002). Prisustvo GPx5 je utvrđeno u slobodnoj epididimalnoj tečnosti i dovodi se u vezu sa vezikulama koje su bogate lipidima i koje se nazivaju "*Epididimozomi*" (Rejraji i sar., 2002; Rejraji i Drevet, 2004). U cilju što bolje zaštite od oštećenja izazvanih ROS, epitel *caudae epididimis* sadrži značajne količine plazma GPx, GPx3 (Schwaab i sar., 1998).

Ocena OS i korišćenje antioksidanasa nije zastupljeno u rutinskoj praksi. Postoji neposredna potreba za uprošćavanje procedura za određivanje ROS i OS i njihovom rutinskom primenom, bez korišćenja složene opreme. Vrlo je važno odrediti referentne vrednosti za ROS iznad kojih bi trebalo upotrebiti antioksidanse za tretman neplodnosti mužijaka. Dozu i dužinu trajanja tretmana bi trebalo odrediti i standardizovati. Sa razvojem pomoćnih reproduktivnih tehnologija, trebalo bi uložiti napor za razvoj optimalne kombinacije antioksidanasa koji bi se dodavali medijumima za razređenje semena (Bansal i Bilaspuri, 2011).

3. CILJ I ZADACI ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog istraživanja je bio ispitivanje efekata dodavanja prirodnih antioksidanasa u hrani za priplodne bikove (inaktivisanih živih ćelija kvasca *Saccharomyces cerevisiae* [soj R3970] sa visokim nivoom organski vezanog selena (izvor selen zavisne glutathion-peroksidaze-Se-GPx) i liofilizovanog preparata pulpe dinje *Cucumis melo* (izvor superoksid dismutaze-SOD) na kvalitet ejakulata priplodnih bikova u uslovima toplotnog stresa. Pored egzogeno opterećujućih faktora (visoke spoljašne temperature), jedan od ciljeva ovog istraživanja je i ispitivanje uticaja krioprezervacije semena kao stresogenog faktora na kvalitet semena bikova koji su dobijali antioksidanse u hrani i grupe bikova koja je hranjena bez antioksidanasa. U cilju praćenja efekta dodvanih preparata vršeno je:

1. priprema koncentrovanih smeša sa dodatkom ispitivanih supstrata pre započinjanja ogleada i utvrđena zastupljenost dodatih antioksidanasa u hrani;
2. određivanje aktivnosti superoksid dismutaze i glutathion peroksidaze u spermalnoj plazmi bikova;
3. kontrola metaboličkog statusa svih jedinki u ogleadu (na početku, sredini i kraju ogleada) sa posebnim akcentom na merenje koncentracije kortizola;
4. merenje temperature i vlažnosti u objektima za smeštaj bikova na dnevnom nivou utvrđivanjem TH indeksa (eng. Temperature-Humidity Index);
5. ispitivanje kvaliteta semena svih bikova CASA tehnikom (kompjuterski asistiranom tehnikom analize semena);
6. ispitivanje uticaja TH indeksa na pokretljivost spermatozoida;
7. utvrđivanje korelacije koncentracija superoksid dismutaze i glutathion peroksidaze i pokretljivosti spermatozoida;
8. citomorfološka ocena kvaliteta semena, supravitalnim bojenjem po Blomu;
9. statistička obrada podataka.

4. MATERIJAL I METODE

4.1. MATERIJAL

Metodom nasumičnog izbora formirane su tri grupe od po 5 bikova, koje se nisu bitno razlikovale prema starosti, proizvodnim rezultatima i eksterijernim karakteristikama.

-I grupa je bila ogleđna koja je tokom 120 dana (u periodu od juna do oktobra meseca 2018 godine) u okviru koncentrovanog dela obroka dobijala specifično inaktivisane žive ćelija kvasca *Saccharomyces cerevisiae* soj R397 (*Alkosel*[®]-Lallemand, Francuska) sa visokim nivoom organski vezanog selena u vidu L(+) selenometionina u ukupnoj dozi od 3 mg/dan.

-II ogleđna grupa je u okviru koncentrovanog obroka tokom 120 dana (u period od juna do oktobra meseca 2018 godine) dobijala po 50 µg/jedninki/dan liofilizovanog preparata pulpe dinje (*Melofeed*[®], Lallemand, Francuska).

-III grupa je bila kontrolna i tokom ispitivanog perioda nije u obroku dobijala gore pomenute antioksidanse.

4.2. METODE

4.2.1. Analiza smeše

Pre započinjanja oglada izvršena je priprema koncentrovanih smeša sa dodatkom ispitivanih supstrata. Analiza koncentrovanih smeša za ishranu priplodnih bikova vršena je u cilju utvrđivanja procenta sirove celuloze, sirovih proteina, sirove masti, pepela kao i sadržaja selena. U koncentrovanim smešama za ishranu bikova određivan je sadržaj sirove vlage, pepela, proteina, masti, celuloze, BEM i selena. Priprema uzorka za analizu vršena je prema proceduri koja je opisana od strane AOAC (1990). Analiza sadržaja osnovnih hranljivih materija vršena je prema sledećim procedurama i to: vlaga SRPS ISO 6496/2001; pepeo SRPS ISO 5984/2002; proteini SRPS ISO 5983/2001; masti SRPS ISO 6492/2001; celuloza prema dokumentovanoj akreditovanoj metodi laboratorije (DM1); dok će je sadržaj BEM određivan kalkulatивно. Analiza sadržaja selena u pomenutim smešama vršena je hidridnim postupkom na atomskom apsorpcionom spektrofotometru (Hydride Generation Atomic Absorption Spectrometry – HGAAS), spektrofotometru (Perkin-Elmer Analyst 700 MHS sistem) sa pozadinskim deuterijum konektorom, lampom za selen pri radnoj jačini struje od 7 mA, na talasnoj dužini 196 nm i sa širinom proreza od 1 nm, kao i aparaturom za generisanje hidrida selena.

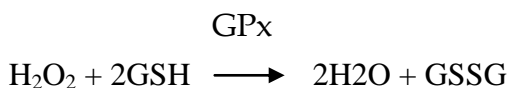
4.2.2. Određivanje parametara antioksidativne zaštite

Prikupljanje ejakulata svih bikova u ogledu vršeno je metodom veštačke vagine uz poštovanje svih sanitarnih mera (temperatura, skliskost, sterilnost, odgovarajući pritisak). Uzorci su prikupljeni na dvonedeljnom nivou (ukupno sedam ejakulatskokova po biku). Ejakulat je razređivan komercijalnim razređivačem (Andromed®, Minitube, Nemačka), pakovan u predhodno obeležene pajete zapremine 0,25 mL. Posle ekvibracije na +4°C pajete su duboko zamrznute i čuvane u tečnom azotu (-196°C).

Za određivanje aktivnosti enzima antioksidativne zaštite (SOD i GPx) korišćena je seminalna plazma dobijena centrifugiranjem semena bikova 10 minuta na 2000 rpm, na 4°C. Nakon izdvajanja seminalne plazme pristupilo se analizama. Sve analize su urađene na aparatu UV/VIS spektrofotometru (BK-36 S390, BIOBASE Meihua, Kina).

Aktivnost SOD u seminalnoj plazmi određena je spektrofotometrijski po metodi Misra i Fridrovich (1972). Metoda se zasniva na sposobnosti SOD da inhibira autooksidaciju adrenalina do adrenohroma u alkalnoj sredini. Reakcija započinje dodavanjem 20 mmol/L adrenalina u reakcionu smešu (0,05 mol/L karbonatni pufer, pH 10,2 i 0,1 mmol/L EDTA), a brzina stvaranja adrenohroma je praćena na $\lambda=480$ nm u trajanju od tri minuta. Jedinica aktivnosti enzima (U) se definiše kao količina enzima neophodna da inhibira stopu autoksidacije adrenalina za 50%. Aktivnost SOD je izražena u U/mL seminalne plazme.

Aktivnost GPx u seminalnoj plazmi određena je po metodi Flohe i Günzler (1984). Princip metode zasniva se na redukciji vodonik peroksida (H₂O₂) u prisustvu redukovanog glutationa (GSH) koji se transformiše u glutation disulfid (GSSG) pod uticajem GPx.



Reakciona smeša sačinjena od 0,1 M fosfatnog pufera (pH 7,4), 2 mM GSH, 10 mM natrijum azida, 1 mM H₂O₂ i seminalne plazme prekida se dodavanjem 5% trihlorsirćetne kiseline, a obojeni kompleks sa Elmanovim reagensom (5,5-ditiobis-2-nitobenzoeva kiselina, DTNB) se očitava na 412 nm. Aktivnost GPx je izražena u mU/mL seminalne plazme.

4.2.3. Biohemijske analize

U cilju procene uticaja ispitivanog preparata na parametre zdravstvenog i/ili metaboličkog statusa, uzimani su uzorci krvi bikova u ogledu. Na početku ogleda, kao i 75. i 120. dana nakon davanja preparata, punkcijom *vene coccigea* uzorkovana je krv bikova (po 6 mL krvi) iz kontrolne i ogledne grupe radi biohemijskih analiza. Uzorci krvi su uzimani u sterilne vakutajnere bez antikoagulansa (upotrebom serumskih vakutajnera BD Vacutainer 367815, BD - Plymouth, Velika Britanija). Nakon uzimanja, uzorci krvi su čuvani u ručnom frižideru na ledu da bi se izvršila spontana koagulacija, a zatim centrifugirani na 3,000 g tokom 15 minuta. Dekantirani uzorci krvnih seruma su zamrzavani na -18 °C sve do izvođenja analiza. U uzorcima krvnog seruma bikova je određivana koncentracija glukoze, ukupnih proteina, albumina, kalcijuma, anorganskog

fosfora, bilirubina, uree, triglicerida i aktivnosti enzima ALT, AST, GGT i kortizola. Koncentracije biohemijskih parametara krvnog seruma određivane su fotometrijski na automatskom veterinarskom biohemijskom analizatoru A15 (Biosystems, Španija). Vrednosti odabranih parametara metaboličkog profila su određene kolorimetrijski i upotrebom enzimskih metoda, korišćenjem komercijalnih test paketa istog proizvođača (Biosystems, Španija).

4.2.4. Bioklimatske analize

Za merenje temeperature i vlažnosti u objektu korišćen je data logger AMT-116, AMTAST, SAD. Datalogerom je na svakih sat vremena merena temperatura i relativna vlažnost vazduha unutar objekata u kojima su grla smeštena, izmerene vrednosti su memorisane i iz njih izračunavan TH indeks. TH indeks je izračunavan korišćenjem Kiblerove jednačine: $THI=1.8Ta-(1-RH)(Ta-14.3)+32$ gde je Ta – izmerena ambijentalna temperatura u °C, RH –relativna vlažnost (Kibler, 1964).

Nakon 30 dana od početka oglada započelo se sa uzorkovanjem odnosno uzimanjem ejakulata priplodnjaka iz sve tri grupe. Uzimanje ejakulata vršeno je 2 puta mesečno do kraja oglada. Svaki ejakulat bio je pregledan makroskopski i mikroskopski i dalje razređen i duboko zamrznut.

4.2.5. Ispitivanje kvaliteta semena

Utvrđivanje kvaliteta semena vršeno je praćenjem nekoliko parametara. Za utvrđivanje koncentracija spermatozoida, pokretljivosti i brzinski parametara koristili smo CASA (*Computer Assisted Semen Analysis*) sistem (ISAS Proiser, model V.1.2., Španija, eng. ISAS=integrated sperm analysis system, srp. Integrisani sistem za analizu sperme). CASA sistemom određena je koncentracija spermatozoida, pokretljivost i brojni brzinski parametri. Za potrebe CASA korišćen je poduzorak od 5 μ l koji se nanosi na leje-komorice (Proiser D4C20, Valensija, Španija), duboke 20 μ m, postavljene na grejnoj ploči mikroskopa. Nakon prestanka pasivnog kretanja spermatozoida, izvršeno je slikanje na svih 7 definisanih polja komorice. Broj analiziranih spermatozoida po uzorku iznosio je od 1500-5000, odnosno 150-250 spermatozoida po snimku. Program je podešen na analizu 25 slika u sekundi, sa ekspozicijom snimka od 2 sekunde (ukupno 50 slika).

Nakon obrade slike dobijeni su sledeći parametri:

- koncentracija spermatozoida ($\times 10^6$ u ml i u dozi);
- procentualnu zastupljenost pojedinih klasa spermatozoida prema pokretljivosti (progresivno pokretni, neprogresivno prokretni i nepokretni), kao i prema brzini (brzi, srednje brzi, spori i statični spermatozoidi);
- vrednosti za parametara brzine koji istovremeno podrazumevaju standardnu CASA terminologiju i specifičnu analizu kinetike spermatozoida za:

-krivolinijsku brzinu (engl. VCL-curvilinear velocity), izražena u mikrometrima po sekundi. Označava prosečnu brzinu spermatozoida na njegovoj istinskoj putanji;

-pravolinijsku brzinu (engl. VSL-straight-line velocity), izražena u mikrometrima po sekundi. Označava prosečnu brzinu spermatozoida na pravolinijskoj putanji koja spaja prvu i poslednju uslikanu poziciju spermatozoida;

-prosečnu brzinu (eng. VAP-average path velocity), izražena u mikrometrima po sekundi. 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 (eng. ALH-amplitude of lateral head displacement), izražena u mikrometrima;

-indeks linearnosti (eng. LIN-linearity), izražen u %. Odnosi se na linearnost krivolinijske putanje i dobija se odnosom VSL/VCL;

-indeks oscilacije (eng. WOB-wobble), izražen u %. Odnosi se na stepen oscilacije istinske putanje u odnosu na prosečnu putanju i dobija se odnosom VAP/VCL;

-pravolinijski indeks (eng. STR-straightness), izražen u %. Odnosi se na linearnost na prosečnoj putanji i dobija se odnosom VSL/VAP;

-frekvenciju prelaska pravolinijske putanje u sekundi (eng. BCF-beat-cross frequency), izražen u hercima (Hz). Odnosi se na prosečan broj prelazaka krivolinijske putanje preko pravolinijske putanje.

4.2.6. Citomorfološke analize semena

Citomorfološke analize semena su sprovedene u cilju utvrđivanja odnosa živih/mrtvih ćelija, nalaza intaktnih i oštećenih akrozoma, protoplazmatskih kapljica, kao i primarnih, sekundarnih i ukupno patoloških formi spermatozoida specifičnim supravitalnim bojenjem po Blomu. Bojenje po Blomu je metod koji ima široku primenu zato što je efektivan, jednostavan i omogućava dobru vizuelizaciju spermatozoida pa se zove još i „live-dead“ bojenje. Omogućava ocenu integriteta ćelijske membrane a u isto vreme i patomorfologiju spermatozoida.

Bojenje po Blom-u se izvodi na sledeći način:

-staviti staklenu pločicu da se zagreje na 37 °C, 30-60 sekundi;

-staviti na jednom kraju pločice kap eozin-nigrozina boje u veličini od 5- mm;

-pored ove kapi boje staviti kap semena;

-kap semena zavisi od njene gustine;

-pomešati seme i boju na pločici;

-uz pomoć druge pločice razmazati ovu mešavinu po celoj pločici;

-osušiti razmaz brzo duvanjem preko pločice;

-pristupiti oceni integriteta membrane i morfologije semena pod uvećanjem 400-1000x;

-potrebno je brojati najmanje 100 ćelija po uzorku, a u slučaju visokog procenta abnormalnosti i 300 ćelija.

Bojenjem po Blomu na preparatu se uočava tamna pozadina, gde se spermatozoidi jasno izdvajaju kao svetlije tvorevine. Normalni živi spermatozoidi su belo obojeni, dok mrtvi spermatozoidi (spermatozoidi sa oštećenom ćelijskom membranom) propuštaju eozin i boje se rozikasto.

4.2.7. Statistička obrada rezultata

Dobijeni podaci su statistički obrađeni korišćenjem softverskog paketa STATISTICA (StatSoft, Inc, Tulsa, OK, USA). Ispitivanje značajnosti razlika prosečnih vrednosti SOD i GPx između posmatrane tri grupe bikova u sedam skokova izvršeno je dvofaktorskom kombinovanom analizom varijanse, između posmatrane tri grupe bikova u jednom skoku jednofaktorskom analizom varijanse, a posebno za svaku grupu bikova u sedam skokova analizom varijanse sa ponovljenim merenjima. Za poređenje parova prosečnih vrednosti korišćen je Tukey-ev test.

Podaci dobijeni za SOD, GPx i THI, za sve grupe, su homogeni ($c_v < 30\%$), pa je za utvrđivanje stepena zavisnosti tih pojava korišćen Pearson-ov koeficijent korelacije. S obzirom na varijabilnost podataka o procentu pokretnih spermatozoida i procentu progresivno pokretnih spermatozoida, za analizu veze između tih karakteristika i SOD i GPx, upotrebljen je Spearman-ov koeficijent korelacije ranga.

Za utvrđivanje statističkih značajnosti jedanaest pokazatelja metaboličkog profila posmatranih istovremeno i pojedinačno na početku, sredini i na kraju eksperimenta korišćena je metoda diskriminacione analize. S obzirom da nije bilo statistički značajnih razlika, korišćena je metoda dvofaktorske kombinovane analize varijanse za pokazatelje metaboličkog profila posmatrane pojedinačno. Za pokazatelje metaboličkog profila za tri grupe posmatrane zajedno, za koje je utvrđena značajna i vrlo značajna razlika prosečnih vrednosti iz tri merenja, Tukey-evim testom su upoređene prosečne vrednosti iz dva merenja.

Utvrđivanje značajnosti razlika prosečnih vrednosti parametara brzine kretanja spermatozoida bikova između eksperimentalnih grupa je rađeno dvofaktorskom kombinovanom analizom varijanse. Za poređenje parova prosečnih vrednosti korišćen je Tukey-ev test i Fischer-ov LSD test.

Posmatrani su parametri citomorfologije u 7 skokova kod bikova iz tri grupe, pa je za ispitivanje razlike prosečnih vrednosti citomorfoloških pokazatelja korišćena dvofaktorska kombinovana analiza varijanse. Za validnu primenu ovog statističkog metoda potrebni su homogeni podaci. Međutim, za sve analizirane grupe podaci o citomorfološkim karakteristikama nisu homogeni. Kako ne postoji neparametarska alternativa za ovaj model analize varijanse, da bi se ispunio navedeni uslov, početni podaci su transformisani u obliku $Y = \sqrt{X}$ za sve analizirane citomorfološke parametre, osim za broj živih OA za koji je upotrebljena transformacija $Y = \sqrt[4]{X}$. Za poređenje parova prosečnih vrednosti korišćen je Tukey-ev test.

5. REZULTATI

5.1. Hemijski sastav smeša

Tabela 1. Rezultati testiranja razlika prosečnih vrednosti parametara hemijskog sastava smeše između dve grupe

Parametri	Kontrolna grupa i grupa tretirana Melofeed-om		Kontrolna grupa i grupa tretirana Alkosel-om		Grupa tretirana Melofeed-om i grupa tretirana Alkosel-om	
	t	p	t	p	t	p
Proteini %	1,396	0,193	0,230	0,823	1,631	0,134
Sirova celuloza %	4,183	0,685	0,166	0,872	0,253	0,806
Pepeo %	2,819	0,018	2,456	0,034	0,398	0,699
Vlaga %	0,358	0,728	0,000	1,000	0,358	0,728
Selen mg/kg	1,446	0,089	4,656	0,001	4,469	0,001

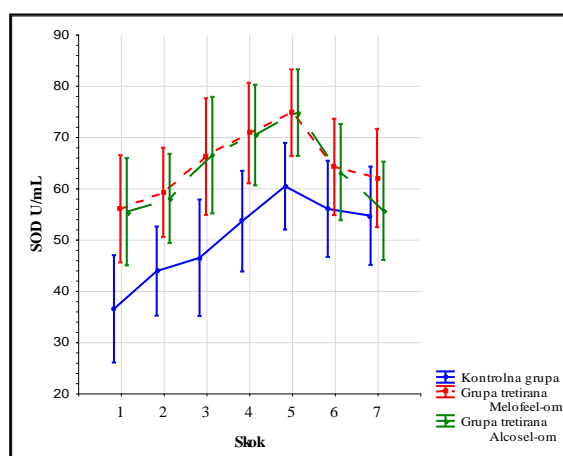
U smeši korišćenju za kontrolnu grupu utvrđen je statistički značajno veći sadržaj pepela u odnosu na sadržaj u smeši korišćenju za grupu tretiranu Melofeed-om ($p=0,018$) i grupu tretiranu Alkosel-om ($p=0,034$).

U smeši korišćenju za grupu tretiranu Alkosel-om utvrđen je statistički vrlo značajno veći sadržaj selena u odnosu na sadržaj u smeši korišćenju za kontrolnu grupu ($p=0,001$) i grupu tretiranu Melofeed-om ($p=0,001$).

5.2. Parametri antioksidativne zaštite

5.2.1. Aktivnost superoksid dismutaze

Na osnovu rezultata dvofaktorske kombinovane analize varijanse može se zaključiti da su se posmatrane grupe statistički vrlo značajno razlikovale po prosečnim vrednostima SOD-a ($F=33,491$; $p<0,001$). Prosečne vrednosti kontrolne grupe su statistički vrlo značajno manje od prosečnih vrednosti za grupe tretirane Melofeed-om ($p<0,001$) i Alcosel-om ($p<0,001$). Prosečne vrednosti za grupu tretiranu Melofeed-om i grupu tretiranu Alcosel-om nisu se razlikovale statistički značajno ($p=0,784$). Analiziranih sedam skokova se statistički vrlo značajno razlikuju ($F=6,749$; $p<0,001$) po prosečnim vrednostima SOD-a. U prvom skoku prosečne vrednosti su vrlo značajno manje nego u četvrtom ($p=0,002$) i petom skoku ($p<0,001$) i značajno manje nego u šestom skoku ($p=0,036$). Vrednost SOD u petom skoku je vrlo značajno veća u odnosu na drugi skok ($p=0,001$) i značajno veća ($p=0,021$) u odnosu na sedmi skok. Interakcija faktora grupa i faktora skok nije statistički značajna ($F=0,613$; $p=0,824$).



Grafikon 1. 95% intervali pouzdanosti za aritmetičke sredine SOD-a po grupama u skokovima

Primenom analize varijanse sa ponovljenim merenjima posebno za svaku grupu bikova, dobijeno je da se statistički vrlo značajno razlikuju prosečne vrednosti SOD-a utvrđene u sedam skokova kod bikova iz kontrolne grupe ($F=7,165$; $p<0,001$), a ne razlikuju značajno kod bikova tretiranih Melofeed-om ($F=1,435$; $p=0,243$) i bikova tretiranih Alcosel-om ($F=2,362$; $p=0,062$). Prosečna vrednost SOD-a kod bikova iz kontrolne grupe dobijena u prvom skoku je statistički značajno manja u poređenju sa prosekom za četvrti skok ($p=0,0102$) i vrlo značajno manja u poređenju sa prosekom za naredne skokove ($p_{1/5}<0,001$; $p_{1/6}=0,003$ i $p_{1/7}=0,006$). Takođe, statistički značajno je manji prosek SOD-a za drugi skok u poređenju sa prosekom za peti skok ($p=0,014$).

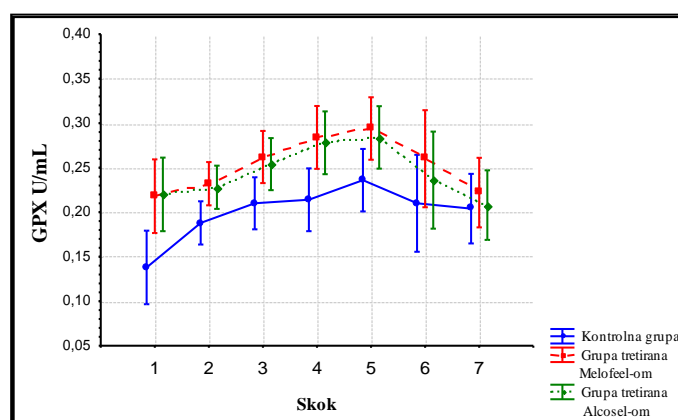
Prosečne vrednosti SOD-a statistički značajno se razlikuju između grupa do petog skoka ($F_1=5,356$; $p_1=0,022$; $F_2=4,586$; $p_2=0,033$; $F_3=4,843$; $p_3=0,029$; $F_4=4,742$; $p_4=0,030$ i $F_5=4,568$; $p_5=0,033$), a posle se ne razlikuju ($F_6=1,075$; $p_6=0,372$ i $F_7=0,825$; $p_7=0,462$). Ispitivanjem značajnosti razlika prosečnih vrednosti dve grupe bikova, utvrđeno je da su u prvih pet skokova prosečne vrednosti SOD-a za kontrolnu grupu bikova značajno manje od prosečnih vrednosti za grupu bikova tretiranih Melofeed-om ($p_1=0,035$; $p_2=0,046$; $p_3=0,0495$; $p_4=0,048$ i $p_5=0,023$), kao i od prosečnih vrednosti za grupu bikova tretiranih Alcosel-om u prvom, trećem i petom skoku ($p_1=0,040$ i $p_3=0,046$ i $p_5=0,022$).

5.2.2. Aktivnost glutation peroksidaze

Prema rezultatima dvofaktorske kombinovane analize varijanse posmatrane tri grupe bikova se vrlo značajno razlikuju ($F=12,832$; $p=0,001$) po prosečnim vrednostima GPx-a. Na osnovu Tukey-evog testa prosečna vrednost GPx-a za kontrolnu grupu statistički vrlo značajno je niža od prosečne vrednosti za grupu bikova tretiranih Melofeed-om ($p=0,001$) i prosečne vrednosti za grupu bikova tretiranih Alcosel-om ($p=0,005$), a prosečne vrednosti za grupe tretirane Melofeed-om i Alcosel-om ne razlikuju se statistički značajno ($p=0,701$).

Za grupe bikova posmatrane istovremeno, prosečne vrednosti GPx-a ostvarene u sedam skokova statistički se vrlo značajno razlikuju ($F=8,252$; $p<0,001$). U prvom skoku prosečne vrednosti su vrlo značajno niže nego u trećem (0,009), četvrtom ($p<0,001$) i petom skoku ($p<0,001$) i značajno niže nego u šestom skoku ($p=0,036$). U drugom, kao i u sedmom skoku vrednosti GPx su značajno manje u odnosu na četvrti ($p_{2/4}=0,041$ i $p_{7/4}=0,016$), a vrlo značajno manje u odnosu na peti skok ($p_{2/5}=0,003$ i $p_{7/5}=0,001$).

Interakcija faktora grupa i faktora skoka nema statistički značajan efekat na GPx ($F=0,647$; $p=0,795$).



Grafikon 2. 95% intervali pouzdanosti za aritmetičke sredine GPX-a po grupama u skokovima

Prema rezultatima jednofaktorske analize varijanse sa ponovljenim merenjima, razlika prosečnih vrednosti GPx-a između sedam skokova statistički je značajna za kontrolnu grupu ($F=3.361$; $p=0,015$), vrlo značajna za grupu bikova tretiranih Melofeed-om ($F=4,920$; $p=0,002$) i nije značajna za grupu bikova tretiranih Alkosel-om ($F=2,213$; $p=0,077$). Za kontrolnu grupu Tukey-ev test je ukazao na vrlo značajno manju prosečnu vrednost GPx-a u prvom skoku u odnosu na peti skok ($p=0,008$). Utvrđeno je da je za grupu tretiranu Melofeed-om prosečna vrednost GPx-a u četvrtom skoku statistički značajno veća u poređenju sa prosečnom vrednosti u prvom skoku ($p=0,030$), i sedmom skoku ($p=0,047$), kao i da je vrlo značajno veća u petom skoku u odnosu na prvi skok ($p=0,009$) i značajno veća u odnosu na drugi skok ($p=0,047$) i sedmi skok ($p=0,014$).

Dalje, analizom varijanse za pojedinačne skokove, dobijeno je da se grupe značajno razlikuju po prosečnim vrednostima GPx-a u prva četiri skoka ($F_1=6,089$; $p_1=0,015$; $F_2=4,774$; $p_2=0,015$; $F_3=4,356$; $p_3=0,038$ i $F_4=5,746$; $p_4=0,018$), a u ostalim se ne razlikuju ($F_5=3,707$; $p_5=0,056$; $F_6=1,000$; $p_6=0,397$ i $F_7=0,278$; $p_7=0,762$). Poređenjem po dve grupe bikova, utvrđeno je da su u prva četiri skoka prosečne vrednosti GPx-a za kontrolnu grupu bikova manje od prosečnih vrednosti za grupu bikova tretiranih Melofeed-om ($p_1=0,029$; $p_2=0,040$; $p_3=0,044$ i $p_4=0,025$), kao i u odnosu na prosečne vrednosti za grupu bikova tretiranih Alkosel-om u prvom i četvrtom skoku ($p_1=0,025$ i $p_4=0,040$).

5.3. Analiza metaboličkog profila

Podaci o svim pokazateljima metaboličkog profila nisu homogeni za sve analizirane grupe bikova. Zato su u cilju validne primene statističke metodologije početni podaci transformisani u obliku $Y = \sqrt{X}$ za ureu, trigliceride i ALT, a za fosfor, ukupni bilirubin i kortizol upotrebljena je transformacija $Y = \sqrt[4]{X}$.

Na osnovu rezultata diskriminacione analize posmatrane tri grupe bikova ne razlikuju se statistički značajno prema jedanaest pokazatelja metaboličkog profila posmatranih istovremeno na početku eksperimenta ($F=0,448$; $p<0,901$), u sredini eksperimenta ($F=0,673$; $p<0,759$) i na kraju eksperimenta ($F=1,177$; $p<0,491$). Posmatrane tri grupe bikova ne razlikuju se statistički značajno i prema svakom pokazatelju metaboličkog profila, posmatranom pojedinačno (Tabela 1.).

Tabela 2. Rezultati diskriminacione analize za tri grupe bikova za pokazatelje metaboličkog profila u tri merenja

Pokazatelj	Početak eksperimenta		Sredina eksperimenta		Kraj eksperimenta	
	F	p	F	P	F	p
Ukupni protein, (g/L)	1,129	0,470	0,532	0,653	6,923	0,126
Albumin (g/L)	0,052	0,951	0,629	0,614	2,533	0,283
Kalcijum (mmol/L)	0,596	0,627	0,745	0,573	10,207	0,089
Fosfor (mmol/L)	0,047	0,955	0,622	0,616	0,296	0,771
Urea (mmol/L)	0,580	0,633	0,961	≈1,000	2,113	0,321
Uk, bilirubin (mmol/L)	1,794	0,358	1,106	0,475	5,339	0,158
Holesterol (mmol/L)	0,242	0,805	0,845	0,542	4,109	0,196
Trigliceridi (mmol/L)	1,117	0,472	0,889	0,529	0,123	0,891
ALT (u/L)	1,414	0,414	0,617	0,618	7,136	0,123
AST (u/L)	0,203	0,831	1,199	0,455	1,649	0,377
Kortizol (nmol/L)	0,497	0,668	0,166	0,857	7,824	0,113

S obzirom na napred konstatovano, rezultati dvofaktorske kombinovane analize varijanse za pokazatelje metaboličkog profila posmatrane pojedinačno (Tabela 2.), pokazuju da se posmatrane tri grupe bikova nisu razlikovale statistički značajno u toku eksperimenta. Razlika prosečnih vrednosti dobijenih u tri merenja statistički je značajna za fosfor i kortizol, a vrlo značajna za albumin, kalcijum, ureu i trigliceride (Tabela 2.). Za sve pokazatelje metaboličkog profila nije značajna interakcija grupe i merenja.

Tabela 3. Rezultati dvofaktorske kombinovane analize varijanse za pokazatelje metaboličkog profila

Pokazatelj	Grupe bikova		Merenja		Interakcija grupe/merenja	
	F	p	F	P	F	p
Ukupni protein, (g/L)	1,006	0,395	0,208	0,814	1,073	0,391
Albumin (g/L)	0,439	0,654	29,953	<0,001	0,658	0,627
Kalcijum (mmol/L)	0,296	0,749	18,023	<0,001	0,340	0,848
Fosfor (mmol/L)	1,556	0,251	4,425	0,023	1,322	0,290
Urea (mmol/L)	1,949	0,185	36,413	<0,001	0,582	0,679
Uk, bilirubin (mmol/L)	0,637	0,546	0,456	0,639	1,464	0,244
Holesterol (mmol/L)	0,977	0,405	2,666	0,090	0,489	0,744
Trigliceridi (mmol/L)	0,344	0,716	17,857	<0,001	0,428	0,787
ALT (u/L)	0,235	0,794	1,024	0,374	0,200	0,936
AST (u/L)	1,057	0,378	1,818	0,184	0,689	0,607
Kortizol (nmol/L)	1,909	0,191	3,414	0,0496	0,889	0,486

Za pokazatelje metaboličkog profila za tri grupe posmatrane zajedno, za koje je utvrđena značajna i vrlo značajna razlika prosečnih vrednosti iz tri merenja, Tukey-evim testom su upoređene prosečne vrednosti iz dva merenja (Tabela 3.). Vrednosti albumina i kalcijuma vrlo značajno, a fosfora značajno su veće na početku eksperimenta u odnosu na vrednosti u sredini i na kraju eksperimenta. Razlika ovih parametara u sredini i na kraju eksperimenta nije statistički značajna. U toku eksperimenta, prosečan nivo uree se statistički vrlo značajno povećavao. Nivo triglicerida je u sredini eksperimenta vrlo značajno veći u odnosu na početni nivo i statistički značajno veći u poređenju sa nivoom na kraju eksperimenta. Takođe, početni nivo triglicerida je statistički značajno manji od krajnjeg. Na početku eksperimenta nivo kortizola je statistički značajno veći nego u sredini eksperimenta.

Tabela 4. Nivoi značajnosti razlika prosečnih vrednosti pokazatelja metaboličkog profila iz dva merenja

Pokazatelj	Početak/sredina eksperimenta	Početak/kraj eksperimenta	Sredina/kraj eksperimenta
Albumin (g/L)	<0,001	<0,001	0,290
Kalcijum (mmol/L)	<0,001	<0,001	0,718
Fosfor (mmol/L)	0,038	0,048	0,994
Urea (mmol/L)	0,004	<0,001	<0,001
Trigliceridi (mmol/L)	<0,001	0,017	0,017
Kortizol (nmol/L)	0,039	0,471	0,346

Na osnovu rezultata analize varijanse sa ponovljenim merenjima, posebno za svaku grupu, za pokazatelje kod kojih su konstatovane razlike (Tabela 4.) može se zaključiti da se prosečne vrednosti za tri izvršena merenja razlikuju značajno ili vrlo značajno u sve tri grupe za albumin, ureu i trigliceride. Prosečni nivoi kalcijuma u tri merenja statistički značajno se razlikuju za grupu bikova tretiranih Melofeed-om, a vrlo značajno za grupu bikova tretiranih Alkosel-om. Statistički je značajna razlika prosečnih vrednosti fosfora izmerenog kod grupe bikova tretiranih Alkosel-om i kortizola kod grupe bikova tretiranih Melofeed-om.

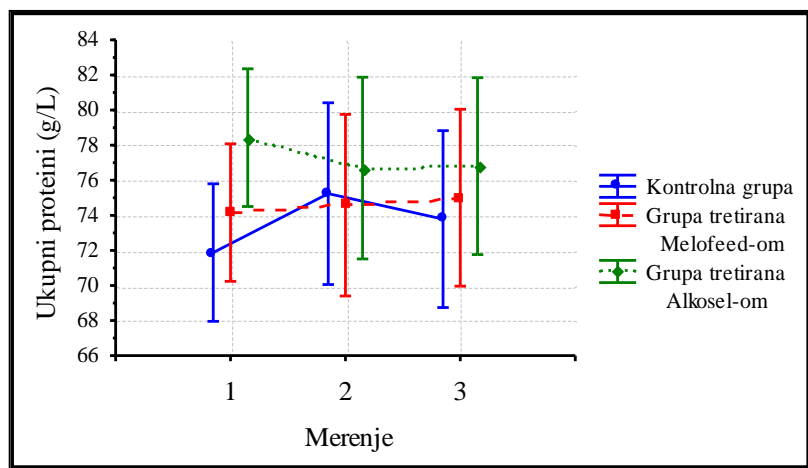
Tabela 5. Rezultati analize varijanse sa ponovljenim merenjima po grupama za pokazatelje metaboličkog profila kod kojih su statistički značajne ili vrlo značajne razlike

Pokazatelj	Kontrolna grupa		Grupa tretirana Melofeed-om		Grupa tretirana Alkosel-om	
	F	p	F	p	F	p
Albumin (g/L)	11,713	0,0004	6,688	0,020	15,194	0,002
Kalcijum (mmol/L)	4,430	0,051	4,444	0,050	10,603	0,006
Fosfor (mmol/L)	1,725	0,238	3,207	0,095	5,278	0,035
Urea (mmol/L)	6,531	0,021	9,821	0,007	68,706	<0,001
Trigliceridi (mmol/L)	5,101	0,037	11,227	0,005	5,295	0,034
Kortizol (nmol/L)	1,308	0,323	4,749	0,044	0,498	0,625

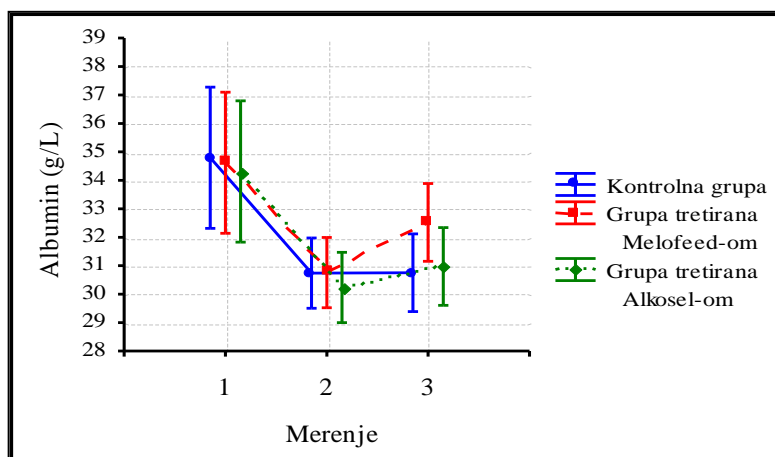
Dalje, Tukey-evim testom je ispitivana značajnost razlika prosečnih vrednosti iz dva merenja (Tabela 5.). Prethodno konstatovane razlike između sva tri merenja najčešće su posledica razlike između merenja na početku i u sredini eksperimenta. Prosečne vrednosti na početku i u sredini eksperimenta statistički značajno ($0,01 < p < 0,05$) ili vrlo značajno ($p < 0,01$) razlikovale su se za albumin i trigliceride kod svih grupa bikova, kalcijum kod tretiranih grupa, fosfor i ureu kod grupe tretirane Alkosel-om i kortizol kod grupe tretirane Melofeed-om. Razlike između prosečnih vrednosti na početku i na kraju eksperimenta manje su izražene. Statistički značajne ili vrlo značajne razlike su za kontrolnu grupu za albumin i ureu, grupu bikova tretiranih Melofeed-om za trigliceride i za grupu bikova tretiranih Alkosel-om za albumin i kalcijum. Vrednosti izmerene na sredini i kraju eksperimenta vrlo značajno su se razlikovale samo za ureu kod bikova tretiranih Alkosel-om.

Tabela 6. Nivoi značajnosti razlika prosečnih vrednosti pokazatelja metaboličkog profila iz dva merenja kod posmatranih grupa bikova

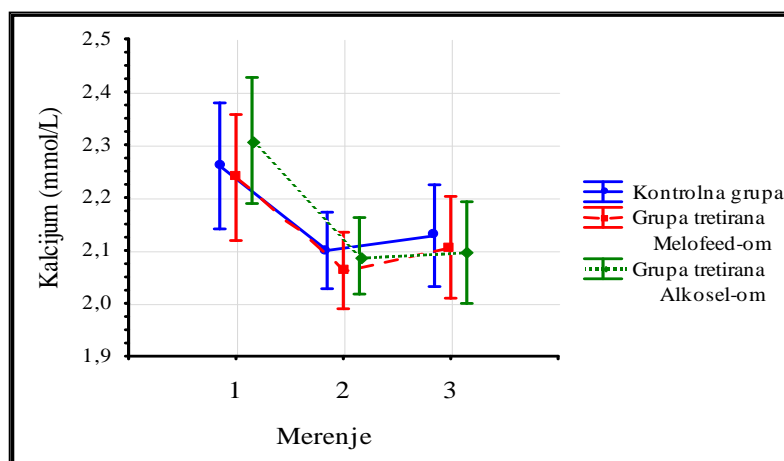
Pokazatelj	Grupa bikova	Početak/sredina eksperimenta	Početak/kraj eksperimenta	Sredina/kraj eksperimenta
Albumin (g/L)	kontrolna	0,008	0,008	0,999
	tretirana Melofeed-om	0,016	0,178	0,274
	tretirana Alkosel-om	0,002	0,007	0,632
Kalcijum (mmol/L)	kontrolna	0,056	0,114	0,879
	tretirana Melofeed-om	0,0496	0,141	0,761
	tretirana Alkosel-om	0,009	0,011	0,993
Fosfor (mmol/L)	kontrolna	0,726	0,215	0,557
	tretirana Melofeed-om	0,082	0,352	0,571
	tretirana Alkosel-om	0,030	0,464	0,179
Urea (mmol/L)	kontrolna	0,392	0,018	0,132
	tretirana Melofeed-om	0,152	0,006	0,108
	tretirana Alkosel-om	0,005	<0,001	<0,001
Trigliceridi (mmol/L)	kontrolna	0,031	0,283	0,321
	tretirana Melofeed-om	0,005	0,025	0,466
	tretirana Alkosel-om	0,033	0,700	0,111
Kortizol (nmol/L)	kontrolna	0,299	0,815	0,605
	tretirana Melofeed-om	0,050	0,092	0,913
	tretirana Alkosel-om	0,922	0,822	0,603



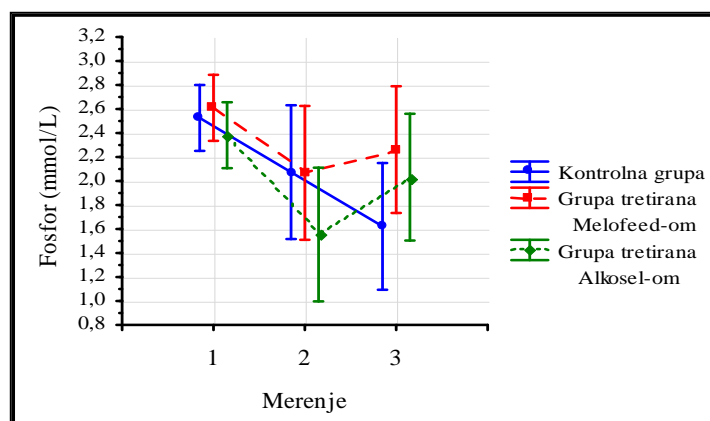
Grafikon 3. prosečne vrednosti za ukupne proteine po grupama



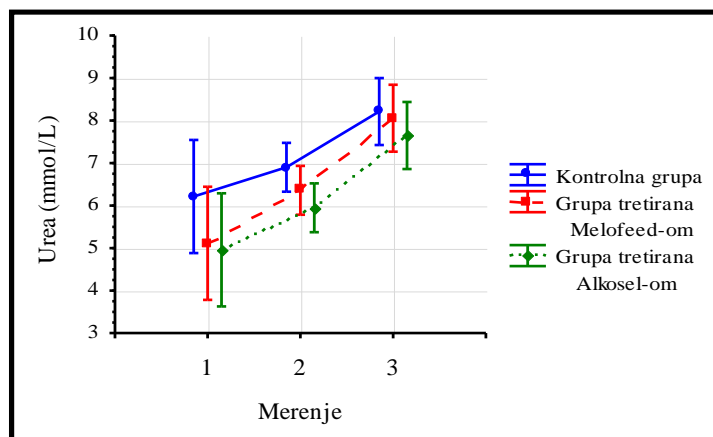
Grafikon 4. prosečne vrednosti za albumine po grupama



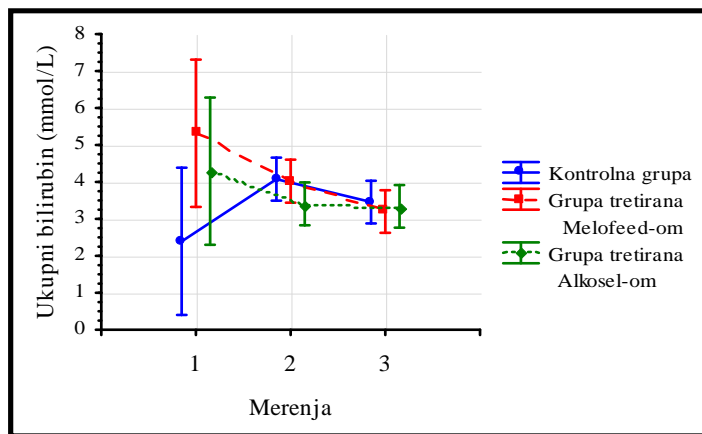
Grafikon 5. prosečne vrednosti za kalcijum po grupama



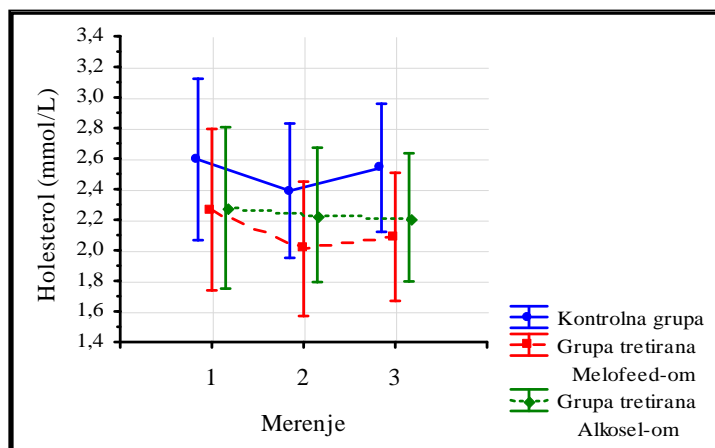
Grafikon 6. prosečne vrednosti za fosfor po grupama



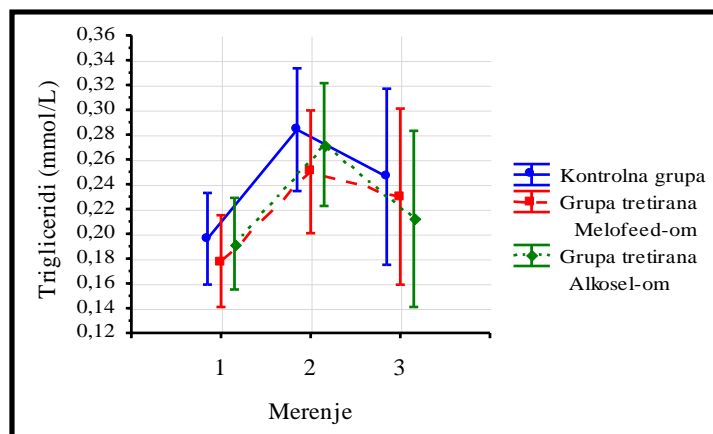
Grafikon 7. prosečne vrednosti za ureu po grupama



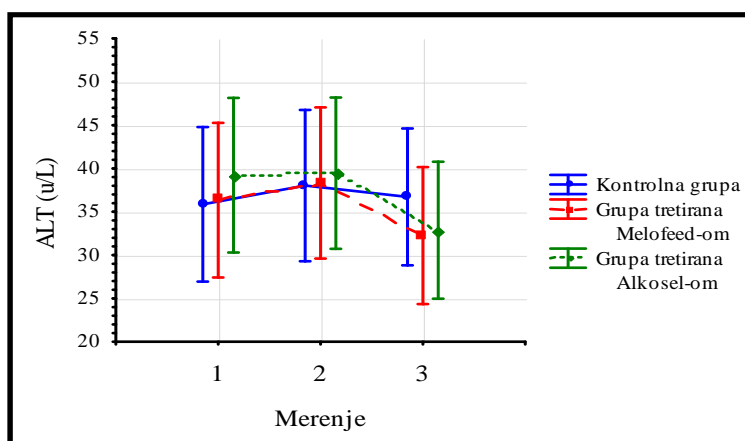
Grafikon 8. prosečne vrednosti za ukupne bilirubine po grupama



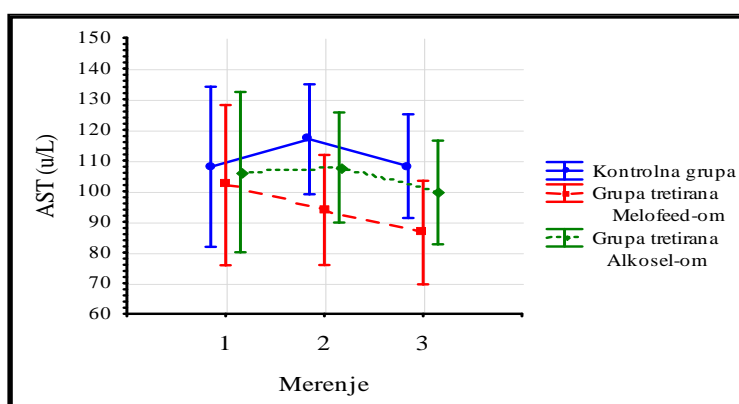
Grafikon 9. prosečne vrednosti za holesterol po grupama



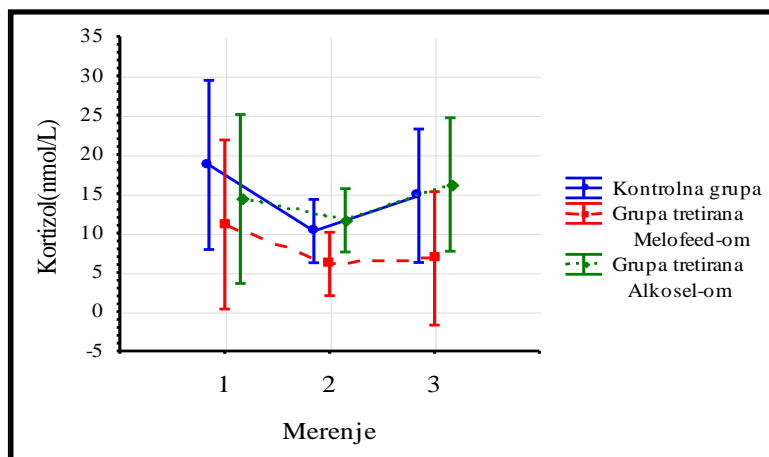
Grafikon 10. prosečne vrednosti za trigliceride po grupama



Grafikon 11. prosečne vrednosti za ALT po grupama



Grafikon 12. prosečne vrednosti za AST po grupama



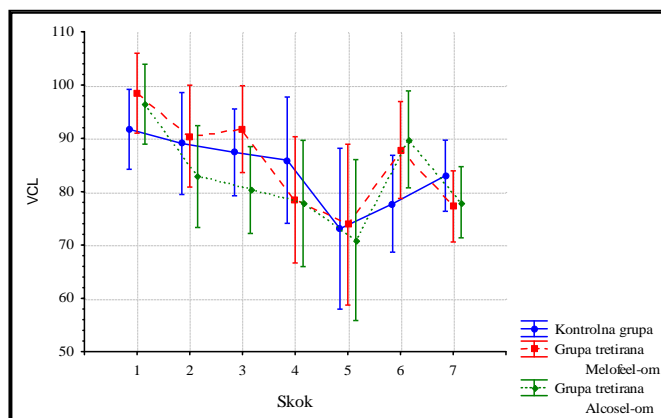
Grafikon 13. prosečne vrednosti za AST po grupama

5.4. Analiza parametara brzine

5.4.1. Krivolinijska brzina

Prema rezultatima dvofaktorske kombinovane analize varijanse posmatrane tri grupe bikova se nisu razlikovale statistički značajno prema prosečnim vrednostima VCL ($F=0,215$; $p=0,812$; Grafikon 14). S obzirom da je $F < 1$, više variraju vrednosti VCL u okviru iste grupe bikova nego između bikova u različitim grupama. Prosečne vrednosti VCL ostvarene u različitim skokovima, za analizirane grupe istovremeno, statistički vrlo značajno se razlikuje ($F=13,733$; $p < 0,001$). Između faktora grupa i faktora skok, interakcija nije statistički značajna ($F=1,731$; $p=0,078$), pa se mogu koristiti jednofaktorski modeli.

Na osnovu Tukey-evog testa, posmatrano za sve grupe istovremeno, prosečne vrednosti VCL vrlo značajno se razlikuju ($p \leq 0,008$) u prvom skoku prema četvrtom, petom, šestom i sedmom skoku, kao i u petom skoku prema prvom, drugom i trećem skoku.



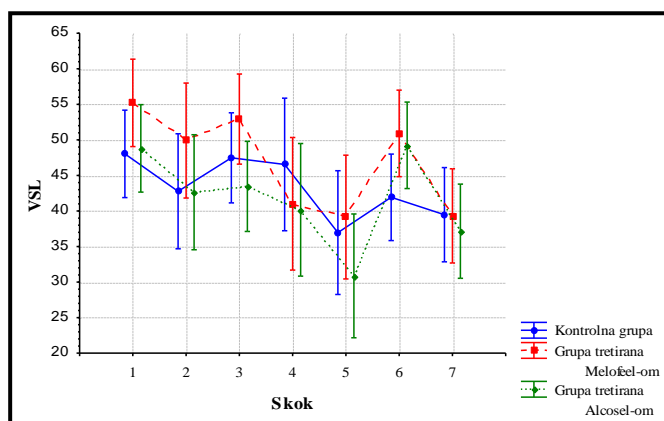
Grafikon 14. 95% intervali pouzdanosti za aritmetičke sredine VCL po grupama u skokovima

Prema rezultatima jednofaktorske analize varijanse sa ponovljenim merenjima, razlika prosečnih vrednosti VCL između svih skokova statistički je značajna u kontrolnoj grupi ($F=3,041$; $p=0,023$), a vrlo značajna u grupama bikova tretiranih Melofeed-om ($F=7,088$; $p<0,001$) i Alkosel-om ($F=8,399$; $p<0,001$). Za kontrolnu grupu Tukey-ev test je ukazao na vrlo značajno veću vrednost VCL u prvom, skoku u odnosu na peti skok. Utvrđeno je da je za grupu tretiranu Melofeed-om prosečna vrednost VCL u prvom skoku statistički vrlo značajno ($p\leq 0,001$) veća u poređenju sa prosečnim vrednostima VCL u četvrtom, petom i sedmom skoku, kao i da je u petom skoku značajno niža u poređenju sa drugim i trećim skokom ($p=0,029$ i $p=0,016$). Takođe, za bikove tretirane Alkosel-om u prvom skoku utvrđena je značajno većavrednost VCL u odnosu na drugi ($p=0,042$) i treći skok ($p=0,0104$) i vrlo značajno veća u odnosu na četvrti, peti i sedmi skok ($p=0,003$). Prosečna vrednost VCL je statistički vrlo značajno veća u šestom skoku u poređenju sa prosekom za peti skok ($p=0,002$).

5.4.2. Pravolinijska brzina

Posmatrane tri grupe bikova se ne razlikuju statistički značajno prema prosečnim vrednostima VSL ($F=1,229$; $p=0,327$). Za ispitivane grupe posmatrane istovremeno, prosečne vrednosti VSL ostvarene u različitim skokovima, statistički vrlo značajno se razlikuju ($F=12,452$; $p<0,001$). Interakcija između faktora grupa i faktora skok nije statistički značajna za VSL ($F=1,471$; $p=0,156$; Grafikon 15).

Prosečna VLS u petom skoku statistički je vrlo značajno manja ($p\leq 0,001$) u odnosu na prosečne vrednosti VSL u prvom, drugom, trećem i šestom skoku i značajno manja u odnosu na vrednost u četvrtom skoku ($p=0,031$). Takođe, prosečna VLS u sedmom skoku statistički je vrlo značajno manja ($p\leq 0,001$) u odnosu na prosečne vrednosti VSL u prvom, trećem i šestom skoku. Prosečna vrednost VSL za četvrti skok vrlo značajno ($p=0,006$) je manja od vrednosti za prvi skok.

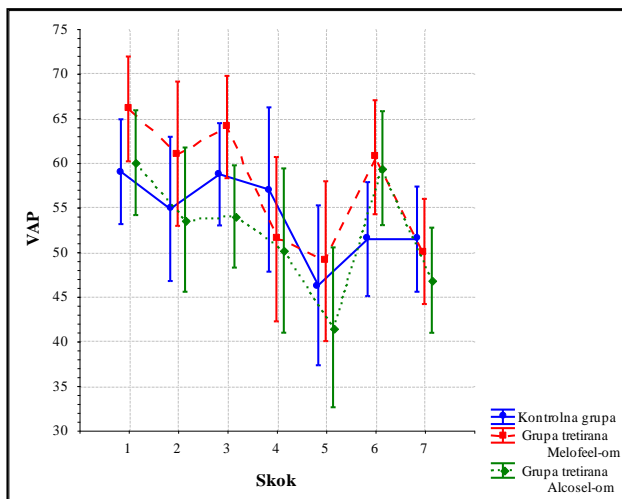


Grafikon 15. 95% intervali pouzdanosti za aritmetičke sredine VSL po grupama u skokovima

Prosečne vrednosti VSL ostvarene u sedam skokova nisu se razlikovale za kontrolnu grupu ($F=2,212$; $p=0,077$), a vrlo značajno su se razlikovale za grupu bikova tretiranih Melofeed-om ($F=6,609$; $p<0,001$), kao i grupu bikova tretiranih Alcosel-om ($F=7,463$; $p<0,001$). Za grupu bikova tretiranih Melofeed-om, prosečna vrednost VSL u prvom skoku je značajno veća u odnosu na četvrti ($p=0,015$) i vrlo značajno veća u odnosu na peti ($p=0,005$) i sedmi skok ($p=0,005$). Takođe, prosečna vrednost VSL u trećem skoku je značajno veća u odnosu na peti ($p=0,019$) i sedmi ($p=0,021$). Kod grupe bikova tretiranih Alcosel-om, prosečna vrednost VSL u petom skoku značajno je manja u poređenju sa prosečnim vrednostima VSL u drugom (0,026) i trećem (0,015) skoku i vrlo značajno manja u poređenju sa prvim ($p<0,001$) i šestim skokom ($p<0,001$). Prosečna vrednost VSL u sedmom skoku statistički značajno je manja nego u prvom ($p=0,028$) i šestom skoku ($p=0,021$).

5.4.3. Prosečna brzina kretanja

Na osnovu rezultata dvofaktorske kombinovane analize varijanse: tri posmatrane grupe bikova ne razlikuju se statistički značajno ($F=1,276$; $p=0,315$) prema proseku za VAP, između skokova razlike u VAP-u su statistički vrlo značajne ($F=14,133$; $p<0,001$) i interakcija faktora grupa i skok nije statistički značajna ($F=1,592$; $p=0,113$). Vrednost VAP-a u petom skoku ne razlikuje se samo u odnosu na sedmi skok, značajno je manja prema četvrtom skoku ($p=0,016$) i vrlo značajno manja ($p<0,001$) prema prosečnim vrednostima iz ostalih skokova. I u sedmom skoku prosek za VAP je manji značajno od proseka drugog skoka ($p=0,022$), a vrlo značajno od proseka za prvi ($p<0,001$) i treći skok ($p=0,001$). Vrlo značajno ($p=0,002$) je manji prosek za VAP u četvrtom skoku u poređenju sa prvim skokom.



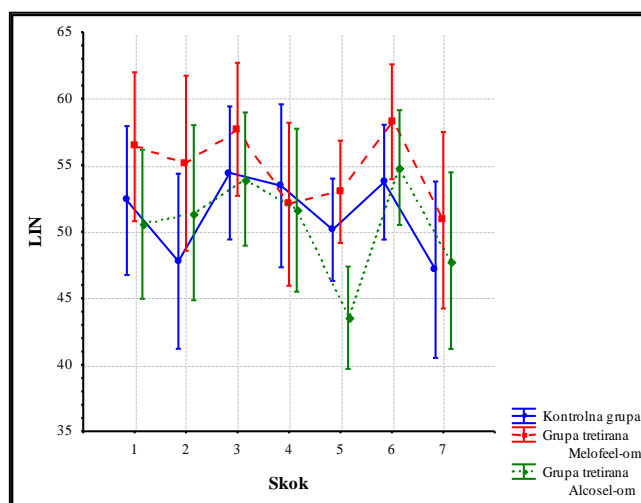
Grafikon 16. 95% intervali pouzdanosti za aritmetičke sredine VAP po grupama u skokovima

Mada jednofaktorska analiza varijanse sa ponovljenim merenjima ukazuje da za kontrolnu grupu između svih skokova, posmatranih istovremeno, postoji značajna razlika ($F=2,664$; $p=0,040$) u prosečnim vrednostima VAP, pojedinačnim Tukey-evim testom nije dobijen ni jedan par skokova sa značajnim ili vrlo značajnim razlikama VAP-a. Blizu kritičnog nivoa su razlike petog skoka sa prvim ($p=0,056$) i sa trećim

($p=0,065$) skokom. Međutim, prema rezultatima Fisher-ovog LSD-testa u petom skoku VAP je značajno manji nego u drugom ($p=0,044$) i četvrtom ($p=0,014$) skoku i vrlo značajno manji u odnosu na prvi ($p=0,004$) i treći ($p=0,005$) skok. Kod grupe bikova tretiranih Melofeed-om između svih skokova, posmatranih istovremeno, postoji vrlo značajna razlika ($F=7,414$; $p<0,001$), koja je posledica razlike prosečnih vrednosti VAP-a u prvom i trećem skoku u odnosu na prosečne vrednosti u četvrtom skoku ($p=0,009$ i $p=0,032$), petom skoku ($p=0,002$ i $p=0,007$) i sedmom skoku ($p=0,004$ i $p=0,014$; Grafikon 16). U petom skoku statistički značajno ($p=0,044$) je manja vrednost VAP u poređenju sa prosekom za drugi skok. Za grupu bikova tretiranih Alcosel-om skokovi se vrlo značajno razlikuju po prosečnim vrednostima VAP-a ($F=8,487$; $p<0,001$), zato što je prosek VAP-a u petom skoku značajno manji u odnosu na prosek VAP-a u drugom skoku ($p=0,015$) i trećem skoku ($p=0,012$), a vrlo značajno manji u odnosu na prosek VAP-a u prvom skoku ($p<0,001$) i šestom skoku ($p<0,001$). Takođe, prosek VAP-a u sedmom skoku je značajno manji u odnosu na prosek VAP-a u šestom skoku ($p=0,011$) i vrlo značajno manji u odnosu na prosek VAP-a u prvom skoku ($p<0,001$).

5.4.4. Indeks linearnosti

Tri posmatrane grupe bikova ne razlikuju se statistički značajno ($F=1,448$; $p=0,273$) prema prosečnim vrednostima LIN-a. Razlike između skokova, za grupe posmatrane istovremeno, su statistički vrlo značajne ($F=6,849$; $p<0,001$) i interakcija faktora grupa i skok ne utiče značajno na LIN ($F=1,212$; $p=0,292$). Vrlo značajno ($p\leq 0,001$) su manje prosečne vrednosti LIN-a u petom i sedmom skoku u poređenju sa prosecima za treći i šesti skok.



Grafikon 17. 95% intervali pouzdanosti za aritmetičke sredine LIN-a po grupama u skokovima

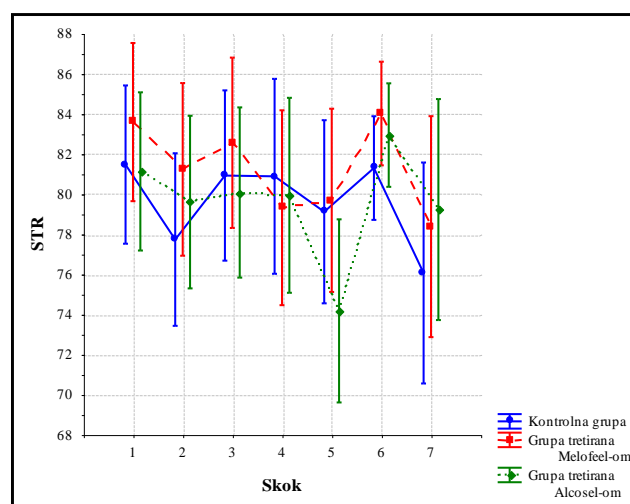
Razlike prosečnih vrednosti LIN-a ostvarenih u sedam skokova: za kontrolnu grupu statistički su značajne ($F=2,633$; $p=0,042$), za grupu tretiranu Melofeed-om nisu statistički značajne ($F=2,145$; $p=0,085$) i za grupu tretiranu Alcosel-om su statistički vrlo značajne ($F=4,746$; $p=0,003$). Tukey-evim testom, za kontrolnu grupu nisu pronađeni parovi sredina koje se statistički razlikuju. Međutim, rezultati Fisher-ovog LSD-testa pokazuju da je prosečna vrednost LIN-a u drugom skoku statistički značajno

manja od prosečnih vrednosti LIN-a u trećem skoku ($p=0,016$), četvrtom skoku ($p=0,037$) i šestom skoku ($p=0,030$). Značajno je manja prosečna vrednost LIN-a u sedmom skoku u odnosu na četvrti skok ($p=0,022$) i šesti skok ($p=0,017$), a vrlo značajno manja u poređenju sa prosekom LIN-a za treći skok ($p=0,009$). Kod bikova tretiranih Alcosel-om prosečna vrednost LIN-a u petom skoku značajno je manja od prosečne vrednosti LIN-a u četvrtom skoku ($p=0,047$) i vrlo značajno je manja u poređenju sa trećim ($p=0,005$) i šestim ($p=0,002$) skokom.

5.4.5. Pravolinijski indeks

Rezultati dvofaktorske kombinovane analize varijanse ukazuju da se posmatrane tri grupe bikova ne razlikuju statistički značajno prema prosečnim vrednostima STR ($F=0,372$; $p=0,697$; Grafikon 18). S obzirom da je $F < 1$, više variraju vrednosti STR u okviru iste grupe bikova nego između bikova u različitim grupama. Prosečne vrednosti STR ostvarene u sedam skokova, za analizirane grupe istovremeno, statistički vrlo značajno se razlikuje ($F=6,188$; $p < 0,001$). Interakcija između faktora grupa i faktora skok nije statistički značajna ($F=1,289$; $p=0,244$).

Posmatrano za sve grupe istovremeno, na osnovu Tukey-evog testa, prosečne vrednosti STR vrlo značajno su manje ($p \leq 0,004$) u petom skoku u odnosu na prvi i šesti skok, značajno manje u odnosu na treći skok ($p=0,036$), a vrlo značajno je manji prosek STR u sedmom skoku u poređenju sa prosekom STR u šestom skoku ($p=0,001$).

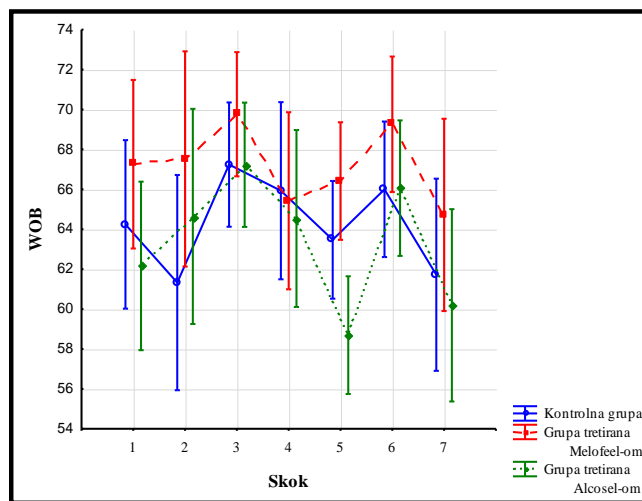


Grafikon 18. 95% intervali pouzdanosti za aritmetičke sredine STR-a po grupama u skokovima

Za bikove iz kontrolne grupe, prosečne vrednosti STR za sedam skokova ne razlikuju se statistički značajno ($F=1,791$; $p=0,144$). Za grupu bikova tretiranih Melofeel-om prosečne vrednosti STR za sedam skokova razlikuju se statistički značajno ($F=3,606$; $p=0,011$), zato što je u sedmom skoku vrednost statistički značajno manja nego u šestom skoku ($p=0,031$). Za grupu bikova tretiranih Alcosel-om prosečne vrednosti STR za sedam skokova razlikuju se statistički vrlo značajno ($F=3,896$; $p=0,007$), zato što je u petom skoku vrednost statistički značajno manja nego u prvom skoku ($p=0,021$) i vrlo značajno manja u poređenju sa šestim skokom ($p=0,002$).

5.4.6. Indeks oscilacije

Efekat grupe nije značajan za WOB ($F=2,670$; $p=0,110$), kao i interakcije grupe i skoka ($F=1,000$; $p=0,458$). Faktor skok vrlo značajno utiče na WOB ($F=5,469$; $p<0,001$). Prosečne vrednosti WOB-a su vrlo značajno veće u trećem skoku u odnosu na prosečne vrednosti za peti ($p=0,002$) i sedmi skok ($p<0,001$). Takođe, prosečna vrednost za šesti skok je značajno veća u odnosu na prosek za peti skok ($p=0,023$) i vrlo značajno veća u odnosu na prosek za sedmi skok ($p<0,001$).



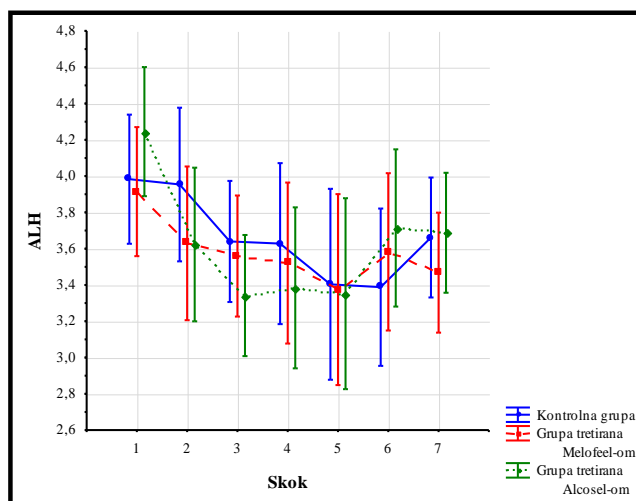
Grafikon 19. 95% intervali pouzdanosti za aritmetičke sredine WOB-a po grupama u skokovima

Na osnovu statističke analiza odnosa prosečnih vrednosti WOB-a između skokova u okviru svake grupe bikova posebno može se zaključiti da se te vrednosti statistički značajno ne razlikuju kod kontrolne grupe bikova ($F=2,462$; $p=0,053$) i kod grupe bikova tretiranih Melofeel-om ($F=1,091$; $p=0,396$), a vrlo značajno se razlikuju kod grupe bikova tretiranih Alcosel-om ($F=4,626$; $p=0,003$). U grupi bikova tretiranih Alcosel-om prosečan WOB u trećem skoku značajno je veći u odnosu na sedmi skok ($p=0,031$) i vrlo značajno veći u odnosu na peti ($p=0,006$). Prosečna vrednost WOB-a značajno je veća i u šestom skoku u odnosu na peti ($p=0,022$).

5.4.7. Amplituda lateralnog otklona pomeranja glave

Vrednost uzoračke F statistike za grupe bikova, dobijena primenom modela dvofaktorske kombinovane analize varijanse, manja je od 1, što znači da se više razlikuju vrednosti ALH u okviru grupa nego između grupa ($F=0,100$; $p=0,906$). I za ALH, prosečne vrednosti ostvarene u sedam skokova, za analizirane grupe istovremeno, statistički vrlo značajno se razlikuju ($F=7,191$; $p<0,001$). Interakcija između faktora grupa i faktora skok ne utiče statistički značajno na prosečne vrednosti ALH ($F=1,137$; $p=0,345$).

Ako se grupe posmatraju istovremeno, na osnovu Tukey-evog testa, dobija se da se prosečna vrednost ALH za prvi skok ne razlikuje značajno samo od prosečne vrednosti za drugi skok ($p=0,106$) a vrlo značajno je veća ($p\leq 0,004$) u odnosu na vrednosti za ostale skokove. Statistički značajno se razlikuju prosečne vrednosti ALH za drugi i peti skok ($p=0,038$; Grafikon 20).

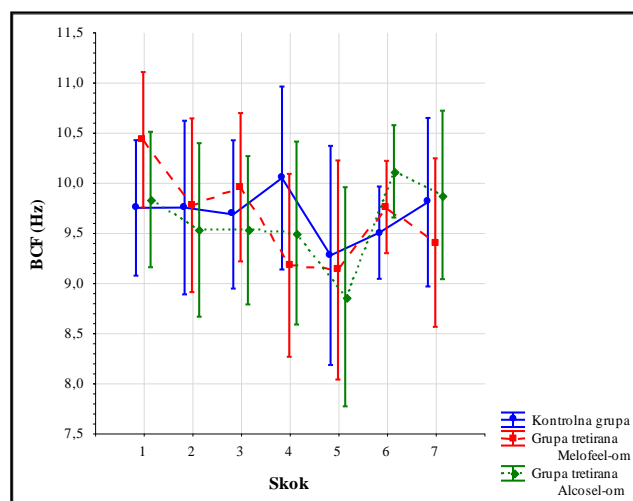


Grafikon 20. 95% intervali pouzdanosti za aritmetičke sredine ALH-a po grupama u skokovima

Analizom odnosa ALH u sedam skokova, posebno za svaku grupu, utvrđeno je da se prosečne vrednosti statistički značajno razlikuju za kontrolnu grupu ($F=2,618$; $p=0,043$), značajno se ne razlikuju za grupu bikova tretiranih Melofeel-om ($F=1,319$; $p=0,287$) i vrlo značajno se razlikuju za grupu bikova tretiranih Alcosel-om ($F=6,401$; $p<0,001$). Tukey test nije pokazao značajne razlike parova sredina za kontrolnu grupu bikova, a prema Fisher-ovom LSD testu prosečna vrednost ALH u prvom skoku vrlo značajno je veća u poređenju sa prosecima za peti ($p=0,0095$) i šesti ($p=0,008$) skok, kao i značajno veća u drugom skoku u odnosu na peti ($p=0,013$) i šesti skok ($p=0,011$). Na bazi Tukey-vog testa za grupu tretiranu Alcosel-om, prosečna vrednost ALH prvog skoka značajno je veća od proseka za drugi skok ($p=0,027$) i vrlo značajno veća od proseka za treći ($p=0,001$), četvrti ($p=0,001$) i peti skok ($p=0,001$).

5.4.8. Frekvencija prelaska pravolinijske putanje

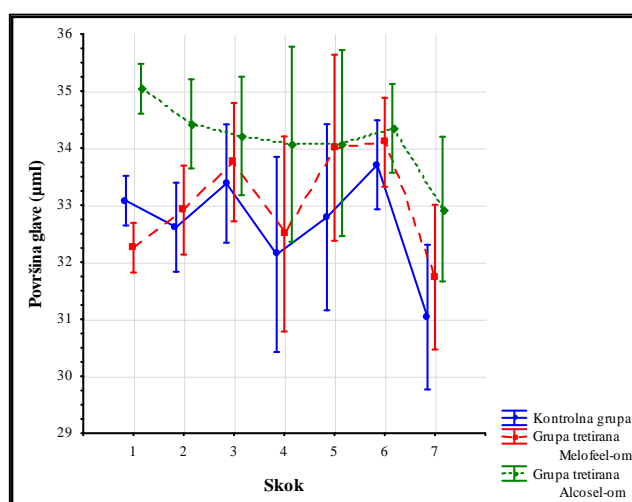
Prema rezultatima dvofaktorske kombinovane analize varijanse, na BCF nije uočen statistički značajan uticaj: grupe bikova ($F=0,035$; $p=0,965$), redosleda skoka ($F=2,214$; $p=0,051$) i interakcije između faktora grupa i faktora skok ($F=0,916$; $p=0,535$; Grafikon 21). Rezultati jednofaktorske analize varijanse sa ponovljenim merenjima ukazuju da i za svaku grupu bikova ne postoji značajna razlika prosečnih vrednosti BCF u sedam skokova ($F_K=0,585$; $p=0,739$ $F_M=2,034$; $p=0,100$ i $F_A=1,396$; $p=0,257$).



Grafikon 21. 95% intervali pouzdanosti za aritmetičke sredine BCF-a po grupama u skokovima

5.4.9. Površina glave spermatozoida

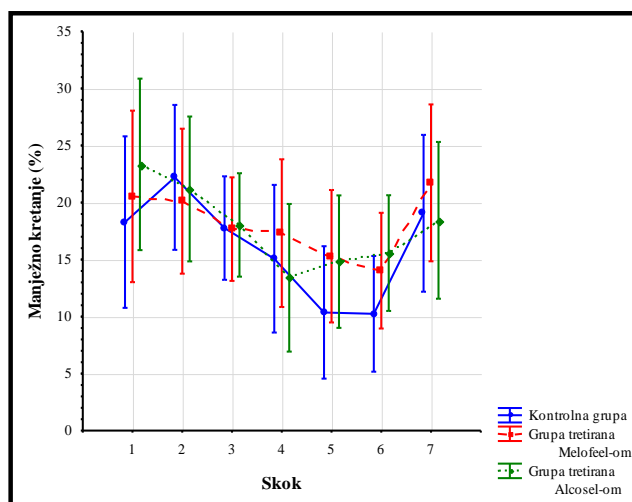
Na prosečnu površinu glave spermatozoida statistički značajan uticaj ima faktor grupa ($F=5,674$; $p=0,016$), a vrlo značajan faktor skok ($F=6,83$; $p<0,001$). Uticaj interakcije ova dva faktora nije statistički značajan ($F=1,190$; $p=0,307$). Po prosečnoj površini glave statistički značajno se razlikuju bikovi iz kontrolne grupe i grupe tretirane Alcosel-om ($p=0,016$). Površina glave u sedmom skoku se ne razlikuje značajno u poređenju sa površinom u četvrtom skoku ($p=0,146$), a vrlo značajno ($p\leq 0,008$) se razlikuje od površine u ostalim skokovima, grafikon 22.



Grafikon 22. 95% intervali pouzdanosti za aritmetičke sredine površine glave po grupama u skokovima

5.4.10. Manježno kretanje

Prosečno manježno kretanje se nije razlikovalo statistički značajno između grupa bikova ($F=0,217$; $p=0,808$). Šta više, veća je heterogenost podataka u okviru iste grupe ($F<1$). Ako se grupe posmatraju zajedno, prosečno manježno kretanje između sedam skokova se statistički vrlo značajno razlikuje ($F=10,307$; $p<0,001$; Grafikon 23). Ta razlika je rezultat vrlo značajne razlike ($p\leq 0,008$) prvog i drugog skoka u odnosu na četvrti, peti i šesti skok; sedmog skoka u odnosu na peti i šesti, kao i značajne razlike ($p=0,045$) između trećeg i četvrtog skoka.



Grafikon 23. 95% intervali pouzdanosti za aritmetičke sredine manježnog kretanja po grupama u skokovima

Primenom jednofaktorske analize varijanse sa ponovljenim merenjima dobijeno je da između prosečnih vrednosti manježnog kretanja u sedam skokova postoji vrlo značajna razlika za bikove iz kontrolne grupe ($F=6,050$; $p=0,001$) i bikove tretirane Alcosel-om ($F=4,266$; $p=0,005$), a da razlika nije statistički značajna kod bikova tretiranih Melofeel-om ($F=2,284$; $p=0,069$).

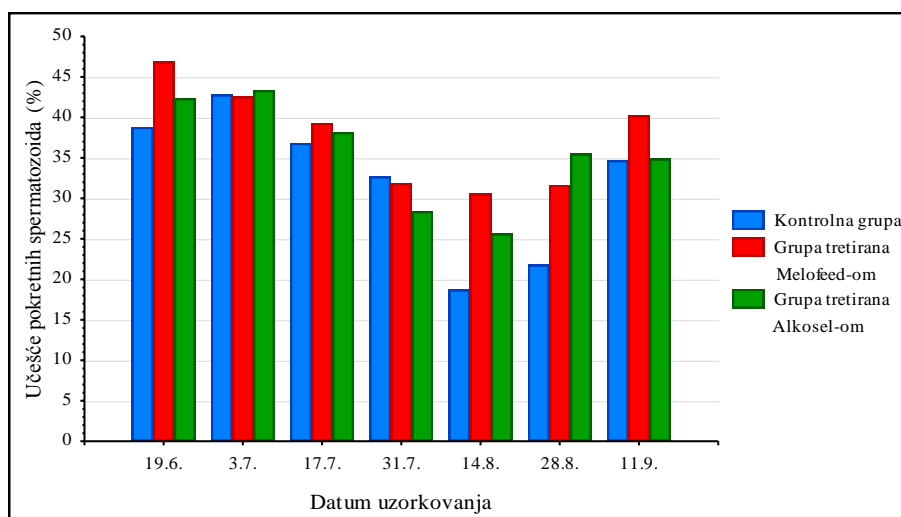
Kod bikova iz kontrolne grupe prosečno manježno kretanje u drugom skoku je statistički vrlo značajno veće, a u sedmom skoku statistički značajno veće u odnosu na prosečno manježno kretanje u petom skoku ($p=0,002$ i $p=0,036$) i šestom skoku ($p=0,002$ i $p=0,033$). Kod bikova iz grupe tretirane Alcosel-om prosečno manježno kretanje u prvom skoku je statistički vrlo značajno veće u odnosu na četvrti skok ($p=0,007$) i značajno veće u odnosu na peti skok ($p=0,026$).

5.5. Analiza učestalosti ukupno pokretnih spermatozoida po grupama

Prema učestalosti pokretnih spermatozoida posmatrane tri grupe bikova statistički značajno se razlikuju u prvom (19.06.) i posljednjem (11.09.) skoku, kao i vrlo značajno u petom (14.08.) i šestom (28.08.) skoku (Tabela 7. i Grafikon 24). Učestalost pokretnih spermatozoida statistički značajno je manje kod kontrolne grupe bikova u odnosu na grupu tretiranu Melofeed-om u prvom (19.06.) i sedmom skoku (11.09.), a vrlo značajno manje u petom (14.08.) i šestom (28.08.) skoku (Tabela 7. i Grafikon 24). Kontrolna grupa bikova u odnosu na grupu bikova tretiranih Alkosel-om ima statistički vrlo značajno manju učestalost pokretnih spermatozoida u petom (14.08.) i šestom skoku (28.08.). Razlika u učestalosti pokretnih spermatozoida između tretiranih grupa bikova je statistički značajna u petom (14,8) i sedmom (11,9) skoku (Tabela 7. i Grafikon 24) u korist grupe bikova tretiranih Melofeed-om.

Tabela 7. Rezultati testiranja značajnosti razlike učestalosti pokretnih spermatozoida između grupa bikova po skokovima

Datum uzorkovanja	Sve grupe		Kontrolna grupa/ grupa tretirana Melofeed-om		Kontrolna grupa/ grupa tretirana Alkosel-om		Grupa tretirana Melofeed-om/ grupa tretirana Alkosel-om	
	χ^2	p	χ^2	p	χ^2	P	χ^2	p
19.06.	6,651	0,037	6,179	0,013	1,480	0,224	1,704	0,192
03.07.	0,084	0,959	<0,001	0,995	0,031	0,861	0,046	0,829
17.07.	0,806	0,668	0,697	0,404	0,205	0,651	0,128	0,720
31.07.	2,872	0,238	0,055	0,814	2,328	0,127	1,535	0,215
14.08.	28,216	<0,001	27,540	<0,001	11,510	0,001	4,946	0,026
28.08.	26,162	<0,001	12,820	<0,001	24,241	<0,001	1,624	0,202
11.09.	6,793	0,034	4,626	0,032	<0,001	0,996	5,048	0,025

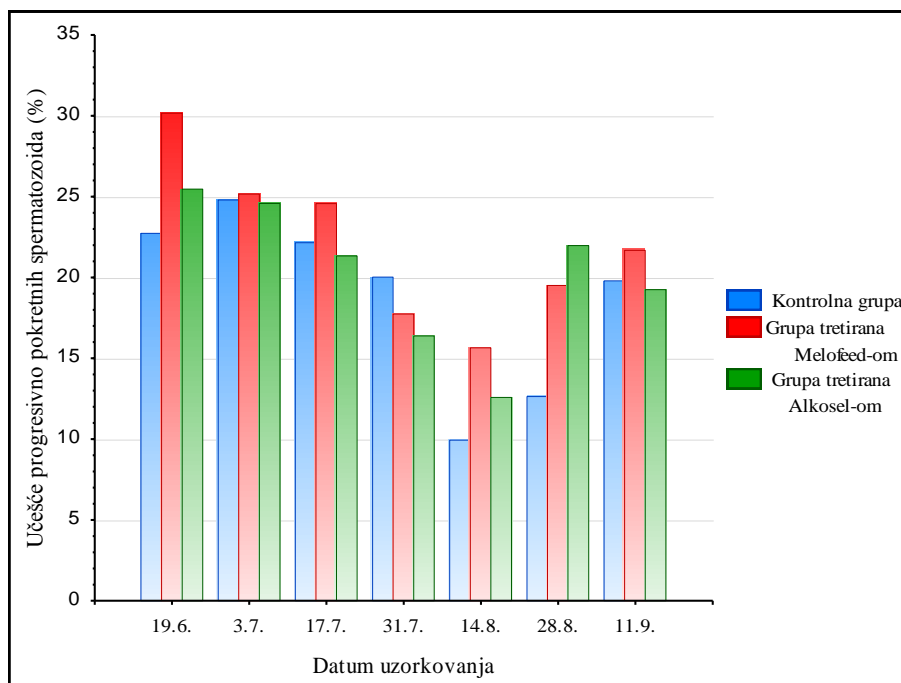


Grafikon 24. Učešće pokretnih spermatozoida po grupama u sedam različitih skokova

U posmatrane tri grupe bikova, učešće progresivno pokretnih spermatozoida razlikuje se statistički značajno prvom (19.06.), a vrlo značajno petom (14.08.) i šestom (28.08.) skoku (Tabela 8. i Grafikon 25). U uzorcima sperme bikova iz kontrolne grupe statistički značajno je manje učešće progresivno pokretnih spermatozoida nego kod bikova tretiranih Melofeed-om u prvom (19.06.) skoku i statistički vrlo značajno manje u petom (14.08.) i šestom (28.08.) skoku (tabela 8. Grafikon 25). Učešće progresivno pokretnih spermatozoida u spermi bikova iz kontrolne grupe vrlo značajno je manje u poređenju sa grupom bikova tretiranih Alkosel-om u šestom (28.08.) skoku (Tabela 8. i Grafikon 25).

Tabela 8. Rezultati testiranja značajnosti razlike učestalosti progresivno pokretnih spermatozoida između grupa bikova po skokovima

Datum uzorkovanja	Sve grupe		Kontrolna grupa/ grupa tretirana Melofeed-om		Kontrolna grupa/ grupa tretirana Alkosel-om		Grupa tretirana Melofeed-om/ grupa tretirana Alkosel-om	
	χ^2	p	χ^2	p	χ^2	P	χ^2	p
19.06.	7,015	0,030	6,626	0,0101	1,264	0,261	2,086	0,149
03.07.	0,064	0,968	0,014	0,907	0,005	0,944	0,033	0,856
17.07.	1,914	0,384	0,876	0,349	0,095	0,758	1,759	0,185
31.07.	2,718	0,257	0,816	0,366	2,432	0,119	0,329	0,566
14.08.	10,800	0,004	10,230	0,001	2,700	0,100	3,080	0,079
28.08.	17,280	<0,001	8,979	0,003	15,930	<0,001	0,842	0,359
11.09.	1,793	0,408	0,709	0,400	0,070	0,791	1,547	0,214



Grafikon 25. Učešće progresivno pokretnih spermatozoida po grupama u sedam skokova

5.6. Uticaj THI na pokretljivost spermatozoida

Jedan od ciljeva rada je bio ispitivanje uticaja THI na pokretljivost spermatozoida kod bikova. Posmatran je efekat THI posle 14 dana na kvalitet spermatozoida. S obzirom na heterogenost podataka, za kvantifikovanje jačine veze % ukupno pokretnih spermatozoida i % progresivno pokretnih spermatozoida sa THI, korišćen je Spearman-ov koeficijent korelacije ranga (Tabela 9). Negativne vrednosti dobijene za ovaj koeficijent ukazuju da sa porastom THI opada procenat ukupno pokretnih i procenat progresivno pokretnih spermatozoida. Međutim, rezultati testiranja jačine veze za posmatrane grupe bikova ukazuju da % ukupno pokretnih spermatozoida i % progresivno pokretnih spermatozoida ne zavisi statistički značajno ($p > 0,05$) od THI, tj da veza između tih pojava gotovo i ne postoji.

Tabela 9. Rezultati korelacione analize između ukupne pokretljivosti spermatozoida i THI kod analiziranih grupa bikova

	Grupa	Spearman-ov koeficijent korelacije	t-statistika	Nivo značajnosti p
% pokretnih spermatozoida/THI	kontrolna	-0,006	-0,030	0,977
	tretirana Melofeed-om	-0,001	-0,006	0,995
	tretirana Alkosel-om	-0,017	-0,090	0,929
% progresivno pokretnih spermatozoida/THI	kontrolna	-0,030	-0,157	0,876
	tretirana Melofeed-om	-0,039	-0,209	0,836
	tretirana Alkosel-om	-0,136	-0,729	0,472

5.7. Analiza korelacija između SOD, GPx i brzine kretanja spermatozoida

S obzirom na varijabilnost podataka za analizu veze između karakteristika antioksidativnih enzima, SOD i GPx i procenta ukupno pokretnih spermatozoida i procenta progresivno pokretnih spermatozoida, korišćen je Spearman-ov koeficijent korelacije ranga.

Rezultati analize zavisnosti posmatranih karakteristika kod svakog bika u toku sedam skokova (Tabela 10.) ukazuju da samo kod jednog bika tretiranog Alcosel-om postoji jaka negativna veza između SOD-a i procenta progresivno pokretnih spermatozoida ($\rho=-0,857$; $t=-3,721$; $p=0,014$), odnosno da sa porastom vrednosti SOD-a značajno opada procenat progresivno pokretnih spermatozoida. Takođe, samo kod jednog bika tretiranog Melofeed-om postoji jaka negativna veza između GPx-a i procenta progresivno pokretnih spermatozoida ($\rho=-0,775$; $t=-2,740$; $p=0,041$), odnosno, porast GPx-a prati značajan pad procenta progresivno pokretnih spermatozoida.

Tabela 10. Pokazatelji jačine veze između SOD-a i GPx-a sa procentom pokretnih i progresivno pokretnih spermatozoida kod svakog posmatranog bika u toku sedam skokova

Bik	Karakteristike		Kontrolna grupa			Grupa tretirana Melofeel-om			Grupa tretirana Alcosel-om		
			Spearman-ov koef.	t	p	Spearman-ov koef.	T	p	Spearman-ov koef.	t	p
1.	SOD	% pokretnih spermatozoida	-0,214	-0,491	0,645	0,036	0,080	0,939	-0,464	-1,172	0,294
		% progresivno pokretnih spermatozoida	-0,321	-0,759	0,482	0,214	0,491	0,645	-0,857	-3,721	0,014
	GPx	% pokretnih spermatozoida	0,162	0,367	0,728	-0,216	-0,495	0,641	0,214	0,491	0,645
		% progresivno pokretnih spermatozoida	0,216	0,495	0,641	-0,180	-0,410	0,699	0,214	0,491	0,645
2.	SOD	% pokretnih spermatozoida	-0,685	-2,101	0,090	-0,179	-0,406	0,702	-0,324	-0,767	0,478
		% progresivno pokretnih spermatozoida	-0,739	-2,451	0,058	-0,429	-1,061	0,337	-0,324	-0,767	0,478
	GPx	% pokretnih spermatozoida	-0,595	-1,654	0,159	-0,685	-2,101	0,090	-0,306	-0,720	0,504
		% progresivno pokretnih spermatozoida	-0,721	-2,325	0,068	-0,775	-2,740	0,041	-0,306	-0,720	0,504
	SOD	% pokretnih spermatozoida	-0,429	-1,061	0,337	0,450	1,128	0,310	-0,414	-1,018	0,355

		% progresivno pokretnih spermatozoida	-0,179	-0,406	0,702	0,631	1,817	0,129	-0,180	-0,410	0,699
	GPx	% pokretnih spermatozoida	-0,291	-0,680	0,527	0,418	1,030	0,350	-0,382	-0,924	0,398
		% progresivno pokretnih spermatozoida	0,091	0,204	0,846	0,364	0,873	0,423	-0,509	-1,323	0,243
4.	SOD	% pokretnih spermatozoida	0,000	0,000	1,000	-0,107	-0,241	0,819	-0,429	-1,061	0,337
		% progresivno pokretnih spermatozoida	-0,036	-0,080	0,939	-0,321	-0,759	0,482	-0,321	-0,759	0,482
	GPx	% pokretnih spermatozoida	-0,536	-1,419	0,215	-0,111	-0,250	0,812	-0,107	-0,241	0,819
		% progresivno pokretnih spermatozoida	-0,571	-1,557	0,180	-0,259	-0,601	0,574	0,179	0,406	0,702
5.	SOD	% pokretnih spermatozoida	-0,500	-1,291	0,253	-0,036	-0,081	0,939	-0,643	-1,877	0,119
		% progresivno pokretnih spermatozoida	-0,286	-0,667	0,535	-0,126	-0,284	0,788	-0,643	-1,877	0,119
	GPx	% pokretnih spermatozoida	-0,145	-0,329	0,756	-0,429	-1,061	0,337	-0,180	-0,410	0,699
		% progresivno pokretnih spermatozoida	-0,018	-0,041	0,969	-0,286	-0,667	0,535	-0,180	-0,410	0,699

Za kontrolnu grupu bikova, u šestom skoku, utvrđena je negativna deterministička (funkcionalna) veza između GPx-a i procenta ukupno pokretnih spermatozoida ($\rho \approx -1,000$; $p \approx 0,000$), kao i procenta progresivno pokretnih spermatozoida ($\rho \approx -1,000$; $p \approx 0,000$) (Tabela 11.). Za grupu bikova tretiranih Melofeed-om korelacija između SOD-a i procenta progresivno pokretnih spermatozoida je negativna i vrlo jaka u drugom skoku ($\rho = -0,975$; $t = -7,550$; $p = 0,005$) i vrlo jaka ali pozitivna u petom skoku ($\rho = 0,975$; $t = 3,576$; $p = 0,037$). Kod ove grupe bikova, za peti skok je karakteristična vrlo jaka pozitivna korelacija između SOD-a i procenta ukupno pokretnih spermatozoida ($\rho = 0,975$; $t = 3,576$; $p = 0,037$). Takođe, veza GPx je funkcionalna sa procentom ukupno pokretnih spermatozoida u trećem skoku ($\rho \approx -1,000$; $p \approx 0,000$) i petom skoku ($\rho = -0,975$; $t = -7,550$; $p = 0,005$). Između posmatranih parametara nije utvrđena značajna korelacija po skokovima za grupu bikova tretiranih Alcosel-om.

Ako se posmatraju svi skokovi zajedno (Tabela 11), dobija se da je statistički značajna korelacija SOD-a i procenta ukupno pokretnih spermatozoida samo u kontrolnoj grupi ($\rho = -0,383$; $t = -2,381$; $p = 0,023$).

Tabela 11. Pokazatelji jačine veze između SOD-a i GPx-a sa procentom pokretnih i progresivno pokretnih spermatozoida po posmatranim grupama bikova i skokovima

Skok	Karakteristike		Kontrolna grupa			Grupa tretirana Melofeel-om			Grupa tretirana Alcosel-om		
			Spearm an-ov koef.	t	p	Spearm -ov koef.	T	p	Spearm an-ov koef.	t	p
1.	SOD	% pokretnih spermatozoida	-0,400	-0,756	0,505	0,300	0,545	0,624	-0,700	-1,698	0,188
		% progresivno pokretnih spermatozoida	-0,400	-0,756	0,505	-0,100	-0,174	0,873	-0,300	-0,545	0,624
	GPx	% pokretnih spermatozoida	-0,600	-1,299	0,285	-0,154	-0,270	0,805	-0,667	-1,550	0,219
		% progresivno pokretnih spermatozoida	-0,600	-1,299	0,285	-0,359	-0,666	0,553	-0,718	-1,788	0,172
2.	SOD	% pokretnih spermatozoida	0,800	2,309	0,104	0,872	3,087	0,054	0,600	1,299	0,285
		% progresivno pokretnih spermatozoida	0,800	2,309	0,104	0,975	7,550	0,005	0,300	0,545	0,624
	GPx	% pokretnih spermatozoida	0,400	0,756	0,505	0,205	0,363	0,741	0,671	1,567	0,215
		% progresivno pokretnih spermatozoida	0,400	0,756	0,505	0,359	0,666	0,553	0,671	1,567	0,215
3.	SOD	% pokretnih spermatozoida	-0,667	-1,550	0,219	-0,300	-0,545	0,624	0,100	0,174	0,873
		% progresivno pokretnih spermatozoida	-0,308	-0,560	0,614	0,000	0,000	1,000	0,100	0,174	0,873
	GPx	% pokretnih spermatozoida	0,300	0,545	0,624	1,000		0,000	0,100	0,174	0,873
		% progresivno pokretnih spermatozoida	0,600	1,299	0,285	0,700	1,698	0,188	0,100	0,174	0,873
		% pokretnih	0,600	1,299	0,285	0,205	0,363	0,741	-0,600	-1,299	0,285

		spermatozoida									
		% progresivno pokretnih spermatozoida	0,300	0,545	0,624	0,051	0,089	0,935	-0,700	-1,698	0,188
	GPx	% pokretnih spermatozoida	-0,100	-0,174	0,873	0,800	2,309	0,104	0,600	1,299	0,285
		% progresivno pokretnih spermatozoida	-0,300	-0,545	0,624	0,600	1,299	0,285	0,700	1,698	0,188
5.	SOD	% pokretnih spermatozoida	0,300	0,545	0,624	0,900	3,576	0,037	0,600	1,299	0,285
		% progresivno pokretnih spermatozoida	0,700	1,698	0,188	0,900	3,576	0,037	0,600	1,299	0,285
	GPx	% pokretnih spermatozoida	0,051	0,089	0,935	0,975	7,550	0,005	0,200	0,354	0,747
		% progresivno pokretnih spermatozoida	-0,410	-0,779	0,493	0,872	3,087	0,054	0,200	0,354	0,747
6.	SOD	% pokretnih spermatozoida	0,300	0,545	0,624	-0,500	-1,000	0,391	-0,100	-0,174	0,873
		% progresivno pokretnih spermatozoida	0,300	0,545	0,624	-0,600	-1,299	0,285	-0,100	-0,174	0,873
	GPx	% pokretnih spermatozoida	-1,000		0,000	-0,100	-0,174	0,873	0,103	0,179	0,870
		% progresivno pokretnih spermatozoida	-1,000		0,000	0,000	0,000	1,000	0,103	0,179	0,870
7.	SOD	% pokretnih spermatozoida	-0,872	-3,087	0,054	0,400	0,756	0,505	-0,600	-1,299	0,285
		% progresivno pokretnih spermatozoida	-0,872	-3,087	0,054	0,500	1,000	0,391	-0,600	-1,299	0,285
	GPx	% pokretnih spermatozoida	0,051	0,089	0,935	0,718	1,788	0,172	0,308	0,560	0,614
		% progresivno pokretnih spermatozoida	-0,205	-0,363	0,741	0,154	0,270	0,805	0,308	0,560	0,614

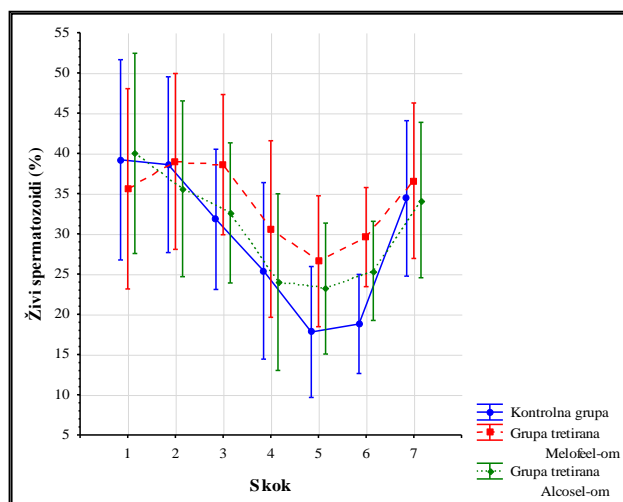
Ukupno	SOD	% pokretnih spermatozoida	-0,383	-2,381	0,023	-0,023	-0,135	0,894	-0,259	-1,542	0,133
		% progresivno pokretnih spermatozoida	-0,332	-2,020	0,052	-0,088	-0,507	0,615	-0,301	-1,812	0,079
	GPx	% pokretnih spermatozoida	-0,277	-1,654	0,108	-0,047	-0,269	0,789	-0,063	-0,360	0,721
		% progresivno pokretnih spermatozoida	-0,265	-1,581	0,123	-0,129	-0,750	0,459	-0,021	-0,124	0,902

5.8. Citomorfologija

Posmatrani su parametri citomorfologije u sedam skokova kod bikova iz tri grupe, pa je za ispitivanje razlike prosečnih vrednosti citomorfoloških pokazatelja korišćena dvofaktorska kombinovana analiza varijanse. Za validnu primenu ovog statističkog metoda potrebni su homogeni podaci. Međutim, za sve analizirane grupe podaci o citomorfološkim karakteristikama nisu homogeni. Kako ne postoji neparametarska alternativa za ovaj model analize varijanse, da bi se ispunionavedeni uslov, početni podaci su transformisaniu obliku $Y = \sqrt{X}$ za sve analizirane citomorfološke parametre, osim za broj živih spermatozoida sa oštećenim akrozomom (ŽOA) za koji je upotrebljena transformacija $Y = \sqrt[4]{X}$.

5.8.1. Učešće ukupno živih spermatozoida

Rezultati dvofaktorske kombinovane analize varijanse (Grafikon 26.), ukazuju da ne postoji statistički značajna razlika između grupa prema prosečnom učešću živih spermatozoida ($F=0,622$; $p=0,554$). S obzirom da je $F < 1$, veća je varijacija podataka u grupama, nego između grupa. Prosečno učešće živih spermatozoida između skokova za analizirane grupe istovremeno statistički vrlo značajno se razlikuje ($F=10,835$; $p < 0,001$). Interakcija faktora grupa i faktora skok nije statistički značajna ($F=0,821$; $p=0,628$), pa se mogu koristiti jednofaktorski modeli.



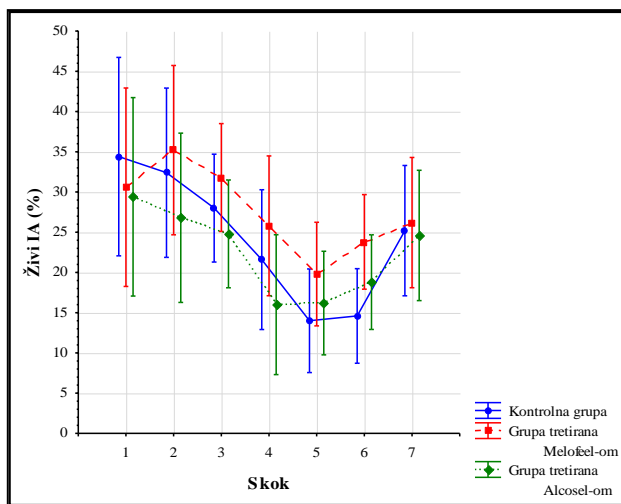
Grafikon 26. 95% intervali pouzdanosti za učešće živih spermatozoida po grupama u skokovima

Prema rezultatima Tukey-evog testa, statistički se vrlo značajno ($p < 0,01$) razlikuje učešće ukupno živih spermatozoida u prvom i drugom skoku u odnosu na četvrti, peti i šesti skok, u trećem i sedmom u odnosu na peti, a statistički značajno u trećem ($p = 0,025$) i sedmom ($p = 0,012$) u odnosu na šesti skok.

Na osnovu rezultata jednofaktorske analize varijanse sa ponovljenim merenjima, razlika prosečnih procenata ukupno živih spermatozoida između svih skokova statistički je vrlo značajna u kontrolnoj grupi ($F = 6,599$; $p < 0,001$) i u grupi tretiranoj Alkosel-om ($F = 5,702$; $p < 0,001$), a nije značajna za grupu bikova tretiranih Melofeed-om. Za kontrolnu grupu Tukey-ev test je ukazao na vrlo značajnu ili značajnu razliku prvog, drugog i sedmog skoka prema petom i šestom skoku. Takođe, za grupu tretiranu Alkosel-om u prvom skoku utvrđen je vrlo značajno veći procenat ukupno živih spermatozoida u odnosu na četvrti ($p = 0,007$) i peti skok ($p = 0,003$) i značajno veći u odnosu na 6 šesti skok ($p = 0,022$). Značajna razlika u prosečnom broju ukupno živih spermatozoida utvrđena je i između drugog i petog skoka ($p = 0,039$).

5.8.2. Učešće živih spermatozoida sa IA

Na osnovu rezultata dvofaktorske kombinovane analize varijanse, ne postoji statistički značajna razlika između tri grupe bikova prema prosečnom učešću živih spermatozoida sa IA ($F = 1,105$; $p = 0,363$). Prosečno učešće živih spermatozoida sa IA između skokova za analizirane grupe istovremeno statistički vrlo značajno se razlikuje ($F = 10,136$; $p < 0,001$). Interakcija faktora grupa i faktora skok nije statistički značajna ($F = 0,845$; $p = 0,604$; Grafikon 27.).



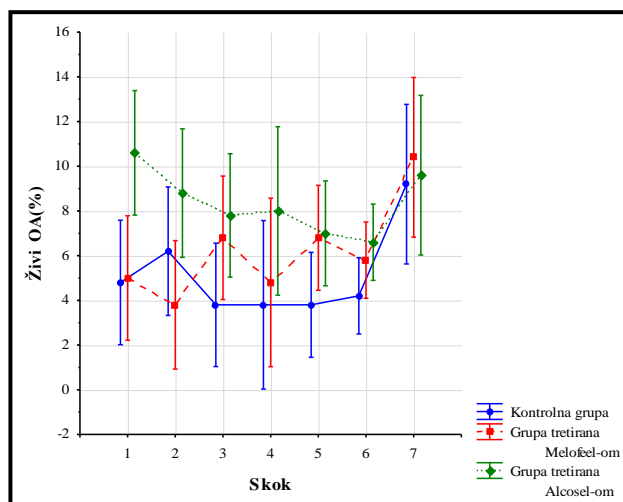
Grafikon 27. 95% intervali pouzdanosti za učešće živih spermatozoida sa IA po grupama u skokovima

Tukey-evim testom utvrđeno je da se statistički vrlo značajno ($p < 0,01$) razlikuje učešće živih spermatozoida sa IA u prvom i drugom skoku u odnosu na četvrti, peti i šesti skok, zatim, u trećem i sedmom skoku u odnosu na peti, a statistički značajno u trećem u odnosu na šesti skok ($p = 0,011$).

Prema rezultatima jednofaktorske analize varijanse sa ponovljenim merenjima, razlika prosečnih procenata živih spermatozoida sa IA između svih skokova statistički je vrlo značajna u kontrolnoj grupi ($F = 7,315$; $p < 0,001$) i u grupi tretiranoj Alkosel-om ($F = 4,090$; $p = 0,006$), a nije značajna za grupu bikova tretiranih Melofeel-om ($F = 1,641$; $p = 0,179$). Za kontrolnu grupu Tukey-ev test je ukazao na vrlo značajnu ili značajnu razliku prvog, drugog i trećeg skoka prema petom i šestom skoku. Takođe, za grupu tretiranu Alkosel-om u prvom skoku utvrđen je značajno veći procenat živih spermatozoida sa IA u odnosu na četvrti ($p = 0,020$) i peti skok ($p = 0,024$).

5.8.3. Učešće živih spermatozoida sa OA

Rezultati dvofaktorske kombinovane analize varijanse ukazuju: da se ispitivane tri grupe bikova vrlo značajno razlikuju prema prosečnom učešću živih spermatozoida sa OA ($F = 8,622$; $p = 0,005$), da se između skokova za analizirane grupe istovremeno statistički vrlo značajno razlikuje prosečno učešće živih spermatozoida sa OA ($F = 3,743$; $p = 0,003$) i da interakcija analiziranih faktora nije statistički značajna ($F = 1,644$; $p = 0,099$; Grafikon 28).



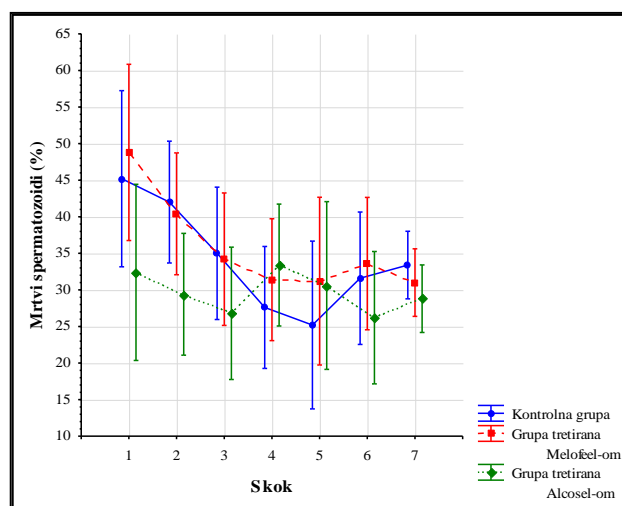
Grafikon 28. 95% intervali pouzdanosti za učešće živih OA spermatozoida po grupama u skokovima

Na osnovu rezultata Tukey-evog testa, prosečno učešće živih spermatozoida sa OA kod bikova tretiranih Alcosel-om vrlo značajno se razlikuje od prosečnog učešća živih spermatozoida sa OA kod bikova iz kontrolne grupe ($p=0,005$) i statistički značajno u poređenju sa bikovima tretiranim Melofeed-om. Prosečno učešće živih spermatozoida sa OA u sedmom skoku statistički vrlo značajno se razlikuje u odnosu na četvrti skok ($p=0,001$) i značajno u odnosu na drugi ($p=0,033$), treći ($p=0,041$), peti ($p=0,022$) i šesti skok ($p=0,016$). Razlike prosečnih učešća živih spermatozoida sa OA između ostalih parova skokova nisu statistički značajne ($p>0,05$).

Rezultati jednofaktorske analize varijanse sa ponovljenim merenjima ukazuju da je razlika prosečnih procenata živih spermatozoida sa OA između svih skokova statistički značajna u kontrolnoj grupi ($F=2,687$; $p=0,039$) i u grupi tretiranoj Melofeed-om ($F=2,630$; $p=0,042$), a nije značajna za grupu bikova tretiranih Alcosel-om ($F=1,216$; $p=0,333$). U kontrolnoj grupi, prema Tukey-evom testu, značajna je razlika prosečnog učešća živih spermatozoida sa OA u četvrtom i sedmom skoku ($p=0,041$), a za tretirane grupe skokovi se nisu statistički značajno razlikovali po prosečnim procentima živih spermatozoida sa OA.

5.8.4. Učešće mrtvih spermatozoida

Na osnovu rezultata kombinovane dvofaktorske analize varijanse, ispitivane tri grupe bikova ne razlikuju se statistički značajno prema prosečnom procentu mrtvih spermatozoida ($F=1,376$; $p=0,290$). Prosečan procenat mrtvih spermatozoida u sedam skokova vrlo značajno se razlikuje ($F=4,823$; $p<0,001$). Između grupa i skokova interakcija nije statistički značajna ($F=1,350$; $p=0,210$). Tukey-ev test ukazuje da se značajno razlikuje prosečan procenat mrtvih spermatozoida u prvom skoku u odnosu na treći ($p=0,030$), četvrti ($p=0,0103$) i sedmi ($p=0,020$), kao i vrlo značajno u odnosu na peti ($p=0,001$) i šesti ($p=0,006$). Između ostalih parova skokova nisu statistički značajne razlike u prosečnom procentu mrtvih spermatozoida.

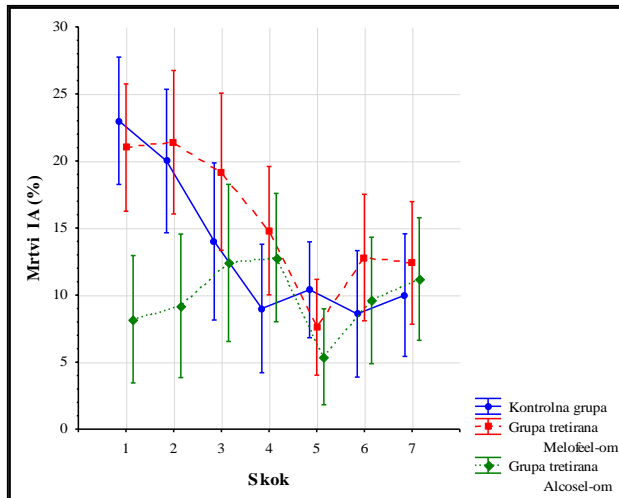


Grafikon 29. 95% intervali pouzdanosti za učešćemrtvih spermatozoida po grupama u skokovima

Za svaku grupu bikova posebno, rezultati jednofaktorske analize varijanse sa ponovljenim merenjima ukazuju da postoji statistički značajna razlika između skokova u procentu mrtvih spermatozoida samo za kontrolnu grupu ($F=3,457$; $p=0,013$). Značajnost te razlike je posledica značajne razlike između procenta mrtvih spermatozoida u prvom i petom skoku, utvrđene Tukey-evim testom ($p=0,017$).

5.8.5. Učešće mrtvih spermatozoida sa IA

Prema rezultatima kombinovane dvofaktorske analize varijanse, ispitivane tri grupe bikova razlikuju se statistički značajno prema prosečnom procentu mrtvih spermatozoida sa IA ($F=5,306$; $p=0,022$). U sedam skokova prosečan procenat mrtvih spermatozoida sa IA vrlo značajno se razlikuje ($F=8,998$; $p<0,001$). Između faktora grupa i faktora skok interakcija je statistički vrlo značajna ($F=3,263$; $p=0,001$). Tukey-ev test ukazuje da je statistički značajno veći prosečan procenat mrtvih spermatozoida sa IA utvrđen za grupu bikova tretiranih Melofeel-om u odnosu na grupu bikova tretiranih Alkosel-om. Mrtvih spermatozoida sa IA statistički vrlo značajno je više u prvom, drugom i trećem skoku u odnosu na njihovo učešće u petom skoku ($p<0,001$). Takođe, u prvom i drugom skoku vrlo značajnu je veći procenat mrtvih spermatozoida sa IA u odnosu na šesti skok ($p_{16}=0,003$ i $p_{26}=0,007$), a značajno veći u odnosu na sedmi skok ($p_{17}=0,022$ i $p_{27}=0,044$).

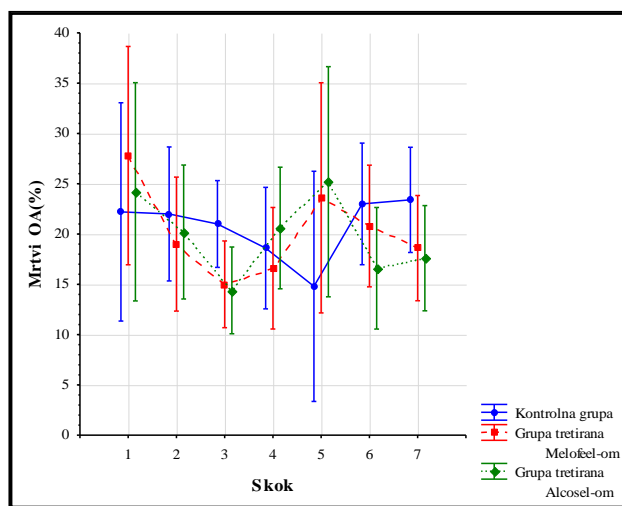


Grafikon 30. 95% intervali pouzdanosti za učešćemrtvih IA spermatozoida po grupama u skokovima

Rezultati analize varijanse sa ponovljenim merenjima ukazuju da između skokova postoji statistički vrlo značajna razlika u učešću mrtvih spermatozoida sa IA u kontrolnoj grupi bikova ($F=6,305$; $p<0,001$) i grupi bikova tretiranih Melofeed-om ($F=7,204$; $p<0,001$). Kod bikova iz kontrolne grupe učešću mrtvih spermatozoida sa IA u prvom skoku je statistički vrlo značajno veće u odnosu na četvrti ($p=0,005$), peti ($p=0,003$) i sedmi ($p=0,008$) skok, a statistički značajno veće prema drugom skoku ($p=0,016$). Takođe, u drugom skoku učešću mrtvih spermatozoida sa IA je statistički značajno veće u odnosu na četvrti ($p=0,029$), šesti ($p=0,020$) i sedmi ($p=0,043$) skok. U grupi bikova tretiranih Melofeed-om učešću mrtvih spermatozoida sa IA u petom skoku je statistički vrlo značajno manje u odnosu na prvi ($p=0,001$), drugi ($p=0,001$) i treći ($p=0,003$) skok.

5.8.6. Učešće mrtvih spermatozoida sa OA

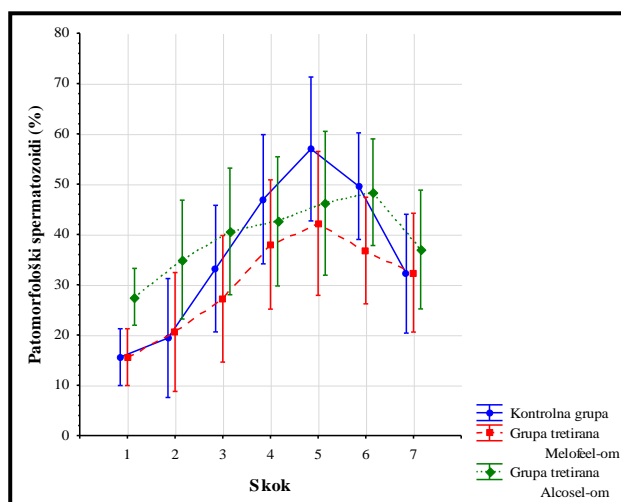
Posmatrane grupe bikova ne razlikuju se statistički značajno po učešću mrtvih spermatozoida sa OA ($F=0,096$; $p=0,909$). S obzirom da je $F<1$, učešće mrtvih spermatozoida sa OA više se razlikuje kod bikova u okviru uzorka, nego između različitih uzoraka. Redni broj skoka ne prouzrokuje razliku u učešću mrtvih spermatozoida sa OA ($F=1,553$; $p=0,173$). Takođe, interakcija faktora grupa i faktora skok nije statistički značajna ($F=1,287$; $p=0,245$).



Grafikon 31. 95% intervali pouzdanosti za učešćemrtvih OAspermatozoida po grupama u skokovima

Rezultati dvofaktorske kombinovane analize varijanse ukazuju: da se ispitivane tri grupe bikova statistički značajno ne razlikuju prema prosečnom učešću patomorfoloških spermatozoida ($F=1,554$; $p=0,251$), da se između skokova za analizirane grupe istovremeno statistički vrlo značajno razlikuje prosečno učešće patomorfoloških spermatozoida ($F=28,081$; $p<0,001$) i da je interakcija analiziranih faktora statistički značajna ($F=2,125$; $p=0,025$).

Posmatrano za sve grupe istovremeno, prosečno učešće patomorfoloških spermatozoida u prvom skoku statistički vrlo značajno se razlikuje ($p<0,001$) u odnosu na sve ostale skokove izuzev drugog. Prosečno učešće patomorfoloških spermatozoida u drugom skoku statistički vrlo značajno se razlikuje ($p<0,001$) u odnosu na četvrti, peti i šesti skok ($p<0,001$) i značajno u odnosu na treći ($p=0,016$) i sedmi skok ($p=0,011$). Takođe, prosečno učešće patomorfoloških spermatozoida u trećem i sedmom skoku statistički vrlo značajno se razlikuje od prosečnih vrednosti za peti i šesti skok ($p<0,01$).



Grafikon 32. 95% intervali pouzdanosti za učešće patomorfoloških spermatozoida po grupama u skokovima

Učešće patomorfoloških spermatozoida u sedam skokova vrlo značajno se razlikuje u kontrolnoj grupi bikova ($F=14,917$; $p<0,001$), kod bikova tretiranih Melofeel-om ($F=10,259$; $p<0,001$), kao i kod grupe bikova tretiranih Alcosel-om ($F=4,418$; $p=0,004$). Za kontrolnu grupu karakteristično je vrlo značajno ($p<0,001$) manje prisustvo patomorfoloških spermatozoida u prvom i drugom skoku u odnosu na četvrti, peti i šesti skok; značajno veće prisustvo u trećem ($p=0,021$) i sedmom ($p=0,041$) skoku prema učešću u prvom skoku, a manje u odnosu na peti skok ($p_{35}=0,027$ i $p_{57}=0,014$). Grupu tretiranu Melofeel-om u prvom skoku u odnosu na četvrti skok ($p<0,001$), peti skok ($p<0,001$), šesti skok ($p=0,001$) i sedmi skok ($p=0,005$), kao i u drugom skoku u odnosu na četvrti skok ($p=0,008$) i peti skok ($p=0,001$), a razlika između učešće patomorfoloških spermatozoida u drugom i šestom skoku je statistički značajna ($p=0,012$).

6. DISKUSIJA

Oksidativni stres (OS) nastaje kao posledica povećanog stvaranja ROS i smanjenja antioksidativnog kapaciteta organizma (Trevisan i sar., 2001). Williams i sar. (2002) iznose da je proces oksidacije neophodan gotovo za sve ćelije u organizmu u cilju njihovog snabdevanja energijom za vitalne funkcije. Približno 95 - 98 % kiseonika koji se koristi u ćelijama, se u aerobnom metabolizmu pretvara u vodu, ali ostale frakcije kiseonika se mogu pretvoriti u ROS, koje doprinose degenerativnim promenama u ćeliji. Jedan od glavnih uzroka OS kod životinja tokom leta je toplotni stres.

Spermatozoidi sisara imaju razvijeni odbrambeni mehanizam protiv OS kroz enzimski antioksidativni sistem. Najpoznatiji enzimi ovog sistema su SOD, CAT i GPx. Aktivnost ovih enzima u seminalnoj plazmi i spermatozoidima varira između vrsta životinja (Asadpour i Tayefi-Nasrabadi, 2012; Cassani i sar., 2005; Partyka i sar., 2012). Prema istraživanjima Bilodeau i sar. (2000), aktivnost CAT u bikovskom semenu je niska, što je potvrdio i Kadirve i sar. (2014) u semenu bivola, stoga je jedan od ciljeva ovog rada bio ispitati nivo SOD i GPx u zamrznutom semenu bikova Simentalske rase iz kontrolne grupe, grupe tretirane Melofeed-om i grupe tretirane Alcosel-om.

Prosečne vrednosti za SOD u kontrolnoj grupi su statistički vrlo značajno manje od prosečnih vrednosti za grupe tretirane Melofeed-om ($p < 0,001$) i Alcosel-om ($p < 0,001$), dok se prosečne vrednosti antioksidansa među tretiranim grupama statistički značajno nisu razlikovale ($p = 0,784$). Analizom sedam skokova u okviru grupa je utvrđeno da se prosečne vrednosti za SOD statistički vrlo značajno razlikuju ($F = 6,749$; $p < 0,001$) i da su aktivnosti enzima u okviru svake grupe rasle do 5. skoka (maksimalna vrednost), a nakon toga opadale i bile najniže su u 7. skoku. Značajna razlika između grupa do petog skoka se može objasniti velikom potrošnjom SOD-a na neutralizaciju slobodnih radikala nastalih kao posledica dugog trajanja toplotnog stresa. Prosečne vrednosti SOD-a u prvih pet skokova za kontrolnu grupu bikova su značajno manje od prosečnih vrednosti za grupu bikova tretiranih Melofeed-om ($p_1 = 0,035$; $p_2 = 0,046$; $p_3 = 0,0495$; $p_4 = 0,048$ i $p_5 = 0,023$), i od prosečnih vrednosti za grupu bikova tretiranih Alcosel-om u 1., 3. i 5. skoku ($p_1 = 0,040$ i $p_3 = 0,046$ i $p_5 = 0,022$). Na osnovu ovoga se može zaključiti da je kod svih grupa došlo do povećanja prosečnih vrednosti SOD-a u prvih 5 skokova kao odgovor organizma na toplotni stres, je u saglasnosti sa istraživanjima Vince i sar. (2009) i Soren i sar. (2016) kod bikova simentalske i karan fries rase. Kod krava je takođe uočena povećana aktivnost SOD u serumu tokom letnjih meseci (Bernabucci i sar. 2002; Chandra i Aggarwal 2009; Lallawmkimi i sar. 2009). Nair i sar. (2006) su utvrdili negativnu korelaciju između SOD i lipidne peroksidacije što znači da u semenu u kome je veća koncentracija SOD manji je stepen lipidne peroksidacije. Nichi i sar. (2006) su dokazali da je kod bikova simentalske rase u letnjem periodu veći stepen lipidne peroksidacije u semenu, pa samim tim organizam kroz svoj antioksidativni enzimski sistem teži da se suprostavi gore navedenom procesu i samim tim spreči sintezu semena lošijeg kvaliteta. U našem istraživanju, prosečne vrednosti za SOD su u grupama tretiranih Melofeed-om i Alcosel-om veće u odnosu na kontrolnu

grupu, što nam ukazuje da su dodaci hrani u obe grupe dali rezultat u povećanju antioksidativnog kapaciteta u odnosu na kontrolnu grupu. Međutim, Sariözkan i sar. (2009b) su utvrdili da su semena bikova holštajn rase koja su razređivana razređivačem sa antioksidansima, imala manju aktivnost SOD od semena koja su razređivana razređivačima bez dodatih antioksidansa.

Dobijena prosečna vrednost GPx-a za kontrolnu grupu je statistički vrlo značajno niža od prosečne vrednosti za grupu bikova tretiranih Melofeed-om ($p=0,001$) i prosečne vrednosti za grupu bikova tretiranih Alcosel-om ($p=0,005$), a prosečne vrednosti za grupe tretirane Melofeed-om i Alcosel-om ne razlikuju se statistički značajno ($p=0,701$). Prosečne vrednosti GPx-a u okviru grupa ostvarene u sedam skokova se statistički vrlo značajno razlikuju ($F=8,252$; $p<0,001$) i rastu do 5. skoka gde postižu maksimalnu vrednost, a zatim opadaju što se može objasniti potrošnjom GPx na antioksidativne procese. Analizom pojedinačnih skokova dobijeno je da se grupe međusobno razlikuju po prosečnim vrednostima samo u prvih četiri skoka. Uz to, prosečne vrednosti GPx u prvih četiri skoka za kontrolnu grupu bikova su manje od prosečnih vrednosti za grupu bikova tretiranih Melofeed-om ($p_1=0,029$; $p_2=0,040$; $p_3=0,044$ i $p_4=0,025$) i manje u odnosu na prosečne vrednosti GPx za grupu bikova tretiranih Alcosel-om u prvom i četvrtom skoku ($p_1=0,025$ i $p_4=0,040$). I ovde se može zaključiti da usled toplotnog stresa dolazi do porasta koncentracije GPx u semenu u svim grupama što je u skladu sa istraživanjima Nichi i sar. (2006) koji su utvrdili visoku koncentraciju GPx u semenu bikova simentalske rase, što su bile značajno veće vrednosti nego u semenu nelore bikova. Pokazano je da je u semenu mlađih simentalskih bikova i kod karan fries bikova povećana aktivnost GPx tokom letnjeg perioda (Majić-Balić i sar. 2012; Soren i sar. 2016). Uz to, povećana aktivnost GPx tokom letnjih meseci je zabeležena i kod krava (Bernabucci i sar. 2002; Chandra i Aggarwal 2009; Lallawmkimi i sar. 2009). Nair i sar. (2006) su utvrdili negativnu korelaciju između GPx i lipidne peroksidacije, pa semena koja imaju veću koncentraciju GPx su manje podložna oksidativnom stresu i oštećenjima. S obzirom da je u našem radu utvrđeno da su prosečne vrednosti za GPx statistički značajno veće u prvih 4 skoka kod tretiranih grupa u odnosu na kontrolu, možemo zaključiti da su ispitivani dodaci ispoljili veći antioksidativni kapacitet u semenu.

Na osnovu rezultata diskriminacione analize posmatrane tri grupe bikova ne razlikuju se statistički značajno prema jedanaest pokazatelja metaboličkog profila posmatranih istovremeno na početku eksperimenta ($F=0,448$; $p<0,901$), u sredini eksperimenta ($F=0,673$; $p<0,759$) i na kraju eksperimenta ($F=1,177$; $p<0,491$). Posmatrane tri grupe bikova ne razlikuju se statistički značajno i prema svakom pokazatelju metaboličkog profila, posmatranom pojedinačno. Dobijeni rezultati nam ukazuju da je toplotni stres imao isti uticaj na biohemijske parametre i na aktivnost enzima grla u oglednim grupama i kontrolnoj grupi. Yadav i sar. (2016) su uočili značajne promene u biohemijskim parametrima i aktivnosti enzima kod vrindavani goveda tek na temperaturi od 40°C , gde je došlo do pada apetita kod goveda i smanjenog unosa kabastog dela hrane. Sa druge strane se u našem eksperimentu može zaključiti da dodatak antioksidanasa u hrani bikova iz oglednih grupa nije imao uticaj na metabolički profil bikova što je u saglasnosti sa nalazima Ganie i sar. (2012) kod junica bivolova. Međutim, uočene su razlike u prosečnim vrednostima parametara između tri merenja u okviru grupe. Razlika prosečnih vrednosti dobijenih u tri merenja statistički je značajna za fosfor i kortizol, a vrlo značajna za

albumin, kalcijum, ureu i trigliceride. Vrednosti albumina i kalcijuma vrlo značajno, a fosfora značajno su veće na početku eksperimenta u odnosu na vrednosti u sredini i na kraju eksperimenta. Za razliku od naših rezultata, značajan porast nivoa albumina u krvi je zabeležen kod krava (El-Masry and Marai, 1991) i teladi bivola (Koubkova i sar., 2002) izloženih toplotnom stresu. Ovaj nalaz je u saglasnosti sa mišljenjem da je albumin glavni ekstracelularni izvor tiola, koji imaju ulogu u neutralizaciji slobodnih radikala, što znači da albumin ima i antioksidativno dejstvo (Halliwell, 1998). Rasooli i sar. (2004) su zabeležili porast nivoa albumina u krvi junica holštajnfrizijske rase tokom leta u odnosu na zimu i sugerisali da razlog za tu pojavu može biti gubitak ekstracelularne tečnosti usled visoke spoljašnje temperature. Kod povišenih ambijentalnih temperatura dolazi do smanjivanja motiliteta rumena i creva, smanjuje se intenzitet preživanja i pasaža hrane kroz digestivni trakt što negativno utiče na resorpciju hranljivih materija i time se može objasniti niži nivo kalcijuma i fosfora u krvi. U toku našeg eksperimenta, prosečan nivo uree se statistički vrlo značajno povećavao, što je u skladu sa istraživanjima koja su sprovedena na kravama (Tahmasbi i sar., 2012; Khalifa i sar., 2016) i bivolima (Shinde i sar., 2008). Preživari izloženi toplotnom stresu prvenstveno koriste glukozu da bi smanjili toplotu koja nastaje kao posledica metaboličkih procesa (Baumgard i Rhoads, 2007). Potrošnja glukoze u ove svrhe dovodi do povećanog obima sinteze glukoze iz proteina, što znači da se povećava obim katabolizma proteina i time objašnjava povećana koncentracija uree u krvi. U našem radu pokazano je da je nivo triglicerida u sredini eksperimenta značajno veći u odnosu na početak i na kraj eksperimenta, što se poklapa sa istraživanjima Yadav i sar. (2016). Pretpostavljamo da sa povećanjem energetske potrebe organizma u cilju održavanja eutermije vodi povećanoj lipolizi i povećanju nivoa triglicerida. Na početku eksperimenta nivo kortizola je statistički značajno veći nego u sredini eksperimenta, što je u skladu sa istraživanjima Alavarez i Johnson (1973) i Ronchi i sar. (2001), koji su pokazali da nivo kortizola u krvi mlečnih krava opada nakon njihove aklimatizacije na toplotni stres. Collier i sar. (2005) su dokazali da akutni toplotni stres dovodi do značajnog povećanja kortizola u krvi, time se može objasniti povećan nivo kortizola na početku eksperimenta, gde nakon aklimatizacije bikova dolazi do pada njegove koncentracije u krvi.

Analiza parametara brzine dobijenih na CASA sistemu pokazuju da se tri grupe bikova ne razlikuju statistički značajno prema prosečnim vrednostima posmatranih parametara. Karaji i sar. (2013) su ispitivali efekat dodavanja GSH i SOD razređivaču za bikovsko seme na kvalitet semena bikova simentalske i holštajn-frizijske rase u uslovima toplotnog stresa i došli do zaključka da antioksidansi nisu imali efekta na parametre brzine kretanja spermatozoida, što je u skladu sa našim rezultatima. Kod nerastova izloženih toplotnom stresu takođe je uočeno da dodavanje antioksidanasa nije imalo uticaja na parametre brzine kretanja spermatozoida (Peña i sar., 2019). Međutim, dodavanje vitamina E i seleno u hrani holštajn-frizijskih bikova tokom vlažnog i toplog leta u Pakistanu je imalo pozitivan uticaj na ALH i STR (Butt i sar., 2019).

Analiza veze između SOD-a, GPx-a i procenta pokretljivih i progresivno pokretljivih spermatozoida kod svakog bika ukazuje da ne postoji statistički značajna povezanost.

Analiza veze između SOD-a, GPx-a i procenta ukupno pokretljivih i progresivno pokretljivih spermatozoida po grupama bikova i skokovima pokazuje da je za kontrolnu grupu bikova u šestom skoku, utvrđena negativna veza između GPx-a i procenta ukupno

pokretnih spermatozoida ($\rho \approx -1,000$; $p \approx 0,000$), kao i procenta progresivno pokretnih spermatozoida ($\rho \approx -1,000$; $p \approx 0,000$). Za grupu bikova tretiranih Melofeed-om utvrđena je negativna i vrlo jaka veza između SOD-a i procenta progresivno pokretnih spermatozoida ($\rho = -0,975$; $t = -7,550$; $p = 0,005$) u drugom skoku, kada je došlo do blagog porasta koncentracije SOD-a u semenu u odnosu na prvi skok, što je bilo nedovoljno da se ublaži negativan uticaj toplotnog stresa. U petom skoku iste grupe utvrđena je vrlo jaka i pozitivna veza ($\rho = 0,975$; $t = 3,576$; $p = 0,037$) između SOD i procenta progresivno pokretljivih spermatozoida, kao i između SOD i procenta ukupno pokretnih spermatozoida. U petom skoku su vrednosti SOD-a bile najveće pa je to očigledno imalo pozitivan uticaj na kvalitet semena ove grupe bikova. Lindemann i sar. (1988) i O'Flaherty i sar. (1997, 1999) su utvrdili pozitivan uticaj SOD-a na pokretljivost semena bivola nakon zamrzavanja-otapanja. Losano i sar. (2018) u svom radu dobijaju pozitivan efekat SOD na pokretljivost spermatozoida bikova. U Melofeed grupi utvrđena je negativna veza GPx-a sa procentom ukupno pokretnih spermatozoida u trećem skoku ($\rho \approx -1,000$; $p \approx 0,000$), a pozitivna veza u petom skoku ($\rho = 0,975$; $t = -7,550$; $p = 0,005$). Dok kod grupe bikova tretiranih Alcosel-om nije utvrđena statistički značajna povezanost između antioksidativnih enzima, procenta ukupno pokretnih i progresivno pokretnih spermatozoida.

Ako se posmatraju svi skokovi zajedno, dobijena je statistički značajna i negativna veza ($\rho = -0,383$; $t = -2,381$; $p = 0,023$) između SOD i procenta ukupno pokretnih spermatozoida samo u kontrolnoj grupi, dok za ostale grupe nema statistički značajne korelacije.

Iz svega ovoga se može zaključiti da porast koncentracije SOD-a i GPx-a po grupama bikova nije bio dovoljan (osim delimično u grupi bikova tretiranih Melofeed-om) da ublaži negativan uticaj toplotnog stresa na kvalitet semena. Asadpour i sar. (2012) su slično ovom istraživanju utvrdili da dodavanje antioksidativnih enzima SOD i GPx razređivačima za seme nije imalo uticaj na pokretljivost spermatozoida nakon zamrzavanja i otapanja. Rajoriya i sar. (2013) nisu našli značajnu povezanost između SOD-a i progresivne pokretljivosti spermatozoida nakon otapanja kod bikova rase tharparkar. Vince i sar (2018) su utvrdili veću aktivnost SOD-a u semenu mlađih bikova simentalske rase u odnosu na starije bikova tokom letnjeg perioda, ali to nije bilo dovoljno da se ublaže efekti oksidativnog stresa u letnjem periodu, što eventualno dovodi do smanjenja pokretljivosti spermatozoida. Suprotno ovim istraživanjima, Kadirve i sar. (2014) su utvrdili pozitivnu vezu između SOD-a, GPx-a, GSH-a i pokretljivosti spermatozoida bivola. Do sličnih rezultata su došli Nair i sar. (2006), koji su utvrdili pozitivnu vezu između SOD-a, GPx-a, G6PD-a i pokretljivosti spermatozoida bikova i bivola. Majić-Balić i sar. (2012) su u semenu mlađih bikova simentalske rase zabeležili povećanje aktivnosti GPx-a tokom leta.

Analizom udela ukupno pokretnih spermatozoida utvrđeno je da se grupe statistički značajno razlikuju i to da je udeo pokretnih spermatozoida značajno manja u kontrolnoj grupi u odnosu na grupu tretiranu Melofeed-om i Alcosel-om i to naročito u petom i šestom skoku, kada je efekat toplotnog stresa dugotrajan i intenzivan. Kod tretiranih grupa bikova udeo ukupno pokretnih spermatozoida je statistički značajno veća u petom i sedmom skoku u grupi bikova tretiranih Melofeed-om u odnosu na grupu bikova tretiranih Alcosel-om. Iz ovoga se može zaključiti da su antioksidansi u hrani imali pozitivan uticaj na ukupnu pokretljivost spermatozoida u tretiranim grupama i da je najbolji efekat postignut u grupi

bikova tretiranih Melofeed-om. Što se tiče udela progresivno pokretnih spermatozoida gore navedene grupe se vrlo značajno razlikuju takođe u petom i šestom skoku, s tim da je učešće progresivno pokretnih spermatozoida najmanje u kontrolnoj grupi bikova. Naša istraživanja su u skladu sa istraživanjima Losano i sar. (2018) i Karaji i sar.(2013), koji su došli do zaključka da dodavanje različitih koncentracija antioksidanasa razređivaču dovodi do povećanja ukupne i progresivne pokretljivosti semena bikova. Prema istraživanjima Petrujkica i sar. (2014) nerastovi koji su dobijali organski selen u ishrani su imali bolju ukupnu pokretljivost i progresivnu pokretljivost semena u odnosu na kontrolnu grupu. Peña i sar. (2019) nisu utvrdili pozitivan efekat dodavanja antioksidanasa u hrani nerastova na ukupnu i progresivnu pokretljivost spermatozoida.

Ispitivanjem uticaja THI na pokretljivost spermatozoida utvrđeno je da sa porastom THI opada procenat pokretnih i progresivno pokretnih spermatozoida, ali da to nije statistički značajno ($p > 0,05$). U skladu sa našim istraživanjem Brito i sar. (2003) su dokazali da ambijetalna temperatura i vlažnost nisu značajno uticali na kvalitet semena kod *Bos indicus* i *Bos taurus* bikova. Takođe, nije uočena statistički značajna povezanost THI sa pokretljivošću spermatozoida kod senepol i holštajn-frizijskih bikova (Salah i sar., 1992; Wildeus i Hammond, 1993). Međutim, Sharma i sar. (2017, 2018) su utvrdili da sa porastom THI dolazi do pada broja živih spermatozoida u ejakulatu bivola i bikova meleza. U eksperimentu na bikovima simentalske rase je dokazano da je THI u negativnoj korelaciji sa progresivnom pokretljivošću mladih bikova tj. da je najmanja progresivna pokretljivost spermatozoida bila tokom letnjeg perioda, kada je THI bio 65,39 (Majić-Balić i sar., 2012, Vince i sar., 2018). U tropskim i polutropskim predelima kvalitet semena je opadao tokom vrelih letnjih dana kod *B. taurus* i bikova meleza, dok kod *B. indicus* bikova toplotni stress nije imao uticaj na kvalitet semena (Fields i sar., 1979; Kumi-Diaka i sar., 1981). Razlozi za dobijanje drugačijih rezultata u gore navedenim istraživanjima mogu biti rasa, starost, ishrana, opšte stanje životinja, sposobnost na akomodaciju, visina temperature i vlažnost tokom eksperimenta, dužina trajanja toplotnog stresa.

Analizom veze između THI i antioksidativnih enzima, dobijeno je da porastom THI u kontrolnoj grupi dolazi do smanjenja SOD-a, dok u grupama tretiranim Melofeed-om i Alcosel-om dolazi do povećanja SOD-a, ali sve ovo nije statistički značajno. Za sve tri grupe bikova karakteristično je da se sa povećanjem THI povećava i vrednost GPx, ali to takođe nije statistički značajno.

Rezultati dvofaktorske kombinovane analize varijanse ukazuju da ne postoji statistički značajna razlika između grupa prema prosečnom učešću živih spermatozoida niti prema prosečnom procentu mrtvih spermatozoida. Efekat toplotnog stresa je bio jak i premašio je antioksidativni kapacitet bikova u sve tri grupe. Ni u istraživanjima Butt i sar. (2019) nije bilo efekta dodavanja selena i vitamina E u hrani holštajn-friziskih bikova tokom leta na citomorfološke karakteristike semena. Da je efekat toplotnog stresa jak i da ima veliki uticaj na citomorfološke osobine dokazali su Nichi i sar. (2006). U njihovim istraživanjima na bikovima simentalske rase dokazano je da je značajno veći procenat patoloških spermatozoida prisutan u ejakulatu tokom leta nego zimi. Do istih rezultata su došli i Residiwati i sar.(2020) koji su ispitali uticaj toplotnog stresa na kvalitet semena bikova rase belgijsko plavo i Laura Nataly Garcia-Oliveros i sar. (2020) koji su eksperiment vršili na nellore bikovima.

7. ZAKLJUČCI

Na osnovu dobijenih rezultata i podataka iz aktuelne literature, može se zaključiti sledeće:

1. Aktivnost antioksidativnih enzima u grupi bikova tretiranih Melofeed-om ($p < 0,001$) i grupi bikova tretiranih Alkoselom ($p < 0,001$) je značajno veća u odnosu na kontrolnu grupu, što nam ukazuje na veći antioksidativni kapacitet spermalne plazme tretiranih grupa.
2. Prosečne vrednosti za tri izvršena merenja razlikuju se značajno ili vrlo značajno u sve tri grupe za albumin ($p_K=0,004$, $p_M=0,020$, $p_A=0,002$), ureu ($p_K=0,021$, $p_M=0,007$, $p_A=0,001$) i trigliceride ($p_K=0,037$, $p_M=0,005$, $p_A=0,034$) što pokazuje da su bikovi u sve tri grupe imali isti način adaptacije na toplotni stres i da su bili u negativnom energetsom bilansu.
3. Dodavanje antioksidanasa nije imalo uticaja na parametre brzine i kretanja spermatozoida. Nije uočena statistički značajna razlika među grupama prema prosečnim vrednostima krivolinijske brzine ($p=0,812$) pravolinijske brzine ($p=0,327$) kao i prosečne brzine kretanja ($p=0,315$). Takođe, pokazano je da se grupe bikova se ne razlikuju značajno prema prosečnim vrednostima indeksa linearnosti ($p=0,273$), pravolinijskog indeksa ($p=0,697$) i indeksa oscilacije ($p=0,110$). U okviru grupa nije zabeležena značajna razlika u amplitudi lateralnog otklona pomeranja glave ($p=0,906$), frekvencije prelaska pravolinijske putanje ($p=0,965$), kao i u prosečnom manježnom kretanju ($p=0,808$).
4. Statistički značajna razlika u prosečnim vrednostima površine glave spermatozoida je utvrđena između kontrolne grupe i grupe tretirane Alkosel-om ($p=0,016$) dok za ostale ispitivane parametre brzine kretanja nije dokazana značajnost među grupama ($p > 0,05$).
5. Procenat pokretnih spermatozoida je značajno manji u kontrolnoj grupi u odnosu na grupu tretiranu Melofeed-om i Alkosel-om i to naročito u petom ($p < 0,001$) i šestom skoku ($p \leq 0,001$), kada je efekat toplotnog stresa dugotrajan i intenzivan što ukazuje na pozitivan efekat dodavanja antioksidanasa u grupama tretiranih bikova.

6. Procenat progresivno pokretljivih spermatozoida je takođe značajno niži u kontrolnoj grupi u odnosu na Melofeed grupu i to u prvom ($p=0,0101$), petom ($p=0,004$) i šestom skoku ($p<0,001$), dok je značajna razlika između kontrolne i Alkosel grupe zabeležena samo u šestom skoku ($p<0,001$). Dodavanje antioksidanasa imalo je pozitivan uticaj na progresivnu pokretljivost spermatozoida.
7. Nije uočena značajna povezanost ($p>0,05$) između THI i aktivnosti antioksidativnih enzima, kao ni povezanost između THI i broja pokretnih spermatozoida kod sve tri grupe bikova.
8. Značajna povezanost između SOD-a i procenta progresivno pokretnih spermatozoida je zabeležena u drugom skoku ($\rho=-0,975$; $p=0,005$) i petom skoku ($\rho=0,975$; $p=0,037$) u grupi tretiranoj Melofeed-om, dok u Alkosel grupi nisu uočene značajne promene. Povećanje SOD i GPx aktivnosti u tretiranim grupama nije bilo dovoljno da ublaži negativan uticaj toplotnog stresa na kvalitet semena.
9. Analizom citomorfoloških parametara utvrđena je statistička značajnost prema procentualnom učešću živih OA (oštećeni akrozom) spermatozoida ($p=0,005$) između grupe bikova tretiranih Alkosel-om u odnosu na kontrolnu i grupu tretiranu Melofeed-om, međutim nije uočena statistička značajnost prema procentu živih spermatozoida ($p=0,554$), kao i prema prosečnom učešću živih IA (intaktni akrozom) spermatozoida ($p=0,363$).
10. Ispitivane tri grupe bikova razlikuju se statistički značajno ($p=0,022$) prema prosečnom procentu mrtvih IA spermatozoida, dok za prosečan procenat mrtvih spermatozoida kao i prosečno učešće mrtvih OA spermatozoida nije utvrđena statistička značajnost među grupama ($p=0,290$; $p=0,909$).
11. Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da dodavanje antioksidanasa u hrani za priplodne bikove u uslovima toplotnog stresa dovodi do povećane aktivnosti antioksidativnih enzima u spermalnoj plazmi i posledično do smanjenja štetnih efekata koji prouzrokuju reaktivne kiseonične vrste (ROS).

8. LITERATURA

1. Agarwal A, Gupta S, Sharma RK, 2005a, Role of oxidative stress in female reproduction, *Reproductive Biology and Endocrinology*, 3, 28.
2. Agarwal A, Prabakaran, SA, Said TM, 2005b, Prevention of oxidative stress injury to sperm, *Journal of andrology*, 26(6), 654-60.
3. Agarwal A, Makker K, Sharma R, 2008, Clinical relevance of oxidative stress in male factor infertility: an update *American Journal of Reproductive Immunology*, 59(1), 2–11.
4. Agarwal A, Nallella KP, Allamaneni SSR, Said TM, 2004, Role of antioxidants in treatment of male infertility: an overview of the literature, *Reproductive BioMedicine Online*, 8(6), 616–27.
5. Agarwal A, Gupta S, Sikka S, 2006, The role of free radicals and antioxidants in reproduction, *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology*, 18, 325-32.
6. Agarwal A, Prabakaran SA, 2005, Mechanism, measurement, and prevention of oxidative stress in male reproductive physiology, *Indian Journal of Experimental Biology*, 43(11), 963–74.
7. Agarwal A, Saleh RA, Bedaiwy MA, 2003, Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction, *Fertility and Sterility*, 79(4), 829–43.
8. Agarwal A, Virk G, Ong C, du Plessis SS, 2014, Effect of oxidative stress on male reproduction, *World Journal of Men's Health*, 32, 1-17.
9. Aitken RJ, 2017, Reactive oxygen species as mediators of sperm capacitation and pathological damage, *Molecular Reproduction and Development*, 84, 1039–52.
10. Aitken RJ, Clarkson JS, Fishel S, 1989, Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation, and human sperm function, *Biology of Reproduction*, 41(1), 183–97.
11. Akbari Asbagh F, Mostafavi E, Hamdi K, Azmodeh O, Ghasemynejad A, Moshtaghi J, Salsabili N, Mashrabi O, 2010, Relation of serum and semen malondialdehyde and total anti-oxidants with sperm parameters in infertile men, *American Journal of Immunology*, 6(3), 43-9.

12. Alahmar AT, 2019, Role of oxidative stress in male infertility: An updated review, *Journal of human reproductive sciences*, 12(1), 4-18.
13. Alvarez MB, Johnson HD, 1973, Environmental heat exposure on cattle plasma catecholamine and glucocorticoids, *Journal of Dairy Science* 56, 189-94.
14. Alvarez, JG, Touchstone JC, Blasco L, Storey BT, 1987, Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa, *Journal of Andrology*, 8, 338-348.
15. Alvarez JG, Storey BT, 1984, Lipid peroxidation and the reactions of superoxide and hydrogen peroxide in mouse spermatozoa, *Biology of Reproduction*, 30, 833-41.
16. Alvarez JG, Storey BT, 1992, Evidence for increased lipid peroxidative damage and loss of superoxide dismutase activity as a mode of sublethal cryodamage to human sperm during cryopreservation, *Journal of Andrology*, 13(3), 232-41.
17. Amann RP, 1962, Reproductive capacity of dairy bulls.IV.Spermatogenesis and testicular germ cell degeneration, *American Journal of Anatomy* 110, 69-78.
18. Amann RP, Johnson L, Thompson DL Jr, Pickett BW, 1976, Daily spermatozoal production, epididymal spermatozoal reserves and transit time of spermatozoa through the epididymis of the rhesus monkey, *Biology of Reproduction*, 15, 586-92.
19. Amann RP, 1981, A critical review of methods for evaluation of spermatogenesis from seminal characteristics, *Journal of Andrology*, 2, 37-58.
20. Anawalt BD, 2013, Approach to male infertility and induction of spermatogenesis, *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 98(9), 3532-3542.
21. Andrabi S, 2009, Factors affecting the quality of cryopreserved buffalo (*Bubalus bubalis*) bull spermatozoa, *Reproduction in Domestic Animals*, 44(3), 552-69.
22. Asadpour R, Jafari R, Tayefi-Nasrabadi H, 2012, The effect of antioxidant supplementation in semen extenders on semen quality and lipid peroxidation of chilled bull spermatozoa, *Iranian Journal of Veterinary Research*, 13(3), 246-9.
23. Asadpour R, Tayefi-Nasrabadi H, 2012, Seasonal variation in antioxidant enzyme activity in seminal plasma in Holstein bulls, *Comparative Clinical Pathology*, 21(2), 173-6.
24. Attal J, Courot M, 1963, Testicular development and onset of spermatogenesis in bulls, *Annales de Biologie Animale, Biochimie, Biophysique*, 3, 219-41.

25. Auten, RL, Davis, JM, 2009, Oxygen toxicity and reactive oxygen species: the devil is in the details, *Pediatric research*, 66(2), 121-7.
26. Bansal AK, 2013, Manganese: a potent antioxidant in semen, *Iranian Journal of Applied Animal Science*, 3(2), 217-22.
27. Bansal AK, Bilaspuri GS, 2007, Effect of ferrous ascorbate on *in vitro* capacitation and acrosome reaction in cattle bull spermatozoa, *Animal Science Report*, 1(2), 69–77.
28. Bansal AK, Bilaspuri GS, 2008a, Effect of manganese on bovine sperm motility, viability, and lipid peroxidation *in vitro*, *Animal Reproduction CBRA*, 5(3), 90–6.
29. Bansal AK, Bilaspuri GS, 2008b, Oxidative stress alters membrane sulfhydryl status, lipid and phospholipid contents of crossbred cattle bull spermatozoa, *Animal Reproduction Science*, 104(2-4), 398–404.
30. Bansal AK, Bilaspuri GS, 2009, Antioxidant effect of vitamin E on motility, viability and lipid peroxidation of cattle spermatozoa under oxidative stress, *Animal Science Papers and Reports*, 27(1), 5–14.
31. Bansal AK, Bilaspuri GS, 2011, Impacts of oxidative stress and antioxidants on semen functions, *Veterinary medicine international*, 2011.
32. Baumgard LH, Rhoads RP, 2007, The effects of hyperthermia on nutrient partitioning. Proceedings Cornell Nutrition Conference For Feed Manufacturers, Ithaca, NY p. 93-104.
33. Beer-Ljubić B, Aladrović J, Marenjak TS, Laskaj R, Majić-Balić I, Milinković-Tur S, 2009, Cholesterol concentration in seminal plasma as predictive tool for quality semen evaluation, *Theriogenology*, 72, 1132– 40.
34. Bernabucci U, Ronchi B, Lacetera, N, Nardone A, 2002, Markers of oxidative status in plasma and erythrocytes of transition dairy cows during hot season, *Journal of Dairy Science* 85, 2173-9.
35. Berndston WE, Desjardins C, 1974, The cycle of the seminiferous epithelium and spermatogenesis in the bovine testis, *American Journal of Anatomy*, 140, 167–79.
36. Berndston WE, Igboeli G, Parker WG, 1987, The numbers of Sertoli cells in mature Holstein bulls and their relationship to quantitative aspects of spermatogenesis, *Biology of Reproduction*, 37, 60–7.

37. Bilaspuri GS, Bansal AK, 2008, Mn^{2+} : a potent antioxidant and stimulator of sperm capacitation and acrosome reaction in crossbred cattle bulls, *Archiv fur Tierzucht*, 51(2), 149–56.
38. Bilodeau JF, Chatterjee S, Sirard MA, Gagnon C, 2000, Levels of antioxidant defenses are decreased in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing, *Molecul Reproduction Development*, 55, 282-8.
39. Bilodeau JF, Blanchette S, Gagnon C, Sirard MA, 2001, Thiols prevent H_2O_2 -mediated loss of sperm motility in cryopreserved bull semen, *Theriogenology*, 56(2), 275–86.
40. Boitani C, Puglisi R, 2009, Selenium, a key element in spermatogenesis and male fertility, In *Molecular Mechanisms in Spermatogenesis* (ed. Springer), New York, NY. p. 65-73.
41. Brennan KM, Pierce JL, Cantor AH, Pescatore AJ, Xiao R, Power RF, 2012, Source of selenium supplementation influences testis selenium content and gene expression profiles in Single Comb White Leghorn roosters, *Biological Trace Element Research*, 145, 330-7.
42. Brito LFC, Silva A, Rodrigues EDF, Vieira LH, Vderagon F, Kastelic LAG, 2002, Effect of environmental factors, age and genotype on sperm production and semen quality in *Bos indicus* and *Bos taurus* AI bulls, *Brazil. Animal Reproduction Science*, 70, 181–90.
43. Brouwers JF, Gadella BM, 2003, In situ detection and localization of lipid peroxidation in individual bovine sperm cells, *Free Radical Biology and Medicine*, 35, 1382–91.
44. Bucak MN, Ateşşahin A, Varisli O, Yüce A, Tekin N, Akşay A, 2007, The influence of trehalose, taurine, cysteamine and hyaluronan on ram semen. Microscopic and oxidative stress parameters after freeze-thawing process, *Theriogenology*, 67(5), 1060–7.
45. Bucak MN, Ateşşahin A, Yüce A, 2008, Effect of antioxidants and oxidative stress parameters on ram semen after the freeze-thawing process, *Small Ruminant Research*, 75(2-3), 128–34.
46. Bucak MN, Sariözkan S, Tuncer PB, Sakin F, Ateşşahin A, Kulaksız R, Çevik M, 2010, The effect of antioxidants on post-thawed Angora goat (*Capra hircus ancyrensis*) sperm parameters, lipid peroxidation and antioxidant activities, *Small Ruminant Research*, 89(1), 24–30.

47. Bucak MN, Tuncer PB, Sariözkan S, Ulutas PA, 2009, Comparison of the effects of glutamine and an amino acid solution on post-thawed ram sperm parameters, lipidperoxidation and anti-oxidant activities, *Small Ruminant Research*, 81(1), 13–7.
48. Buckland RB, 1971, The activity of six enzymes of chicken seminal plasma and sperm: 1. Effect of in vitro storage and full sib families on enzyme activity and fertility, *Poultry Science*, 50(6), 1724–34.
49. Butt MA, Shahid MQ, Bhatti JA, Khalique A 2019, Effect of dietary vitamin E and selenium supplementation on physiological response and reproductive performance in Holstein Friesian bulls during humid hot summer, *Pakistan Veterinary Journal*, 39(4), 593-7.
50. Cassani P, Beconi MT, O’Flaherty C, 2005, Relationship between total superoxide dismutase activity with lipid peroxidation, dynamics and morphological parameters in canine semen, *Animal Reproduction Science*, 86, 163-73.
51. Chandra G, Aggarwal A, 2009, Effect of DL- α -Tocopherol acetate on calving induced oxidative stress in periparturient crossbred cows during summer and winter seasons, *Indian Journal of Animal Nutrition*, 26, 204-10.
52. Chatterjee S, De Lamirande E, Gagnon C, 2001, Cryopreservation alters membrane sulfhydryl status of bull spermatozoa: protection by oxidized glutathione, *Molecular Reproduction and Development*, 60(4), 498–506.
53. Cocchia N, Pasolini MP, Mancini R, Petrazzuolo O, Cristofaro I, Rosapane I, Sica A, Tortora G, Lorzio R, Paraggio G, Mancini A, 2011, Effect of sod (superoxide dismutase) protein supplementation in semen extenders on motility, viability, acrosome status and ERK (extracellular signal-regulated kinase) protein phosphorylation of chilled stallion spermatozoa, *Theriogenology*, 75(7), 1201–10.
54. Collier RJ, Baumgard LH, Lock AL, Bauman DE, 2005, Physiological limitations, nutrient partitioning. In Yield of farmed species. Constraints and opportunities in the 21st Century (ed. R Sylvester-Bradley and J Wiseman), Nottingham University Press, Nottingham, UK, p. 351–377.
55. Comizzoli P, Wildt DE, 2014, Mammalian fertility preservation through cryobiology: value of classical comparative studies and the need for new preservation options, *Reproduction, Fertility and Development*, 26(1), 91-98.
56. Curtis SK, Amann MA, 1981, Testicular development and establishment of spermatogenesis in Holstein bulls, *Journal of Animal Science*, 53, 1645–57.

57. Dandekar SP, Nadkarni GD, Kulkarni VS, Punekar S, 2002, Lipid peroxidation and antioxidant enzymes in male infertility, *Journal of Postgraduate Medicine*, 48(3), 186–9.
58. De Lamirande E, Lamothe G, 2009, Reactive oxygen-induced reactive oxygen formation during human sperm capacitation. *Free Radical Biology and Medicine*, 46(4), 502–10.
59. Desai NR, Mahfouz R, Sharma R, Gupta S, Agarwal A 2010, Reactive oxygen species levels are independent of sperm concentration, motility, and abstinence in a normal, healthy, proven fertile man: a longitudinal study, *Fertility and Sterility*, 94(4), 1541–3.
60. Desai NR, Sharma R, Maker K, Sabnegh E, Agarwal A, 2009, Physiological and pathological levels of reactive oxygen species in neat semen of infertile men, *Fertility and Sterility*, 92, 1626-31.
61. Donà G, Fiore C, Tibaldi E, Frezzato F, Andrisani A, Ambrosini G, Fiorentin D, Armanini D, Bordin L, Clari G, 2011, Endogenous reactive oxygen species content and modulation of tyrosine phosphorylation during sperm capacitation, *International journal of andrology*, 34(5 Pt 1), 411–9.
62. dos Santos Hamilton TR, de Castro LS, de Carvalho Delgado J, de Assis PM, Siqueira AFP, Mendes CM, Goissis MD, Muiño-Blanco T, Cebrián-Pérez JA, Nichi M, Visintin JA, D'Ávila Assumpção MEO, 2016, Induced lipid peroxidation in ram sperm: semen profile, DNA fragmentation and antioxidant status, *Reproduction*, 151(4), 379-90.
63. Du Plessis SS, Makker K, Desai NR, Agarwal A, 2008, Impact of oxidative stress on IVF, *Expert Review of Obstetrics and Gynecology*, 3(4), 539–54.
64. Dumollard R, Carroll J, Duchen MR, Campbell K, Swann K, 2009, Mitochondrial function and redox state in mammalian embryos. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 20, 346-53.
65. Dym M, Fawcett DW, 1970, The blood-testis barrier in the rat and the physiological compartmentation of the seminiferous epithelium, *Biology of Reproduction*, 3, 308–26.
66. El-Masry KA, Marai IFM, 1991, Comparison between Friesians and water buffaloes in growth rate, milk production and some blood constituents, during winter and summer conditions of Egypt, *Animal Science*, 53(1), 39-43.
67. El- Sharawy M, Eid E, Darwish S, Abdel- Razek I, Islam MR. Kubota, K, Yamauchi N, El- Shamaa I, 2017, Effect of organic and inorganic selenium supplementation on

- semen quality and blood enzymes in buffalo bulls. *Animal Science Journal*, 88(7), 999-1005.
68. El-Sisy GA, El-Nattat WS, El-Sheshtawy RI, 2008, Effect of superoxide dismutase and catalase on viability of cryopreserved buffalo spermatozoa, *Global Veterinaria*, 2(2), 61–5.
 69. Fields MJ, Burns WC, Warnick AC, 1979, Age, season and breed effects on testicular volume and semen traits in young beef bulls, *Journal of Animal Science*, 48, 1299-304.
 70. Ford WC, 2001, Reactive oxygen species and sperm, *Human Fertility*, 4, 77–8.
 71. Fujii J, Iuchi Y, Matsuki S, Ishii T, 2003, Cooperative function of antioxidant and redox systems against oxidative stress in male reproductive tissues, *Asian Journal of Andrology*, 5, 231–42.
 72. Gadea J, Sellés E, Marco MA, Coy P, Matás C, Romar R, Ruiz S, 2004, Decrease in glutathione content in boar sperm after cryopreservation. Effect of the addition of reduced glutathione to the freezing and thawing extenders, *Theriogenology*, 62, 690–701.
 73. Ganie AA, Baghel RPS, Mudgal V, Sheikh GG 2012, Effect of selenium supplementation on blood metabolic profile of buffalo heifers, *Indian Journal of Animal Research*, 46(4), 407-9.
 74. Garrido N, Meseguer M, Simon C, Pellicer A, Remohi, J, 2004, Proxidative and antioxidative imbalance in human semen and its relation with male infertility, *Asian Journal of Andrology*, 6, 1, 59–65.
 75. Garcia-Oliveros LN, de Arruda RP, Batissaco L, Gonzaga, VHG, Nogueira VJM, Florez-Rodriguez SA, Almeida FS, Alves MBR, Pinto SCC, Nichi M, Losano JDA, Kawai GKV, Celeghini ECC, 2020, Heat stress effects on bovine sperm cells: a chronological approach to early findings, *International Journal of Biometeorology*, 64(8), 1367-78.
 76. Gavella M, Lipovac V, Vučilić M, Ročić B, 1996, Relationship of sperm superoxide dismutase-like activity with other spermspecific enzymes and experimentally induced lipid peroxidation in infertile men, *Andrologia*, 28(4), 223–9.
 77. Gilmont DL, Senger PL, Sylvester SR, Griswold MD, 1990, Seminal transferring and spermatogenic capability in the bull, *Biology of Reproduction*, 43, 151–7.
 78. Guérin P, El Mouatassim S, Ménézo Y, 2001, Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings, *Human Reproduction Update*, 7(2), 175–89.

79. Gündoğan M, 2006, Some reproductive parameters and seminal plasma constituents in relation to season in Akkaraman and Awassi rams, *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 30(1), 95–100.
80. Halliwell B, 1998, Albumin-an excellent extra cellular antioxidant, *Biochemical pharmacology* 37, 569-71.
81. Hendin BN, Kolettis PN, Sharma RK, Thomas AJ, Agarwal A, 1999, Varicocele is associated with elevated spermatozoa reactive oxygen species production and diminished seminal plasma antioxidant capacity, *Journal of Urology*, 161(6), 1831–4.
82. Hochereau-de Reviers MT, 1970, Etude des divisions spermatogoniales et du renouvellement de la spermatogonie souche chez le taureau, PhD thesis, Paris University of Sciences, France.
83. Hochereau-de Reviers MT, 1971, Etude cinétique des spermatogonies chez les mammifères. In La cinétique de prolifération cellulaire. INSERM symposium series seminar, 18, 189–216.
84. Holland MK, Storey BT, 1981, Oxygen metabolism of mammalian spermatozoa, generation of hydrogen peroxide by rabbit epididymal spermatozoa, *Biochemical Journal*, 198, 273-80.
85. Ing NH, Curley KO Jr, Welsh TH Jr, Johnson L, Staub C, 2018, Anatomy and physiology of the male reproductive system and potential targets of toxicants, In *Comprehensive toxicology*, volume 4, 3rd edition (ed. CA McQueen), Elsevier Ltd, Oxford, UK, p. 2–63.
86. Jayaganthan P, Perumal P, Balamurugan TC, Verma RP, Singh LP, Pattanaik AK, Kataria M, 2013, Effects of *Tinospora cordifolia* supplementation on semen quality and hormonal profile of ram, *Animal Reproduction Science*, 140, 1, 47–53.
87. Jalmeria NS, Panth S, Pandita S, Roy AK, Ashutosh M, Mohanty TK, Bhakat M, Punetha M, Gupta D, 2018, Seasonal variations in hormones and enzymes of seminal plasma and its relationship with semen quality in crossbred cattle bulls, *Biological Rhythm Research*, PP. 1- 11.
88. Jimenez C, Lefrancois AM, Ghyselinck NB, Dufaure JP, 1992, Characterization and hormonal regulation of 24 kDa protein synthesis by the adult murine epididymis, *Journal of Endocrinology*, 133, 197-203.

89. Johnson L, Petty CS, Neaves WB, 1981, A new approach to quantification of spermatogenesis and its application to germinal cell attrition during human spermatogenesis, *Biologie of Reproduction*, 25, 217–26.
90. Johnson L, 1985, Increased daily sperm production in the breeding season of stallions is explained by an elevated population of spermatogonia, *Biology of Reproduction*, 32, 1181–90.
91. Johnson L, 1986, Review article: Spermatogenesis and aging in human, *Journal of Andrology* 7, 331–54.
92. Jutte NHPM, Grootegoed JA, Rommerts FFG, van der Molen HJ, 1983, FSH stimulation of the production of pyruvate and lactate by Sertoli cells may be involved in the regulation of spermatogenesis, *Journal of Reproduction and Fertility*, 68, 219–26.
93. Jutte NHPM, Jansen R, Grootegoed JA, Rommerts FFG, Clausen OPF, van der Molen HJ, 1982, Regulation of survival of rat pachytene spermatocytes by lactate supply from Sertoli cells, *Journal of Reproduction and Fertility*, 65, 431–8.
94. Kadirve G, Kumar S, Ghosh SK, Perumal P, 2014, Activity of antioxidative enzymes in fresh and frozen thawed buffalo (*Bubalus bubalis*) spermatozoa in relation to lipid peroxidation and semen quality, *Asian Pacific Journal of Reproduction*, 3(3), 210-7.
95. Kanter M, Aktas C, Erboga, M, 2013, Heat stress decreases testicular germ cell proliferation and increases apoptosis in short term: an immunohistochemical and ultrastructural study, *Toxicology and Industrial Health*, 29(2), 99-113.
96. Karaji OR, Kia HD, Ashrafi I 2013, Effects of in combination antioxidant supplementation on microscopic and oxidative parameters of freeze-thaw bull sperm, *Cell Tissue Bank*, DOI 10.1007/s10561-0139412-y.
97. Kaur P, Bansal, MP, 2005, Effect of selenium-induced oxidative stress on the cell kinetics in testis and reproductive ability of male mice, *Nutrition*, 21, 351–7.
98. Kefer JC, Agarwal A, Sabanegh E, 2009, Role of antioxidants in the treatment of male infertility, *International Journal of Urology*, 16, 5, 449–57.
99. Kehr S, Malinouski M, Finney L, Vogt S, Labunskyy VM, Kasaikina MV, Carlson BA, Zhou Y, Hatfield DL, Gladyshev VN, 2009, X-ray fluorescence microscopy reveals the role of selenium in spermatogenesis, *Journal of Molecular Biology*, 389, 808-18.
100. Kohrle J, Jakob F, Contempéré B, Dumont JE, 2005, Selenium, the thyroid, and the endocrine system, *Endocrine reviews*, 26(7), 944-984.

101. Koubkova M, Knizkova L, Kunc P, Hartlova H, Flusser J, Dolezal O, 2002, Influence of high environmental temperatures and evaporative cooling on some physiological, hematological and biochemical parameters in high-yielding dairy cows. *Czech Journal of Animal Science*, 47(8), 309-18.
102. Koppers AJ, De Iuliis GN, Finnie JM, McLaughlin EA, Aitken RJ, 2008, Significance of mitochondrial reactive oxygen species in the generation of oxidative stress in spermatozoa, *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 93(8), 3199-207.
103. Kramer MF, 1960, Spermatogenesis bij de stier, Thesis, Rijkuniversiteit, Utrecht, the Netherlands
104. Kryukov GV, Castellano S, Novoselov SV, Lobanov AV, Zehtab AV, Guigó R, Gladyshev VN, 2003, Characterization of mammalian selenoproteomes, *Science*, 300, 1439-43.
105. Kumar R, Jagan Mohanarao G, Arvind A, Atreja SK, 2011, Freeze-thaw induced genotoxicity in buffalo (*Bubalus bubalis*) spermatozoa in relation to total antioxidant status, *Molecular Biology Reports* 38(3), 1499-506.
106. Kumi-Diaka J, Nagaratnam V, Rwuaan JS, 1981, Seasonal and age-related changes in semen quality and testicular morphology of bulls in a tropical environment, *Veterinary Record*, 108, 13-5.
107. Lallawmkimi CM, 2009, Impact of thermal stress and vitamin-E supplementation on Heat shock protein 72 and antioxidant enzymes in Murrah buffaloes, Ph.D. Thesis submitted to NDRI deemed University, Karnal (Haryana), India.
108. Lejeune H, Jégou B, Carreau S, Saez JM, 1996, Régulation paracrine et autocrine des fonctions testiculaires, In *Endocrinologie masculine* (ed. MA Drosdowsky, J Belaisch and A Vermeulen), Doin Editeurs, Paris, France, p.75-101.
109. Lindemann CB, O'Brien JA, Giblin FJ, 1988, An investigation of effectiveness of certain antioxidants in preserving motility of reactivated bull sperm models, *Biology of reproduction*, 38(1), 114-20.
110. Losano JDA, Angrimani DSR, Rui BR, Bicudo LC, Dalmazzo A, Silva BCS, Viana CHC, Mendes CM, Assumpção MEOA, Barnabe VH, Nichi M, 2018, The addition of docosahexaenoic acid (DHA) and antioxidants (glutathione peroxidase and superoxide dismutase) in extenders to epididymal sperm cryopreservation in bulls, *Cambridge University Press*, 1-8.

111. Mauduit C, Benahmed M, 1996, Growth factors in the testis development and function. In Male gametes production and quality (ed. S Hamamah and R Mieuxset), 3–45, Les Editions INSERM, Paris, France.
112. Magnes LJ, Li TK, 1980, Isolation and properties of superoxide dismutase from bovine spermatozoa, *Biology of Reproduction*, 22, 965–9.
113. Majić-Balić I, Milinković-Tur S, Samardžija M, Vince S, 2012, Effect of age and environmental factors on semen quality, glutathione peroxidase activity and oxidative parameters in Simmental bulls. *Theriogenology*, 78, 423–31.
114. Makker K, Agarwal A, Sharma R, 2009, Oxidative stress and male infertility, *Indian Journal of Medical Research*, 129, 357– 67.
115. Marin-Guzman J, Mahan DC, Whitmoyer R, 2000, Effect of dietary selenium and vitamin E on the ultrastructure and ATP concentration of boar spermatozoa, and the efficacy of added sodium selenite in extended semen on sperm motility, *Journal of Animal Science*, 78, 1544–50.
116. Martinez P, Proverbio F, Camejo M I, 2007, Sperm lipid peroxidation and pro-inflammatory cytokines, *Asian Journal of Andrology*, 9,102–7.
117. Moore AI, Squires EL, Graham JK, 2005, Adding cholesterol to the stallion sperm plasmamembrane improves cryosurvival, *Cryobiology*, 51(3), 241–9.
118. Nair JS, Brar AS, Ahuja CC, Sangha SPS, Chaudhary KC, 2006, A comoparative study on lipid peroxidation, activities of antioxidant enzymes and viability of cattle and buffalo bull spermatozoa during storage at refrigeration temperature, *Animal Reproduction Science*, 96, 21-9.
119. Nichi M, Bols PE, Züge RM, Barnabe VH, Goovaerts IG, Barnabe RC, Cortada CNM, 2006, Seasonal variation in semen quality in *Bos indicus* and *Bos taurus* bulls raised under tropical conditions, *Theriogenology*, 66, 822– 8.
120. Nirupama M, Devaki M, Nirupama R, Yajurvedi HN, 2013, Chronic intermittent stress-induced alterations in the spermatogenesis and antioxidant status of the testis are irreversible in albino rat, *Journal of Physiology and Biochemistry*, 69, 59-68.
121. O'Donnell L, Nicholls PK, O'Bryan MK, McLachlan RI, Stanton, PG, 2011, Spermiation: the process of sperm release. *Spermatogenesis*, 1(1), 14-35.
122. O'Flaherty CM 2014, The enzymatic antioxidant system of human spermatozoa, *Advances in Andrology*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/626374>

123. O'Flaherty CM, Beconi MT, Beorlegui NB 1997, Effect of natural antioxidants superoxide dismutase and hydrogen peroxide on capacitation of frozen-thawed bull spermatozoa, *Andrologia*, 29, 269-75.
124. O'Flaherty CM, Beorlegui N, Beconi M 1999, Reactive oxygen species requirements for bovine sperm capacitation and acrosome reaction, *Theriogenology*, 52, 289–301.
125. Karaji RO, Kia HD, Ashrafi I, 2013, Effects of in combination antioxidant supplementation on microscopic and oxidative parameters of freeze-thaw bull sperm, *Cell and tissue banking*, 15(3), 461-470.
126. Khalifa HH, Safwat MA, El-Sysy MAI, Abd ElFatah M, Al-Metwaly MAE, 2016, Effect of selenium and vitamin E supplementation as a nutritional treatment for some physiological and productive traits of Holstein dairy cows under Egyptian summer conditions, *Journal of Egyptian Academic Society for Environmental Development. D, Environmental Studies*, 17(1), 97-113.
127. Kibler HH, 1964, Environmental physiology and shelter engineering. LXVII. Thermal effects of various temperature-humidity combinations on Holstein cattle as measured by eight physiological responses, *Research bulletin University of Missouri. Agricultural Experiment Station*, 862.
128. Ortavant R, 1959, Spermatogenesis and morphology of the spermatozoon. In *Reproduction in domestic animals. volume 2* (ed. HH Cole and PE Cupps), Academic Press, New York, USA, p. 1–50.
129. Parrish, JJ, Susko-Parrish J L, Winer MA, First NL, 1988, Capacitation of bovine sperm by heparin, *Biology of Reproduction*, 38, 1171–80.
130. Partyka A, Łukaszewicz E, Nizański W, 2012, Effect of cryopreservation on sperm parameters, lipid peroxidation and antioxidant enzymes activity in fowl semen, *Theriogenology*, 77(8), 1497-504.
131. Patel HA, Siddiquee GM, Chaudhari DV, Suthar VS, 2016, Effect of different antioxidant additives in semen diluent on cryopreservability (–196°C) of buffalo semen, *Veterinary world*, 9(3), 299.
132. Peña ST, Jr., Gummow B, Parker AJ, Paris DBBP 2019, Antioxidant supplementation mitigates DNA damage in boar (*Sus scrofa domesticus*) spermatozoa induced by tropical summer, *PLoS ONE*, 14(4), e0216143.
133. Perumual P, 2014, Effect of Superoxide Dismutase on Semen Parameters and Antioxidant Enzyme Activities of Liquid Stored (5⁰C) Mithun (*Bos frontalis*) Semen, *Journal of Animals* 2014.

134. Perumal P, Chamuah JK, Rajkhowa(1) C 2013a, Effect of catalase on the liquid storage of mithun (*Bos frontalis*) semen, *Asian Pacific Journal of Reproduction*, 2(3), 209–14.
135. Perumal P, Vupru K, Rajkhowa C (2) 2013b, Effect of addition of taurine on the liquid storage (5 °C) of mithun (*Bos frontalis*) semen, *Veterinary Medicine International*, 2013.
136. Petrujkić BT, Šefer DS, Jovanović IB Jovičin M, Janković S, Jakovljević G, Beier RC, Anderson RC, 2014, Effects of commercial selenium products on glutathione peroxidase activity and semen quality in stud boars, *Animal Feed Science and Technology* 197, 194-205.
137. Pineda MH 2003, Male reproductive system. In: Pineda MH, Dooley MP, editors., McDonalds veterinary endocrinology and reproduction, Iowa: Iowa State Press, USA, p. 239–82.
138. Połatajko A, Banaś B, Encinar JR, Szpunar J, 2005, Investigation of the recovery of selenomethionine from selenized yeast by two-dimensional LC-ICP MS, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 381, 844–9.
139. Rahal A, Kumar A, Singh V, Yadav B, Tiwari R, Chakraborty S, Dhama K 2014, Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: the interplay. *BioMed Research International*, 2014.
140. Rajoriya JS, Prasad JK, Ghosh SK, Perumal P, Kumar A, Kaushal S, Singh M, 2013, Effects of season changes and cholesterol efflux in relation to freezability in Tharpakar bull semen, *Asian Pacific Journal of Reproduction*, 2, 280-8.
141. Rao M, Zhao XL, Yang J, Hu SF, Lei H, Xia W, Zhu CH, 2015, Effect of transient scrotal hyperthermia on sperm parameters, seminal plasma biochemical markers, and oxidative stress in men, *Asian journal of andrology*, 17(4), 668.
142. Rasooli A, Nouri M, Khadjeh GH, Rasekh A, 2004, The influences of seasonal variations on thyroid activity and some biochemical parameters of cattle. *Iranian Journal Veterinary Research, University of Shiraz* 5(2), 1383.
143. Rayman MP, 2012, Selenium and human health. *The Lancet*, 379, 1256–68.
144. Reddy NSS, Mohanarao GJ, Atreja SK 2010, Effects of adding taurine and trehalose to a tris-based egg yolk extender on buffalo (*Bubalua bubalis*) sperm quality following cryopreservation, *Animal Reproduction Science*, 119, 183-90.
145. Rejraji H, Drevet JR, 2004, Secretions apocrines dans le tractus genital male, roles potentiels dans la maturation des gametes, *Andrologie*, 1, 22-33.

146. Rejraji H, Vernet P, Drevet JR, 2002, GPX5 is present in the mouse caput and cauda epididymidis lumen at three different locations, *Molecular Reproductive Development*, 63, 96-103.
147. Residiwati G, Tuska HAS, Budiono, Kawai GKV, Jamadi AS, Santoro D, Leemans B, Boccart C, Pascottini OB, Opsomer G, Soom AN 2020, Practical methods to assess the effects of heat stress on the quality of frozen-thawed Belgian Blue semen in field conditions, *Animal Reproduction Science*, 221, 106572.
148. Rhee SG, 2006, H₂O₂, a necessary evil for cell signaling, *Science*, 312, 5782, 1882–3.
149. Ritzèn EM, Boitani C, Parvinen M, French FC, Feldman M, 1982, Stage-dependent secretion of ABP by rat seminiferous tubules, *Molecular and Cellular Endocrinology*, 25, 25–33.
150. Rivlin J, Mendel J, Rubinstein S, Ektovitz N, Breitbart H, 2004, Role of hydrogen peroxide in sperm capacitation and acrosome reaction, *Biology of Reproduction*, 70, 518–22.
151. Roeckel-Drevet P, Gagne G, Tourvieille de Labrouhe D, Dufaure JP, Nicolas P, Drevet JR, 1998, Molecular characterization, organ distribution and stress-mediated induction of two glutathione peroxidase-encoding mRNAs in sunflower, *Helianthus annuus*, *Physiologia Plantarum*, 103, 385-94.
152. Ronchi B, Stradaoli G, Verini Supplizi A, Bernabucci U, Lacetera N, Accorsi PA, Nardone A, Seren E, 2001, Influence of heat stress or feed restriction on plasma progesterone, oestradiol-17, LH, FSH, prolactin and cortisol in Holstein heifers, *Livestock Production Science*, 68 (2-3), 231-41.
153. Russell LD, Griswold MD 1993, The Sertoli cell, Cache River Press, St Louis, MO, USA.
154. Sakkas D, Urner F, Bizzaro D, Manicardi G, Bianchi PG, Shoukir Y, Campana A, 1998, Sperm nuclear DNA damage and altered chromatin structure: effect on fertilization and embryo development, *Human Reproduction*, 13(4), 11–9.
155. Salah MS, El-Nouty FD, Al-Hajri MR, Mogawer HH, 1992, Effect of season on seminal characteristics of Holstein bull under semi-arid environment. Biophysical characteristics, *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 5(3), 439-47.
156. Saleh RA, Agarwal A, 2002, Oxidative stress and male infertility: from research bench to clinical practice, *Journal of Andrology*, 23, 737–52.
157. Sanocka D, Kurpisz M, 2004, Reactive oxygen species and sperm cells, *Reproductive Biology and Endocrinology*, 2, 12–26.

158. Sariözkan S, Bucak MN, Tuncer PB, Ulutas PA, Bilgen A, 2009a, The influence of cysteine and taurine on microscopicoxidative stress parameters and fertilizing ability of bull semen following cryopreservation, *Cryobiology*, 58(2), 134–8.
159. Sariözkan S, Tuncer PB, Bucak MN, Ulutaş PA, 2009b, Influence of various antioxidants on microscopic-oxidative stress indicators and fertilizing ability of frozen-thawed bull semen, *Acta Veterinaria Brno*, 78, 463-9.
160. Sariözkan S, Türk G, Cantürk F, Yay A, Eken A, Akşay A 2013, The effect of bovine serum albumin and fetal calf serum on spermquality,DNAfragmentation and lipid peroxidation of theliquid stored rabbit semen, *Cryobiology*, 67(1), 1–6.
161. Schwaab V, Lareyre JJ, Vernet P, Pons E, Faure J, Dufaure JP, Drevet JR, 1998, Characterization, regulation of the expression and putative roles of two glutathione peroxidase proteins found in the mouse epididymis, *Journal of reproduction and fertility. Supplement*, 53, 157-62.
162. Setchell BP 1970, Testicular blood supply, lymphatic drainage, and secretion fluid in the testis, Development, anatomy, and physiology, (ed. AD Johnson,WR Gomesand NLVandemark), AcademicPress, New York, USA, p. 101–239,
163. Sharlip ID, Jarow JP, Belker AM, Lipshultz LI, Sigman M, Thomas AJ, Schlegel PN, Howards SS, Nehra A, Damewood MD, Overstreet JW, Sadovsky R, 2002, Best practice policies for male infertility, *Fertility and Sterility*, 77(5), 873–82.
164. Sharma M, Bhat Y, Sharma N, Singh A 2018, Comparative study of seasonal variation in semen characteristics of buffalo bull, *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 6, 1, 947-51.
165. Sharma M, Bhat Y, Singh A, Sharma N, Rawat S, 2017, Effect of temperature humidity index on semen quality of bovine bull, *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 6(12), 1822-30.
166. Shinde PL, Dass RS, Garg AK, Bhadane KP, 2008, Effect of vitamin E and selenium supplementation on growth, nutrient utilization and their balance in male buffalo calves, *Animal Nutrition and Feed Technology*, 8(2), 157-65.
167. Shoaie A, Zamiri MJ, 2008, Effect of butylated hydroxytoluene on bull spermatozoa frozen in egg yolk-citrate extender, *Animal Reproduction Science*, 104(2–4), 414–8.
168. Sikka SC, 2001, Relative impact of oxidative stress on male reproductive function, *Current Medicinal Chemistry*, 8(7) 851–62.

169. Sikka SC, Rajasekaran M, Hellstrom WJG 1995, Role of oxidative stress and antioxidants in male infertility, *Journal of Andrology*, 16(6), 464–8.
170. Silva SV, Soares AT, Batista AM, Almeida FC, Nunes JF, Peixoto CA, Guerra MMP, 2011, In vitro and in vivo evaluation of ram sperm frozen in tris egg- yolk and supplemented with superoxide dismutase and reduced glutathione, *Reproduction in domestic animals*, 46(5), 874-81.
171. Singer G, Granger DN, 2007, Inflammatory responses underlying the microvascular dysfunction associated with obesity and insulin resistance, *Microcirculation*, 14, 375–87.
172. Soren S, Singh SV, Singh P, 2016, Influence of season on seminal antioxidant enzymes in Karan Fries bulls under tropical climatic conditions, *Turkish Journal of Veterinary and Animal Science*, 40, 797-802.
173. Srivastava N, Srivastava SK, Ghosh SK, Kumar A, Perumal P, Jerome A, 2013, Acrosome membrane integrity and cryocapacitation are related to cholesterol content of bull spermatozoa, *Asian Pacific Journal of Reproduction*, 2(2), 126–31.
174. Staub C, Johnson L, 2018, Review: Spermatogenesis in the bull, *Animal*, 1-9.
175. Stradaoli G, Sylla L, Monaci M, Maiorino M, 2009, Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in bull spermatozoa provides a unique marker in the quest for semen quality analysis, *Theriogenology*, 72, 91– 8.
176. Surai PF, 2002, Natural Antioxidants in Avian Nutrition and Reproduction, Nottingham University Press, Nottingham, UK.
177. Tahmasbi AM, Kazemi M, Moheghi MM, Bayat J, Shahri, AM, 2012, Effects of selenium and vitamin E and night or day feeding on performance of Holstein dairy cows during hot weather, *Journal of Cell and Animal Biology*, 6(3), 33-40.
178. Trevisan M, Browne R, Ram M, Muti P, Freudenheim J, Carosella AM, Armstrong D, 2001, Correlates of markers of oxidative status in the general population, *American Journal of Epidemiol*, 154, 348-56.
179. Ursini F, Maiorino M, Roveri A, 1997, Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx): More than an antioxidant enzyme? *Biomedical and Environmental Science*, 10, 327–32.
180. Uysal O, Bucak MN, 2007, Effects of oxidized glutathione, bovine serum albumin, cysteine and lycopene on the quality of frozen-thawed ram semen, *Acta Veterinaria Brno*, 76(3), 383–90.

181. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J, 2007, Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease, *The international journal of biochemistry and cell biology*, 39(1), 44-84.
182. Valko M, Morris H, Cronin MTD, 2005, Metals, toxicity and oxidative stress, *Current Medicinal Chemistry*, 12(10), 1161–208.
183. Vernet P, Faure J, Dufaure JP, Drevet JR, 1997, Tissue and developmental distribution, dependence upon testicular factors and attachment to spermatozoa of GPx5, a murine epididymis-specific glutathione peroxidase, *Molecular Reproductive Development*, 47, 87-98.
184. Vince S, Žura Žaja I, Samardžija M, Majić Balić I, Vilić M, Đuričić D, Valpotić H, Marković F, Milinković-Tur S, 2018, Age-related differences of semen quality, seminal plasma and spermatozoa antioxidative and oxidative stress variables in bulls during cold and warm periods of the year, *Animal*, 12(3), 559-68.
185. Walczak–Jedrzejowska R, Wolski JK, Slowikowska–Hilczer J, 2013, The role of oxidative stress and antioxidants in male fertility, *Central European journal of urology*, 66(1), 60-7.
186. Whanger PD, 2002, Selenocompounds in plants and animals and their biological significance, *Journal of American College of Nutrition*, 21, 223–32.
187. Wildeus S, Hammond AC, 1993, Testicular, semen and blood parameters in adapted and nonadapted *Bos taurus* bulls in the semi-arid tropics, *Theriogenology*, 40(2), 345-55.
188. Williams CA, Kronfeld DS, Hess TM, Saker KE, Waldron JN Crandell KM, Hoffman M, Harris PA, 2002, Antioxidant supplementation and subsequent oxidative stress of horses during an 80-km endurance race, *Journal of Animal Science*, 82, 588-94.
189. Witte TS, Schäfer-Somi S, 2007, Involvement of cholesterol, calcium and progesterone in the induction of capacitation and acrosome reaction of mammalian spermatozoa, *Animal Reproduction Science*, 102, 181–93.
190. Wright C, Milne S, Leeson H, 2014, Sperm DNA damage caused by oxidative stress: modifiable clinical, lifestyle and nutritional factors in male infertility, *Reproductive biomedicine online*, 28(6), 684-703.
191. Yadav B, Singh G, Wankar A, Dutta N, Chaturvedi VB, Verma MR 2016, Effect of simulated heat stress on digestibility, methane emission and metabolic adaptability in crossbred cattle, *Asian-Australasian Journal of Animal Science*, 29(11), 1585-92.

192. Yeste M, 2016, Sperm cryopreservation update: Cryodamage, markers, and factors affecting the sperm freezability in pigs, *Theriogenology*, 85(1), 47-64.
193. Yousef MI, Abdallah GA, Kamel KI, 2003, Effect of ascorbic acid and Vitamin E supplementation on semen quality and biochemical parameters of male rabbits, *Animal Reproduction Science*, 76(1-2), 99–111.
194. Zalata A, Hafez T, Comhaire F, 1995, Evaluation of the role of reactive oxygen species in male infertility, *Human Reproduction*, 10(6), 1444–51.
195. Zanganeh Z, Zhandi M, Zare-Shahneh A, Najafi A, Nabi MM, Mohammadi-Sangcheshmeh A, 2013, Does rosemary aqueous extract improve buck semen cryopreservation? *Small Ruminant Research*, 114, 120-5.

BIOGRAFIJA

Slobodan Petrović, dipl. vet. spec., rođen je 04. 06. 1979. u Svilajncu. Osnovnu školu i gimnaziju završio je u Svilajncu. Upisao se na Fakultet veterinarske medicine u Beogradu 1998. i sa uspehom ga završio 2004 godine (prosečna ocena 8,62). Nakon završetka studija obavio je pripravnički staž u veterinarskoj stanici „Kolari“ u Kolarima, nakon čega je položio stručni ispit. Od 2006. godine zaposlen u SVC „Velika Plana“ u Velikoj Plani. Upisao se na specijalističke studije iz reprodukcije domaćih životinja na istom Fakultetu 2007. godine. Godine 2011. odbranio je specijalistički rad na temu „Uticaj davanja humanog horionskog gonadotropina na kvalitet semena bikova“. Od oktobra 2015. godine pohađa doktorske akademske studije na Fakultetu veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu. Položio je sve ispite predviđene planom i programom poslediplomskih studija sa prosečnom ocenom 9,57. U periodu od 2017-2020, kao stručni saradnik bio je angažovan na projektu ART-REM ”Curricula Development in the Fields of Reproductive Biology/Assisted Reproductive Technologies and Regenerative Medicine in Serbia ”. Kao autor objavio je 3 naučna i stručna rada, od kojih je jedan rad objavio u časopisu sa SCI liste.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Слободан Петровић

број уписа 14/6

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

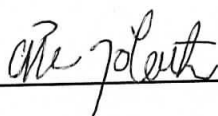
Испитивање ефеката додавања антиоксиданаса у храни на квалитет семена приплодних

бикова у условима топлотног стреса

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

Потпис докторанда

У Београду, 21. 06. 2021.



Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Слободан Петровић

Број уписа 14/6

Студијски програм Докторске академске студије

Наслов рада Испитивање ефеката додавања антиоксиданаса у храни на квалитет семена приплодних бикова у условима топлотног стреса

Ментор доцент др Милан Малетић

Потписани Слободан Петровић

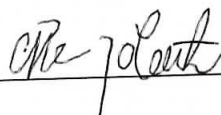
изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања 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 докторанда

У Београду, 21.06.2021.



Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

Испитивање ефеката додавања антиоксиданаса у храни на квалитет семена

приплодних бикова у условима топлотног стреса

која је моје ауторско дело.

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

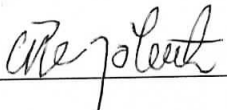
Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 21.06.2021.



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 прераде. 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 прераде. 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. 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 дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.