

IZVEŠTAJ O OCENI ZAVRŠENE DOKTORSKE DISERTACIJE

I PODACI O KOMISIJI:

1. Datum i naziv organa koji je imenovao komisiju: 25. 05. 2016. god., Nastavno-naučno veće Fakulteta veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu, 168. sednica.

2. Sastav komisije sa naznakom imena i prezimena svakog člana, zvanja, naziva uže naučne oblasti za koju je izabran u zvanje, godinom izbora u zvanje i naziv fakulteta, ustanove u kojoj je član komisije zaposlen:

dr Slobodanka Vakanjac, vanredni profesor, Ginekologija sa andrologijom, 2011. god., Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu

dr Dragan Šefer, redovni profesor, Ishrana domaćih životinja, 2014, Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu

dr Miodrag Lazarević, redovni profesor, Fiziologija, 2002. god., Fakultet veterinarske medicine Beograd Univerziteta u Beogradu

dr Vojislav Pavlović, redovni profesor, Ginekologija sa andrologijom, 2002, god., Fakultet veterinarske medicine Beograd

dr Aleksandar Milovanović, naučni saradnik, Reprodukcijska domaćih životinja 2015, Naučni institut za veterinarstvo, Novi Sad.

II PODACI O KANDIDATU:

1. Ime, ime jednog roditelja, prezime: Goran Radan Jakovljević

2. Datum rođenja, opština, Republika: 07.11.1965.god, Kraljevo, Srbija

3. Datum odbrane, mesto i naziv magistarske teze\*: 16.07.2004, Beograd, "Ispitivanje fertilne sposobnosti semena mladih bikova pod uticajem paragenetskih faktora"

4. Naučna oblast iz koje je stečeno akademsko zvanje magistra nauka\*: Reprodukcijska domaćih životinja

III NASLOV DOKTORSKE DISERTACIJE: „Uticaj teških metala iz hrane i vode na kvalitet duboko zamrznutog semena bika“

IV PREGLED DOKTORSKE DISERTACIJE (navesti broja strana poglavlja, slika, šema, grafikona i sl.):

Doktorska disertacija je napisana na 117 stranica i sadrži sledeća poglavlja: Uvod (3 strane), Pregled literature (30 strana), Cilj i zadaci istraživanja (1 strana), Materijal i metode rada (10 strana), Rezultati istraživanja (28 strane), Diskusija (31 strana), Zaključci (2 strane) i spisak literature (12 strana). Doktorska disertacija je dokumentovana sa 50 tabela, 38 grafikona i 3 slike. Na početku teze se nalazi kratak sadržaj na srpskom i engleskom jeziku.

**V VREDNOVANJE POJEDINIH DELOVA DOKTORSKE DISERTACIJE (dati kratak opis svakog poglavlja disertacije: uvoda, pregleda literature, cilja i zadataka istraživanja, materijal i metoda, rezultata, diskusije, spiska referenci):**

U **Uvodu** kandidat daje kratak pregled podele mineralnih materija u biljnom i životinjskom svetu, način unošenja i njihove uloge u organizmu i ističe da je najmanje deset mikroelemenata neophodno u ishrani domaćih životinja. Oni su regulatori osmotskog pritiska, elektrohemijske reakcije krvi, limfe i telesnih tečnosti i propustljivosti ćelijskih membrana, ulaze u sastav kostiju i zuba, učestvuju u sintezi hormona, vitamina i enzima. Poseban značaj reprodukciji ima cink što proizilazi iz činjenice da je on značajna komponenta ili aktivator enzima uključenih u sintezu polnih steroida. Različiti antropogeni zagađivači (olovo, kadmijum, živa, arsen i dr), mogu uticati na funkcije reproduktivnog trakta i na kvalitet sperme životinja i ljudi. Svojim prisustvom u hrani i vodi, teški metali dovode do različitih poremećaja velikog broja funkcija organizma uključujući i smanjenje kvaliteta ejakulata.

Poglavlje **Pregled literature** je podeljeno na šest podpoglavlja. U prvom podpoglavlju kandidat opisuje sastav sperme bikova i navodi da je ona složena i specifična po svom sastavu, a sastoji se od semene plazme i spermatozoida. Semena plazma je proizvod akcesornih polnih žlezda i sprovodnih puteva muškog genitalnog trakta i ima izraženu varijabilnost u pogledu prisustva i koncentracije pojedinih sastojaka. Kandidat opisuje da se semena plazma sastoji od neorganskih i organskih sastojaka. Od neorganskih sastojaka, kojih ima oko 0,9%, dokazano je prisustvo Na, K, Mg, Ca, Zn, Mn, Cu, Cl, Fe, sulfata, fosfata i bikarbonata. Od organskih sastojaka u seminalnoj plazmi se nalaze ugljeni hidrati, proteini i masti. U drugom podpoglavlju, kandidat detaljno opisuje izgled, građu i sastav spermatozoida bika. Zreo spermatozoid bika se sastoji od glave, srednjeg dela i repa. Na glavi spermatozoida se nalazi akrozom koji sadrži specifične enzime: akrozin, hijaluronidazu, kiselu fosfatazu, arilamidazu, arilsulfatazu A i aspartat-arilamidazu koji omogućavaju prodiranje u jajnu ćeliju. Glavni funkcionalni delovi repa su: aksonema, mitohondrijski procep, prateća vlakna (ogrtaji) i fibrilarna ovojnica. Njihova osnovna uloga je u kretanju spermatozoida. U trećem podpoglavlju kandidat opisuje proces spermatogeneze koji se odvija u izuvijanim semenim kanalima i obično se može podeliti u četiri faze. Prva faza je mitotička deoba spermatogonija, druga faza je mejotička deoba spermatocita, treća faza je deoba sekundarnih spermatocita (II mejotička deoba) i četvrta faza je metamorfoza (transformacija) spermatida u zrele spermatozoide. U četvrtom podpoglavlju kandidat navodi vrste patoloških promena na spermatozoidima. Svaki ejakulat sadrži i određeni procenat patološki promenjenih spermatozoida, a smanjena plodnost nastaje pri znatnom povećanju broja patoloških formi. Tada se govori o terato-zoospermiji, a promenjeni spermatozoidi nisu sposobni za oplodnju. Postoje primarni defekti, koji nastaju u toku spermatogeneze u klicinom epitelu, ali treba praviti razliku između nespecifičnih i specifičnih promena. Sekundarni defekti nastaju pri prolasku spermatozoida u lumen *tubula contorti*, u toku transporta i epididimalnog sazrevanja i nagomilavanja u repu pasemnika. Dok tercijarne promene nastaju posle izlaska spermatozoida u spoljašnju sredinu i najčešće su posledica pogrešnih manipulacija ejakulatom. U petom podpoglavlju, kandidat navodi osnovne parametre kvaliteta ejakulata bika koji moraju biti ispunjeni da bi se prema važećem pravilniku mogao smatrati pogodnim za obradu i upotrebu za veštačko osemenjavanje (VO). Ejakulat mora da ima zapreminu od najmanje 2 mL, mlečnu boju, konzistenciju mleka i miris specifičan za vrstu. Minimalna progresivna pokretljivost treba da bude 65%, najmanja koncentracija  $500 \times 10^6/\text{mL}$  i pH vrednost od 6,5 do 7,0. Maksimalno dozvoljen procenat morfološki promenjenih spermatozoida je 20%, a ukupan broj bakterija u spermi može da bude  $5\,000\text{ CFU/mL}$ . U istom poglavlju se navode i parametri kvaliteta duboko zamrznutog semena bika posle otapanja. Seme bika nakon odmrzavanja treba da ispunjava sledeće minimalne uslove: da ima progresivnu pokretljivost spermatozoida od najmanje 50%, procenat morfološki promenjenih spermatozoida do 30%, progresivnu pokretljivost posle testa otpornosti od najmanje 40%. Broj progresivno pokretnih i morfološki normalnih spermatozoida u dozi posle odmrzavanja mora da bude najmanje  $1 \times 10^6$ , a ukupan broj bakterija do  $500\text{ CFU/mL}$ . U šestom podpoglavlju kandidat navodi podatke o mineralnim supstancama u živom svetu, sa posebnim akcentom na funkciju i ulogu cinka u reprodukciji. Značaj cinka u reprodukciji proizilazi iz činjenice da je on, ili osnovna komponenta, ili aktivator enzima koji su uključeni u sintezu polnih steroida. Cink je bitan za biosintezu testosterona i utiče na aktivnost folikulo-stimulirajućeg i luteinizirajućeg hormona, tako da je u uskoj vezi sa procesom spermatogeneze. Deficit cinka izaziva smetnje u razvoju testisa uz vidnu atrofiju tubularnog epitela i istovremeno smanjen sadržaj cinka u testisima, epididimusu i prostati. U istom

poglavljju, kandidat navodi oblike i načine unošenja i uticaj olova, kadmijuma i žive na organizam i reproduktivni sistem. U prirodi se olovo pretežno nalazi u obliku sulfidnih i karbonatnih jedinjenja i minerala galenita, cerusita i anglezita i vrlo često se pojavljuje u rudama zajedno s cinkom. Olovo se kao polutant može detektovati u svim segmentima životne sredine i biološkim sistemima i odavno je poznato njegovo toksično dejstvo u životnoj i radnoj sredini. Olovo nije esencijalni metal, a uneto u organizam se može naći u gotovo svim tkivima i organima sisara. Nakon unošenja, olovo ispoljava toksični efekat na jetru, bubrege i mozak, koji se i smatraju njegovim ciljnim organima. Olovo je metal sa kumulativnim dejstvom i deluje konkurentno prema nekim esencijalnim metalima (gvožđu, kalcijumu, bakru i cinku). Olovo se akumulira u tkivima i može da izazove brojne neurološke, hematološke i reproduktivne poremećaje. Dugotrajna izloženost uticaju olova dovodi do promena u kvalitetu semena i promena u hromatinskoj strukturi. Internacionalna agencija za istraživanje kancera IARC (International Agency For Research on Cancer) je još 1987. godine svrstala olovo u kancerogene materije. Kadmijum je označen kao jedan od 126 najvećih zagađivača životne sredine od strane Američke agencije za zaštitu životne sredine, a njegovo biološko vreme poluraspada je kod ljudi između 10 i 30 godina. Kadmijum se unosi u organizam u obliku para i čestica prašine kao oksid, hlorid, fluorid, sulfid, karbonat i acetat. Najveća količina kadmijuma se unosi putem kontaminirane hrane (pirinač, iznutrice i gljive). Izuzetno toksičan efekat kadmijuma je rezultat njegovih interakcija sa esencijalnim mikro i makro elementima, posebno sa gvožđem, kalcijumom, bakrom i cinkom. Živa je široko rasprostranjena u prirodi gde se može naći u elementarnom, neorganskom i organskom obliku. Opšta populacija ljudi i životinja je izložena negativnom efektu žive uglavnom putem konzumiranja kontaminirane hrane, posebno ribe, u kojoj se živa akumulira u obliku metilirane žive. Trovanje elementarnom živom nastaje i udisanjem i pošto se dobro resorbuje u plućima, a zadržava se u centralnom nervnom sistemu ili ostaje u eritrocitima. Organski proizvodi žive se rastvaraju u mastima i dobro se resorbuju iz digestivnog trakta. Jedinjenja žive ometaju steroidogenezu, uključujući sintezu polnih hormona, narušavaju plodnost mužjaka i ženki i ometaju osovine hipotalamus-hipofiza-tireoidea i hipotalamus-hipofiza-nadbubreg.

U poglavljju **Cilj i zadaci istraživanja**, kandidat navodi da je osnovni cilj istraživanja sprovedenih u okviru ove doktorske disertacije bio određivanje koncentracija cinka, olova, kadmijuma i žive u hrani i vodi za priplodne bikove, vodi za pripremu razređivača, određivanje koncentracije ovih elementa u duboko zamrznutom semenu bikova i analiza njihovog uticaja na parametre koji određuju kvalitet sperme. Radi realizacije ovih ciljeva formulisani su sledeći istraživački zadaci:

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

U poglavljju **Materijal i metode istraživanja** kandidat detaljno opisuje sve etape i metode planiranih istraživanja. Ispitivanjima je obuhvaćeno duboko zamrznuto seme od ukupno 40 bikova i to iz svake grupe po deset (A, B, C sa tri različita lokaliteta u Srbiji i D iz Nemačke). Sa tri lokaliteta u Srbiji i jednog u Nemačkoj, uzeti su uzorci vode, koncentrata i sena kojima su bikovi hranjeni i napajani poslednjih šest meseci, kao i uzorci vode za pripremu razređivača za seme.

## Ispitivanje kvaliteta duboko zamrznutog semena

Procenat živih i mrtvih spermatozida određivan je posle otapanja pajeta i bojenja Tripan plavim/Eozin Nigrozinom (TP/NE) modifikacija po Jovičinu, upotrebom mikroskopa (Bio Optica, Italija) pri uveličanju od 500 - 1000 X. Određivanje koncentracije spermatozoida vršeno je CASA metodom. Defekti akrozoma su utvrđivani posle bojenja po Farelly-u i posmatranja pod imerzionim objektivom uz povećanje od 1000 X.

Duboko zamrznuta sperma je pregledana CASA analizatorom (ISAS Proiser, model V.1.2., Španija, eng. ISAS = Integrated Sperm Analysis System). Pregledom su obuhvaćeni: koncentracija i parametri pokretljivosti spermatozoida, odnos živih i mrtvih spermatozoida, nalaz intaktnih i oštećenih akrozoma, protoplazmatskih kapljica, kao i primarnih, sekundarnih i ukupnih patoloških formi spermatozoida. Za pojedine strukturne i fiziološke karakteristike spermatozoida korišćen je protočni citometar (Guava EasyCyte, Guava Technologies Inc, Hayward, California, USA). Ovaj aparat je opremljen softverom podešenim za analizu semena i obradu podataka (IMV Technologies, L'Aigle, Francuska).

Ukupan broj živih aerobnih mikroorganizama određivan je standardnom metodom ISO TR 8607 ISO (fR 8607:1991 (E))

## Ispitivanje duboko zamrznutog semena i hrane za bikove na prisustvo olova, cinka, kadmijuma i žive

Određivanje koncentracije olova, cinka i kadmijuma u duboko zamrznutom semenu i hranivima vršeno je atomskim apsorpcionim spektrometrom Analysc 700 (Perkin Elmer, Engleska) metodom izvan područja primene SRPS EN 14084:2008 Prehrambeni proizvodi - Određivanje elemenata u tragovima - Određivanje olova, kadmijuma, cinka, bakra i gvožđa atomskom apsorpcionom spektrometrijom (AAS) posle mikrotalasnog razaranja.

Određivanje koncentracije žive u duboko zamrznutom semenu i hrani vršeno je na atomskom apsorpcionom spektrometru Analysc 700 (Perkin Elmer, Engleska) metodom izvan područja primene SRPS EN 13806:2008 Prehrambeni proizvodi - Određivanje elemenata u tragovima - Određivanje žive atomskom apsorpcionom spektrometrijom (AAS) – tehnikom hladnih para (CVAAS) posle razaranja pod pritiskom.

U poglavlju **Rezultati istraživanja** kandidat je u četiri podpoglavlja prikazao rezultate do kojih je došao. U prvom podpoglavlju su prikazani rezultati ocene kvaliteta duboko zamrznutog semena posle otapanja. Analiza prosečnih vrednosti koncentracije spermatozoida ( $10^6/\text{mL}$ ), je ukazala da je najveće vrednosti ovog parametra imala eksperimentalna grupa C ( $104,235 \pm 15,649$ ), dok je najmanji broj spermatozoida zabeležen u grupi D ( $68,324 \pm 13,534$ ). Signifikantne razlike ( $p < 0,05$ ) su ustanovljene samo između ove dve grupe, dok između ostalih grupa, njih nije bilo ( $p > 0,05$ ). Najveće variranje, koje izlazi izvan granica homogenosti statističke serije (45,93%), je zabeleženo u eksperimentalnoj grupi A. Analiza prosečnih vrednosti broja spermatozoida u jednoj dozi semena ( $10^6$ ), ukazala je, da je najveće vrednosti ovog parametra imala eksperimentalna grupa C ( $26,802 \pm 4,195$ ), dok je najmanji broj spermatozoida registrovan u grupi D ( $17,081 \pm 3,383$ ). Kao i u prethodnom slučaju, statistički signifikantne razlike ( $p < 0,01$ ) su ustanovljene samo između ove dve grupe, ali ne i između ostalih ( $p > 0,05$ ). Najveće variranje, koje izlazi izvan granica homogenosti statističke serije (45,93%), je registrovano u eksperimentalnoj grupi A. Analizirajući prosečne vrednosti procenta ukupno pokretljivih spermatozoida u jednoj dozi semena, ustanovljeno je da je najveće vrednosti imala eksperimentalna grupa C ( $54,14 \pm 10,95\%$ ), dok je najmanji procenat pokretnih spermatozoida zabeležen u grupi A ( $42,95 \pm 12,23\%$ ). Između eksperimentalnih grupa nisu ustanovljene statistički signifikantne razlike ( $p > 0,05$ ). Najveća variranja, koje izlaze izvan granica homogenosti statističke serije, zabeležena su u eksperimentalnim grupama D (38,46%) i B (36,38%). Eksperimentalna grupa C je imala najveće prosečne vrednosti broja ukupno pokretljivih spermatozoida u jednoj dozi semena ( $14,337 \pm 4,665 \times 10^6$ ), dok je najmanji broj pokretnih spermatozoida zabeležen u grupi D ( $9,028 \pm 4,545 \times 10^6$ ). Između eksperimentalnih grupa bikova nisu ustanovljene signifikantne razlike ( $p > 0,05$ ). U svim eksperimentalnim grupama je zapaženo visoko variranje, koje je bilo najveće kod eksperimentalne grupe A (78,70%) a najmanje u grupi C (32,54%). Ovako visoko variranje podataka i relativno mala dubina statističkih serija, doprinelo je izostanku signifikantnih

1 razlika. Analiza prosečnih vrednosti procenta progresivno pokretnih spermatozoida ukazala  
 2 je da je najveće vrednosti imala eksperimentalna grupa C ( $32,88 \pm 8,67\%$ ), dok je najmanja  
 3 pokretljivost spermatozoida zabeležena u grupi A ( $24,70 \pm 7,69\%$ ). Između eksperimentalnih  
 4 grupa nisu ustanovljene statistički signifikantne razlike ( $p > 0,05$ ). Najveća variranja, koja izlaze  
 5 izvan granica homogenosti statističke serije, zabeležena su u eksperimentalnim grupama B  
 6 ( $43,89\%$ ) i D ( $40,60\%$ ). Analizom prosečnih vrednosti broja progresivno pokretnih  
 7 spermatozoida u dozi ( $10^6$ ) ustanovljeno je da je najveće vrednosti imala eksperimentalna  
 8 grupa C ( $8,679 \pm 3,141$ ), dok je najmanje progresivno pokretnih spermatozoida bilo u grupi D  
 9 ( $5,012 \pm 2,557$ ). Između eksperimentalnih grupa nisu ustanovljene signifikantne razlike  
 10 ( $p > 0,05$ ). U svim grupama je zabeleženo visoko variranje vrednosti ovog parametra, koje je  
 11 bilo najveće u eksperimentalnoj grupi A ( $76,88\%$ ) a najmanje u grupi C ( $36,19\%$ ). Visok  
 12 stepen varijacija podataka i relativno mala dubina statističkih serija su doprineli izostanku  
 13 statističke značajnosti razlika. Analiza prosečnih vrednosti procenta brzih spermatozoida u  
 14 dozi, ukazala je da je najveće vrednosti imala eksperimentalna grupa C ( $39,27 \pm 11,77\%$ ), dok  
 15 je najmanje brzih spermatozoida zabeleženo u grupi A ( $29,46 \pm 10,16\%$ ). Između  
 16 eksperimentalnih grupa nisu utvrđene statistički signifikantne razlike ( $p > 0,05$ ). U svim  
 17 eksperimentalnim grupama je uočeno visoko variranje vrednosti ovog parametra, koje je bilo  
 18 najveće kod bikova grupe D ( $48,06\%$ ), a najmanje kod bikova grupe C ( $29,96\%$ ). Visok  
 19 stepen variranja i mala dubina statističkih serija su uslovili izostanak statistički signifikantnih  
 20 razlika. Bikovi eksperimentalne grupe D su imali najveći prosečni procenat živih  
 21 spermatozoida ( $61,40 \pm 13,68\%$ ) dok je najmanje živih spermatozoida registrovano u grupi A  
 22 ( $55,00 \pm 10,07\%$ ). Između eksperimentalnih grupa nisu ustanovljene statistički signifikantne  
 23 razlike ( $p > 0,05$ ), a najveće variranje ( $34,73\%$ ), koje izlazi izvan granica homogenosti  
 24 statističke serije, zabeleženo je kod bikova eksperimentalne grupe B.  
 25 Najveće prosečne vrednosti procenta živih spermatozoida sa intaktnim akrozomom  
 26 ustanovljene su u eksperimentalnoj grupi C ( $47,40 \pm 14,45\%$ ), dok je najmanje živih  
 27 spermatozoida sa intaktnim akrozomom registrovano kod bikova grupe D ( $46,80 \pm 14,73\%$ ).  
 28 Između eksperimentalnih grupa bikova nisu ustanovljene statistički signifikantne razlike u  
 29 srednjim vrednostima ovog parametra ( $p > 0,05$ ). Najveće variranje, koje izlazi izvan granica  
 30 homogenosti statističke serije, zabeleženo je u eksperimentalnoj grupi B ( $37,10\%$ ). Analizom  
 31 prosečnih vrednosti procenta živih spermatozoida sa oštećenim akrozomom, ustanovljeno je  
 32 da je u uzorcima semena bikova eksperimentalne grupe D, bilo najviše ovih ćelija  
 33 ( $7,40 \pm 3,27\%$ ). Ovaj procenat je bio signifikantno veći od procenta u grupi C ( $2,70 \pm 2,83\%$ )  
 34 ( $p < 0,01$ ) i značajno veći ( $p < 0,05$ ) u odnosu na procenat registrovan u grupi A ( $3,40 \pm 3,27\%$ ).  
 35 Između ostalih grupa bikova nisu ustanovljene signifikantne razlike u srednjim vrednostima  
 36 ovog parametra ( $p > 0,05$ ). U svim eksperimentalnim grupama je zabeleženo visoko variranje  
 37 procenta živih spermatozoida sa oštećenim akrozomima, koje je bilo najveće u  
 38 eksperimentalnoj grupi C ( $104,83\%$ ), a najmanje u grupi D ( $44,23\%$ ). Ovako visoko variranje  
 39 podataka i relativno mala dubina statističkih serija su imali za posledicu izostanak statistički  
 40 signifikantnih razlika između ostalih grupa. Analiza prosečnih vrednosti ukupnog procenta  
 41 spermatozoida sa oštećenim akrozomom u dozi semena, ukazala je da su najveće vrednosti  
 42 registrovane u eksperimentalnoj grupi A ( $25,20 \pm 6,91\%$ ), dok je najmanji procenat  
 43 spermatozoida sa oštećenim akrozomom zabeležen u grupi C ( $17,00 \pm 5,37\%$ ). Između  
 44 eksperimentalnih grupa nisu ustanovljene statističke signifikantne razlike ( $p > 0,05$ ). Najveća  
 45 variranja, koja izlaze izvan granica homogenosti statističke serije, zabeležena su u  
 46 eksperimentalnim grupama B ( $54,29\%$ ) i D ( $47,06\%$ ). Prosečne vrednosti procenta  
 47 spermatozoida sa protoplazmatskom kapljicom su bile najveće u eksperimentalnoj grupi B  
 48 ( $1,90 \pm 2,38\%$ ), dok je najmanja vrednost zabeležena u grupi D ( $1,00 \pm 1,33\%$ ). Između  
 49 eksperimentalnih grupa nisu ustanovljene statistički signifikantne razlike ( $p > 0,05$ ). U svim  
 50 eksperimentalnim grupama je uočljivo visoko variranje vrednosti ovog parametra, koje je bilo  
 51 najveće u grupi A ( $117,81\%$ ) a najmanje u C grupi ( $73,14\%$ ). Visoke vrednosti koeficijenta  
 52 varijacije i relativno mala dubina statističkih serija, imali su za posledicu izostanak statističke  
 53 značajnosti razlika u srednjim vrednostima ovog parametra. Prosečne vrednosti procenta  
 54 primarno abnormalnih, odnosno patološki promenjenih spermatozoida su bile najveće u  
 55 eksperimentalnoj grupi C ( $11,60 \pm 6,31\%$ ), a najmanje u grupi A ( $6,80 \pm 4,98\%$ ). Između  
 56 eksperimentalnih grupa bikova nisu ustanovljene statistički signifikantne razlike u srednjim  
 57 vrednostima ovog parametra ( $p > 0,05$ ). Najveća variranja, koja izlaze izvan granica  
 58 homogenosti statističke serije, su zabeležena u eksperimentalnim grupama A ( $73,30\%$ ) i C  
 59 ( $54,40\%$ ). Analiza prosečnih vrednosti procenta sekundarno abnormalnih, odnosno patološki  
 60 promenjenih spermatozoida u dozi, ukazala je da su one najveće u eksperimentalnoj grupi B

(6,30±4,86%), dok je najmanja vrednost zabeležena u grupi A (3,50±1,96%). Između eksperimentalnih grupa bikova nisu ustanovljene signifikantne razlike ( $p>0,05$ ). U svim eksperimentalnim grupama je zabeleženo visoko variranje, koje je bilo najveće u grupi D (104,13%) a najmanje u grupi A (55,94%). Ovako visoko variranje podataka i relativno mala dubina statističkih serija su uslovili izostanak statistički signifikantnih razlika. Prosečne vrednosti procenta ukupno patološki promenjenih spermatozoida bile najveće u eksperimentalnoj grupi C (15,90±7,80%), dok je najmanji broj promenjenih spermatozoida registrovan u grupi A (10,30±6,13%). Usled visokih vrednosti koeficijenata varijacije i relativno male dubine statističkih serija, nisu ustanovljene statistički signifikantne razlike u srednjim vrednostima ( $p>0,05$ ) procenta ukupno patološki promenjenih spermatozoida. U svim eksperimentalnim grupama je zabeleženo visoko variranje, koje je bilo najveće u grupi A (59,51%), a najmanje u grupi B (34,95%).

Analizom prosečnih vrednosti statusa hromatina, kod neoštećenih spermatozoida, ustanovljeno je da je najveće vrednosti ovog parametra imala eksperimentalna grupa A (90,15±6,39%) i one su bile signifikantno veće od najmanjih vrednosti (63,97±22,18%) koje su zabeležene u grupi B ( $p<0,01$ ). Između ostalih eksperimentalnih grupa nisu ustanovljene statistički signifikantne razlike ( $p>0,05$ ). Najveće variranje, koje izlazi izvan granica homogenosti statističke serije (34,67%), zabeleženo je u eksperimentalnoj grupi B. Analiza prosečnih vrednosti procenta spermatozoida sa oštećenim hromatinom, ukazala je su najveće vrednosti registrovane u eksperimentalnoj grupi B (35,14±21,30), dok je najmanji broj oštećenih spermatozoida imala grupa A (9,93±6,47). Samo su između ove dve grupe ustanovljene statistički signifikantne razlike ( $p<0,01$ ). U svim grupama bikova je uočljivo visoko variranje ovog parametra. Ono je bilo najveće eksperimentalnoj grupi A (65,17%), a najmanje u grupi D (47,10%). Ovako visoko variranje podataka i relativno mala dubina statističkih serija su uslovili izostanak statistički signifikantnih razlika u srednjim vrednostima između ostalih grupa.

Analizom prosečnih vrednosti procenta živih spermatozoida u dozi semena, ustanovljeno je da su one bile najmanje u eksperimentalnoj grupi A (37,79±16,58%) i bile su signifikantno manje od najvećih vrednosti procenta živih spermatozoida koji je zabeležen u grupi D (64,23±16,36%); ( $p<0,01$ ). Takođe je procenat živih spermatozoida bio značajno manji u C grupi (43,86±8,78%) u odnosu na grupu D (64,23±16,36%) ( $p<0,05$ ). Vrednosti registrovane u eksperimentalnoj grupi su bile statistički signifikantno manje od vrednosti u eksperimentalnoj grupi B (62,47±19,43%) ( $p<0,05$ ). Između ostalih eksperimentalnih grupa nisu ustanovljene statistički signifikantne razlike u srednjim vrednostima ( $p>0,05$ ). U svim eksperimentalnim grupama je uočljivo povećano variranje, koje je bilo najveće u grupi A (43,89%) a najmanje (20,02%) u C grupi. Prosečne vrednosti procenta živih spermatozoida sa intaktnim akrozomom su bile najmanje u eksperimentalnoj grupi A (36,27±16,31%) i bile su statistički signifikantno manje od najvećih vrednosti procenta živih spermatozoida koji je zabeležen u grupi D (59,11±17,11%) ( $p<0,05$ ). Procenat živih spermatozoida sa intaktnim akrozomom je bio značajno manji kod bikova grupe A (36,27±16,31) u odnosu na B grupu (58,08±18,18%) ( $p<0,05$ ). Između ostalih eksperimentalnih grupa nisu ustanovljene statistički signifikantne razlike ( $p>0,05$ ). Najveći koeficijent varijacije (44,95%), koji izlazi izvan granica homogenosti statističke serije, zabeležen je eksperimentalnoj grupi A. Prosečne vrednosti procenta mrtvih spermatozoida sa intaktnim akrozomom u dozi semena bika su bile najmanje u eksperimentalnoj grupi B (17,27±7,13%) i bile su statistički signifikantno manje ( $p<0,01$ ) od najvećih vrednosti procenta mrtvih spermatozoida sa intaktnim akrozomom zabeleženim u grupi C (33,69±7,53%). Takođe je procenat mrtvih spermatozoida sa intaktnim akrozomom, bio značajno manji ( $p<0,01$ ) u grupi D (19,14±8,57%) u odnosu na C grupu (33,69±7,53%). Između ostalih eksperimentalnih grupa nisu ustanovljene statistički signifikantne razlike ( $p>0,05$ ). Najveće variranje, koje izlazi izvan granica homogenosti statističke serije, zabeleženo je u eksperimentalnim grupama D (44,75%) i B 41,30%. Analiza prosečnih vrednosti živih spermatozoida sa oštećenim akrozomom ukazuje da je eksperimentalna grupa C imala najmanje vrednosti ovog parametra (1,31±0,57%) i one su bile statistički signifikantno manje od najvećih vrednosti procenta živih spermatozoida sa oštećenim akrozomom koji je zabeležen u grupi D (5,12±1,17%) ( $p<0,01$ ). Procenat živih spermatozoida sa oštećenim akrozomom je bio značajno manji u grupi C (1,31±0,57%) u odnosu na B grupu (4,39±2,95) ( $p<0,01$ ). Eksperimentalna grupa A (1,51±0,74%) je imala statistički signifikantno manji procenat živih spermatozoida sa oštećenim akrozomom od eksperimentalne grupe D (5,12±1,17%) ( $p<0,01$ ). Na kraju, procenat živih spermatozoida sa oštećenim akrozomom je bio značajno manji kod A grupe (1,51±0,74%) u odnosu na grupu B (4,39±2,95%) ( $p<0,01$ ).

1 Između ostalih eksperimentalnih grupa nisu ustanovljene statistički signifikantne razlike  
 2 ( $p>0,05$ ). Kod svih eksperimentalnih grupa je zabeleženo visoko variranje, koje je bilo najveće  
 3 u eksperimentalnoj grupi B (67,15%), a najmanje u D grupi (22,90%). Prosečne vrednosti  
 4 procenta mrtvih spermatozoida sa oštećenim akrozomom su bile najmanje u  
 5 eksperimentalnoj grupi D ( $16,61\pm7,92\%$ ) i bile su statistički signifikantno manje ( $p<0,01$ ) od  
 6 najvećih vrednosti ovog parametra koji je zabeležen u grupi A ( $37,91\pm10,19\%$ ).  
 7 Eksperimentalna grupa B ( $20,23\pm14,96\%$ ) je imala signifikantno manji procenat mrtvih  
 8 spermatozoida u odnosu na vrednosti eksperimentalne grupe A ( $p<0,05$ ). Procenat mrtvih  
 9 spermatozoida sa oštećenim akrozomom je bio značajno manji u C grupi ( $22,45\pm10,12\%$ ) u  
 10 odnosu na grupu ( $p<0,05$ ). Između ostalih eksperimentalnih grupa nisu ustanovljene statistički  
 11 signifikantne razlike ( $p>0,05$ ). Kod svih eksperimentalnih grupa je zabeleženo visoko  
 12 variranje, koje je bilo najveće u eksperimentalnoj grupi B (73,96%) a najmanje u grupi A  
 13 (26,89%). Ovako visoko variranje podataka i relativno mala dubina statističkih serija su  
 14 doprinele izostanku statistički signifikantnih razlika između ostalih grupa. Prosečne ukupne  
 15 vrednosti mrtvih spermatozoida sa oštećenim akrozomom bile su najmanje ( $p<0,05$ ), od  
 16 najvećih vrednosti procenta mrtvih spermatozoida koji je zabeležen u grupi A ( $39,06\pm9,91\%$ ).  
 17 Procenat mrtvih spermatozoida sa oštećenim akrozomom je bio značajno manji  $p<0,05$  u C  
 18 grupi ( $23,76\pm10,45\%$ ) u odnosu na grupu A ( $39,06\pm9,91\%$ ). Između ostalih eksperimentalnih  
 19 grupa nisu ustanovljene statistički signifikantne razlike ( $p>0,05$ ). Kod svih eksperimentalnih  
 20 grupa je zabeleženo visoko variranje, koje je bilo najveće u eksperimentalnoj grupi B  
 21 (55,55%), a najmanje u grupi A (25,38%). Visoko variranje podataka i relativno mala dubina  
 22 statističkih serija doprinelo je izostanku statistički signifikantnih razlika između srednjih  
 23 vrednosti ovog parametra registrovanih u ostalim grupama. Analizom prosečnih vrednosti  
 24 procenta spermatozoida sa neoštećenom membranom ustanovljeno je da je najveće  
 25 vrednosti imala eksperimentalna grupa B ( $49,23\pm21,20\%$ ), dok je najmanji procenat ovih  
 26 spermatozoida zabeležen u grupi A ( $41,46\pm10,20\%$ ). Između eksperimentalnih grupa nisu  
 27 ustanovljene statistički signifikantne razlike u srednjim vrednostima ( $p>0,05$ ). Najveće  
 28 variranje, koje izlazi izvan granica homogenosti statističke serije, zabeleženo je u  
 29 eksperimentalnim grupama B (43,06%) i C (21,07%). Analizom prosečnih vrednosti procenta  
 30 spermatozoida sa oštećenom membranom ustanovljeno je da je eksperimentalna grupa A  
 31 imala najveće srednje vrednosti ovog parametra ( $58,64\pm10,26\%$ ), dok je najmanji broj  
 32 spermatozoida sa oštećenim membranama registrovan u grupi B ( $50,78\pm21,20\%$ ). Između  
 33 eksperimentalnih grupa nisu ustanovljene statistički signifikantne razlike u srednjim  
 34 vrednostima ( $p>0,05$ ). Najveće variranje, koje izlazi izvan granica homogenosti statističke  
 35 serije, zabeleženo je u eksperimentalnim grupama B (41,75%) i C (34,56%).  
 36 Analiza prosečnih vrednosti brzine spermatozoida na njihovoj istinskoj putanji ukazala je da je  
 37 najveće vrednosti imala eksperimentalna grupa C ( $89,28\pm16,49\text{ }\mu\text{m/sec}$ ), dok je najmanja  
 38 vrednost zabeležena kod grupe D ( $69,46\pm10,64\text{ }\mu\text{m/sec}$ ). Samo su između ove dve grupe  
 39 ustanovljene su statistički signifikantne razlike u srednjim vrednostima ( $p<0,05$ ), dok to nije  
 40 bio slučaj između ostalih grupa ( $p>0,05$ ). Najveće variranje, koje se nalazi u granicama  
 41 homogenosti statističke serije, zabeleženo je u eksperimentalnoj grupi B (23,95%). Rezultati  
 42 analize prosečne linearne brzine spermatozoda ukazuju da je najveće vrednosti ovog  
 43 parametra imala eksperimentalna grupa C ( $48,85\pm9,27\text{ }\mu\text{m/sec}$ ), dok je najmanja srednja  
 44 vrednost zabeležena u grupi D ( $36,25\pm6,64\text{ }\mu\text{m/sec}$ ). Između eksperimentalnih grupa nisu  
 45 ustanovljene statistički signifikantne razlike u srednjim vrednostima ( $p>0,05$ ). Najveće  
 46 variranje, koje se nalazilo u granicama homogenosti statističke serije, zabeleženo je u  
 47 eksperimentalnoj grupi B (31,64%). Prosečne vrednosti srednje brzine su bile najveće u  
 48 eksperimentalnoj grupi C ( $60,32\pm10,55\text{ }\mu\text{m/sec}$ ), a najmanje u grupi D ( $46,86\pm8,01\text{ }\mu\text{m/sec}$ ).  
 49 Samo je između ove dve grupe ustanovljena statistički signifikantna razlika u srednjim  
 50 vrednostima ( $p<0,05$ ). Najveće variranje, koje se nalazilo u granicama homogenosti  
 51 statističke serije, zabeleženo je u eksperimentalnoj grupi B (28,07%). Analizom prosečnih  
 52 vrednosti amplituda lataralnog otklona ustanovljeno je da je eksperimentalna grupa D imala  
 53 najmanju srednju vrednost ovog parametra ( $2,94\pm0,29\text{ }\mu\text{m}$ ), što je statistički vrlo značajno  
 54 manje ( $p<0,01$ ) od prosečne vrednosti eksperimentalne grupe C ( $3,62\pm0,54\text{ }\mu\text{m}$ ), a značajno  
 55 manje ( $p<0,05$ ) od one u eksperimentalnoj grupi A ( $3,53\pm0,32\text{ }\mu\text{m}$ ). Eksperimentalna grupa B  
 56 ( $3,01\pm0,49\text{ }\mu\text{m}$ ) je imala vrednosti koje su značajno ( $p<0,05$ ) manje nego u eksperimentalnim  
 57 grupama A ( $3,53\pm0,32\text{ }\mu\text{m}$ ) i C ( $3,62\pm0,54\text{ }\mu\text{m}$ ). Između ostalih eksperimentalnih grupa nisu  
 58 ustanovljene statistički signifikantne razlike ( $p>0,05$ ). Najveće variranje, koje je bilo u  
 59 granicama homogenosti statističke serije, zabeleženo je u eksperimentalnoj grupi B (16,46%).  
 60

Prosečne vrednosti indeksa linearnosti su bile najveće u eksperimentalnoj grupi B ( $56,50 \pm 6,64\%$ ), a najmanje u grupi A ( $48,19 \pm 7,14\%$ ). Statistički signifikantne razlike u srednjim vrednostima su dokazane samo između ove dve grupe ( $p < 0,05$ ), ali ne i između ostalih ( $p > 0,05$ ). Najveće variranje, koje se nalazilo u granicama homogenosti statističke serije, zabeleženo je u eksperimentalnoj grupi A ( $14,81\%$ ). Analizom prosečnih vrednosti indeksa oscilacije je ustanovljeno da je eksperimentalna grupa A imala najmanju vrednost ovog parametra ( $61,18 \pm 3,58\%$ ), što je statistički vrlo značajno manje ( $p < 0,01$ ) od prosečnih vrednosti registrovanih u ostalim eksperimentalnim grupama B ( $69,74 \pm 4,74\%$ ), C ( $67,73 \pm 3,95\%$ ) i D ( $67,32 \pm 3,74\%$ ). Između ostalih grupa nisu ustanovljene statistički signifikantne razlike ( $p > 0,05$ ). U svim oglednim grupama su koeficijenti varijacija bili veoma niski. Analizom prosečnih vrednosti pravolinijskog indeksa ustanovljeno je da je najveće srednje nvrednosti ovog parametra imala eksperimentalna grupa C ( $80,82 \pm 2,44\%$ ), a najmanje grupa D ( $77,18 \pm 3,17\%$ ). Između eksperimentalnih grupa nisu ustanovljene statistički signifikantne razlike ( $p > 0,05$ ). Variranja podataka su, u svim eksperimentalnim grupama, bila mala. Najveće prosečne vrednosti prelazaka pravolinijske putanje su ustanovljene u eksperimentalnoj grupi A ( $10,51 \pm 1,87$  Hz), dok su najmanje srednje vrednosti zabeležene u grupi D ( $9,61 \pm 0,93$  Hz). Između eksperimentalnih grupa nisu ustanovljene statistički signifikantne razlike ( $p > 0,05$ ). Najveće variranje, koje se nalazilo u granicama homogenosti statističke serije, zabeleženo je u eksperimentalnoj grupi A ( $17,82\%$ ). Analizom prosečnih vrednosti procenta manježnog kretanja spermatozoida, ustanovljeno je da su one bile najveće u eksperimentalnoj grupi D ( $26,23 \pm 10,64\%$ ), dok je najmanja vrednost zabeležena kod grupe B ( $21,91 \pm 7,82\%$ ). Između eksperimentalnih grupa nisu ustanovljene statistički signifikantne razlike ( $p > 0,05$ ). Kod svih eksperimentalnih grupa je zabeleženo visoko variranje, koje je bilo najveće u eksperimentalnoj grupi D ( $40,58\%$ ), a najmanje u grupi C ( $23,02\%$ ). Ovako visoko variranje podataka i relativno mala dubina statističkih serija imali su za posledicu izostanak statistički signifikantnih razlika u srednjim vrednostima.

Analizom prosečnih vrednosti površine glave spermatozoida ustanovljeno je da je najmanju srednju vrednost imala eksperimentalna grupa A ( $25,62 \pm 1,39 \mu\text{m}^2$ ), što je bilo statistički vrlo značajno manje ( $p < 0,01$ ) od prosečne vrednosti u eksperimentalnim grupama C ( $30,73 \pm 1,23 \mu\text{m}^2$ ) i D ( $29,32 \pm 1,36 \mu\text{m}^2$ ), a značajno manje ( $p < 0,05$ ) od onih u eksperimentalnoj grupi B ( $27,60 \pm 1,38 \mu\text{m}^2$ ). Eksperimentalna grupa B ( $27,60 \pm 1,38 \mu\text{m}^2$ ) je imala vrednost koja je statistički vrlo značajno manja ( $p < 0,01$ ) od vrednosti eksperimentalne grupe C ( $30,73 \pm 1,23 \mu\text{m}^2$ ), a značajno manja ( $p < 0,05$ ) od vrednosti eksperimentalne grupe D ( $29,32 \pm 1,36 \mu\text{m}^2$ ). Između prosečnih vrednosti registrovanih u eksperimentalnim grupama C i D, nisu ustanovljene statistički signifikantne razlike ( $p > 0,05$ ). U svim eksperimentalnim grupama su ustanovljena minimalna variranja.

U drugom podpoglavlju su prikazani rezultati određivanja koncentracije teških metala u hranivima, vodi za piće i vodi korišćenju za razređivač za seme. Najmanja koncentracija cinka je utvrđena u senu kojim je hranjena grupa bikova A i iznosila je  $12 \text{ mg/kg}$ , dok su kod ostalih grupa vrednosti za koncentraciju cinka bile ali približno iste. Koncentracija žive u senu je bila najveća u grupama B i D ( $0,52$  i  $0,41 \text{ mg/kg}$ ) dok su ostalim grupama vrednosti bile četverostruko niže. Koncentracija olova u senu je bila najveća u grupi A i iznosila je  $5,4 \text{ mg/kg}$ , a najniža u grupi D ( $2,2 \text{ mg/kg}$ ). Koncentracija kadmijuma u senu je bila najniža u grupi D i iznosila je  $0,11 \text{ mg/kg}$ , dok je kod ostalih grupa bila za  $50$  do  $80\%$  viša. Kako je određivanje koncentracije teških metala vršeno u samo jednom uzorku sene nije rađena statistička analiza. Koncentracija cinka u potpunoj krmnoj smeši je bila najviša u grupama C i D ( $84$  i  $78 \text{ mg/kg}$ ), a niža u ostalim grupama ( $50$  i  $51 \text{ mg/kg}$ ). Koncentracija žive je bila veća u grupama B i D ( $0,65$  i  $0,62 \text{ mg/kg}$ ) u odnosu na grupe A i C ( $0,08$  i  $0,14 \text{ mg/kg}$ ). Koncentracija olova je bila najveća u grupi D i iznosila je  $2,5 \text{ mg/kg}$ , dok je količina kadmijuma bila najveća u grupi A i iznosila je  $0,22 \text{ mg/kg}$ . Kako je određivanje koncentracije teških metala vršeno u samo jednom uzorku koncentrovanog hraniva, korišćenog za ishranu bikova, nije rađena statistička analiza. Koncentracija cinka u vodi za piće je bila najveća u grupi D u odnosu na sve ostale grupe i iznosila je  $0,74 \text{ mg/L}$ . Koncentracija žive je u svim ispitivanim grupama bila je manja od  $0,001 \text{ mg/L}$  što je u isto vreme i granica osetljivosti metode. Koncentracija olova u vodi za piće je bila najmanja u grupi A i iznosila je  $0,012 \text{ mg/L}$ , dok je u ostalim ispitivanim grupama bila približno ista ( $0,20 - 0,22 \text{ mg/mL}$ ). Koncentracija kadmijuma u vodi za piće je bila najmanja u grupi A i bila je manja od  $0,001 \text{ mg/L}$ , dok su u ostalim grupama vrednosti bile nešto veće i približno iste. Kako je određivanje koncentracije teških metala vršeno u samo jednom uzorku vode kojom su napajani bikovi, nije rađena statistička analiza. Koncentracije žive, olova i kadmijuma u vodi koja je korišćena za pripremu

1 razređivača za seme, bile su približno iste u svim ispitivanim grupama. Jedino je  
2 koncentracija cinka bila veća u uzorku vode korišćene u centru A. Kako je određivanje  
3 koncentracije teških metala vršeno u samo jednom uzorku vode za pripremu razređivača za  
4 seme, nije rađena statistička analiza.

5 U trećem podpoglavlju su prikazani rezultati određivanja koncentracije teških metala u duboko  
6 zamrznutom semenu. Statističkom analizom koncentracije Zn u dozama semena  
7 eksperimentalnih grupa bikova je ustanovljeno da su najnižu koncentraciju Zn imali bikovi  
8 eksperimentalne grupe B ( $3,15 \pm 2,74 \mu\text{g/mL}$ ). Ona je bila vrlo značajno manja ( $p < 0,01$ ) u  
9 odnosu na koncentraciju u grupi A ( $6,44 \pm 0,57 \mu\text{g/mL}$ ) i značajno manja ( $p < 0,05$ ) u odnosu na  
10 eksperimentalnu grupu C ( $6,08 \pm 1,25 \mu\text{g/mL}$ ). Između srednjih vrednosti, registrovanih u  
11 ostalim grupama, nisu ustanovljene statistički signifikantne razlike ( $p > 0,05$ ). Koeficijenti  
12 varijacije su bili veoma visoki u grupama B (87,08%) i D (81,17%), dok su na  
13 zadovoljavajućem nivou bili u grupama A (8,79%) i C (20,58). Ovako veliki koeficijenti  
14 varijacija predstavljaju jedan od razloga za izostanak statistički signifikantnih razlika u  
15 srednjim vrednostima između ostalih eksperimentalnih grupa. Statističkom analizom  
16 koncentracije Hg u duboko zamrznutom semenu bikova ustanovljeno je da su najmanje  
17 koncentracije Hg registrovane u eksperimentalnim grupama D ( $0,03 \pm 0,01 \mu\text{g/mL}$ ) i B  
18 ( $0,04 \pm 0,01 \mu\text{g/mL}$ ) i one su bile vrlo značajno manje ( $p < 0,01$ ) u odnosu na koncentracije u  
19 grupama A ( $0,07 \pm 0,01 \mu\text{g/mL}$ ) i C ( $0,06 \pm 0,01 \mu\text{g/mL}$ ). Između ostalih grupa nisu ustanovljene  
20 statistički signifikantne razlike u srednjim vrednostima ( $p > 0,05$ ). Koeficijenti varijacije su bili u  
21 granicama homogenosti statističkih serija. Statističkom analizom koncentracije Pb, u duboko  
22 zamrznutom semenu bikova, ustanovljeno je da je najveća koncentracija olova registrovana u  
23 eksperimentalnoj grupi C ( $0,07 \pm 0,017 \mu\text{g/mL}$ ) i ona je bila vrlo značajno veća ( $p < 0,01$ ) u  
24 odnosu na sve ostale eksperimentalne grupe. Vrlo značajna razlika ( $p < 0,01$ ) je ustanovljena i  
25 između grupe A ( $0,02 \pm 0,005 \mu\text{g/mL}$ ) i grupe B ( $0,04 \pm 0,009 \mu\text{g/mL}$ ). Između ostalih grupa nije  
26 ustanovljena statistički signifikantna razlika ( $p > 0,05$ ). Koeficijenti varijacije su bili u granicama  
27 homogenosti statističkih serija izuzev u grupi D u kojoj je vrednost ovog parametra iznosila  
28 64,40%. Tokom određivanja koncentracije Cd u duboko zamrznutom semenu bikova  
29 utvrđeno je da su sve ispitivane vrednosti bile ispod granica osetljivosti metode.

30 U četvrtom podpoglavlju su prikazani rezultati mikrobiološke analize duboko zamrznutog  
31 semena. Analizom 40 uzoraka duboko zamrznutog i zatim otopljenog semena bikova, nisu  
32 izolovani aerobni mikroorganizmi.

34 U poglavlju **Diskusija**, kandidat je razmotrio dobijene rezultate sa svih aspekata od značaja  
35 za izabranu temu i istovremeno ih uporedio sa rezultatima većeg broja drugih autora,  
36 objavljenim u stranim i domaćim časopisima.

38 U poglavlju **Spisak literature** citirano je 157 relevantnih referenci novijeg datuma.

## 41 VI ZAKLJUČCI ISTRAŽIVANJA (navesti zaključke koji su prikazani u doktorskoj 42 disertaciji):

- 44 1. Srednje vrednosti procenta ukupno pokretljivih spermatozoida, ukupnog broja pokretljivih  
45 spermatozoida u dozi, procenta i broja progresivno pokretljivih spermatozoida je bio u  
46 skladu sa usvojenim normativima (Pravilnik o načinu obeležavanja sperme, načinu  
47 vođenja evidencije o proizvodnji sperme, kao i o uslovima koje mora da ispunjava  
48 sperma u pogledu kvaliteta, Službeni glasnik R.Srbije br. 38/2014) i između grupa bikova  
49 nisu dokazane statistički značajne razlike u srednjim vrednostima. Prosečan broj brzih  
50 spermatozoida u dozi je bio manji u odnosu na standardne vrednosti u svim grupama  
51 bikova.
- 52 2. Srednje vrednosti procenta živih spermatozoida, živih spermatozida sa intaktnim  
53 akrozomom, ukupnog procenta oštećenih akrozoma, spermatozoida sa  
54 protoplazmatskom kapljicom, primarno i sekundarno abnormalnih formi ćelija i ukupno  
55 patološki promenjenih spermatozoida su bile u skladu sa usvojenim normativima.  
56 Između grupa bikova nisu dokazane statistički značajne razlike u srednjim vrednostima.
- 57 3. Srednje vrednosti procenta živih spermatozoida sa oštećenim akrozomom su takođe bile  
58 u skladu sa usvojenim normativima, ali su između pojedinih grupa bikova utvrđene  
59 statistički značajne razlike u srednjim vrednostima.

4. Srednje vrednosti procenta spermatozoida sa neoštećenim hromatinom su bile niže, a sa oštećenim hromatinom više u odnosu na utvrđene standardne vrednosti. Između pojedinih grupa su utvrđene statistički značajne razlike u srednjim vrednostima.
5. Srednje prosečne vrednosti procenta živih spermatozoida u dozi i procenta živih spermatozoida sa intaktnim akrozomom su bile u skladu sa usvojenim normativima u grupama B i D, a značajno manje u grupama A i C. Procenat mrtvih spermatozoida sa intaktnim akrozomom u dozi je bio u skladu sa usvojenim normativima, a između pojedinih grupa su utvrđene statistički značajne razlike u srednjim vrednostima. Procenat mrtvih spermatozoida sa oštećenim akrozomom u dozi i ukupan broj ćelija sa oštećenim akrozomom je bio u skladu sa usvojenim normativima u grupama, B, C i D, a značajno veći u grupi A (utvrđeno testom statusa membrane spermatozoida i akrozoma protočnom citometrijom).
6. Procenat spermatozoida sa neoštećenim ili oštećenim membranama je takođe bio u skladu sa usvojenim normativima, a između grupa nisu utvrđene statistički značajne razlike u srednjim vrednostima (utvrđeno testom vitalnosti spermatozoida protočnom citometrijom)
7. Srednje vrednosti krivolinijske brzine spermatozoida su bile u granicama karakterističnim za vrstu, a pravolinijska i prosečna brzina su bile značajno manje u grupama A, B i C u odnosu na grupu D. Vrednosti za amplitudu lateralnog odklona se nisu značajno razlikovale između grupa i skladu su sa navodima iz literature.
8. Srednje vrednosti indeksa linearnosti su bile niske u svim grupama dok je indeks oscilacije bio u granicama karakterističnim za vrstu. Između pojedinih grupa su utvrđene statistički značajne razlike u srednjim vrednostima. Srednje vrednosti pravolinijskog indeksa, frekvence prelazaka pravolinijske putanje i ćelija koje ispoljavaju manježno kretanje su bile u granicama karakterističnim za vrstu i nisu se statistički značajno razlikovale između grupa.
9. Koncentracija cinka u senu je iznosila 12 mg/kg do 17 mg/kg, a u koncentrovanj hrani od 50 mg/kg do 84 mg/kg, što je znatno niže od koncentracija koje dozvoljavaju NRC, Pravilnik o kvalitetu hrane za životinje i Evropski pravilnik EC2002/32.
10. Koncentracija cinka u vodi za piće je bila u opsegu od 0,03 mg/L do 0,74 mg/L dok je koncentracija žive u svim grupama bila približno ista ( $<0,001$  mg/L). Koncentracija olova je iznosila 0,012 - 0,022 mg/L, a kadmijuma 0,0010 - 0,0014 mg/L što je značajno niže od vrednosti dozvoljenih važećim normativima
11. Koncentracije cinka, žive, olova i kadmijuma u vodi koja je korišćena za pravljenje razređivača za seme, su bile približno iste u svim ispitivanim grupama i bile su ispod donje granice osetljivosti metode ( $<0,001$  mg/L).
12. Koncentracija cinka u semenu bikova simentalske rase je u našim ispitivanjima bila u opsegu od  $3,15 \pm 2,74$  do  $6,44 \pm 0,57$  mg/kg, žive od  $0,03 \pm 0,01$  do  $0,07 \pm 0,01$  mg/kg i olova od  $0,02 \pm 0,005$  mg/kg do  $0,07 \pm 0,017$  mg/kg. Koncentracija kadmijuma je u ispitivanim uzorcima bila ispod nivoa detekcije metode ( $<0,001$  mg/kg).
13. Sadržaj teških metala u vodi za piće, vodi za pripremu razređivača za seme, hranivima i semenu bikova pripremljenom za VO je u svim uzorcima bio ispod vrednosti dozvoljenih važećim normativima a ispitivani parametri kvaliteta semena su u bili u opsegu vrednosti karakterističnih za vrstu. Korelacionom analizom nije utvrđena povezanost sadržaja ispitivanih teških metala sa parametrima kvaliteta semena.

## **VII OCENA NAČINA PRIKAZA I TUMAČENJA REZULTATA ISTRAŽIVANJA (navesti da li su dobijeni rezultati u skladu sa postavljenim ciljem i zadacima istraživanja, kao i da li zaključci proizilaze iz dobijenih rezultata):**

Dobijeni rezultati su u potpunosti u skladu sa postavljenim ciljem i zadacima istraživanja, a izvedeni zaključci jasno proizilaze iz dobijenih rezultata.

**VIII KONAČNA OCENA DOKTORSKE DISERTACIJE:**

**1. Da li je disertacija napisana u skladu sa obrazloženjem navedenim u prijavi teme?**

Doktorska disertacija mr Gorana Jakovljevića pod nazivom „Uticaj teških metala iz hrane i vode na kvalitet duboko zamrznutog semena bika“ je u potpunosti napisana u skladu sa obrazloženjem navedenim u prijavi.

**2. Da li disertacija sadrži sve elemente propisane za završenu doktorsku disertaciju?**

Doktorska disertacija sadrži sve elemente koji se zahtevaju za završenu doktorsku disertaciju.

**3. Po čemu je disertacija originalan doprinos nauci?**

Doprinos ove doktorske disertacije je u tome što postignuti rezultati ukazuju da se primenom savremenih analitičkih hemijskih metoda i metoda kompjuterizovane analize, kao što je CASA i protočne citometrije, može veoma precizno analizirati potencijalni uticaj cinka i teških metala (kadmijum, olovo i živa) na parametre kvaliteta semena bika. Ovi rezultati su značajni, kako za veterinarsku, tako i za humanu medicinu, zbog toga što primenjeni pristup pruža mogućnosti za analizu i praćenje uticaja pojedinih mikroelemenata, kao biozagađivača životne sredine, na plodnost domaćih životinja i ljudi.

**IX PREDLOG:**

**Na osnovu ukupne ocene disertacije, komisija predlaže (odabrati jednu od tri ponuđenih mogućnosti):**

**- da se doktorska disertacija prihvati a kandidatu odobri odbrana**

- da se doktorska disertacija vrati kandidatu na doradu

- da se doktorska disertacija odbije

13.06.2016.  
Beograd,

POTPISI ČLANOVA KOMISIJE

dr Slobodanka Vakanjac, vanredni profesor, Fakultet  
veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu

dr Dragan Šefer, redovni profesor, Fakultet  
veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu

dr Miodrag Lazarević, redovni profesor, Fakultet  
veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu

dr Vojislav Pavlović, redovni profesor u penziji,  
Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u  
Beogradu

dr Aleksandar Milovanović, naučni saradnik,  
Institut za veterinarstvo, Novi Sad.