

SLOVENSKÁ POĽNOHOSPODÁRSKA UNIVERZITA V NITRE

DIZERTAČNÁ PRÁCA

Ing. Ján Turčan

SLOVENSKÁ POĽNOHOSPODÁRSKA UNIVERZITA V NITRE

Rektor: prof. Ing. Mikuláš Látečka, PhD.

FAKULTA AGROBIOLÓGIE A POTRAVINOVÝCH ZDROJOV

Dekan: prof. Ing. Daniel Bíro, PhD.

Kontaminácia inseminačných dávok býkov, baranov a kancov kadmíom, zinkom, železom, olovom, niklom a meďou a jej vzťah ku kvalite spermií

Dizertačná práca

Katedra fyziológie živočíchov

Vedúci katedry: doc. MVDr. Peter Massányi, PhD.

Školiteľ: doc. Ing. Emília Kollárová, PhD.

Školiteľ – špecialista: doc. MVDr. Peter Massányi, PhD.

Ing. Ján Turčan

Nitra, 2010

Abstrakt

So zvyšovaním ľudských aktivít vstúpila do popredia aj otázka toxicity ťažkých kovov v životnom prostredí zvierat a človeka. Na druhej strane reprodukčné orgány patria medzi telesné orgány, ktoré nie sú bezpodmienečne potrebné pre život jedinca, ale slúžia k zachovaniu druhu. V súčasnej dobe sú veľmi dobre popisované vážne zmeny spôsobené prítomnosťou xenobiotík v niektorých orgánoch zvierat.

V predloženej práci sme sa zamerali na stanovenie koncentrácie kadmia, zinku, železa, olova, medi a niklu v inseminačných dávkach býkov, baranov a kancov; stanovenie výskytu patologických foriem spermii v sledovaných inseminačných dávkach a určenie závislosti medzi koncentráciou sledovaných prvkov v inseminačných dávkach býkov, baranov a kancov a vybranými parametrami kvality inseminačných dávok.

V práci sme použili 150 hlboko zmrazených inseminačných dávok od 15 dospelých plemenných býkov plemena Slovenské strakaté, 90 hlboko zmrazených inseminačných dávok od 9 dospelých plemenných baranov plemena Zošľachtená valaška a 19 čerstvých ejakulátov od dospelých plemenných kancov plemena Biela ušľachtilá. Pri stanovení kovov v biologickom materiáli boli použité metódy atómovej absorpčnej spektrofotometrie. Pre analýzu výskytu patologických spermii sme zhotovovali z inseminačných dávok preparáty farbené podľa Giemsa–Romanowski. Preparáty sme posudzovali na optickom mikroskope pri 450 násobnom zväčšení. Patologicky zmenené spermie sme zoraďovali do klasifikačnej tabuľky patologických (morfologicky malformovaných) foriem spermii.

Analýza koncentrácie vybraných prvkov v zmrazených inseminačných dávkach býkov preukázala, že priemerná koncentrácia medi je $1,694 \mu\text{g.ml}^{-1}$, železa $39,295 \mu\text{g.ml}^{-1}$, zinku $85,893 \mu\text{g.ml}^{-1}$, kadmia $0,103 \mu\text{g.ml}^{-1}$, olova $0,062 \mu\text{g.ml}^{-1}$ a niklu $0,124 \mu\text{g.ml}^{-1}$. Na základe morfolologickej analýzy tvoria inseminačné dávky býkov v 88,2% normálne spermie a 11,8% tvoria morfologicky zmenené resp. patologické spermie. Z celkového počtu patologických spermii býka sme zistili, že 32,63% tvoria hlavičky bez bičíka, 23,97% tvorí torzo bičíka, 17,29% tvorí kľučkovité stočenie bičíka, 5,01% tvorí zlomený bičík, 3,98% tvorí klbko bičíka, 1,61% je retencia cytoplazmatickej kvapky a 15,51% tvoria iné abnormálne spermie. Korelačná analýza preukázala silnú koreláciu v inseminačných

dávkach býkov medzi koncentráciou železa a koncentráciou zinku a koncentráciou niklu a hlavičkami bez bičika.

Analýza koncentrácie vybraných prvkov v zmrazených ejakulátoch baranov preukázala, že koncentrácia medi je $2,565 \mu\text{g.ml}^{-1}$, železa $41,530 \mu\text{g.ml}^{-1}$, zinku $62,274 \mu\text{g.ml}^{-1}$, kadmia $0,124 \mu\text{g.ml}^{-1}$, olova $0,361 \mu\text{g.ml}^{-1}$ a niklu $0,320 \mu\text{g.ml}^{-1}$. Na základe výsledkov tvoria inseminačné dávky baranov v 82,83% normálne spermie a 17,17% tvoria morfológicky zmenené resp. patologické spermie. Z celkového počtu patologických spermií baranov sme zistili, že 54,05% tvoria hlavičky bez bičika, 19,04% tvorí torzo bičika, 11,01% tvorí kľučkovité stočenie bičika, 3,49% tvorí zlomený bičik, 2,68% tvorí klbko bičika, 1,40% je retencia cytoplazmatickej kvapky a 8,33% tvoria iné abnormálne spermie. Korelačná analýza preukázala silnú koreláciu v ejakulátoch baranov medzi koncentráciou olova a koncentráciou kadmia, koncentráciou niklu a hlavičkami bez bičika, koncentráciou medi a koncentráciou niklu, koncentráciou medi a hlavičkami bez bičika a koncentráciou železa a torzom bičika.

Analýza koncentrácie vybraných prvkov v čerstvých ejakulátoch kancov preukázala, že koncentrácia medi je $1,678 \mu\text{g.ml}^{-1}$, železa je $16,511 \mu\text{g.ml}^{-1}$, zinku $175,659 \mu\text{g.ml}^{-1}$, kadmia $0,521 \mu\text{g.ml}^{-1}$, olova $0,020 \mu\text{g.ml}^{-1}$ a niklu $0,082 \mu\text{g.ml}^{-1}$. Na základe výsledkov tvoria inseminačné dávky kancov v 91,72% normálne spermie a 8,28% tvoria morfológicky zmenené resp. patologické spermie. Z celkového počtu patologických spermií kanca sme zistili, že 38,41% tvoria hlavičky bez bičika, 10,63% tvorí torzo bičika, 27,29% tvorí kľučkovité stočenie bičika, 5,07% tvorí zlomený bičik, 10,27% tvorí klbko bičika, 2,78% je retencia cytoplazmatickej kvapky a 5,55% tvoria iné abnormálne spermie. Silné korelácie sme v sledovaných inseminačných dávkach kancov nezistili.

Dosiahnuté výsledky jasne dokazujú negatívny účinok vybraných prvkov na kvalitu inseminačných dávok a možné environmentálne faktory ovplyvňujúce reprodukčné ukazovatele.

Abstract

With increasing activities of human populations also the question of heavy metal toxicity in environment of animals and humans raised attention. On the other hand, the reproductive organs belong to body organs which are not unconditionally essential for individual life, but they serve for the preservation of species. In present the serious alterations caused by the occurrence of xenobiotics in various animal organs are quite well described.

In present study we have focused on the determination of cadmium, zinc, iron, lead, copper and nickel concentration in insemination doses of bulls, rams and boars; determination of the occurrence of pathological spermatozoa in analyzed insemination doses and determination of the correlation between the concentration of analyzed elements in insemination doses of bulls, rams and boars and selected parameters of insemination doses quality.

In the study 150 deeply frozen insemination doses from 15 adult breeding bulls of the Slovak Pied breed, 90 deeply frozen insemination doses from 9 adult breeding rams of Improved Valachian breed and 19 fresh semen samples of adult breeding boars of White Improved breed were used. For determination of elements in biological material the methods of atomic absorption spectrophotometry were used. For the analysis of the occurrence of pathological spermatozoa in insemination doses slides stained according to Giemsa–Romanowski were prepared. The slides were evaluated on the optical microscope at the magnification 450x. Pathological spermatozoa were classified to the evaluation table of pathological (morphological malformed) spermatozoa forms.

Analysis of the concentration of selected elements in frozen bull insemination doses demonstrated that the average concentration of copper is $1.694 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, iron $39.295 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, zinc $85.893 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, cadmium $0.103 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, lead $0.062 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ and nickel $0.124 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Morphological analysis detected that in bull insemination doses 88.20% form normal spermatozoa and 11.80% form morphologically altered, resp. pathological spermatozoa. From the total number of bull pathological spermatozoa 32.63% form separated flagellum, 23.97% flagellum torso, 17.29% knob twisted flagellum, 5.01% broken flagellum, 3.98%

flagellum ball, 1.61% retention of cytoplasmic drop and 15.51% form other abnormal spermatozoa. Correlation analysis detected high correlation in bull insemination doses between the concentration of iron and concentration of zinc and between the concentration of nickel and separated flagellum.

Analysis of the concentration of selected elements in frozen ram insemination doses demonstrated that the average concentration of copper is $2.565 \mu\text{g.ml}^{-1}$, iron $41.530 \mu\text{g.ml}^{-1}$, zinc $62.274 \mu\text{g.ml}^{-1}$, cadmium $0.124 \mu\text{g.ml}^{-1}$, lead $0.361 \mu\text{g.ml}^{-1}$ and nickel $0.320 \mu\text{g.ml}^{-1}$. Morphological analysis detected that in ram insemination doses 82.83% form normal spermatozoa and 17.17% form morphologically altered, resp. pathological spermatozoa. From the total number of ram pathological spermatozoa 54.05% form separated flagellum, 19.04% flagellum torso, 11.01% knob twisted flagellum, 3.49% broken flagellum, 2.68% flagellum ball, 1.40% retention of cytoplasmic drop and 8.33% form other abnormal spermatozoa. Correlation analysis detected high correlation in ram insemination doses between the concentration of lead and concentration of cadmium, between the concentration of copper and concentration of nickel, between the concentration of nickel and separated flagellum, between the concentration of copper and separated flagellum and between the concentration of iron and flagellum torso.

Analysis of the concentration of selected elements in fresh boar semen doses demonstrated that the average concentration of copper is $1.678 \mu\text{g.ml}^{-1}$, iron $16.511 \mu\text{g.ml}^{-1}$, zinc $175.659 \mu\text{g.ml}^{-1}$, cadmium $0.521 \mu\text{g.ml}^{-1}$, lead $0.020 \mu\text{g.ml}^{-1}$ and nickel $0.082 \mu\text{g.ml}^{-1}$. Morphological analysis detected that in boar insemination doses 91.72% form normal spermatozoa and 8.28% form morphologically altered, resp. pathological spermatozoa. From the total number of boar pathological spermatozoa 38.41% form separated flagellum, 10.63% flagellum torso, 27.29% knob twisted flagellum, 5.07% broken flagellum, 10.27% flagellum ball, 2.78% retention of cytoplasmic drop and 5.55% form other abnormal spermatozoa. Correlation analysis detected any high correlation in boar semen doses.

Obtained results clearly demonstrate the negative effect of selected elements on the insemination doses quality and possible environmental factors effecting reproductive parameters.

Touto cestou vyslovujem úprimné poďakovanie doc. Ing. Emílii Kollárovej, CSc., školiteľke, za pomoc pri realizácii tejto práce, doc. MVDr. Petrovi Massányimu za pripomienky a námety a všetkým kolegom z Katedry fyziológie živočíchov za ústretovosť a usmerňovanie počas vykonávania analýz a spracovania výsledkov.

OBSAH

ÚVOD	9
1 PREHLAD O SÚČASNOM STAVE RIEŠENEJ PROBLEMATIKY	10
1.1 VYMEDZENIE ZÁKLADNÝCH POJMOV	10
1.2 MORFOLÓGIA SPERMIÍ	12
1.2.1 Hlavička spermií	13
Nukleoplazma	14
Akrozóm	16
Postakrozómová čiapočka	17
1.2.2 Bičík	17
Centriolový (implamtačný) oddiel	18
Mitochondriálny (spojovací) oddiel	19
Hlavný oddiel	19
Koncový (terminálny) oddiel	20
1.3 VÝVOJ SPERMIÍ – SPERMATOGENÉZA	21
Rozmnožovanie	21
Meióza	23
Metamorfóza (spermiogenéza)	26
1.4 VLASTNOSTI EJAKULÁTU BÝKA A BARANA	28
Makroskopické vyšetrenie ejakulátu býka a barana	28
Mikroskopické a biochemické vyšetrenie ejakulátu býka a barana	30
1.5 VLASTNOSTI EJAKULÁTU KANCA	32
Makroskopické vyšetrenie	32
Mikroskopické a biochemické vyšetrenie	32
Morfologické vyšetrenie	34
1.6 FAKTORY OVPLYVNÚJÚCE REPRODUKCIU SAMCOV	35
Meď	36
Železo	39
Zinok	40
Kadmium	42
Olovo	46
Nikel	49
2 CIELE PRÁCE	52
3 MATERIÁL A METÓDY	53
4 VÝSLEDKY	56
4.1 ANALÝZA ZMRAZENÝCH (ID) EJAKULÁTOV BÝKOV	56
4.2 ANALÝZA ZMRAZENÝCH (ID) EJAKULÁTOV BARANOV	61
4.3 ANALÝZA ČERSTVÝCH (ID) EJAKULÁTOV KANCOV	66
5 DISKUSIA	72
6 NÁVRH NA VYUŽITIE POZNATKOV PRE ĎALŠÍ ROZVOJ VEDY	85
7 ZÁVER	87
8 POUŽITÁ LITERATÚRA	89
9 ZOZNAM PUBLIKOVANÝCH PRÁC AUTORA SÚVISIACICH S RIEŠENOU PROBLEMATIKOU	107

ÚVOD

Jedným z ekologických fenoménov najmä druhej polovice 20. storočia je skutočnosť, že človek musí koexistovať s nadmerným množstvom chemických látok od začiatku embryonálneho vývoja až po smrť. Činnosť ľudstva, predovšetkým niektoré oblasti ako je priemyselná činnosť, energetika, doprava, ale aj poľnohospodárska produkcia sú trvalým a dá sa povedať stále sa zvyšujúcim zdrojom cudzorodých látok, ktoré sa dostávajú do životného prostredia a do potravy. Tieto látky, aj keď sú súčasťou neživej prírody a v malých množstvách sa nachádzajú aj v živej hmote, pri relatívne nízkych koncentráciách nepriaznivo ovplyvňujú činnosť buniek, orgánov a tým aj funkcie celého organizmu.

Medzi cudzorodé látky, ktorých je veľké množstvo, patria aj ťažké kovy. Väčšina z nich je pre organizmy škodlivá. Mnohé sú značne toxické pre človeka, pre zvieratá, ale aj pre rastliny. Ich nebezpečnosť zvyšuje sumačný účinok, lebo sa ukladajú v organizmoch. Významným zdrojom týchto látok, nebezpečných predovšetkým pre ľudí, je potravinový reťazec.

S rastúcim stupňom znečistenia životného prostredia sa záujem o dôsledky pôsobenia toxických látok na živé systémy všeobecne, a konkrétne na človeka, zvyšuje. Keď sa ióny kovu dostanú do tela človeka, vstupujú do interferencie s metabolickými dráhami, prípadne sa ukladajú v rôznych tkanivách a orgánoch.

Problém spočíva v tom, že ťažké kovy zvieratá a človek svojimi zmyslami v potrave nie sú schopní priamo rozpoznať. Ani vyššie koncentrácie zmyslami nezistia. Preto sa prijímaniu takýchto látok nevedia priamo a bezprostredne brániť. Človek sa musí spoliehať na celospoločenskú ochranu, ktorá okrem iného spočíva v monitorovaní výskytu týchto látok v životnom prostredí. Zákernosť pôsobenia ťažkých kovov spočíva v tom, že okrem akútnych intoxikácií, ktoré sú vzácne, sa tieto látky v tele hromadia, kumulujú a organizmus postupne menia.

1 PREHLAD O SÚČASNOM STAVE RIEŠENEJ PROBLEMATIKY

1.1 VYMEDZENIE ZÁKLADNÝCH POJMOV

Spermia sa skladá z dvoch základných častí, a to z hlavičky a z bičíka. Základ hlavičky tvorí jadro, prednú časť hlavičky pokrýva akrozóm. Bičík sa skladá zo štyroch oddielov: centriolového (krčka), mitochondriálneho, hlavného a koncového.

Podľa Goulda et al. (1975) spermie býka, barana, kanca a žrebca sa zaraďujú do tretej skupiny cicavčích spermií charakteristických pravidelne oválnou, sploštenou a relatívne rovnako hrubou hlavičkou.

Rozmery spermií uvedených druhov v priemerných hodnotách podľa Gamčíka et al. (1992) sú v tabuľke:

Tabuľka 1 – Rozmery spermií u niektorých druhov zvierat

Druh	Hlavička (µm)			Bičík (µm)	
	Dĺžka	Šírka	Mitochondriálna časť	Hlavná časť	Koncová časť
Kanec	8,5	4,25	10,00	30,0	53,0
Býk	8,5 – 10,0	4,0 – 4,25	14,84	40,0 – 50,0	72,0
Baran	8,2	4,25	14,00	40,0 – 50,0	70,0
Žrebec	5,0 – 8,0	2,4 – 4,6	8,0 – 10,0	30,00 – 43,00	57,4 – 63,6

V definícii používania opisovaných termínov sa vychádza z nomenklatúry podľa Roosena–Rungeho (1962), Fawceta (1975) a Clermonta (1972). Pod pojmom spermatogéza sa rozumie vývoj samčej pohlavnej bunky domácich cicavcov. V tomto procese sa relatívne málo diferencované kmeňové bunky spermatogónie transformujú na spermie. Počas priebehu spermatogenézy sa rozlišujú 3 základné fázy alebo etapy: spermatocytogenéza, meióza a spermiogenéza (metamorfóza). Prvú prezentujú spermatogónie tvoriace postnatálne mitotické štádium, teda fázu množenia, druhú spermatocyty, ktoré sú v meiotickej fáze zrenia a spermatídy reprezentujú tretiu

postmeiotickú fázu spermatogenézy. Medzi prvou a druhou fázou sa dá opísať fáza rastu, ktorá zahŕňa profázu prvého zrecieho delenia meiózy.

Pod spermiocytoγένézou niektorí autori (Klika et al., 1988) zahŕňajú opakované delenie semenných buniek vrátane redukčného delenia. Spermiogénézou sa v anglickej literatúre označuje proces premeny spermatidy v spermiiu. V nemeckej literatúre sa používa aj názov spermiogenesis. Bishop a Walton (1960) pomenovali tento proces spermatoleosis. V staršej nemeckej literatúre sa pod názvom spermiogenesis rozumie celý vývoj samčej pohlavnej bunky. Zmysel tohto názvu sa často využíva aj v našej literatúre. Ide o synonymum anglického spermatogenesis. V súčasnosti sa na celom svete zaužíval názov spermiogenesis v zmysle vývoja spermatidu (Massányi, 1991).

Pod spermiáciou sa rozumie uvoľňovanie sa spermie do lúmenu semenotvorného kanálíka (Amann, 2010). Cyklom semenotvorného epitelu sa označuje séria zmien na danom úseku semenotvorného kanálíka od určitého formovania sa buniek po jeho opätovné objavenie sa. Dĺžka spermatogenézy je najkratší čas od prvého delenia sa bunky až po spermiáciu. Trvá aspoň 4 cykly. Štádiá cyklu sú charakteristické zoskupením jednotlivých druhov pohlavných buniek semenotvorného kanálíku. V semenotvorných kanálikoch býka, kanca, barana, psa a hlodavcov sa dá rozoznať 8 štádií. Prvé prirodzené štádium sa začína miznutím spermii zo semenotvorného kanálíka a prítomnosťou iba okrúhlych spermatíd. Leblond a Clermond (1952) podľa zafarbenia akrozómového systému zaviedli rozdelenie cyklu na jednotlivé stupne. Ako generácia sa definuje skupina morfoloicky podobných buniek v približne rovnakom štádiu vývoja spermatogenézy a za spermatogenetické vlny sa označujú bunkové asociácie pozdĺž semenotvorného kanálíka.

Výsledkom spermatogenézy je spermia. K predstave o jej normálnej morfológii sa dospelo na základe mnohých pozorovaní a výsledkov prác. Akákoľvek odchýlka od normálneho stavu a štruktúry sa pokladá za anomáliu. Priemerný počet patologických zmien je veľmi variabilný a závisí od mnohých činiteľov. Každá zmena nemá rovnaký fyziologický význam. Za fyziologický výskyt možno považovať 5 – 10% zmien. Oveľa prísnejšie sa hodnotia primárne, teda testikulárne zmeny. Morfoloické zmeny vyvolávajú poruchy plodnosti vtedy, keď sa vyskytujú vo veľkom množstve trvalo pri tom istom plemenníkovi. U plemenníkov intenzívne využívaných na umelú insemináciu nesmie

ejakulát obsahovať viac ako 20% morfológických malformácií. Z uvedeného počtu nemajú teratoidné a primárne zmeny na hlavičke prekročiť 5%, na akrozóme 10% a nezrelých spermíí nemá byť viac ako 2% (Gamčík et al., 1992; Massányi et al., 2000).

1.2 MORFOLÓGIA SPERMIE

Spermie, samčie pohlavné bunky, vznikajú v stočených semenotvorných kanálikoch (*tubuli seminiferi contorti*) semenníka. Objavil ich v roku 1677 Leeuwenhoekov žiak Ham z Leidenu. Sám Leeuwenhoek pokladal spermie ako čulo pohybujúce sa útvary s charakteristickou stavbou za primitívne zárodoky, ktoré v semene parazitujú. Od neho pochádza tiež starší, dosiaľ niekedy používaný názov samčej pohlavnej bunky – *spermatozoon* (v latinskej forme *animaculum seminis* – semenné zvieratko). Podľa vtedajších predstáv mala hlavička tohoto semenného zvieratka obsahovať miniatúru celého ľudského individua (Toman a Massányi, 1997).

Až neskôr v roku 1780 dokázal Spallanzani pomocou umelej inseminácie oplodňovaciu schopnosť samčieho semena, ktorú však neprisudzoval spermíám, ale chemickému vplyvu semennej plazmy na vajíčko. Tento názor vyvrátili až Prévost a Dumas v roku 1824, ktorí dokázali, že fertilizačnú schopnosť majú spermie (Massányi, 1991).

Rozvoj mikroskopickej techniky umožnil ďalej prehĺbovať štúdium morfológických vlastností spermíí a bližšie poznať ich štruktúru. Väčšina základných poznatkov o tvare a základnej štruktúre spermíí rôznych druhov samcov pochádza z klasických prác na sklonku 19. a začiatku 20. storočia, z obdobia svetelného mikroskopu. Sú to najmä práce Leydiga, Jensena, Bendu a Retziusa. Súčasný poznatky o štruktúre a ultraštruktúre spermíí sú výsledkom štúdií mnohých autorov a pochádzajú hlavne z obdobia po II. svetovej vojne. Významnú úlohu v štúdiu morfológie zohral elektrónový mikroskop. Prostredníctvom neho sa dospelo k poznaniu ultraštruktúry spermie, čím sa v podstate doriešila nielen funkcia spermie ako celku, ale aj jej jednotlivých častí.

Normálna spermia sa skladá z dvoch základných častí: hlavičky a bičička. Hlavička spermie sa počas spermiogenézy vytvára hlavne z jadra spermatídy, takže základným

materiálom hlavičky je jadro. Na prednej časti je hlavička pokrytá obalom – akrozómom, v zadnej časti len cytoplazmatickou membránou a postakrozomálnou čiapkou. Celú hlavičku pokrýva bunková membrána, ktorá prechádza na bičík.

Bičík spermie sa skladá zo 4 hlavných oddielov: centriolového (implantačného) oddielu, spojovacieho (mitochondriálneho) oddielu, hlavného oddielu a koncového (terminálneho) oddielu.

Spermie jednotlivých druhov samcov domácich zvierat majú rozličnú veľkosť a tvarové odchýlky. Priemerná dĺžka spermie sa pohybuje v rozpätí 55 – 75 μm . Hlavička zaberá takmer polovicu hmotnosti spermie. Na hlavičku pripadá 51% a na bičík 49% celkovej hmotnosti spermie (Massányi, 1991).

1.2.1 HLAVIČKA SPERMIE

V procese oplodnenia má hlavička spermie významnú funkciu. Jej úlohou je preniesť dedičný materiál lokalizovaný v nukleoplazme, pričom je potrebný správne vyvinutý a intaktný akrozomálny systém a nukleoplazma.

Hlavička spermie sa skladá z týchto častí: nukleoplazma (jadro) štrukturálneho pôvodu, akrozomálneho systému a postakrozomálnej čiapočky (Massányi, 1991).

Hlavička spermie býka má tvar tenisovej rakety. Predstavuje silne sploštený ovál, ktorý pri plošnej projekcii je širší na apikálnom okraji než pri báze hlavičky na mieste spojenia s bičíkom. Na sagitálnom priereze má hlavička tvar pretiahnutého úzkeho klinu, ktorý je pri báze hlavičky najširší a postupne sa zužuje. Tvarom sa hlavička býka veľmi podobá hlavičke spermie barana a capa. Hlavičky spermie kanca, žrebca a psa sú podobné, majú skoro pravidelný oválny tvar, no v porovnaní so spermiou býka sú o niečo užšie a kratšie. Hlavička spermie hydiny má cylindrický tvar, vpredu s hrotom (Massányi, 1991; Bochenek et al., 2001).

Tvar hlavičky spermie je podmienený tvarom kondenzovanej nukleoplazmy. Výnimku tvorí mierne zdvihnutý a zhrubnutý apikálny okraj podmienený zhrubnutím akrozómu. Tento útvar nazývaný apikálne teliesko bol nájdený pri býkoch, baranoch a králikoch, hlavičky spermie psa, žrebca a zajaca toto zhrubnutie nemajú.

Elektrónovomikroskopické výskumy dokazujú, že hlavička spermie býka je skoro symetrická, pričom asymetrická hlavička sa pokladá za chorobný prejav a príčinu porúch plodnosti (Kojima, 1978).

Nukleoplazma

Nukleoplazma vyplňa celé jadro hlavičky spermie. Jej štruktúra je homogénna a kompaktná. V jadre hlavičiek spermií sa nachádza otcovský dedičný materiál v kondenzovanej forme, viazaný na DNA. Jadro hlavičiek má významnú afinitu k nukleárnym farbivám (fuchsín, hematoxylín), silne absorbuje ultrafialové lúče a dáva Feulgenovu reakciu a reakciu akridínovou oranžou. Je rezistentné na pôsobenie deoxyribonukleázy a ľahko sa rozpúšťa v NaOH. V jadre sa okrem chromatinu (asi 45%) nachádza ešte bielkovina bohatá na arginín (Harrison et al., 2005).

Jadro hlavičiek spermií sa odlišuje od jadra somatických buniek tým, že má polovičný (haploidný) obsah DNA a ďalej tým, že chromatin nemá usporiadaný vo forme vlákien, ale vo forme compactnej masy. Jadrová tekutina sa v nukleoplazme spermií nenachádza. Hlavička takto pripomína tzv. pyknotické jadrá. Strata tekutých častí z jadra sa prejavuje znížením mernej hmotnosti spermií, ktorá sa po ich dozretí mení od 1,240 do 1,334. Cytofotometrické výsledky z merania DNA dokazujú, že intenzita sfarbenia jadra Feulgenovou reakciou sa zvyšuje od vrcholu hlavičky ku jej báze, od ukazovateľa 0,2 – vrchol do 0,4 – báza (Massányi, 1991).

Chromozómy charakteristické pre deliace sa jadro alebo chromatinové vlákna intermitotického jadra všetkých ostatných somatických buniek nemožno diferencovať ani pri použití elektrónového mikroskopu, takže jadro spermie sa javí homogénne. Nitkovité chromozómy sa zistili v spermiách pstruhov po pôsobení niektorých rozpúšťadiel. V spermiách kohúta natrávených pepsínom, ktorý rozpúšťa obal a bielkoviny hlavičky, možno vidieť sieť chromatinových nití zodpovedajúcich chromonémam – vláknam, z ktorých sú zložené chromozómy. Tieto poznatky poukazujú na to, že napriek údajom o homogénnosti a kompaktnosti nukleoplazmy spermie táto pozostáva z chromatinových vlákien, ktoré možno zistiť špeciálnymi metodikami (Harrison et al., 2005).

Experimentálnym pôsobením niektorých látok sa zistila granulárna štruktúra nukleoplazmy aj v spermiiach cicavcov. Pri veľkom zväčšení v elektrónovom mikroskope vidieť, že granuly sú vlastne kľbká tvorené veľmi jemnými vláknami. Ako je známe z procesu oplodnenia, jadro sa po vniknutí spermie do vajíčka rýchlo rozpadne na chromatinové vlákna a dostane podobu chromatinu somatických buniek. Tento stav trvá len veľmi krátko a z chromatinu samičieho a samčieho prvojadra sa vytvoria chromozómy, ktorých počet a tvar závisí od druhu zvierat a je špecifický (Massányi, 1991).

V nukleoplazme spermii môžeme príležitostne pozorovať menšie alebo väčšie svetlé prázdne miesta, tzv. vakuoly. Vakuoly sa najčastejšie nachádzajú na apikálnom okraji a ekvatoriálnom segmente hlavičky spermie. Možno ich pozorovať už počas formovania sa hlavičky v tretej fáze metamorfózy spermatídy. Ich priemer je 0,1 – 0,2 μm . Väčšie vakuoly možno vidieť svetelným, menšie vakuoly elektrónovým mikroskopom. Vakuoly sa môžu vyskytovať pri 2 – 80% spermii, vyššie percento výskytu má vplyv na plodnosť. Zatiaľ sa zistili v spermiiach býka, žrebca, kanca, králik a muža. Hoci pri niektorých druhoch, napr. u človeka, je výskyt vakuol v nukleoplazme spermii pomerne častý, tento jav je nenormálny a vakuoly treba zaradiť medzi primárne štrukturálne malformácie spermii (Gamčík et al., 1992; Escrich et al., 2009).

Jadro obaluje nukleárna membrána, ktorá je dvojvrstvomá, pri báze hlavičky o niečo silnejšia. Jadrové póry, ktoré sú miestom výmeny materiálu medzi jadrom a cytoplazmou, sa v spermiiach nevyskytujú, okrem malého úseku v okolí tzv. bazálnych teliesok. Tieto telieska predstavujú malé množstvo fibrilárneho chromatinu uloženého na báze hlavičky. Ich význam je nejasný. Predpokladá sa, že v spermiiach cicavcov sú jediným miestom, kde je možná syntéza informačnej RNA. Bazálne telieska sa zistili v spermiiach býka, kanca, niektorých druhov opíc a niektorých hlodavcov. Nevyskytujú sa v spermiiach človeka a žrebca (Massányi, 1991).

Akrozóm

Akrozóm pokrýva prednú časť hlavičky spermie. Je to cytoplazmatický útvar čiapočkovitého tvaru, ktorý sa nachádza medzi bunkovou a nukleárnou membránou. Akrozóm zaberá skoro 50% plochy hlavičky, pri jednotlivých zvieratách sa druhovo líši. Akrozóm býka pokrýva apikálnu polovicu jadra a je ukončený ekvatoriálnym segmentom polmesiačikovitého tvaru. Akrozóm kanca pokrýva takmer 2/5 jadra a ekvatoriálny segment má polkruhovitý tvar. Objavenie sa ekvatoriálneho segmentu súvisí so starnutím, prípadne so smrťou bunky. Chorobné zmeny na akrozóme sa prejavujú zmenou fertility a môžu byť hereditárnej povahy (Gamčík et al., 1992).

Na povrchu je akrozóm pokrytý cytoplazmatickou membránou. Pod ňou sa nachádza membránová zložka akrozómu – vonkajšia a vnútorná akrozomálna membrána. Vnútorný list prebieha k jadrovej membráne. Vnútro akrozomálneho systému tvorí akrozómový materiál, predovšetkým fermenty, ktoré napomáhajú penetrácii a rozpúšťaniu obalov vajíčka (Massányi a Janisch, 1993).

Penetračná funkcia akrozómu nastáva pri kontakte spermii s vajíčkom v pohlavných ústrojoch samice. O mechanizme uvoľňovania enzýmov uložených v akrozomálnej hmote existujú v súčasnosti dve hypotézy. Podľa prvej cytoplazmatická membrána praskne na prednom okraji postnukleárnej čiapočky. Potom praskne vonkajší list membránovej zložky akrozómu pozdĺž predného okraja ekvatoriálneho segmentu. Vonkajší list membránovej zložky sa dvíha, čím sa z akrozomálneho systému umožní uvoľnenie enzýmov, ktoré rozpúšťajú *corona radiata*, *zona pellucida* a cytoplazmatický obal vajíčka. Oddelená vonkajšia membrána (*galea capitis*) sa obyčajne rozdelí na dve časti v tvare kúpovej čiapky, niekedy obe polovice zostanú pri sebe. Vnútorná membrána akrozómovej čiapočky pokrýva prednú časť – perforatórium – hlavičky spermie (Massányi, 1991). Podľa druhej hypotézy sa akrozómová membrána rozpadne, pričom sa vytvoria póry v približne rovnakých vzdialenostiach, cez ktoré sa uvoľňujú enzýmy lokalizované v akrozómovej hmote. Štúdiá procesu oplodnenia kráľika, ošípaných a človeka pomocou elektrónového mikroskopu potvrdili platnosť druhej hypotézy (Massányi, 1991).

Na označenie akrozómu sa používalo viac názvov. V roku 1898 použil Lenhosek termín akrozóm na označenie vnútornej zóny proakrozómu spermatídy a perforatória zrelej spermie. Viacerí autori používali synonymá, ako napr. akrozomálny systém, hlavičková čiapka, *galea capitis*, *perforatorium*, *spermiocalyphthrothea* a cytoplazmatická čiapočka. Príčinou používania viacerých synonym pre ten istý útvar boli nedostatočné poznatky o jeho úlohe a zložení (Massányi, 1991).

Pri dlhšom skladovaní semena podlieha akrozóm niektorým degeneratívnym zmenám, ktoré sa prejavujú zvlhčením vonkajšej akrozómovej membrány a objavením sa svetlých miest v akrozóme, a tiež jeho napučívaním. Mŕtve spermie majú poškodený akrozóm, alebo po ňom zostanú len zvyšky. Uvoľňovanie a praskanie akrozómu nastáva pri prestarnutých a nesprávne uchovávaných (konzervovaných) spermiiach (Massányi, 1991).

Postakrozomová čiapočka

Je to útvar obalujúci tú časť jadra, ktorú nepokrýva akrozóm, siaha teda do ekvatoriálneho segmentu po bázu hlavičky (asi 40% dĺžky jadra). Na neporušenej spermii je spojená s bunkovou membránou. Postakrozomálna čiapočka sa zvyrazňuje po impregnácii striebrom. Táto čiapočka predstavuje tenkú vrstvičku materiálu priliehajúceho tesne k cytoplazmatickej membráne. Materiál má asi $100 \cdot 10^{-10}$ periodicitu, čo môže pripomínať jednovrstvovú palisádu mikrotubulov v priečnom priereze. Postakrozomálna čiapočka je omnoho rezistentnejšia voči vonkajším vplyvom ako akrozóm (Massányi, 1991).

1.2.2 BIČÍK SPERMIE

Bičik ako ústroj pohybu sprostredkúva transport spermie na miesto oplodnenia. Pritom dôležitú úlohu má mitochondriálny aparát, ktorý vyrába energiu (ATP), a komplex axiálnych vlákien ako miesto, kde sa táto energia mení na mechanickú – na pohyb spermie. Bičik spermie sa delí na niekoľko častí, ktoré sa odlišujú lokalizáciou, štruktúrou a funkciou. Sú to krček spermie, spojovací, hlavný a koncový oddiel. Nové označovanie

lepšie vystihuje štruktúralnu, resp. funkčnú podstatu jednotlivých častí: centriolový alebo implantačný oddiel pre krčok a mitochondriálny alebo stredný oddiel pre spojovací oddiel (Massányi, 1991).

Centriolový (implantačný) oddiel

Je štruktúralne i vývojovo najzložitejšou časťou spermie. Jeho morfológický základ tvoria dva centrioly (proximálny a distálny) a tzv. segmentované chordy. Z oboch centriolov sa úplne zachováva len proximálny, z ktorého vznikajú segmentované i nesegmentované (hladké) chordy a pravdepodobne aj fibrózna pošva. Distálny (flagelotvorný) centriol, z ktorého vzniká axonéma, je pri zrelých spermiiach len v podobe rudimentu. Proximálny centriol so segmentovanými chordami, ktoré sa naň upínajú, vytvára hlavicu bičíka (Rocha et al., 2006).

Hlavica bičíka zapadá do implantačnej jamky na báze hlavičky, ktorá je presným negatívnym odliatkom hlavice bičíka. Vzniká tak spojenie medzi hlavičkou a bičíkom spermie podobné kĺbu. Segmentované chordy nepresahujú krčok spermie, ale sa pozvoľna zmenšujú a tupo zakončujú, pritom sa z vonkajšej strany prikladajú k hladkým chordám. Medzi segmentovanými a hladkými chordami sa tak vytvára pevné klinovité spojenie. Ďalšie oddiely bičíka spermie tvorí komplex osových vláken. Vlákna sú charakteristicky usporiadané. V strede je centrálny pár vláken, ktoré sú duté, ostatné vlákna sú usporiadané do dvoch koncentrických kruhov (Massányi, 1991).

Vnútorňý kruh tvorí 9 vláken. Tieto vlákna sú v skutočnosti dvojité, tzv. dublety. Jedno z dvojice vláken je vždy plné a označuje sa ako element A, druhé vlákno je duté, podobné trubičke (mikrotubulus) a označuje sa ako element B. Z každého elementu A vystupujú dva výbežky (ramená) smerujúce k elementu B susednej dvojice (Massányi, 1991).

Vonkajší kruh tvorí opäť 9 vláken, ktoré sú vždy plné a oveľa hrubšie ako predchádzajúce vlákna. Označujú sa ako chordy (hladké). Ich hrúbka distálnym smerom rýchlo klesá, až sa napokon slepo zakončujú. Na rozdiel od centrálnych mikrotubúl a

vláken vnútorného kruhu, ktoré prebiehajú celým bičíkom (od distálneho centriolu až do konca bičika), chordy nedosahujú ani koniec hlavnej časti bičika (Gamčík et al., 1992).

Mitochondriálny (spojovací) oddiel

Mitochondriálny oddiel je pokračovaním centriolového oddielu spermie. Distálnym smerom je ohraničený Jensenovým prstencom. Tento prsteneček sa v pozdĺžnych rezoch javí ako dva rovnoramenné trojuholníky (Gamčík et al., 1992).

Mitochondriálny oddiel charakterizuje prítomnosť mitochondrií. Množstvo a dĺžka mitochondrií je podmienená druhmi zvierat; spermia býka má túto časť bičika asi o 50% dlhšiu ako hlavičku (hlavička spermie je dlhá asi 15 μm a dosahuje hrúbku asi 0,8 μm). Mitochondriálny oddiel spermie sa skladá asi z 90 individuálnych mitochondrií, sústredených v závitnicovej pošve. Jedna mitochondria tvorí asi 3/4 závitú špirály a celá mitochondriálna pošva vytvára asi 65 – 75 závitov. Sklon špirály je v jej proximálnej časti pravidelne strmší a niekedy prvé mitochondrie majú takmer longitudinálny priebeh. Niekedy sa táto časť označuje aj ako *pars ascendens* na rozdiel od distálnej časti označovanej ako *pars spiralis*, kde priebeh závitov je menej strmý. Na konci mitochondriálnej pošvy sú mitochondrie uložené takmer cirkulárne. Mitochondriálna pošva sa priamo prikladá na chordovú sústavu komplexu osových vláken. Ich charakteristické usporiadanie je 2 + 9 + 9 a tvorí podklad mitochondriálneho oddielu (Massányi, 1991).

Hlavný oddiel

Je to najdlhšia časť bičika a celej spermie vôbec. Chordy sú v tejto časti oveľa tenšie ako na úrovni mitochondriálneho oddielu. Neustále sa stenčujú, až sa na nerovnakej výške slepo zakončia. V dôsledku toho asi poslednú 1/4 hlavného oddielu bičika tvorí iba samotná axonéma, t.j. pár centrálnych vláken – mikrotubúl a 9 dvojítych vláken usporiadaných do kruhu (Gamčík et al., 1992).

Rozsah hlavného oddielu bičika určuje prítomnosť fibróznej pošvy (analogicky s mitochondriálnym oddielom, ktorý obsahuje mitochondrie). Fibrózna pošva pokrýva

komplex osových vlákien. Podľa starších názorov vlákna tvorili súvislý celok, mali špirálovitý priebeh a vytvárali pošvu na spôsob špirály (z toho pochádza aj starší názov – *helix*). Podľa novších poznatkov získaných pomocou elektrónového mikroskopu ani keratoidná fibrózna pošva hlavného oddielu nie je pravou špirálou, podobne ako mitochondriálna pošva, ale skladá sa z dvoch častí (elementov). Prvý longitudinálny element tvoria dve vlákna, ktoré prebiehajú paralelne s osovými vláknami bičíka a stoja navzájom proti sebe. Z oboch pozdĺžnych vlákien vystupujú priečne výbežky – rebrá, ktoré z oboch strán obopínajú osovú vlákna a vytvárajú súvislý kruh. Súbor všetkých priečných výbežkov predstavuje cirkulárny element fibróznej pošvy. Fibrózna pošva zabezpečuje nielen súdržnosť osových vlákien, ale poskytuje aj pevnosť a pružnosť potrebnú na kmitanie bičíka (Massányi, 1991).

Koncový (terminálny) oddiel

Je to najdistálnejšia časť bičíka spermie. Osovú vlákna nie sú obalené nijakou pošvou, iba cytoplazmatickou membránou. Axonéma má odlišnú štruktúru. V dubletoch sa na mieste plného elementu A nachádza trubička, takže axonému tvoria dvojice mikrotubulov. Nie sú vytvorené ani ramená, čo zapríčiňuje rozpad presnej organizácie axonémy. V druhej polovici terminálneho oddielu bičíka jeden z dvoch mikrotubulov zaniká, sú tu iba jednoduché mikrotubuly. Ich počet a usporiadanie nie sú konštantné (Lv et al., 2010).

Celú spermium, hlavičku a všetky oddiely bičíka pokrýva nepreušovaná cytoplazmatická membrána. V elektrónovom mikroskope sa javí táto membrána ako dvojrstvová membránová jednotka. Cytoplazmatická membrána je veľmi citlivá na zmenu osmózy a ľahko sa poškodzuje, napr. už pri vypieraní spermií v roztoku NaCl. Pri porušení cytoplazmatickej membrány sa odkrývajú labilné systémy (akrozóm, mitochondriálny oddiel). Pri uložení spermií do hypotonického roztoku membrána napučiava do tvaru pľuzgiera a stáva sa dobre viditeľnou. Odumretím spermie vzrastá permeabilita cytoplazmatickej membrány a tento jav sa využíva na diferenciálne farbenie živých a mŕtvych spermií. Pri živých spermiách neprepúšťa cytoplazmatická membrána farbivá.

Z toho dôvodu nereagujú živé spermie na farbu, ale mŕtve spermie sa sfarbia na červeno, modro alebo fialovo, a to podľa druhu použitého farbiva. Táto metóda nedáva dobre reprodukovateľné výsledky, pretože už samo farbivo pôsobí nepriaznivo na cytoplazmatickú membránu spermií a môže zmeniť jej permeabilitu. Ak farbenie je o niečo kratšie, všetky mŕtve spermie sa nefarbia a naopak, ak je farbenie dlhšie, sfarbia sa aj živé spermie. Iné štúdie ukazujú, že zmena permeability bunkovej membrány spermií vzniká aj za fyziologických podmienok v dôsledku kapacitácie (Bedford, 1983). Živé spermie inkubované určitý čas v maternici sa sfarbia ako mŕtve. Zmena permeability cytoplazmatickej membrány spermií vzniká aj pri ich zmrazovaní (Gamčík et al., 1992).

1.3 VÝVOJ SPERMIÍ (SPERMATOGENÉZA)

Spermatogénne bunky sú početnejšie než Sertolihove bunky a tvoria hlavný typ buniek (Martiniaková et al., 2008).

Spermie sa vyvíjajú v semenotvorných kanálikoch semenníkov. Základy semenotvorných kanálikov vznikajú už počas embryonálneho vývoja v podobe semenných povrazcov. V pohlavných povrazcoch je možné rozoznať prvopohlavné bunky (gonocyty) a bunky podporné. Gonocyty sa rozmnožujú a niekoľko mesiacov pred narodením jedinca z nich vznikajú materské bunky (spermatogónie).

Spermatogéza prebieha v pravidelných cykloch a nemožno ju urýchliť ani spomaliť. Tieto cykly nasledujú za sebou v presných časových intervaloch, pričom sa každý nový cyklus začína asi o 1/4 dĺžky cyklu neskôr než predchádzajúci. V stene semenotvorných kanálikov sa vyskytujú 4 bunkové generácie, ale každá z nich je z iného spermatogénneho cyklu. Pri zvieratách s normálne vyvinutým pohlavným systémom prebieha spermatogéza po celý život a končí sa v senu (Toman a Massányi, 1997).

Spermatogénny cyklus tvorí rozmnožovanie, meióza a metamorfóza.

Rozmnožovanie

Je spojené s mnohonásobným delením a postupnou diferenciáciou buniek. Vznikajú spermatogónie dvojakého druhu: A – spermatogónie (materská bunka), Im – spermatogónie (spermatogónie intermediárneho typu) a B – spermatogónie. Spermatogónie sa mitoticky delia, pričom vznikajú spermatocyty I. radu a ich počet geometricky rastie (Toman a Massányi, 1997).

Spermatogónie sú východiskovou bunkou spermatogenézy. Predstavujú kombináciu semenotvorných buniek nachádzajúcich sa v parietálnom rade semenotvorného epitelu dotiaľ, kým sa vytvoria spermatocyty.

A – spermatogónie sú kmeňové materské bunky nachádzajúce sa na obvodě semenotvorných kanálikov. Sú to veľké bunky guľatého tvaru s malým množstvom cytoplazmy, na povrchu s chromatínom. Jadro obklopené tenkou membránou má elipsovité tvar s dlhou osou, ktorá leží paralelne so stenou tubulov. V centre jadra leží veľké jadierko.

Im – spermatogónie vznikajú delením A – spermatogónií tak, že okrem jednej dcérskej bunky, ktorá sa podobá materskej, vzniká druhá bunka vyššie diferencovaná, intermediárneho typu. Táto bunka je podobná A – spermatogónii, ale s tým rozdielom, že má menšie jadro, ktoré je bohatšie na chromatín.

B – spermatogónie sú pokračovaním spermatogónií intermediárneho typu, po niekoľkonásobnom rozdelení a rozmnožení. Tieto bunky sú charakteristické tým, že chromatín sa nachádza v blízkosti jadrovej membrány vo forme kôrovitého zhrubnutia. Od A – spermatogónie sa líši tvarom chromozómov (uzlíkovité zhrubnutie na konci) a veľkosťou, ktorá sa mení počas mitotického delenia (Lukáč et al., 2007).

Spermatocyty I. radu sú okrúhle bunky (pri hospodárskych zvieratách veľkosti 12 – 17 μm) s veľkým jadrom, ktoré sa na rozdiel od spermatogónií slabšie farbja. V semenotvornom epiteli býkov sa objavujú v 4. mesiaci a kancov v 3. mesiaci po narodení (Massányi, 1991).

Spermatocyty I. radu postupujú od obvodu semenotvorných kanálikov smerom do stredu a vytvárajú druhý rad semenotvorných buniek. V prvom rade sa nachádzajú spermatogónie (Massányi, 1991; Gamčík et al., 1992).

Meióza

Charakterizuje ju rast a zrecie delenie spermatocytov. Pri prvom meiotickom delení vznikajú zo spermatocytov I. radu spermatocyty II. radu a pri druhom delení spermatidy, posledná najpočetnejšia generácia vo vývoji spermíí (Auger, 2010).

Meióza, alebo zrecie delenie pohlavných buniek sa skladá z dvoch po sebe nasledujúcich a funkčne úzko spojených bunkových delení, ktoré sa vyznačujú zmenami na chromozómoch a ich delením. Cieľom meiózy je výmena materiálu medzi homologickými chromozómami a redukcia ich počtu, t.j. zníženie normálneho počtu chromozómov na polovicu (z diploidného na haploidný počet). Toto sa dosahuje tým, že sa chromozómy počas dvoch delení buniek len raz úplne rozštiepia (Gamčík et al., 1992).

Prvé meiotické delenie sa týka spermatocytov I. radu. Je charakteristické veľmi dlhou profázou zloženou z leptoténneho, zygoténneho, pachyténneho, diploténneho štádia a diakinézy, pokračuje metafázou, anafázou a telofázou (Toman a Massányi, 1997).

Začiatok tohto zložitého delenia sa prejavuje v rozčleňovaní chromatinovej vrstvy pod jadrovou membránou spermatocytov I. radu na chromatinové vlákna. Špiralizované chromozómy sú v plnom (diploidnom) počte a podobajú sa hrubým tyčinkám alebo guľôčkam. V leptoténnom štádiu nastáva dešpiralizácia chromozómov. Tieto sa predlžujú na veľmi dlhé, tenké vlákna. Centromérmi sa sústreďujú na okraj jadra, blízko centriolu a vytvárajú takto tzv. leptoténny buket, druhé konce sú voľné. V chromonémach (základné vlákna chromozómov) sa začína syntéza DNA. Zygoténne štádium charakterizuje približovanie homologických dvojparov chromozómov (vždy dva a dva homologické chromozómy z každej sady), pričom vznikajú dvojice, tzv. bivalentné chromozómy. Párovanie (konjugácia) chromozómov je dôležitý prejav meiózy, čím sa líši od mitózy. Buketové usporiadanie sa nemení a vzniká zygoténny buket. Chromoméry (korálikovité útvary sú akoby navlečené na chromonému) sa začínajú nasycovať DNA. Pachyténne

štádium je obdobím meiózy, pri ktorom sa bivalentné (párované) chromozómy opäť skracujú a hrubnú. Každá z ich chromatíd sa pozdĺžne rozštiepi na dve polovice. Vzniká útvar, ktorý tvoria 4 chromatídy (zodpovedajú naďalej bivalentným chromozómom), označuje sa ako chromatídová tetráda. Diploténne štádium – je z genetického hľadiska najdôležitejšie štádium meiózy, pri ktorom sa chromatídy tetrád ovijajú, na niektorých úsekoch sa dotýkajú a na iných sa vzdávajú. Miesto dotyku a prekríženia chromatíd sa nazýva chiazma. Týmto procesom sa vysvetľuje výmena materiálu medzi jednotlivými chromozómami, tzv. crossing-over (prekríženie chromozómov), a tak aj kombinácia dedičných znakov. Prebieha ďalšia špiralizácia chromoném a nasycovanie chromomér DNA. Chiazmy sa posúvajú ku koncom chromozómov následkom odpudzovania sa homologických chromozómov (Massányi, 1991).

V tomto štádiu nastáva výmena určitých chromatídových úsekov. V štruktúre i v tvare rekombinovaných chromozómov sa nepozorujú nijaké zmeny. Pokiaľ je génové zloženie vymenených častí homozygotné, v genotype nenastáva žiadna zmena – pri neimbredných druhoch hospodárskych zvierat je to veľmi vzácny jav. V prípade heterozygotného zloženia vymenených úsekov v genotype zvierat nastávajú závažné dôsledky, zvlášť ak ide o väzbové zmeny. Nie každé pretrhnutie chromatíd musí mať za následok crossing-over (Gamčík et al., 1992).

Diakinéza je posledné štádium meiotickej fázy. Bivalentné chromozómy sa maximálne kontrahujú a vytvárajú guľovité útvary, z ktorých vystupujú ich centromérové konce. Bivalentné chromozómy sa formujú do ekvatoriálnej roviny, ich centromérové konce sa dislokujú, až dosiahnu protilahlé postavenie (premetafáza). Bivalentné chromozómy zostávajú v ekvatoriálnom postavení. Vnútoraná štruktúra chromozómov tvoriacich bivalenty je vplyvom pokračujúceho nasycovania DNA málo výrazná. Jadrová membrána sa rozpúšťa, jadierko dosiaľ viditeľné sa stráca, v priestore jadra sa diferencuje deliace vretienko a nastáva fáza heterotypického delenia – metafáza. V tomto vývojovom období spermatocytu I. radu mizne jadrová membrána a chromatídy sa zhromažďujú do ekvatoriálnej roviny nie svojimi centromérmi, ale terminalizovanými chiazmami (terminalizácia – posun chiazmiem ku koncom chromozómov vplyvom odpudzovania homologických chromozómov od seba a redukcia ich počtu). V metafáze sú chromozómy

krátke a bez štruktúry (pozorovateľné aj v svetelnom mikroskope). V anafáze sa bivalentné chromozómy (tetrády) rozdeľujú na svoje pôvodné časti – diády, ktoré prechádzajú k opačným pólom bunky, nastáva redukcia počtu chromozómov. Z každého bivalentu tvoreného homologickými chromozómami ide ku každému chromozómu len jeden, to znamená, že v profáze sa spárované homologické chromozómy po výmene materiálu a neúplnom rozštiepení opäť rozchádzajú, a to každý z páru do inej dcérskej bunky. Dcérske jadrá v telofáze obsahujú už len polovičný počet chromozómov – diád. Posun chromozómov k pólom je celkom náhodný a nezávislý (Massányi, 1991).

Po krátkej interkinéze, ktorá je medzifázou medzi končiacim sa heterotypickým a začínajúcim homotypickým delením, sa z rozdeleného spermatocyty I. radu diferencujú dve haploidné bunky – spermatocyty II. radu.

Druhé meiotické delenie – homotypické je na rozdiel od heterotypického delenia veľmi podobné normálnemu mitotickému deleniu. V spermatocytoch II. radu, v porovnaní s ostatnými typmi buniek, nenastáva pozdĺžne delenie chromatíd, ale len delenie centromér. Diády sa rozpadnú na dve skupiny monád – jednoduché chromozómy v tom istom počte sa rozchádzajú do dcérskych buniek (v spermatocytoch I. radu sa nedelia centroméry a v spermatocytoch II. radu chromatídy). Týmto spôsobom sa chromatídy rozdelia jedenkrát, kým bunka sa rozdelí dvakrát. Novovzniknuté dcérske bunky – spermatídy majú haploidný počet chromozómov, charakteristický pre zrelé pohlavné bunky. Vznikom spermatíd sa končí delenie vyvíjajúcich sa samčích pohlavných buniek (spermatocytogéza).

Spermatídy sa tvarom a zložením podobajú spermatocytom II. radu. Sú to malé, okrúhle, prípadne polygonálne bunky. Jadro je o niečo menšie než pri spermatocytoch II. radu. Obsahuje niekoľko veľkých chromatínových granúl rozličnej veľkosti, uložených pod hrubou jadrovou membránou. Spermatídy sa nachádzajú pri lúmene semenotvorných kanálikov a sú uložené do zväzkov v okách Sertoliho buniek (Toman a Massányi, 1997).

Meiotické delenie a spermatocyty I. radu znamenajú v spermatogéze kritické štádium. Pri porušení deliaceho procesu sa môžu vyvinúť spermie bez fertilizačných vlastností. Nepravidelnosti v meióze sa vyskytujú predovšetkým pri mladých jedincoch. Dvojica chromozómov XY určujúcich pohlavie sa delí pri meióze tak, že dlhší X

chromozóm sa pohybuje k jednému a kratší Y chromozóm k druhému pólu bunky. Po rozdelení spermatocytu I. radu sa do každého spermatocytu II. radu dostáva vždy len jeden chromozóm (Hess a de Franca, 2008).

Metamorfóza (spermiogenéza)

V tomto období sa mení okrúhla spermatida na štíhlu spermium, ktorá obsahuje všetky vlastnosti na úspešné splnenie procesu oplodnenia. Počas procesu premeny si bunka vytvára pohybový ústroj (bičik) a formuje sa na penetráciu vajíčka (vznik akrozómu). Metamorfóza sa delí na Golgiho štádium, akrozómovej čiapočky, kaudálnej manžety a štádium zrenia (Martiniaková et al., 2008).

V Golgiho štádiu sa pri jadre mladej spermatídy tvorí základ akrozómu v podobe malého mechúrka s tmavým telieskom vo vnútri (akrozómové granulum). V štádiu akrozómovej čiapočky sa základ akrozómu zväčšuje, prikladá sa na jadro a nakoniec ako akrozómová čiapočka pokrýva celú prednú polovicu jadra spermatídy. Na opačnej strane vzniká pri jadre základ bičika. Z diplozómu (centriol) vyrastá vlákienko, ktoré sa smerom od jadra predlžuje, cytoplazma sa postupne prelieva a jadro sa dostáva do excentrickej polohy. V štádiu kaudálnej manžety sa guľaté jadro spermatídy mení na plošnú hlavičku spermie. Vzniká kaudálna manžeta, ktorá sa začína a upína na rovníku jadra. Kaudálna manžeta rastie smerom cez kaudálnu polovicu jadra až ponad prvý oddiel bičika. Jej stena sa skladá zo submikroskopických rovnobežných trubičiek. Akrozómová čiapočka podlieha dehydratačným zmenám, pravdepodobne dochádza k redukcii akrozómového materiálu. Úloha kaudálnej manžety nie je celkom jasná. V štádiu zrenia sa kaudálna manžeta rozplýva pozdĺž prednej časti jadra a mizne. Vzniká bičik a akrozóm, nepotrebná cytoplazma odchádza. Najprv sa vyvíja obal hlavného oddielu bičika, tzv. fibrózna pošva a potom hrubá mitochondriálna pošva. Mitochondrie sa prikladajú koncami k sebe, vzniká hrubé vlákno, ktoré sa ovíja okolo osového vlákna na úrovni spojovacieho oddielu bičika. Po odchode nepotrebných cytoplazmy a dehydratácii akrozómu je skončená premena spermatídy na spermium (Kulíšek et al., 2006).

Spermie sa uvoľňujú zo zväzku so Sertolihou bunkou a ako voľné bunky sa dostávajú zo semenotvorných kanálikov do vývodných semenných ciest a do chvosta prísemenníka. Postup vývodným kanálkom prísemenníkov trvá 10 – 15 dní. Až do ejakulácie sú spermie uskladnené v chvoste prísemenníka a nevykazujú vlastnosti aktívneho pohybu (Massányi, 1991).

Na mladých spermiách sa vyskytujú tzv. protoplazmatické kvapky – lokálne ampulovité rozšírenie pošvy spojovacieho oddielu bičíka. Počas pasáže kanálom prísemenníka sa tento útvar z krčka posúva pozdĺž spojovacieho oddielu na koniec, kde sa vylúči. Tieto útvary možno pozorovať i na ejakulovaných spermiách, osobitne v prípadoch vyššieho pohlavného zaťaženia, alebo pri niektorých poruchách semenotvorného epitelu. Protoplazmatické kvapky tvoria predovšetkým zvyšky Golgiho komplexu (Massányi et al., 2000).

Začiatok spermatogenézy je podmienený mnohými endogénnymi a exogénnymi faktormi. Vplyv týchto nepriaznivých činiteľov na spermatogézu sa objaví v spermiograme v rozlične dlhom období po začiatku ich pôsobenia, čo závislý aj od dĺžky spermatogénneho cyklu, ktorý trvá u býkov a baranov 60 – 70 dní, u kancov 50 – 60 dní (Lukáč et al., 2007).

Spermatogenéza prebieha v celom semenotvornom kanáliku nepretržite. V semenotvornom kanáliku sa vyvíja spermatogénny proces vlnovito a cyklicky, vždy v určitej časti. Mladé spermie pasívne transportuje prúd tekutiny a kontrakcie *tunica dartos* a *m. cremaster* do chvosta prísemenníka, ktorý spermiám predstavuje vhodný rezervoár. Tu sú spermie uložené tesne vedľa seba a vo zvýšenej koncentrácii spermií $0,01 \cdot 10^6 \cdot \text{mm}^{-1}$ v semenníku sa nachádza v hlave prísemenníka 0,16 miliónov, v tele 1 milión a v chvoste 3,6 milióna spermií v 1 mm. Pri kancovi je v chvoste prísemenníka koncentrácia spermií 33–krát väčšia než v ejakuláte (Massányi, 1991).

1.4 VLASTNOSTI EJAKULÁTU BÝKA A BARANA

Základným predpokladom získania kvalitného a bezchybného ejakulátu od plemenníkov pôsobiacich v inseminácii je dodržiavanie zásad hygieny pri ich ošetrovaní, ustajňovacích a laboratórnych priestorov, laboratórnych pomôcok, atrapy i pripúšťadla. Ejakulát sa môže odberať iba od plemenníkov, ktoré vyhovujú predpísaným zdravotným podmienkam. Plemenníky určené na odber treba dobre očistiť, predkožky plemenníkov umyť vlažnou mydlovou vodou, opláchnuť čistou vodou a osušiť buničitou vatou. Zadnú časť atrapy, prípadne fantómu treba dezinfikovať pred každým odberom a po ňom. Ejakulát odoberajú od plemenníkov iba pracovníci, ktorí sú na to určení a vyškolení. Pripúšťadlo a pripúšťacia miestnosť sa musia po každom odbere dezinfikovať. Na odber sa používajú sterilné alebo dezinfikované vagíny s jednorazovým polyetylénovým zberačom. Po odbere sa vagína skloní ústím dole, aby sa zabránilo stekaniu nečistôt do ejakulátu (Gamčík et al., 1992).

Získaný ejakulát sa hodnotí v laboratóriu pri teplote 18 – 25°C. Miestnosť musí byť čistá, suchá, dobre vetrateľná. Všetky pomôcky, ktoré prichádzajú do kontaktu s ejakulátom sa musia dokonale umyť, opláchnuť destilovanou vodou a sterilizovať. Pred použitím sa pomôcky predhrievajú v termostate na teplotu ejakulátu. Ejakulát sa posudzuje okamžite po odbere, najneskôr však do 10 minút po odbere pre stanovenie stupňa riedenia. Ejakulát sa posudzuje makroskopicky, mikroskopicky a biochemicky (Andrabi, 2009).

Makroskopické vyšetrenie ejakulátu býka a barana

Vlastnosti ejakulátu jednotlivých druhov hospodárskych zvierat sú rôzne. Všeobecne je ejakulát vylúčený v tekutej alebo polotekutej forme. Tekutý charakter má ejakulát prežúvavcov, psa a vtákov. U býka dochádza pri pohlavnom vzrušení k vylučovaniu sekrétu bulbouretrálnych žliaz a tento sekrét, ako je tomu nakoniec aj u iných druhov zvierat, upravuje pH uretry. Spermie a ďalšie sekréty prídavných pohlavných žliaz sú po tejto fáze ejakulované takmer súčasne. Po odstredení 5 ml hustého ejakulátu získame asi 4,5 ml semennej plazmy, čo znamená, že semenná plazma sa podieľa na

celkovom ejakuláte býka asi 90%. Väčšiu časť semennej plazmy a teda ejakulátu tvoria sekrety uretrálnych žliaz, ktoré sú vylučované počas celej ejakulácie a predstavujú i v hustom semene konečnú fázu ejakulátu. Sekret prostaty sa podieľa na celkovom objeme ejakulátu iba malou mierou (Gamčík et al., 1992).

Objem ejakulátu u zdravých býkov sa pohybuje v rozpätí 3 – 6 cm³. Kvalitný ejakulát je nepriehľadná, hustá tekutina smotanovej konzistencie, s mierne zrnitým vzhľadom. Farbu podmieňuje hustota a konzistencia ejakulátu. Ejakulát s dobrou kvalitou býva smotanový až mliečne sfarbený. Kvalitný ejakulát býka pripomína pach čerstvo nadojeného mlieka, po odbere rýchlo mizne. pH ejakulátu sa pohybuje od 6,4 do 7,0, hodnota pH priamo závisí od hustoty ejakulátu (Gamčík et al., 1992).

U barana dochádza tiež k jednorazovej ejakulácii, takže postup vylučovania sekretov z prídavných pohlavných žliaz behom ejakulácie je zhodný s býkom. Objem ejakulátu je však podstatne menší. Semenná plazma sa na celkovom objeme ejakulátu podieľa 70 – 75%, lebo pri odstredení 1 ml ejakulátu získame 1/3 až 1/4 objemu, ktorý je tvorený spermiami. Objem ejakulátu zdravého barana má byť v priemere 1 – 1,5 cm³. Kvalitný ejakulát je nepriehľadný, hustý, smotanovitej konzistencie, má vysokú viskozitu a dobrú zrnitosť. Farbu podmieňuje hustota a konzistencia. Ejakulát s dobrou kvalitou býva špinavosivý, krémovosivý až mliečny. Pach ejakulátu nie je špecifický. pH ejakulátu barana sa pohybuje v rozpätí od 6,4 do 7,2, hodnota priamo závisí od hustoty ejakulátu. Hlavičky spermií býka a barana sú v podstate podobné. Rozdiely sú iba na bazálnej časti hlavičky a na postakrozómovom zúbkovanom okraji baraních spermií (Anel et al., 2006).

Pri makroskopickom vyšetrení sa hodnotí:

1. objem ejakulátu (závisí od individuálnych vlastností jedinca, veku, výživy, ošetrovania),
2. zrnitosť (posudzujeme na okraji zberača a závisí od obsahu sekretov prídavných pohlavných žliaz a vývodných pohlavných žliaz),
3. farba (závisí od hustoty a koncentrácie ejakulátu),
4. pach ejakulátu (je špecifický a závisí od druhu zvierat),
5. obsah cudzích prímiesí v ejakuláte – najčastejšie sa v ňom vyskytujú tukové kvapky, chlpy, moč, hlien, nečistoty z predkožky, prach a piesok (Gamčík et al., 1992).

Mikroskopické a biochemické vyšetrenie ejakulátu býkov a baranov

Mikroskopické hodnotenie ejakulátu sa robí hneď po odbere, najneskôr do 10 minút. Vyšetrenie sa robí pri teplote 38 – 40°C pod mikroskopom. Posudzuje sa:

1. koncentrácia spermií,
2. aktivita pohybu spermií,
3. intenzita pohybu – vírivosť spermií,
4. morfológické vyšetrenie ejakulátu.

Pri biochemickom vyšetrení sa robia nasledovné testy:

1. skúška na prežívateľnosť spermií (určuje, ako dlho vydržia spermie v istom prostredí mimo organizmu; testy prežívateľnosti sú dôležité pre posúdenie biologickej hodnoty a oplodňovacej schopnosti spermií),
2. skúška rezistencie (je založená na zisťovaní odolnosti spermií voči škodlivému účinku 1% roztoku NaCl),
3. hodnotenie stupňa aglutinácie (zhlukovania) spermií.

Aby sa získaný ejakulát mohol maximálne využiť, musí sa riediť. Riedidlo čo najviac predlžuje životaschopnosť a oplodňovaciu schopnosť spermií, musí byť teda súčasne aj konzervačným prostriedkom. Nie každé riedidlo, ktoré ejakulát znáša, ho súčasne aj konzervuje. Dĺžka uchovania ejakulátu závisí od konzervačných schopností riedidla. Pomer riedenia sa určí podľa počtu spermií v 1 mm³ s progresívnym pohybom vpred za hlavičkou a podľa počtu spermií v jednej inseminačnej dávke. Teplota riedidla musí byť vždy taká istá ako teplota ejakulátu (Lukáč et al., 2007).

V priebehu uplynulých rokov boli vyskúšané rôzne zloženia riediacich roztokov, ktoré podľa účinnosti možno rozdeliť do troch skupín:

1. extendory – slúžia na zväčšenie objemu ejakulátu, ktorý sa používa bezprostredne, to znamená v čerstvom stave,
2. protektory – okrem zväčšenia objemu ejakulátu zaisťujú zdroj výživy a ochranu spermií v prostredí mimo organizmus po dlhšiu dobu,
3. implementory – v podstate protektory, ku ktorým boli pridané látky pôsobiace na pohlavné orgány samíc a ovplyvňujúce priaznivo pasáž spermií a proces oplodnenia.

Vlastný odber ejakulátu sa vykonáva len u jedincov, ktorí vyhovujú predpísaným zdravotným podmienkam. Odber sa robí podľa plánu pre jednotlivých plemenníkov. Pripúšťadlo musí byť prispôbené tak, aby ho bolo možné dokonale fixovať a nehrozilo nebezpečenstvo úrazu. Po odbere sa prísne dodržiava zásada zabrániť tepelným šokom a otrasom ejakulátu. Riedidlo sa v zásade pripravuje vždy čerstvé. Ejakulát sa schladzuje v chladničke počas 90 minút na teplotu 1 – 3°C. Zmrazovanie sa uskutočňuje po uplynutí ekvilibračnej doby. Prebieha na hranoloch alebo doskách suchého ľadu. Minimálna výška dosky je 3 cm. Urovanie dosky sa robí vyžehlením. Do urovnaného povrchu sa vyhlbia predhriatym jamkovačom jamky. Dôležitá je ich hĺbka, aby zmrazovanie piluliek prebiehalo rovnomerne. Pred vlastným nakvapkaním nesmú byť dierky zarosené. Ejakulát sa pred nakvapkaním dokonale premieša. Suchý ľad sa po nakvapkaní ejakulátu prikryje sterilnou buničitou vatou, ktorá zachytáva vlhkosť. Doba zmrazovania je 7 minút, s postupným poklesom teploty. Po zmrazení sa pilulky vysypú do téglíka naplneného tekutým dusíkom. Takto pripravené kelímky sa uložia do transportných alebo zásobných kontajnerov. Každá pilulka/pejeta sa rozmrazuje samostatne. Inseminačná dávka sa pripravuje tesne pred insemináciou (Gamčík et al. , 1992; Salamon a Maxwell, 2000).

1.5 VLASTNOSTI EJAKULÁTU KANCA

Po získaní ejakulátu sa najskôr oddelí hlien od tekutej časti ejakulátu preliatím cez sterilnú gázu (pokiaľ nedošlo k filtrácii počas odberu filtrom vloženým do zberača), stanoví sa pH a ejakulát sa posúdi makroskopicky a mikroskopicky.

Makroskopické vyšetrenie ejakulátu kanca

Objem ejakulátu sa stanoví s presnosťou na 10 ml v kalibrovannej nádobe. Veľkosť objemu koliše najčastejšie od 100 do 500 ml, aj keď v ojedinelých prípadoch možno získať 750 až 900 ml. U mladých kancov koliše objem ejakulátu najčastejšie od 120 do 200 ml, u starších kancov od 200 do 350 ml. Na objem ejakulátu vplývajú najmä individualizmus, výživa, vek a plemenná príslušnosť, frekvencie odberu a čiastočne aj technika odberu ejakulátu (Gamčík et al., 1992).

Konzistencia závisí na koncentrácii spermií. Najčastejšie je konzistencia ejakulátu vodnatá a len pri veľmi hustých ejakulátoch, alebo pri frakciách bohatých na spermie sa vyskytuje zrnitá konzistencia (Lukáč et al., 2007).

Základná farba hustého ejakulátu je mliečne biela. Odchýlky od tejto farby, vyjadrené rôznymi odtieňmi, sú podmienené koncentraciou spermií a priehľadnosťou celého ejakulátu. Pach ejakulátu kanca je nevýrazný a len v prípadoch, kedy došlo k vytlačeniu obsahu prepuciálneho vaku, je typicky kančí. Ináč môže dojsť ku zmene pachu pri prítomnosti moču alebo hnisu v ejakuláte. Stanovenie pH je potrebné vykonávať ihneď po jeho získaní a oddelení hlienu, lebo pri neskoršom meraní môže nastať zmena hodnoty pH. Krajné hodnoty pH semena kanca sú od 6,4 do 7,9, najčastejšie sú zisťované medzi 7,2 – 7,6 pH (Gamčík et al., 1992).

Mikroskopické a biochemické vyšetrenie ejakulátu kanca

Mikroskopické a biochemické vyšetrenie spočíva v posúdení pohyblivosti spermií (motility), koncentrácie a morfológie spermií (Oyeyemi et al., 2008).

Motilita spermií sa zisťuje pri teplote 40°C do 15 minút po získaní ejakulátu. Pri tomto vyšetrení sa v ejakuláte riedenom fyziologickým roztokom v pomere 1:1 – 5 určuje percento spermií s progresívnym pohybom. Ejakulát použiteľný na umelú insemináciu musí obsahovať najmenej 60% progresívne sa pohybujúcich spermií. Niektorí autori však doporučujú používať v umelej inseminácii aj ejakulát, ktorý obsahuje 50% spermií s progresívnym pohybom. Zistená pohyblivosť spermií sa vyjadruje priamo v percentách alebo aj desatinným systémom, kde 1,0 = 100%, 0,9 = 90% atď. (Gamčík et al., 1992).

Názory na koncentráciu a celkový počet spermií v ejakuláte kancov nie sú úplne jednotné. Rozdiely vo výsledkoch sú pravdepodobne spôsobené rozdielnou skladbou pokusných plemenníkov (vek, plemeno, frekvencia odberu a i.). V priemere sa najčastejšie zisťuje 200 000 – 240 000 spermií v 1 mm³, zatiaľ čo hraničné hodnoty sú veľmi rozdielne. Najväčšie rozdiely v minimálnej a maximálnej koncentrácií sa uvádzajú 10000 až 1 milión v 1 mm³. Vzhľadom k uvedeným rozdielom sa líšia i názory na hodnotenie koncentrácie spermií (Lukáč et al., 2007).

Hustota semena kanca v 1 mm³ sa popisuje nasledovne:

hustý ejakulát	– 200 000 spermií a viac,
stredne husté	– 100 000 až 200 000 spermií,
riedky ejakulát	– 50 000 až 100 000 spermií,
oligospermia	– pod 50 000 spermií.

K účelom umelej inseminácie je možné použiť aj riedky ejakulát, v prípade ak zodpovedá norme po iných stránkach. Koncentrácia spermií v ejakuláte plemenných kancov sa počas roku mení. Absolútne najmenšia produkcia spermií bola zistená v júli a auguste. V celom ejakuláte sa nachádza 20 – 80 miliárd spermií. Z ekonomického hľadiska je veľmi dôležité aby do procesu inseminácie boli zaradovaní plemenníci, v ktorých ejakuláte bolo zistené 50 miliárd spermií a viac, čo umožňuje rozdeliť ejakulát na 10 inseminačných dávok a viac (Gamčík et al., 1992).

Morfologické vyšetrenie

Príprava preparátu spočíva v tom, že vzorka ejakulátu sa riedi (pre nízku koncentráciu spermií) v pomere 1: 2 – 4. Tvar spermií kanca po zafarbení preparátu sa značne odlišuje od spermií býka hlavne v tom, že akrozóm pokrýva 2/3 hlavičky a pomerne často sa stretávame s abaxiálne nasadeným bičíkom, čo sa u spermií kanca nehodnotí ako vada. V ejakuláte normálne plodného kanca sa počet abnormálnych spermií pohybuje medzi 2 – 6% (0,2 – 25%), z ktorých najväčší podiel pripadá na spermie s protoplazmatickou kvapkou alebo stočeným bičíkom (Gamčík et al., 1992).

Pokiaľ ide o maximálne prípustný výskyt morfológicky zmenených spermií, sú niektorí autori toho názoru, že v ejakuláte normálne plodného kanca sa môže vyskytovať maximálne 20% patologických spermií. Podľa praktických skúseností sa môže v ejakuláte kanca vyskytovať až 25% zmenených spermií, pričom spermie s protoplazmatickou kvapkou by nemali presiahnuť 10% (Lukáč et al., 2007).

U kancov, u ktorých je znížená plodnosť napríklad následkom nadmernej exploatacie, sa zisťuje veľké percento spermií s protoplazmatickou kvapkou, ktorá je uložená na krčku, alebo na spojovacej časti bičíka, zatiaľ čo znížená plodnosť, alebo neplodnosť zapríčinená ochorením semenníkov a prisemenníkov má za následok výskyt veľkého počtu primárnych zmien spermií prejavujúcich sa v zmene tvaru a štruktúry spermií (Gamčík et al., 1992).

1.6 FAKTORY OVPLYVŇUJÚCE REPRODUKCIU SAMCOV

Reprodukčný proces samcov závisí na komplexnej rade biologických vzťahov zahrňujúcich mnoho orgánov, typov buniek, typov molekúl ako aj presnú časovú a priestorovú koordináciu procesov. Nie je preto prekvapujúce, že tento zložitý biologický systém je zraniteľný rozličnými environmentálnymi faktormi, fyzikálnymi ako aj chemickými (Massányi et al., 1999).

V klinických disciplínach sa primárny záujem venuje reprodukčným poruchám ľudí. Laboratórne zvieratá sú živočíšnymi druhmi s najlepšie popísanými procesmi základnej reprodukčnej fyziológie ako aj farmakologickej a toxikologickej odpovedi na účinky xenobiotík. Hoci existujú anatomické a fyziologické odlišnosti medzi laboratórnymi, hospodárskymi zvieratami a človekom, ktoré môžu ovplyvniť ich individuálne odpovede na toxické látky, použitie vyšších primátov ako model pre humánnu odpoveď nevedie k výrazným úspechom a to z toho dôvodu, že testikulárna anatómia a spermatogenéza nie sú oveľa podobnejšie popisované u vyšších primátov v porovnaní laboratórných zvierat s človekom (Slanina et al., 1985; Nava-Hernández et al., 2009)

Reprodukčné toxikanty majú často svoje špecifické cieľové testikulárne bunkové typy alebo individuálne reprodukčné orgány. Táto zjavná špecificita závisí od dávky ako aj doby trvania účinku látok. Chemické látky, ktoré účinkujú na jeden typ buniek alebo orgán pri jednom experimentálnom spôsobe bývajú často toxické pre viacero štádií spermatogénnych buniek (prokarbazín), alebo viacero reprodukčných orgánov (metylchlorid), ak je dávka zvýšená alebo expozícia predĺžená (Scialli a Zinaman, 1993).

Je mnoho špecifických chemických látok, ktoré pôsobia na bunky semenníka na jednotlivé štádiá spermatogenézy. Histopatologické analýzy nám umožňujú kategorizovať rozličné reprodukčné toxikanty podľa ich cieľov v semenníku. Avšak ak chceme efektívne určiť počiatočný celulárny cieľ, vyšetrenie semenníkov musí prebehnúť rýchlo po expozícii, často do hodiny, nakoľko zmeny mnohých typov buniek semenníka môžu mať za následok rozsiahle lézie, takže kanáliky obsahujú len Sertoliho bunky. Analýza takýchto semenníkov prináša málo využiteľných informácií (Scialli a Zinaman, 1993; Sokol et al., 1998; Massányi et al., 2000a,b; Toman et al., 2000; Sadik, 2008; Penna et al., 2009).

Med'

Med' patrí medzi prvky, ktoré sú pre človeka na jednej strane esenciálne a na druhej strane potenciálne toxické. Kovová med', zlúčeniny medi, alebo zliatiny obsahujúce med' človek používal už v prehistorickej dobe. Rimania nazývali med' "*aes cyprium*" (cyperský kov), neskôr "*cuprum*", pretože v tej dobe sa med' ťažila na Cypre (Bencko et al., 1995).

Med' je prvok s atómovým číslom 29 a relatívnou atómovou hmotnosťou $8,9 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$. V prírode sa vyskytuje v jednomocnom a dvojmocnom stave. V dvojmocnom stave je izomorfná so zinkom, horčíkom a železom. V kryštalickej forme je načervenalým kovom. Med' je dobre kujná, ťažná, je dobrým vodičom tepla a elektrického prúdu (Bencko et al., 1995).

Kontaminácia med'ou je popisovaná u domácich ako aj voľne žijúcich zvierat (Čelechovská et al., 2007, 2008; Kosanovic et al., 2007). V literatúre sú pomerne dobre popisované účinky medi na pohlavný systém samcov. Analyzoval sa morfológický obraz semenníkov plemenných baranov po experimentálnej záťaži priemyselnou emisiou s obsahom medi. Patologicko–anatomická pitva preukázala výrazné ikterické sfarbenie obalov semenníka. Ikterické sfarbenie javili aj všetky rezné plochy parenchýmom semenníka. Pri pohmate tkanivo semenníka má mäkšiu konzistenciu (Vrzgulová et al., 1993).

Používanie medených nádob pri príprave a konzumácii potravín môže spôsobiť zdravotné problémy, pretože sa do potravy môžu uvoľňovať vedľajšie produkty korózie medi, ak sa medený riad dostane do kontaktu s chloridmi alebo organickými látkami. Med' koroduje v prítomnosti chloridových iónov a chlór môže zvyšovať alebo znižovať koróziu medi v potrubí na pitnú vodu v závislosti na koncentrácii NaCl. Zistilo sa, že NaCl a čínsky čaj spôsobujú relatívne vysoké uvoľňovanie medi z medeného riadu v deionizovanej aj v pitnej vodovodnej vode (Ni a Li, 2008).

Med' ako súčasť enzýmov sa podieľa na celom rade fyziologických funkcií v organizme zvierat. Pri vysokých dávkach medi bol zistený jej zvýšený obsah v pečeni a zároveň zvýšená retencia v extrahepatických tkanivách. V mlieku boli stanovené priemerné hodnoty $0,10 - 0,15 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1} \text{ Cu}$ nezávisle od množstva medi v kŕmnych dávkach. U teliat pri

podávaní náhradiek mlieka bola stanovená 70%-ná absorpcia medi (ACR, 1980). S postupným vývojom funkcie predžalúdkov bol pozorovaný výrazný pokles absorpcie medi. Pre teľatá je dostatočná dávka 2 – 4 mg Cu v 1 kg roztoku mliečnej náhradky. Za priaznivých podmienok pokrýva u mladého a mliečného dobytko dennú potrebu dávka 4 – 6 mg medi v kg sušiny krmiva. Odporúčaná dávka 10 mg.kg⁻¹ sušiny krmiva pre hovädzí dobytok zohľadňuje aj rôzne podmienky v poľnohospodárskej praxi. Z viacerých sledovaní vyplýva, že využiteľnosť medi z mladého pastevného porastu je nízka a z toho dôvodu sa odporúča, aby pri dlhodobejšom pasení mladého dobytko bol prívod medi zvýšený na 15 – 20 mg.kg⁻¹ prijatej sušiny krmiva. S vyššími dávkami medi musíme počítať aj vtedy, keď sú v krmivách prítomné vyššie množstvá antagonistických prvkov, ako je síra, molybdén a železo. Ďalej bolo pozorované, že vyššie dávky zinku (viac ako 100 mg.kg⁻¹ a kadmia viac ako 5 mg.kg⁻¹) ovplyvňujú využitie medi. Hovädzí dobytok na rozdiel od oviec toleruje oveľa výraznejšie prekročenie dávok medi oproti optimu (ACR, 1980).

Histologický a submikroskopický nález preukázal, že periférnejšie uložené semenotvorné kanáliky v tesnom kontakte s *tunica albuginea* ukázali stagnovanú spermatogézu. Lúmen kanálikov je úplne, alebo čiastočne vyplnený vývojovými štádiami zárodočných buniek. Nezriedka bola zaznamenaná od periférie kanálikov cirkulárna dislokácia semenotvorného parenchýmu tak, že s vnútornou stenou *lamina propria* kanálikov len sporadicky komunikovali spermatogónie a jadrá Sertolihových buniek. Zárodočné bunky podliehajú generatívnym zmenám s deštrukciou až cytolýzou. Nezrelé vývojové štádiá spermií vyplňujú lúmen kanálikov (Vrzgulová et al., 1995).

Stena semenotvorných kanálikov je zhrubnutá v dôsledku multiplikácie lamelárnej vrstvy bazálnej membrány, ako aj čiastočnou dislokáciou jednotlivých vrstiev steny kanáliku. V extrémnych prípadoch po redukcii bunkových i nebunkových vrstiev *lamina propria* sú pôvodné kanáliky periférne lemované len lamelárnou vrstvou bazálnej membrány, ktorá svojou stavbou vykazuje enormne nepravidelný priebeh. Jednotlivé lamely sú málo kontrastné a výrazná je ich homogenizácia. Lamelárna vrstva tvorí smerom do vnútra kanálikov rôzne invaginácie. Intertubulárny priestor hlavne po periférii je nápadný hyperpláziou intersticiálnych buniek, ktoré zahrňujú rôzne štádiá vývojových typov ako fibrocyty, fibroblasty, až po Leydigove bunky, ktoré mali ruptúru

cytoplazmatickej membrány. V hlbších vrstvách semenotvorného parenchýmu dominujú kanáliky čiastočne, alebo úplne vakuolizované, lemované z periférie len jednou bunkovou vrstvou, prípadne zbytkami zárodočných buniek (spermatogónie, spermatocyty, spermatidy), ktoré formovali nepravidelné bunkové asociácie. Kanáliky s takto blokovanou spermatogenezou naznačujú postupnú stagnáciu spermatogenézy. Semenotvorné kanáliky s úplnou stratou bunkových zložiek sú v bezprostrednom susedstve kanálikov, ktoré ešte dosahujú všetky vývojové štádiá germinatívneho epitelu a v centrálnějších polohách aj spermie, ktorých bičíky sú nasmerované do lúmenu kanálikov (Vrzgulová et al., 1993).

Toxický účinok medi sa prejavuje atakovaním membránových štruktúr buniek a ich intracytoplazmatických zložiek. V periférnej zóne kanálikov, v mieste lokalizácie jadier Sertoliho buniek a v mieste spermatogónií vznikajú vakuoly väčších rozmerov, ktoré dislokovali a vzájomne separovali tieto bunky, čím sa následne porušovalo *syncytium* Sertoliho buniek. Dochádza často k ruptúre plazmalemy spermatogónií, ktoré obsahujú len zbytky cytoplazmy s dobre definovateľným jadrom. Centrálnějšíe uložené spermatocyty vykazovali vakuolizáciu cytoplazmy a zvršťovanie jadier. Vyznačujú sa poškodením vnútornej skladby mitochondrií vedúcou až k vytrácaniu mitochondriálnych kríst. Spermatidy v štádiu zretia sa manifestujú poškodením plazmalemy, napučiavaním mitochondrií a v extrémnych prípadoch aj ruptúrou akrozómového váčika a deformáciou jadra. Spermatidy vyšších štádií metamorfózy sú spravidla homogenizované, cytoplazmatická membrána je miestami prerušená. Na spermiách možno vidieť široký rozptyl malformačných zmien bičíka (torzo; chýbanie mitochondriálnej časti; zdvojenie bičíka), ako aj chýbanie respektíve deformáciu apikálneho konca spermií. Med' znižuje aj percento aktívnych spermií, spôsobuje pokles koncentrácie spermií a vyšší podiel primárnych zmien spermií. Mechanizmus toxického pôsobenia medi sa posudzuje tak, že najskôr sa porušuje kvalita ejakulátu toxickým účinkom na semennú plazmu, čoho prejavom je pokles percenta aktívnych spermií a naopak zvýšením percenta malformovaných spermií, čo je priamym dôsledkom poškodenia germinatívnej zložky gonád (Vrzgulová et al., 1995; Eghbali et al., 2008; Roychoudhury a Massányi, 2008; Yuyan et al., 2008; Cybulski et al., 2009).

Železo

Do organizmu sa železo dostáva potravou. Železo prijaté do organizmu sa veľmi starostlivo opatruje a vykonáva v ňom určitý kolobeh. Na rozdiel od iných iónov sa aj málo vylučuje. Organizmus živočíchov a človeka nemá osobitný systém na vylučovanie nadbytočného železa. Vysoké dávky železa môžu byť toxické (Ferenčík et al., 2000).

Železo patrí medzi prvky, ktorých potreba pre mladé, intenzívne rastúce zvieratá je veľmi vysoká. Pri nedostatku železa v prvých týždňoch života sa u prasiatok vyvíja fyziologická anémia. Predpokladá sa, že v dôsledku fyziologickej anémie hynie v prvých týždňoch života 20 – 30% prasiatok (Vrzgula et al., 1990).

S intenzívnym rastom prasiatok po uliahnutí sa zväčšuje aj celkový objem krvi. Na udržanie normálnej hladiny hemoglobínu v krvi (11 – 12 g), ako aj na náhradu inej spotreby musia prasiatka denne zužitkovať 6 – 10 g železa. Pri dostatočnom prívode železa sa obsah hemoglobínu v organizme rýchlo zväčšuje, zatiaľ čo pri nedostatku železa sa pozoruje rýchly úbytok hemoglobínu v krvi, zmeny tvaru a veľkosti erytrocytov a vyvíjajú sa všetky príznaky fyziologickej anémie prasiat. Údajov o retencii železa v organizme ošípaných rozličných vekových skupín nie je veľa. V pokusoch s ciciakmi vo veku 1 – 5 dní pomocou rádioaktívneho železa sa zistilo, že prasiatka využívajú 95 – 99% tohto prvku. Vo veku jedného týždňa sa zase ukázalo, že maximálna hodnota absorpcie železa zo síranu železnatého je 83,9%, a to pri nízkej hladine jeho prívodu a 39,1% pri perorálnom zavedení 50 mg Fe^{2+} (Vrzgula et al., 1990).

V pokusoch s prasiatkami vo veku 8 – 9 týždňov sa zistilo, že retencia železa zo síranu železnatého sa mení v rozpätí od 5,1% do 25,6%. Z výpočtov, ktoré sa urobili, vyplýva, že prasiatka tejto vekovej skupiny využívajú priemerne okolo 12% železa.

Údaje o využití železa prasnými prasnicami sú rozličné. Poukazuje sa na to, že priemerná denná retencia železa u prasníc v poslednej tretine prasnosti predstavuje 5,4% z privádzaného množstva. Pretože endogénne straty železa sú veľmi nízke, je jeho retencia takmer totožná s absorpciou. Treba poznamenať, že retencia železa závisí do určitej miery od zloženia krmnej dávky. V pokusoch s rastúcimi ošípanými sa zistilo, že pri zvýšenom prívode vápnika v krmnej dávke sa bilancia železa stáva výrazne zápornou. Aj fosfor má

pravdepodobne na retenciu železa nepriaznivý vplyv. Na základe experimentálnych údajov sa zistilo, že ak ošípané zo začiatočnou živou hmotnosťou 20,7 – 22,8 kg dostávajú kŕmnu dávku s obsahom 5,0 a 7,0 g železa v 1 kg sušiny, znižuje sa spotreba krmiva o 20%, klesajú priemerné denné prírastky o 30% a narušuje sa mineralizácia kostry a metabolizmus fosforu, čo sa prejavuje preukazným znížením koncentrácie anorganického fosforu v krvnom sére z 8,6 (kontrola) na 5,5 mg. Pri jednorazovej perorálnej aplikácii železa v podobe zelenej skalice v dávke $0,6 \text{ g.kg}^{-1}$ hmotnosti tela sa pozoruje hynutie pokusných prasiat (Slanina et al., 1985; Vrzgula et al., 1990).

Neúmerné hladiny železa pôsobia deštruktívne na testikulárnu funkčnosť a spermatogézu, takže zmenšenie semenníkov a znížená produkcia spermií môže byť vyvolaná zvýšenou hladinou železa. Železo dokonca môže aj zvýšiť produkciu spermií, hlavne feritín ale aj samotné železo, ktoré je uskladnené v Leydigových bunkách a Sertoliho bunkách, ktoré majú nutričný a protektívny účinok v samotnej gametogéze (Merker et al., 1996; Luscisoli et al., 1999).

Aj keď homeostáza železa v organizme je veľmi prísne regulovaná, zabezpečuje bazálnu funkčnosť hemoglobínu. Zvýšené množstvo železa pôsobí deštruktívne na testikulárnu funkčnosť a spermatogézu no fyziologická hladina je dokonca požadovaná pre správnu produkciu spermií (Luscisoli et al., 1999).

Zinok

Človek používa zinok viac ako 2000 rokov. Starí Rimania miešali zinkovú rudu s meďou a získavali mosadz. Koncom 16. storočia sa začal zinok dovážať z Indie a Číny do Európy.

Zinok patrí do skupiny 2b periodického systému. Má atómové číslo 27, relatívnu atómovú hmotnosť 65,4 a špecifickú hmotnosť $7,13 \text{ g.cm}^{-3}$. Zinok je relatívne mäkký kov, ktorý ľahko reaguje s anorganickými ako aj organickými látkami. V priemysle sa najčastejšie používa oxid zinočnatý, ktorý je vo väčšine rozpúšťadiel málo rozpustný (Bencko et al., 1995).

Zinok je esenciálny stopový prvok, nevyhnutný pre všetky druhy žijúcich organizmov. Je súčasťou viac ako 200 metaloenzýmov, čím zasahuje do všetkých životne dôležitých funkcií (Carrascal Moreno et al., 2005; Demirel et al., 2008).

Na základe výsledkov analýz zinku v pôde, v rastlinách a v matriciach zvierat vyplýva, že hospodárske krmivá nezabezpečujú optimálny prísun zinku a je potrebná jeho suplementácia (Vrzgula, 1990). Množstvo potrebného zinku v kŕmnej dávke závisí od druhu a veku zvierat, plemennej príslušnosti, produkcie a reprodukcie, zdravotného stavu a v neposlednej miere aj od zastúpenia ostatných živín v krmive. Pre všetky kategórie prežúvavcov a ošípaných by sa mal obsah zinku v krmive pohybovať od 50 do 100 mg.kg⁻¹ sušiny.

Zúčastňuje sa na stavbe bunkových a organelových membrán a zároveň ich chráni pred vonkajšími vplyvmi, čo je zvlášť dôležité z pohľadu spermie v procese spracovania ejakulátu. Deficit zinku u mladých samcov spôsobuje atrofiu semenotvorného epitelu, poškodzuje sa vývoj gonád, čo sa primárne prejaví hypogonadizmom. Deficit zinku pohlavne dospelých samcov spôsobuje poruchy v priebehu spermatogenézy. Pri sledovaní vybraných spermiologických ukazovateľov sa zistilo, že pri zníženej koncentrácii zinku v krvi je nižšia hustota a aktivita spermií, je znížená prežívateľnosť spermií ako aj vyšší výskyt patologických spermií. Pozorovania na úrovni elektrónovej mikroskopie bližšie odhalili rôzne morfológické zmeny na spermiách. Z primárnych morfológických malformácií možno dokumentovať nález zdvojených hlavičiek, tvar hlavičiek v podobe písmena U, L, hlavičky trojuholníkového tvaru na priečnom priereze a rôzneho bizarného tvaru. Primárne zmeny na bičíkoch sa vyznačovali rôznymi nepravidlosťami v počte a usporiadaní centrálnych a periférnych tubulov. Zo sekundárnych zmien sa najčastejšie pozorujú zmeny na celistvosti akrozómového systému ako aj zvlnenie a vezikulárne rozpadnutie akrozómovej a cytoplazmatickej membrány (Cigánková et al., 1994, 1997, 1998).

V semenotvorných kanálikoch s hypozinkémiou sa zistili výrazné atrofické zmeny. Semenotvorný epitel bol nízky, avšak Sertolihho bunky a spermatogónie, ktoré sa nachádzajú v bazálnej časti semenotvorných kanálikov, neboli poškodené. V lúmene kanálikov sa nachádzajú odlúpnuté bunky semenotvorného epitelu. Stena semenotvorných

kanálikov je v dôsledku deplécie spermatocytov a spermatídov mierne zvlnená. Intersticiálne tkanivo pozostáva z riedkeho väziva, krvných a lymfatických ciev a Leydigových buniek. Tieto sa nachádzajú v skupinách po 3 – 5 buniek alebo ojedinele, obyčajne v blízkosti krvných kapilár. Ich mikroskopický obraz je pri hypozinkémii normálny. Možno konštatovať, že zinok priaznivo pôsobí na spermatogézu (Cigánková et al., 1997, 1998).

Kadmium

Kadmium je kov chemicky príbuzný zinku. Prirodzene sa vyskytuje so zinkom a olovom v rudách obsahujúcich sulfidy týchto kovov. Má atómovú hmotnosť 112,4 a atómové číslo 4. Kadmium sa vyskytuje v množstve anorganických a organických zlúčenín ako dvojmocný kation. S organickými zlúčeninami tvorí komplexy a táto jeho vlastnosť je základom pre niektoré analytické metódy jeho stanovenia (Bencko et al., 1995).

Základným zdrojom vstupu kadmia do potravinového reťazca je aplikácia fosforečných hnojív, produkcia železa, ocele a spaľovanie uhlia. Všeobecne sa akceptuje, že ľudia sú najcitlivejšími receptormi na príjem kadmia z prostredia. Ľudia sú vystavení príjmu kadmia cez potravinový reťazec, fajčením, pôdou, dýchaním a pitnou vodou (Sokol et al., 1998). Obsah kadmia v potravinách takisto ako pri olove, závisí od jeho obsahu v pôde. Z potravín živočíšneho pôvodu vykazujú vysoký obsah kadmia hlavne obličky. Vajcia, mlieko a mliečne výrobky obsahujú len malé množstvo kadmia (Velíšek, 2002). Korenie, koreniny, potravinárske farbivá a konzervačné látky, ktoré sa pridávajú do potravín, môžu obsahovať kadmium a byť nositeľmi kontaminácie. Hlavným zdrojom príjmu kadmia v strave sú obilniny, zelená listová zelenina a zemiaky (Sokol et al., 1998). Kadmium sa ukladá v pôde a vo vode blízko priemyselných zdrojov (Klein a Snodgrass, 2003). Keď sa soli kadmia uvoľnia do vodného prostredia, kôrovce a ryby akumulujú dostatočne veľké množstvo kadmia, čo môže byť nebezpečné, ak sú súčasťou pravidelnej stravy (Todd, 2003). Je prijímané rôznymi morskými živočíchmi, najmä planktómom, mäkkýšmi a kôrovcami. Tmavé mäso jedlých krabov môže obsahovať viac kadmia ako 5 – 15 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$. Je aj normálnou súčasťou rastlín a môže sa absorbovať cez listy a korene. Rastliny nemajú

vylučovacie mechanizmus pre kadmium. Vysoké koncentrácie kadmia môžu obsahovať rastliny rastúce blízko zdrojov kontaminácie z priemyslu (Klein a Snodgrass, 2003). Obsah kadmia v potravinách je veľmi rozdielny, listy zeleniny a korene rastlín všeobecne majú vyšší obsah kadmia ako semená, hoci semená olejníkov majú vysoký obsah kadmia (McLaughlin et al., 1999). Satarug et al. (2003) uvádzajú, že obilniny a zelenina obsahujú 5–krát viac kadmia ako ovocie. Zvýšený obsah kadmia v pôde je výsledkom zvýšenej absorpcie kadmia rastlinami. Proces okysličovania pôdy zvyšuje jeho priemernú koncentráciu v potravinách (Rojas et al., 1999). V mliečnej žľaze dobytka a ďalších cicavcov sa kadmium vyskytuje v malom množstve a táto žľaza je účinnou bariérou pre jeho vylučovanie do mlieka (Klein a Snodgrass, 2003). Kadmium je normálnou zložkou väčšiny potravín. Niektoré mäkkýše majú dokonca vysoké koncentrácie kadmia v rozpätí 50 – 100 $\mu\text{g.kg}^{-1}$. Pitná voda všeobecne obsahuje menej kadmia, okolo 1 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ alebo menej, čo sa často považuje za typickú hodnotu vo väčšine situácií. Denná dávka kadmia je zvyčajne okolo 10 – 25 $\mu\text{g.kg}^{-1}$. Vysoký denný prívod kadmia sa vyskytuje medzi mládežou, ktorá má najvyšší kalorický príjem (Rojas et al., 1999). Obavy zo zvýšeného prívodu kadmia môžu mať vegetariáni alebo tí, ktorí konzumujú vnútornosti, či morské produkty (Satarug et al., 2003).

Semená slnečnice obsahujú prirodzene vyššie množstvo kadmia, než iné zložky potravy. V štúdiu na 60 dobrovoľníkoch sa počas 48 týždňov zistovala distribúcia a vylučovanie kadmia po prijímaní v slnečnicových semenách. Obsah kadmia v semenách bol 0,52 $\mu\text{g.g}^{-1}$. Hoci sa výrazne zvýšil príjem Cd zo 65 μg na 175 μg za týždeň, nedošlo k výrazným zmenám koncentrácie kadmia v červených krvinkách, vo vylučovaní kadmia v moči alebo obsahu kadmia vo vlasoch. Vylučovanie kadmia vo výkaloch však výrazne vzrástlo. Vylučovanie markera poškodenia obličiek ťažkými kovmi močom, N–acetyl–beta–D–glukozaminidázy, takiež nevykazovalo signifikantné zvýšenie. Autori uvádzajú, že absorpcia kadmia zo slnečnicových semien je asi 10% (2 – 18%). Záverom vyplynulo, že konzumácia 255 g (t.j. asi 130 μg kadmia za týždeň nad normálny príjem) slnečnicových semien počas 48 týždňov nemala výrazný vplyv na celkový obsah kadmia v organizme (Reeves et al., 2001).

Mechanizmus hepatotoxických účinkov kadmia sa pokúša vysvetliť niekoľko teórií. Pravdepodobne nepôsobí toxicky len priamo na hepatocyty, ale pôsobí aj nepriamo aktiváciou Kupferových buniek. Priame toxické účinky kadmia sa prejavujú dysfunkciou mitochondrií a peroxidáciou lipidov. Nepriame účinky sú spôsobené indukciou Kupferových buniek, ktoré produkujú reaktívne zlúčeniny dusíka (NO) konverziou L-arginínu a L-citrulínu prostredníctvom syntetázy (iNOS). V pokusoch na myšiach sa však zistilo, že tento enzým ani následné zvýšenie NO nehrá dôležitú úlohu v hepatotoxicite kadmia. Línia myší, ktorá netvorí iNOS vykazovala rovnaké poškodenie pečene ako u divých myší (Harstad a Klaassen, 2002). Dôsledkom pôsobenia kadmia nie je len vážne poškodenie semenníkov (hyperémia, atrofia), ale tento kov môže poškodiť aj metabolizmus acetohexamidu v mikrozómoch pečene. Acetohexamid je antidiabetický preparát, ktorý sa enzymaticky redukuje v pečeni. Tento proces je však závislý na androgénoch. Kadmium svojim účinkom na semenníky znižuje sekréciu týchto androgénov a tým zasahuje aj do metabolizmu liekov (Shimada et al., 2002).

Pri štúdiu reprodukčnej toxicity kadmia sa sledovali účinky kadmia po jednorazovom intraperitoneálnom podaní a po dlhodobom perorálnom podávaní na morfológickú stavbu semenníkov králikov domácich (Toman et al., 2002). Po 48 hodinách od i.p. podania sa zistilo červené až tmavofialové sfarbenie semenníkov. Semenotvorný epitel javil známky poškodenia rôzneho rozsahu. V niektorých semenníkoch bol epitel normálny, ale strácal kontakt s bazálnou membránou. V iných prípadoch došlo k odumieraniu buniek semenotvorného epitelu až k nekróze parenchýmu semenníka a zastaveniu spermatogenézy. Intersticiálne priestory sa rozšírili a krvné cievy mali poškodenú stenu. Po chronickom podávaní kadmia v potrave sú zmeny slabšie a uniformnejšie. V centre semenníka sú kanáliky zachované s prebiehajúcou spermatogenezou, ale po periférii vypadávajú bunky zo zárodočného epitelu a zastavuje sa spermatogéza. V týchto miestach sa rozširuje väzivo. Kvantitatívnou analýzou sa zisťuje zmenšenie objemu semenotvorného epitelu a lúmenu kanálikov po podaní kadmia a zvýšenie objemu väziva (Toman a Massányi, 1997; Massányi et al., 2002).

Po podaní toxickej dávky kadmia potkanom je možné už po 24 hodinách pozorovať na semenníkoch príznaky nekrózy, ktorá sa pri pozorovaní elektrónovým mikroskopom

prejavuje rozpadom kapilárneho riečišťa, veľkými zmenami na bazálnej membráne semenotvorných kanálikov a v degenerácii semenotvorného epitelu. Na spermiiach z chvosta prisemenníka sú viditeľné jasné zmeny v štruktúre mitochondrií a ich napučíavanie (Toman a Massányi, 1997, Massányi et al., 2001).

Kadmiom spôsobená nekróza semenníkov sa popisuje u mužov a u ďalších primátov. Kadmium spôsobuje vaskulárne poškodenia a edematizáciu interstícia, čo vedie k hemorágiám, zníženej produkcii androgénov Leydigovými bunkami, nekróze Sertolihových buniek, inhibícii spermatogenézy a prípadne až k atrofii semenníkov. Po jednorazovom podaní kadmia potkanom a myšiam dochádza v semenníku k poklesu DNA, RNA a aktivity mnohých enzýmov obsahujúcich zinok. Obsah bielkovín sa zvyšuje aj napriek tomu, že syntéza bielkovín je redukovaná (Massányi et al., 1991; Rahman et al., 2007; Thompson a Bannigan, 2008).

Podanie kadmia má za následok poruchu spermiácie od štádia IX po neskoršie štádia spermatogenézy v semenotvornom epiteli (Scialli a Zinaman, 1993). Kadmium inhibuje aktivitu cholin acetyl-transferázy a spôsobuje pokles syntézy acetylcholínu v spermiiach a poškodzuje pohyblivosť spermií. Tieto zmeny možno sledovať u potkanov, citlivých línií myší a ostatných cicavčích druhov so skrôtom. Semenníky cicavcov bez skróta (jež) a gonády vtákov sú všeobecne po expozícii kadmiom nepostihnuté (Scialli a Zinaman, 1993).

V troch pokusoch na plemenných kancoch sa sledoval vplyv kadmia na kvalitu ejakulátu a na jeho ukladanie vo vybraných tkanivách. Kadmium pri zvýšenom prívode v kŕmnej dávke preukazne preniká do pečene, obličiek a semenníkov. Jeho zvýšenie v generatívnych orgánoch sa neprejavilo zvýšením obsahu kadmia v ejakuláte. Pri hodnotení produkcie spermií v období pred pokusom možno pri nízkej dávke popísať skôr stimulačný účinok. Hodnotenie ejakulátu (percento patologických spermií, percento nepoškodených akrozómov, sledovanie prežívateľnosti spermií) nevykazuje podstatné rozdiely (Krátký et al., 1995). Na druhej strane sa popisuje, že vysoké dávky kadmia utlmujú dráhovú rýchlosť a priamosť dráhy spermií (Massányi et al., 1996a, 1999b).

Olovo

Napriek tomu, že toxicita olova a jeho zlúčenín je známa niekoľko storočí, záujem o štúdium toxického účinku tohto prvku nepoklesol, skôr naopak. Stále širšie použitie olova v rôznych oblastiach priemyslu a zvlášť používanie tetraetylolova ako antidetonačnej prísady do benzínu má za následok zvyšujúcu sa kontamináciu životného prostredia týmto kovom.

Olovo je prvok skupiny IVb periodického systému s relatívnou atómovou hmotnosťou 207,19 a atómovým číslom 82. Vo väčšine anorganických zlúčenín sa olovo vyskytuje v dvojmocnej forme. Anorganické soli olova sú väčšinou zle rozpustné s výnimkou octanu, dusičnanu, chlorečnanu, chloristanu a do určitej miery aj chloridu (Bencko et al., 1995).

Olovo je najrozšírenejšie z ťažkých kovov. Vyskytuje sa v pôde, vodách i v atmosferických komponentoch biosféry. Predpokladá sa, že v oblastiach doteraz nekontaminovaných ľudskou činnosťou by nemala koncentrácia olova v ovzduší presiahnuť 1 ng.m^{-3} . Niektoré merania uskutočnené v Grónsku a na Novej Zemi tento predpoklad potvrdili (Bencko et al., 1995).

Olovo je v stopách prírodnou zložkou pôdy, vody a živočíchov. Hlavným zdrojom kontaminácie životného prostredia zlúčeninami olova je automobilová doprava (Caplun et al., 1984; Skalická et al., 2002; Myslek a Kalisińska, 2006; Sánchez-Chardi, 2007). Olovo tohto pôvodu je zdrojom kontaminácie živočíchov žijúcich v týchto biotopoch (Čelechovská et al., 2007). Ďalším zdrojom olova sú emisie z priemyselných podnikov spaľujúcich uhlie pri spracovaní farebných kovov a pri ďalších priemyselných procesoch, ale aj pri hnojení priemyselnými hnojivami (Williams, 1977; Findejsová et al., 1982). Pri dlhodobom príjme sa olovo ukladá najmä do kostí, menej v obličkách, pečeni a svaloch (Jančová et al., 2006; Lazarus et al., 2008). Pri akútnych otravách sa olovo ukladá do parenchymatóznych orgánov a svaloviny, menej do kostí (Cibulka et al., 1980). Jeho dlhodobý príjem spôsobuje poruchy humorálnych mechanizmov, zníženie tvorby protilátok ako i ďalšie poruchy (Breyl, 1987). Z hľadiska toxicity je významná jeho kumulačná schopnosť, ktorá spôsobuje zvyšovanie jeho koncentrácie na každom stupni potravinového reťazca (Cibulka et al., 1985).

Podľa výskumov akumulácie ťažkých kovov v organizme zvierat sa usúdilo, že daniel škvrtný je dobrým bioindikátorom znečistenia prostredia. Zistili sa silné závislosti medzi obsahom olova a ortuti v obličkách danielov a sezónou. Koncom leta a začiatkom jesene sa zaznamenali najvyššie hladiny olova a ortuti, čo zrejme súvisí s prijímaným krmivom. Význam sa prikladá najmä konzumácii hřibov, ktoré, ako je známe, obsahujú vyššie hladiny kovov (Pokorny a Ribarič-Lasnik, 2002).

Vstrebávanie olova z vonkajšieho prostredia nezávisí len na množstve olova prítomného v mieste vstupu do organizmu za jednotku času. Vstrebávanie výrazne ovplyvňujú fyzikálno-chemické vlastnosti kovu a jeho zlúčenín, fyziologický stav organizmu ako celku ako aj stav orgánov, ktoré sú vstupnou bránou pre olovo a ďalšie faktory ako sú vek a pohlavie. Fyzická záťaž vedie k zvýšenej pľúcnej ventilácii a osoby ťažko pracujúce musia mať aj vyšší príjem potravín. Aj tieto faktory môžu výrazne ovplyvniť vstrebávanie olova (Cibulka et al., 1991).

Olovo a ďalšie ťažké kovy sa uvoľňujú z glazúr niektorých tradičných tuniských hrnčiarskych výrobkov v koncentráciách, ktoré sú dostatočne vysoké na to, aby poškodili zdravie človeka. Pri 24 hodinovom teste žltozelených a zelenobielych hrnčekov z tuniského obchodu, ktoré sa naplnili roztokom kyseliny octovej, sa uvoľnilo do roztoku do $51 \mu\text{g Pb.ml}^{-1}$. Tieto hodnoty vysoko prekračujú limit stanovený U.S. FDA. Použitie tradičného mliečneho derivátu (leben), široko konzumovaného ako nápoj v Tunisku, ako testovacie médium ukázalo, že z jednej šálky človek prijíma až $1407 \mu\text{g}$ olova. Používanie takýchto nádob môže spôsobiť vážne zdravotné problémy tuniským konzumentom (Belgaied, 2003).

Ťažké kovy v prostredí sú rizikovým faktorom vzniku rakoviny. V Turecku (východná časť), kde je vyšší výskyt rakoviny žalúdka a čreva, sa skúmal obsah kovov (Co, Cd, Pb, Zn, Mn, Ni a Cu) v pôde, ovocí a zelenine. Pôda vulkanického pôvodu a produkty na nej pestované obsahujú karcinogénne kovy v takých hladinách, ktoré môžu byť zodpovedné za vysoký výskyt rakoviny v tejto oblasti (Türkdogan et al., 2003). V mušliach sa zistili nasledovné hladiny prvkov (mg.kg^{-1}): Zn – 205; Cu – 6,20; Cd – 0,57; Pb – 0,85; Ni – 2,5 a Cr – 1,18 (Milacic a Kralj, 2003).

Väčšina keramických nádob používaných v Egypte je pokrytých glazúrou, ktorá obsahuje silikát olova. V prípade nedokonalého vypálenia pri nedostatočne vysokej teplote

sa pri ich používaní uvoľňuje olovo, najmä účinkom kyslej potraviny. Tradičným varením sa uvoľňuje o niečo väčšie množstvo olova než pri príprave v mikrovlnke, čo je pravdepodobne spôsobené dlhším časom prípravy tradičným spôsobom prípravy nad plameňom. Častá príprava jedla v mikrovlnke môže viesť k príjmu takého množstva olova, ktoré je na hranici alebo prekračujúce prípustný týždenný limit pre dospelých – 3 mg. Príprava jedál na otvorenom ohni v týchto nádobách je kvôli dlhšej dobe prípravy ešte rizikovejšia a tieto nádoby sú potenciálnym zdrojom toxických hladín olova, ktoré sa v organizme kumulujú a poškodzujú nervový systém, pečeň, obličky. Skúmali sa možné účinné metódy na elimináciu olova z prirodzene kontaminovaných jedlých rýb (Tilapie), ktoré sa lovia v rieke Níl. Zistilo sa, že výrazne pôsobilo premývanie v 10% roztoku liečivej rastliny - ambrózie (*Ambrosia maritima*) a polypeptidu nizínu, ktoré eliminovali olovo z rýb úplne. Na druhej strane, pitná voda bola najmenej účinná (Salim et al., 2003).

Nepriaznivé účinky olova na väzbu gonadotropínov na receptory sú popisované pri reprodukčnom systéme. Dokázala sa znížená afinita gonadotropínov k ich receptorom u samcov potkanov. V súvislosti s intoxikáciou olovom sa popisuje hyperplázia Leydigových buniek v atrofických tubuloch. Hoci koncentrácia testosterónu v sére je u pacientov profesionálne exponovaných olovom normálna, boli popísané poruchy spermatogenézy vrátane výskytu oligospermie, azospermie a atenospermie (Scialli a Zinaman, 1993).

Olovo však neovplyvňuje funkciu reprodukčných orgánov len u cicavcov. Poškodenie semenníkov olovom sa popisuje aj u dospelých kohútov. Zaznamenal sa spomalený rast semenníkov japonských prepelíc počas vývoja po aplikácii olova. K zníženiu počtu spermií v semenníkoch divokých hrdličiek došlo po pridaní olova do pitnej vody pred párením a počas celého rozmnožovacieho cyklu (Cibulka et al., 1991).

Značne rozdielne údaje o účinku olova na samčí pohlavný aparát doteraz nedovoľujú jednoznačne sa vyjadriť o jeho toxicite. Hildebrand et al. (1973) pozorovali výrazné poškodenie spermatogenézy potkanov už pri dávke 0,3 mg za deň podávaného po dobu 30 dní, avšak Derr et al. (1976) a Fahim a Khare (1980) pri trojnásobne vyššej dávke počas jedného roka takéto zmeny nezistili. Barratt et al. (1989) nepozorovali výrazne negatívny účinok na niektorý z typov pohlavných buniek ako aj výskyt abnormálnych spermií. Kraskowskii et al. (1979) však prítomnosť abnormálnych spermií nezaznamenali.

Lancrajan et al. (1975) zistil u mužov postihnutých otravou olovom až 86% abnormálnych spermii oproti 14% kontrolných vzoriek semenotvorných kanálikoch. Prekvapivo malý účinok olova na niektorý typ z pohlavných buniek Barratt et al. (1989) vysvetlili ochranným účinkom hemotestikulárnej bariéry, kým Gregor a Mason (1990) to vysvetľujú rozdielnou individuálnou toleranciou podávanej látky.

Účinok olova sa prejavuje aj v zníženom obsahu nukleových kyselín v mozgu plodov. Na druhej strane Piskáč et al. (1985) uvádzajú transplacentárne poškodenie plodov, pričom bola zistená kumulácia olova v kostiach plodov, menej v pečeni, obličkách a v čreve. Pozoroval sa aj zvýšený obsah olova v kostiach niektorých druhov poľovnej zveri.

Nikel

Nikel po jeho odlišení od železa a kobaltu objavil švédsky bádateľ A. Cronstedt v roku 1751 pri rozboře nikelinu, od ktorého odvodil jeho názov. Kovový nikel sa nachádza v železných meteoritoch, inak iba vo väzbe so sírou, arzénom, antimónom, alebo viazaný na kyselinu kremičitú. Pre rastliny a niektoré živočíchy je nepostrádateľným esenciálnym prvkom. Z biologických účinkov sú najzávažnejšie jeho alergentné a karcinogénne účinky (Bencko et al., 1995).

Nikel je biely, lesklý, kujný a ťažký kov, na vzduchu stály, slabo feromagnetický. V nemčine znamená darebák. Objavil ho A. F. Cronstedt roku 1751 v medenej rude vo Švédsku. Vyrába sa po vypražení sírnikových rúd na oxid nikelnatý redukciou uhlíkom. Čistý nikel sa získava rozkladom karbonylu niklu ako 99,99% nikel. Vyskytuje sa v arzenových rudách: nikelíne a gersdorfite v Kanade, na Urale. Jeho významným nerastom je aj zelený kremičitan nikelnatý – garnierit, ktorého ložiská sú v Novej Kaledónii a v Poľsku. Okrem toho nikel sprevádza železo v pyritoch, pentlanditoch a nachádza sa aj v naftě (Bencko et al., 1995).

Pretože odoláva korózii, poniklúvajú sa ním korčule, bicykle, súčiastky áut a ozdobné kovové predmety. Z jeho zliatiny sa razia drobné mince. Zo zliatin, nazývaných nové striebro, alpaka alebo argentán, ktoré obsahujú okrem medi a zinku 10 až 20% niklu, sa vyrábajú príbory. Významnou zliatinou je aj konštán, nichróm a nikelín, ktoré sú pre

malú elektrickú vodivosť vhodné na výrobu vinutí do elektrických pecí. Najväčšia časť niklu sa spotrebuje na výrobu niklových ocelí, odolných proti korózii, ktoré sa stali zbrojným kovom na výrobu hlavni pušiek. Najznámejšia je nehrdzavejúca oceľ s 9% Ni a 18% Cr, z ktorej sa vyrábajú chirurgické nástroje (Bencko et al., 1995).

Sledoval sa účinok niklu na produkciu testosterónu Leydigovými bunkami myší *in vitro* po expozícii *in vivo* aj *in vitro*. CELP myši boli opakovane vystavené expozícií NiSO₄ v dávke 10, 20 a 40 mg.kg⁻¹ živej hmotnosti. Zistil sa útlm produkcie testosterónu u zvierat exponovaných dávke 20 a 40 mg.kg⁻¹. Vo vzťahu k niklu sa nezistili zmeny hmotnosti tela, semenníkov, prisemenníkov, hypofýzy a ani obličiek. Po kultivácii Leydigových buniek sa zisťuje dávkovo závislý pokles produkcie testosterónu pri stimulácii buniek hCG. Zisťuje sa aj časovo závislý pokles produkcie testosterónu. Výsledky poukazujú na dávkovo závislý pokles produkcie testosterónu stimulovaných Leydigových buniek myší *in vivo* aj *in vitro* pri dávke, ktorá nespôsobí všeobecne toxický, alebo výrazne cytotoxický účinok. Časovo závislé analýzy naznačujú, že účinok niklu na produkciu testosterónu je závislý na čase a koncentrácií a nie na stupni cytotoxicity (Forgács et al., 2001).

Sledoval sa aj vplyv niklu (NiCl₂) na štruktúru semenníka u myší *in vivo*. Zvieratá boli rozdelené na skupiny, ktoré intraperitoneálne dostali jednorazovú dávku 20 mg NiCl₂.kg⁻¹ živej hmotnosti (skupina A), 40 mg NiCl₂.kg⁻¹ (skupina B) a skupina C bez podania niklu slúžila ako kontrola. Zvieratá boli usmrtené 48 hodín po podaní niklu. Váženie nepreukázalo žiadne preukazne rozdiely v hmotnosti zvierat pred pokusom a po podaní niklu. Nezistil sa ani rozdiel v pomere hmotnosti semenníkov k celkovej hmotnosti. V oboch pokusných skupinách sa zistili preukazný pokles relatívneho objemu semenotvorného epitelu v porovnaní s kontrolou. Podobne sa zistil aj preukazný rozdiel medzi skupinou A a B. Relatívny objem interstícia bol nepreukazne vyšší v oboch pokusných skupinách. Relatívny objem bol vyšší po podaní niklu. Kvalitatívnym hodnotením sa zistila dilatácia krvných ciev v interstíciu, undulácia bazálnej membrány a v semenotvornom epiteli sa vyskytovali prázdne miesta. Priemer semenotvorného kanálika bol preukazne vyšší v oboch pokusných skupinách v porovnaní s kontrolou. Podobne výška semenotvorného epitelu preukazovala výrazný pokles po podaní niklu. Naopak, hodnotenie priemeru lúmenu semenotvorného kanálika bolo signifikantne vyššie v oboch pokusných

skupinách. TUNEL analýza preukazala vyššiu frekvenciu apoptózy v interstíciu zvierat po podaní niklu v porovnaní s kontrolnou skupinou. Dosiahnute výsledky jasne dokazujú negatívny účinok niklu na štruktúru ako aj funkciu semenotvorného epitelu s hľadiska produkcie spermíí (Massányi et al., 2007).

3 CIELE PRÁCE

So zvyšovaním ľudských aktivít vstúpila do popredia aj otázka toxicity ťažkých kovov v životnom prostredí zvierat a človeka. Na druhej strane reprodukčné orgány patria medzi telesné orgány, ktoré nie sú bezpodmienečne potrebné pre život jedinca, ale slúžia k zachovaniu druhu. V súčasnej dobe sú veľmi dobre popisované vážne zmeny spôsobené prítomnosťou kadmia, medi, olova a zinku v niektorých orgánoch zvierat.

V predloženej práci sme sa zamerali na nasledovné problémy:

1. Stanovenie koncentrácie kadmia, zinku, železa, olova, medi a niklu v inseminačných dávkach býkov, baranov a kancov.
2. Stanovenie výskytu patologických foriem spermií v sledovaných inseminačných dávkach.
3. Určenie závislosti medzi koncentráciou sledovaných prvkov v inseminačných dávkach býkov, baranov a kancov a vybranými parametrami kvality inseminačných dávok.

4 MATERIÁL A METODIKA

V práci sme použili 150 hlboko zmrazených inseminačných dávok od 15 dospelých plemenných býkov plemena Slovenské strakaté, 90 hlboko zmrazených inseminačných dávok od 9 dospelých plemenných baranov plemena Zošľachtená valaška a 19 čerstvých ejakulátov od dospelých plemenných kancov plemena Biela ušľachtilá. Ejakuláty býkov a baranov boli získavané a následne spracované na plemenárskom ústave rutinnými metódami do formy peliet. Ejakuláty kancov boli získavané a následne spracované na vybranom poľnohospodárskom družstve rutinnými metódami.

Pri stanovení kovov v biologickom materiály boli použité metódy atómovej absorpčnej spektrofotometrie s atomizáciou v plameni (FAAS) a elektrotermickou atomizáciou v grafitovej kyvete s pyrolytickou vrstvou (ETAAS) (Taylor et al., 2002, 2004, 2005, 2006).

Na rozklad biologických vzoriek bola použitá mineralizácia mokrou cestou s použitím HNO_3 a H_2O_2 . Mineralizácia sa vykonala v mikrovlnnom mineralizátore CEM Star System 2, čo je otvorený systém s fokusovaným poľom mikrovlnnej energie. Po mineralizácii sa vzorky kvantitatívne preniesli do 50 ml odmerných baniek a doplnili deionizovanou vodou (Kramárová et al., 2005).

Vo vzorkách ejakulátu bol metódou FAAS stanovený zinok a metódou ETAAS stanovené kadmium, olovo, železo, nikel a meď. Pri metóde ETAAS bol použitý atómový absorpčný spektrofotometer Varian SpectrAA 20 BQ (Varian Inc., Palo Alto, CA, USA) s elektrotermickým atomizátorom GTA 96. Pri metóde FAAS bol použitý atómový absorpčný spektrofotometer Varian SpectrAA 300A. Pri stanoveniach metódou ETAAS pri všetkých prvkoch bola použitá deutériová korekcia pozadia a atomizácia zo strany grafitovej kyvety. Pri stanovení olova bolo injektované 2x20 μl vzorky a 8 μl modifikátora. Ako modifikátor bol použitý $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$. Pri stanovení kadmia bolo injektované 2x20 μl vzorky a 7 μl modifikátora. Bol použitý zmesný modifikátor Pd a kyselina citrónová. Pri stanovení medi bolo injektované 10 μl vzorky bez modifikátora. Pri stanovení boli použité chemikálie čistoty p.a. Použité štandardy boli komerčne pripravené. Pracovné štandardy boli pripravené zo zásobného roztoku riedením s 0,5% HNO_3 . Pri umývaní laboratórneho

skla a pri príprave roztokov a štandardov bola použitá deionizovaná voda (Massányi et al., 2005; Skalická et al., 2008).

Pre analýzu výskytu patologických spermíí sme zhotovovali z inseminačných dávok nátery na podložné sklíčka na okraji označené poradovým číslom vyšetrenia (býka, barana, kanca). Jednu kvapku zriedenej inseminačnej dávky sme rozotreli na podložnom sklíčku (v uhle 45°) ťahom kvapky za hranou sklíčka, aby vzorka nevnikla pod hranu krycieho sklíčka, ktorým sa robil náter. Spermie by sa mohli mechanicky poškodiť a vznikli by artefakty. Nátery sme nechali usušiť na ohrievacej doske (38°C). Keď boli nátery matné, preparáty sme fixovali 30 minút Hancockovým roztokom v zložení formalín $125,0\text{ cm}^3$, NaCl $10,0\text{ g}$, NaHCO_3 $0,5\text{ g}$, *aqua fontis ad* $1000,0\text{ cm}^3$. Preparát sme dôkladne opláchli tenkým prúdom destilovanej vody (pH $7,0 - 7,4$) po dobu 1 minúty, usušili sme na vzduchu a následne farbili v kvetách Giemsovým roztokom 2 hodiny. Farbiaci roztok o zložení Giemsa – Romanowski farbivo ($8,0\text{ cm}^3$), Sörensonov fosfátový pufer o pH $7,0$ ($4,0\text{ cm}^3$) a destilovaná voda s pH $7,4$ ($70,0\text{ cm}^3$) sme pripravili tesne pred použitím na jednorazové použitie. Preparáty sme dôkladne opláchli destilovanou vodou (pH $7,0 - 7,4$) 1 minútu. Potom sme preparát pomaly sušili. Na preparátoch sa akrozóm sfarbí výrazne modrofialovo, so svetlejším ekvatoriálnym segmentom a ešte svetlejšou zadnou časťou hlavičky (*pars posterior*).

Preparáty sme posudzovali na optickom mikroskope pri 450 násobnom zväčšení. Pri každom býkovi sme hodnotili v priemere 1000 spermíí, celkovo 15000 spermíí, pri baranovi sme zhodnotili v priemere tiež 1000 spermíí a celkovo sme zhodnotili 9000 spermíí, pri každom kancovi sme hodnotili v priemere 1000 spermíí a celkovo sme zhodnotili 19000 a celkovo sme tak zhodnotili 45000 spermíí.

Patologicky zmenené spermie sme zorad'ovali do klasifikačnej tabuľky patologických (morfológicky malformovaných) foriem spermíí bežne používanej na hodnotenie spermíí v plemenných chovoch. Zo škály patologických foriem spermíí sme vybrali 8 zmien, ktoré sme hodnotili – hlavička bez bičíka, torzo bičíka, kľučkovité stočenie bičíka, zlomený bičík, zvinutie (klbko) bičíka, retencia cytoplazmatickej kvapky a iné patologické formy spermíí. Pri súčasnom výskyte primárnej i sekundárnej anomálie sme

zarátali len primárnu. Pri výskyte voľných hlavičiek a voľných bičikov sme započítavali len hlavičky (Gamčík et al., 1992; Massányi et al., 1996; Lukáč et al., 2009).

Zo získaných výsledkov sme vypočítali priemer, smerodajnú odchýlku, maximálnu a minimálnu hodnotu a následne sme vypočítali korelačné koeficienty s použitím PC programu SAS podľa predošlých prác (Massányi et al., 2004, 2005).

4 VÝSLEDKY

4.1 Analýza zmrazených inseminačných dávok (ID) / ejakulátov býkov

Analýza koncentrácie vybraných prvkov v zmrazených inseminačných dávkach býkov preukázala, že koncentrácia medi je 1,694 $\mu\text{g.ml}^{-1}$, s minimálnou hodnotou 1,455 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ a maximálnou hodnotou 2,152 $\mu\text{g.ml}^{-1}$. Priemerná koncentrácia železa je 39,295 $\mu\text{g.ml}^{-1}$, s minimálnou hodnotou 17,035 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ a maximálnou hodnotou 94,532 $\mu\text{g.ml}^{-1}$. Koncentrácia zinku v inseminačných dávkach býkov bola 85,893 $\mu\text{g.ml}^{-1}$, s minimálnou hodnotou 34,441 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ a maximálnou hodnotou 242,704 $\mu\text{g.ml}^{-1}$. Pri sledovaní koncentrácie kadmia bola zistená priemerná koncentrácia 0,103 $\mu\text{g.ml}^{-1}$, s minimálnou hodnotou 0,012 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ a maximálnou hodnotou 0,423 $\mu\text{g.ml}^{-1}$. Koncentrácia olova v inseminačných dávkach býkov bola 0,062 $\mu\text{g.ml}^{-1}$, s minimálnou hodnotou 0,002 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ a maximom 0,150 $\mu\text{g.ml}^{-1}$. U niklu bola zistená koncentrácia 0,124 $\mu\text{g.ml}^{-1}$, s minimálnou hodnotou 0,035 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ a maximálnou hodnotou 0,281 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ (Tabuľka 2).

Tabuľka 2 – Koncentrácie vybraných prvkov ($\mu\text{g.ml}^{-1}$) v inseminačných dávkach býkov

parameter	x	SD	minimum	maximum
Cu	1,694	0,211	1,455	2,152
Fe	39,295	22,073	17,035	94,532
Zn	85,893	61,612	34,441	242,704
Cd	0,103	0,141	0,012	0,423
Pb	0,062	0,043	0,002	0,150
Ni	0,124	0,071	0,035	0,281

x – priemer; SD – smerodajná odchýlka; minimum – minimálna hodnota; maximum – maximálna hodnota

Na základe morfolologickej analýzy tvoria inseminačné dávky býkov v 88,2% normálne spermie a 11,8% tvoria morfologicky zmenené resp. patologické spermie. Z celkového počtu patologických spermii býka sme zistili, že 32,63% tvoria hlavičky bez bičíka, 23,97% tvorí torzo bičíka, 17,29% tvorí kľučkovité stočenie bičíka, 5,01% tvorí zlomený bičík, 3,98% tvorí kľbko bičíka, 1,61% je retencie cytoplazmatickej kvapky a 15,51% tvoria iné abnormálne spermie (Tabuľka 3, Graf 1).

Tabuľka 3 – Analýza výskytu patologických spermii v inseminačných dávkach býkov

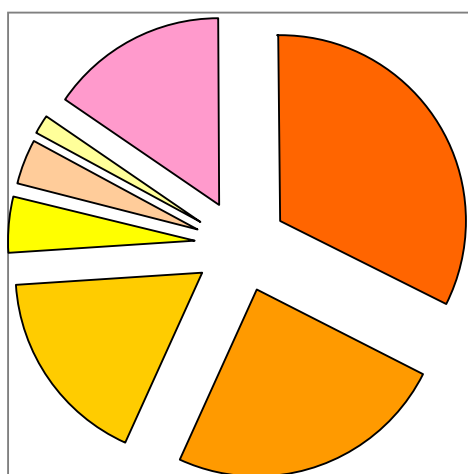
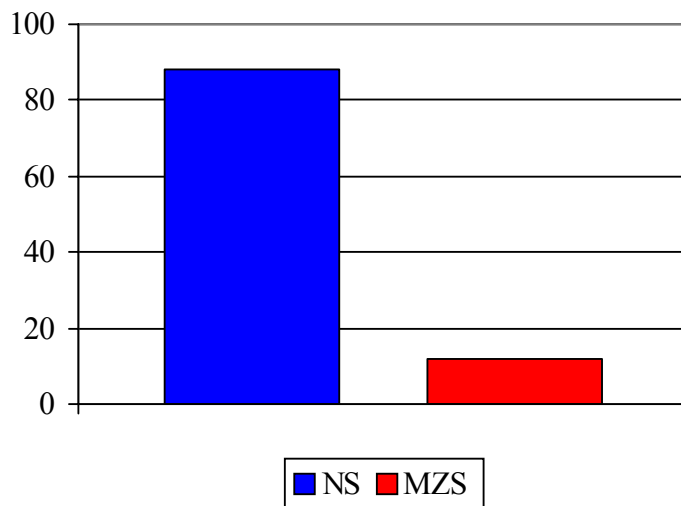
Parameter	x	SD	minimum	maximum
NS (%)	88,20	9,53	81,32	95,40
MZS (%)	11,80	4,88	4,60	18,68
HBB (%)	32,63	19,07	9,78	50,62
TB (%)	23,97	10,57	10,41	35,80
KSB (%)	17,29	10,72	8,52	28,68
ZB (%)	5,01	3,89	2,12	8,55
KB (%)	3,98	2,89	1,95	7,14
RCK (%)	1,61	1,72	0,04	3,62
IAS (%)	15,51	8,66	6,32	23,70

NS – normálne spermie; MZS – morfologicky zmenené spermie;

HBB – hlavička bez bičíka; TB – torzo bičíka; KSB – kľučkovité stočenie bičíka; ZB – zlomený bičík; KB – kľbko (zvinutie) bičíka; RCK – retencia cytoplazmatickej kvapky;

IAS – iné abnormálne spermie

Graf 1 – Výskyt patologických spermíí (%) v inseminačných dávkach býkov



NS – normálne spermie; MZS – patologické/morfologicky zmenené spermie;
 HBB – hlavička bez bičíka; TB – torzo bičíka; KSB – kľúčkovité stočenie bičíka; ZB – zlomený bičík; KB – kľbko (zvinutie) bičíka; RCK – retencia cytoplazmatickej kvapky; IAS – iné abnormálne spermie

Korelačná analýza preukázala silnú pozitívnu koreláciu v inseminačných dávkach býkov medzi:

- koncentráciou železa a obsahom zinku,
- koncentráciou niklu a hlavičkami bez bičika.

Strednú pozitívnu koreláciu v sledovaných inseminačných dávkach býkov sme zistili medzi:

- koncentráciou medi a koncentráciou olova,
- koncentráciou medi a koncentráciou niklu,
- koncentráciou olova a koncentráciou niklu,
- koncentráciou niklu a morfoloicky zmenenými spermiami,
- koncentráciou olova a hlavičkou bez bičika,
- koncentráciou niklu a torzom bičika,
- koncentráciou olova a torzom bičika,
- koncentráciou zinku a kľučkovitým stočením bičika,
- koncentráciou kadmia a kľučkovitým stočením bičika,
- koncentráciou železa a zlomeným bičíkom,
- koncentráciou zinku a zlomeným bičíkom,
- koncentráciou medi a klbkom bičika,
- koncentráciou niklu a klbkom bičika,
- koncentráciou železa a retenciou cytoplazmatickej kvapky,
- koncentráciou zinku a retenciou cytoplazmatickej kvapky,
- koncentráciou niklu a retenciou cytoplazmatickej kvapky
- koncentráciou železa a inými abnormálnymi spermiami,
- koncentráciou zinku a inými abnormálnymi spermiami.

Strednú negatívnu koreláciu v sledovaných inseminačných dávkach býkov sme zistili medzi:

- koncentráciou železa a hlavičkou bez bičika.

- koncentráciou zinku a hlavičkou bez bičíka (Tabuľka 4).

Tabuľka 4 – Korelácie medzi sledovanými prvkami a patologickými spermiami v inseminačných dávkach býkov

	Cu	Fe	Zn	Cd	Pb	Ni
Cu	1	0,29	0,27	0,07	0,56	0,52
Fe		1	0,72	-0,30	0,19	-0,06
Zn			1	-0,14	0,19	-0,12
Cd				1	-0,47	-0,12
Pb					1	0,42
Ni						1
MZS	0,25	0,10	0,07	0,10	0,32	0,64
HBB	0,28	-0,34	-0,48	0,01	0,45	0,76
TB	0,17	-0,02	0,04	-0,10	0,46	0,62
KSB	0,12	0,28	0,40	0,56	-0,32	-0,01
ZB	-0,05	0,66	0,61	-0,18	-0,01	0,01
KB	0,40	0,20	0,28	0,32	0,18	0,52
RCK	0,26	0,49	0,43	-0,22	0,23	0,52
IAS	-0,04	0,42	0,35	-0,04	0,10	0,13

NS – normálne spermie; MZS – morfológicky zmenené spermie;

HBB – hlavička bez bičíka; TB – torzo bičíka; KSB – kľučkovité stočenie bičíka; ZB – zlomený bičík; KB – kľbko (zvinutie) bičíka; RCK – retencia cytoplazmatickej kvapky;

IAS – iné abnormálne spermie

0,01 – 0,33 – slabá korelácia; 0,34 – 0,66 – stredná korelácia; 0,67 – 0,99 – silná korelácia

4.2 Analýza zmrazených inseminačných dávok (ID) / ejakulátov baranov

Analýza koncentrácie vybraných prvkov v zmrazených ejakulátoch baranov preukázala, že koncentrácia medi je $2,565 \mu\text{g.ml}^{-1}$, s minimálnou hodnotou $2,149 \mu\text{g.ml}^{-1}$ a maximálnou hodnotou $2,756 \mu\text{g.ml}^{-1}$. Priemerná koncentrácia železa je $41,530 \mu\text{g.ml}^{-1}$, s minimálnou zistenou hodnotou $29,137 \mu\text{g.ml}^{-1}$ a maximálnou hodnotou $61,212 \mu\text{g.ml}^{-1}$. Koncentrácia zinku v ejakulátoch baranov bola $62,274 \mu\text{g.ml}^{-1}$, s minimálnou hodnotou $24,366 \mu\text{g.ml}^{-1}$ a maximom $137,258 \mu\text{g.ml}^{-1}$. Pri sledovaní koncentrácie kadmia bola zistená priemerná koncentrácia $0,124 \mu\text{g.ml}^{-1}$, s minimálnou hodnotou $0,003 \mu\text{g.ml}^{-1}$ a maximálnou hodnotou $0,432 \mu\text{g.ml}^{-1}$. Koncentrácia olova v inseminačných dávkach baranov bola $0,361 \mu\text{g.ml}^{-1}$, s minimálnou hodnotou $0,003 \mu\text{g.ml}^{-1}$ a maximálnou hodnotou $0,450 \mu\text{g.ml}^{-1}$. U niklu bola zistená koncentrácia $0,320 \mu\text{g.ml}^{-1}$, s minimálnou hodnotou $0,005 \mu\text{g.ml}^{-1}$ a maximálnou hodnotou $0,398 \mu\text{g.ml}^{-1}$ (Tabuľka 5).

Tabuľka 5 – Koncentrácie vybraných prvkov ($\mu\text{g.ml}^{-1}$) v inseminačných dávkach baranov

parameter	x	SD	minimum	maximum
Cu	2,565	0,198	2,149	2,756
Fe	41,530	10,812	29,137	61,212
Zn	62,274	35,356	24,366	137,258
Cd	0,124	0,122	0,003	0,432
Pb	0,361	0,069	0,003	0,450
Ni	0,320	0,192	0,005	0,398

x – priemer; SD – smerodajná odchýlka; minimum – minimálna hodnota; maximum – maximálna hodnota

Na základe výsledkov tvoria inseminačné dávky baranov v 82,83% normálne spermie a 17,17% tvoria morfológicky zmenené resp. patologické spermie. Z celkového počtu patologických spermií baranov sme zistili, že 54,05% tvoria hlavičky bez bičíka, 19,04% tvorí torzo bičíka, 11,01% tvorí kľúčkovité stočenie bičíka, 3,49% tvorí zlomený bičik, 2,68% tvorí kľbko bičíka, 1,40% je retencia cytoplazmatickej kvapky a 8,33% tvoria iné abnormálne spermie (Tabuľka 6, Graf 2).

Tabuľka 6 – Analýza výskytu patologických spermií v inseminačných dávkach baranov

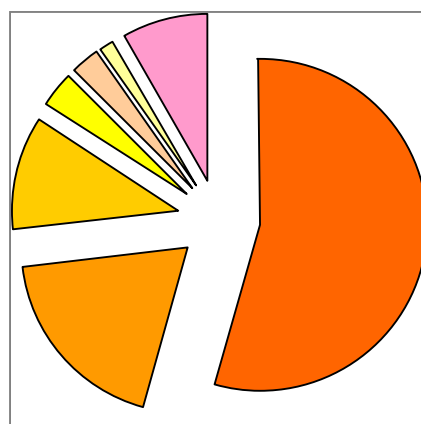
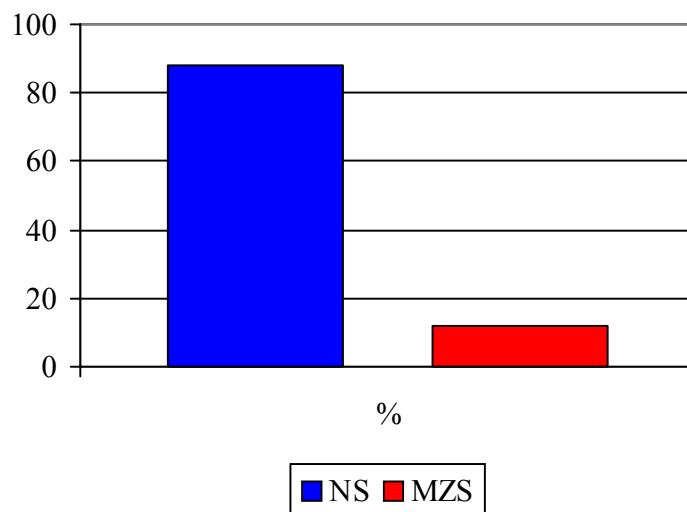
parameter	x	SD	minimum	maximum
NS (%)	82,83	10,24	73,43	92,53
MZS (%)	17,17	8,80	7,47	26,57
HBB (%)	54,05	15,21	38,54	71,55
TB (%)	19,04	7,33	12,01	27,98
KSB (%)	11,01	8,58	3,26	19,60
ZB (%)	3,49	1,52	2,05	6,23
KB (%)	2,68	1,34	1,23	4,07
RCK (%)	1,40	1,03	0,25	2,55
IAS (%)	8,33	4,15	4,02	13,52

NS – normálne spermie; MZS – morfológicky zmenené spermie;

HBB – hlavička bez bičíka; TB – torzo bičíka; KSB – kľúčkovité stočenie bičíka; ZB – zlomený bičik; KB – kľbko (zvinutie) bičíka; RCK – retencia cytoplazmatickej kvapky;

IAS – iné abnormálne spermie

Graf 2 – Výskyt patologických spermíí (%) v inseminačných dávkach baranov



■ HBB
 ■ TB
 ■ KSB
 ■ ZB
 ■ KB
 ■ RCK
 ■ IAS

NS – normálne spermie; MZS – morfológicky zmenené spermie;

HBB – hlavička bez bičíka; TB – torzo bičíka; KSB – kľučkovité stočenie bičíka; ZB – zlomený bičík; KB – kľbko (zvinutie) bičíka; RCK – retencia cytoplazmatickej kvapky;

IAS – iné abnormálne spermie

Korelačná analýza preukázala silnú pozitívnu koreláciu v ejakulátoch baranov medzi:

- koncentráciou olova a koncentráciou kadmia,
- koncentráciou niklu a hlavičkami bez bičíka.

Korelačná analýza preukázala silnú negatívnu koreláciu v ejakulátoch baranov medzi:

- koncentráciou medi a koncentráciou niklu,
- koncentráciou medi a hlavičkami bez bičíka,
- koncentráciou železa a torzom bičíka.

Strednú pozitívnu koreláciu preukázala korelačná analýza v ejakulátoch baranov medzi:

- koncentráciou niklu a morfológicky zmenenými spermiami,
- koncentráciou železa a hlavičkou bez bičíka,
- koncentráciou kadmia a torzom bičíka,
- koncentráciou olova a torzom bičíka,
- koncentráciou niklu a retenciou cytoplazmatickej kvapky.

Strednú negatívnu koreláciu preukázala korelačná analýza v ejakulátoch baranov medzi:

- koncentráciou medi a morfológicky zmenenými spermiami,
- koncentráciou niklu a torzom bičíka,
- koncentráciou medi a kľbkom bičíka,
- koncentráciou železa a retenciou cytoplazmatickej kvapky (Tabuľka 7).

Tabuľka 7 – Korelácie medzi sledovanými prvkami a patologickými spermiami v inseminačných dávkach baranov

	Cu	Fe	Zn	Cd	Pb	Ni
Cu	1	0,07	0,12	0,31	0,25	-0,71
Fe		1	0,01	0,04	0,06	0,44
Zn			1	-0,02	-0,06	0,20
Cd				1	0,98	-0,24
Pb					1	-0,20
Ni						1
MZS	-0,45	0,27	0,19	0,22	0,20	0,41
HBB	-0,70	0,54	-0,15	0,12	0,14	0,77
TB	0,27	-0,67	-0,01	0,55	0,45	-0,50
KSB	0,25	0,12	-0,16	-0,11	-0,14	-0,27
ZB	0,01	-0,38	-0,26	-0,30	-0,34	-0,08
KB	-0,54	0,28	-0,29	-0,05	0,03	0,30
RCK	0,24	-0,46	-0,16	-0,03	-0,06	0,63
IAS	0,34	0,09	0,22	-0,10	-0,05	-0,09

NS – normálne spermie; MZS – morfológicky zmenené spermie;

HBB – hlavička bez bičika; TB – torzo bičika; KSB – kľúčkovité stočenie bičika; ZB – zlomený bičik; KB – kľbko (zvinutie) bičika; RCK – retencia cytoplazmatickej kvapky;

IAS – iné abnormálne spermie

0,01 – 0,33 – slabá korelácia; 0,34 – 0,66 – stredná korelácia; 0,67 – 0,99 – silná korelácia

4.3 Analýza čerstvých ejakulátov (ID) kancov

Analýza koncentrácie vybraných prvkov v čerstvých ejakulátoch kancov preukázala, že koncentrácia obsah medi je $1,678 \mu\text{g.ml}^{-1}$, s minimálnou hodnotou $1,399 \mu\text{g.ml}^{-1}$ a maximálnou hodnotou $1,922 \mu\text{g.ml}^{-1}$. Priemerná koncentrácia železa je $16,511 \mu\text{g.ml}^{-1}$, s minimálnou hodnotou $6,255 \mu\text{g.ml}^{-1}$ a maximom $26,369 \mu\text{g.ml}^{-1}$. Koncentrácia zinku v ejakulátoch kancov bola najvyššia – $175,659 \mu\text{g.ml}^{-1}$, s minimálnou hodnotou $108,887 \mu\text{g.ml}^{-1}$ a maximálnou hodnotou $244,632 \mu\text{g.ml}^{-1}$. Pri sledovaní koncentrácie kadmia bola zistená priemerná koncentrácia $0,521 \mu\text{g.ml}^{-1}$, s minimálnou hodnotou $0,488 \mu\text{g.ml}^{-1}$ a maximálnou hodnotou $0,601 \mu\text{g.ml}^{-1}$. Koncentrácia olova v inseminačných dávkach kancov bola $0,020 \mu\text{g.ml}^{-1}$, s minimálnou hodnotou $0,001 \mu\text{g.ml}^{-1}$ a maximálnou hodnotou $0,041 \mu\text{g.ml}^{-1}$. U niklu bola zistená koncentrácia $0,082 \mu\text{g.ml}^{-1}$, s minimálnou hodnotou $0,019 \mu\text{g.ml}^{-1}$ a maximálnou hodnotou $0,153 \mu\text{g.ml}^{-1}$ (Tabuľka 8).

Tabuľka 8 – Koncentrácie vybraných prvkov ($\mu\text{g.ml}^{-1}$) v inseminačných dávkach kancov

Parameter	x	SD	minimum	maximum
Cu	1,678	0,271	1,399	1,922
Fe	16,511	10,345	6,255	26,369
Zn	175,659	65,722	108,887	244,632
Cd	0,521	0,041	0,488	0,601
Pb	0,020	0,019	0,001	0,041
Ni	0,082	0,060	0,019	0,153

x – priemer; SD – smerodajná odchýlka; minimum – minimálna hodnota; maximum – maximálna hodnota

Na základe výsledkov tvoria inseminačné dávky kancov v 91,72% normálne spermie a 8,28% tvoria morfológicky zmenené resp. patologické spermie. Z celkového počtu patologických spermií kanca sme zistili, že 38,41% tvoria hlavičky bez bičíka, 10,63% tvorí torzo bičíka, 27,29% tvorí kľúčkovité stočenie bičíka, 5,07% tvorí zlomený bičik, 10,27% tvorí kľbko bičíka, 2,78% je retencia cytoplazmatickej kvapky a 5,55% tvoria iné abnormálne spermie (Tabuľka 9, Graf 3).

Tabuľka 9 – Analýza výskytu patologických spermií v inseminačných dávkach kancov

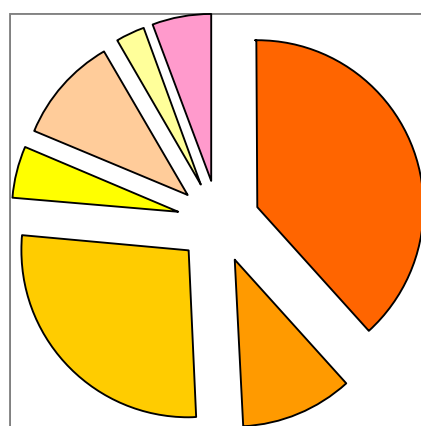
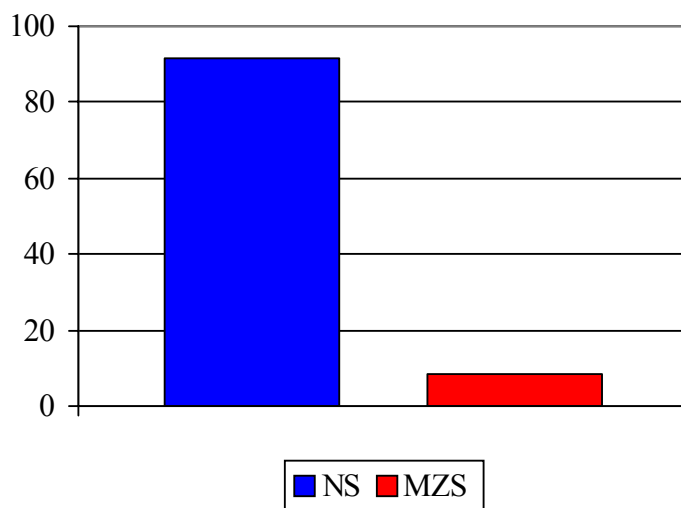
parameter	x	SD	minimum	maximum
NS (%)	91,72	5,24	87,31	93,33
MZS (%)	8,28	2,45	6,67	12,69
HBB (%)	38,41	8,85	30,19	46,62
TB (%)	10,63	4,31	6,76	14,49
KSB (%)	27,29	5,98	21,50	33,57
ZB (%)	5,07	4,63	0,84	9,30
KB (%)	10,27	5,23	5,92	14,61
RCK (%)	2,78	1,55	1,45	4,11
IAS (%)	5,55	2,96	2,66	8,45

NS – normálne spermie; MZS – morfológicky zmenené spermie;

HBB – hlavička bez bičíka; TB – torzo bičíka; KSB – kľúčkovité stočenie bičíka; ZB – zlomený bičik; KB – kľbko (zvinutie) bičíka; RCK – retencia cytoplazmatickej kvapky;

IAS – iné abnormálne spermie

Graf 3 – Výskytu patologických spermíí (%) v inseminačných dávkach kancov



■ HBB ■ TB ■ KSB ■ ZB ■ KB ■ RCK ■ IAS

NS – normálne spermie; MZS – morfológicky zmenené spermie;

HBB – hlavička bez bičíka; TB – torzo bičíka; KSB – kľúčkovité stočenie bičíka; ZB – zlomený bičík; KB – kľbko (zvinutie) bičíka; RCK – retencia cytoplazmatickej kvapky;

IAS – iné abnormálne spermie

Strednú pozitívnu koreláciu v sledovaných inseminačných dávkach kancov sme zistili medzi:

- koncentráciou medi a koncentráciou olova
- koncentráciou kadmia a koncentráciou niklu
- koncentráciou olova a koncentráciou niklu
- koncentráciou kadmia a hlavičkou bez bičíka
- koncentráciou niklu a hlavičkou bez bičíka
- koncentráciou zinku a zlomeným bičikom

Strednú negatívnu koreláciu v sledovaných inseminačných dávkach kancov sme zistili medzi:

- koncentráciou medi a morfológicky zmenenými spermiami
- koncentráciou kadmia a zlomeným bičikom
- koncentráciou olova a inými abnormálnymi spermiami
- koncentráciou niklu a inými abnormálnymi spermiami (Tabuľka 10)

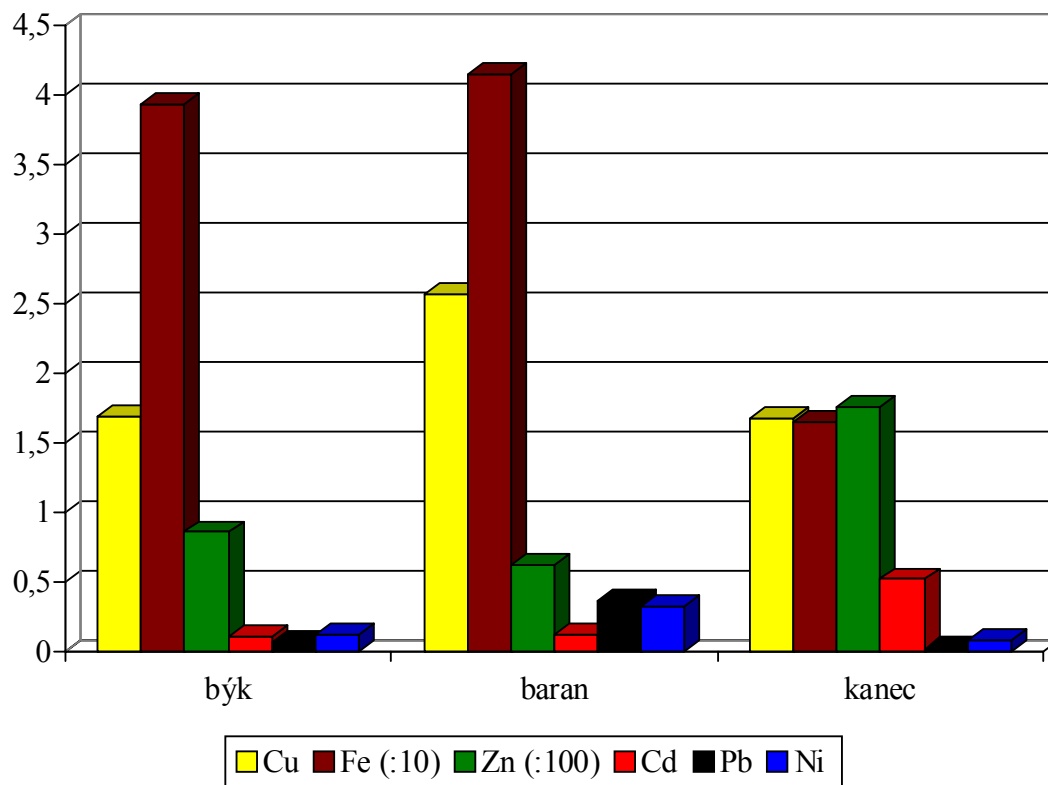
Tabuľka 10 – Korelácie medzi sledovanými prvkami a patologickými spermiami v inseminačných dávkach kancov

	Cu	Fe	Zn	Cd	Pb	Ni
Cu	1	0,11	-0,03	-0,19	0,53	0,13
Fe		1	0,11	-0,29	0,05	0,32
Zn			1	-0,17	0,18	-0,05
Cd				1	-0,01	0,40
Pb					1	0,34
Ni						1
MZS	-0,36	0,16	-0,17	0,16	-0,07	0,17
HBB	-0,15	0,06	0,02	0,48	0,01	0,43
TB	-0,11	-0,12	-0,05	0,33	0,13	-0,06
KSB	-0,09	0,06	-0,06	0,27	0,08	0,22
ZB	-0,15	0,20	0,43	-0,34	0,09	-0,18
KB	-0,19	0,09	-0,09	0,09	0,06	0,10
RCK	-0,24	-0,15	0,06	-0,09	-0,10	0,15
IAS	-0,22	-0,04	-0,31	-0,26	-0,42	-0,45

MZS – morfológicky zmenené spermie; HBB – hlavička bez bičíka; TB – torzo bičíka; KSB – kľúčkovité stočenie bičíka; ZB – zlomený bičik; KB – kľbko (zvinutie) bičíka; RCK – retencia cytoplazmatickej kvapky; IAS – iné abnormálne spermie

0,01 – 0,33 – slabá korelácia; 0,34 – 0,66 – stredná korelácia; 0,67 – 0,99 – silná korelácia

Graf 4 – Porovnanie koncentrácie vybraných prvkov ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) v inseminačných dávkach



5 DISKUSIA

Detekcia a monitorovanie xenobiotík, ako rizikových faktorov ovplyvňujúcich parametre zdravia zvierat, v biologických tekutinách je veľmi aktuálnou problematikou nakoľko tieto slúžia ako podstatné transportné média.

Ako hlavné zdroje ťažkých kovov kvalifikuje Beneš (1988) zdroje: prirodzené (zvetrávanie hornín, atmosferické zrážky a pevný spád), antropogénne delené na priame spôsobené úmyselnou (aplikáciou napr. morením osív, ochrana kultúr, zlepšovanie úrodnosti, priemyselné hnojivá, odpadové suroviny, priemyselné komposty, závlahová voda) a nepriame z neúmyselnej aplikácie ako je priemysel energetický, metalurgický, hutnícky a chemický, doprava, mestské a priemyselné aglomerácie. Z hľadiska zabezpečovania zdravia ľudskej populácie sa za dôležité považuje ochrana potravinového reťazca pred kontamináciou ťažkými kovmi, ktorá je z 20% spôsobená vlastnou poľnohospodárskou činnosťou a z 80% ide o znečistenie z cudzích zdrojov, predovšetkým priemyselnou činnosťou. S rastúcim stupňom znečistenia životného prostredia sa záujem o dôsledky pôsobenia toxických látok na živé systémy všeobecne a konkrétne na človeka zvyšuje. Keď sa ióny kovu dostanú do tela živočíchov, vstupujú do interferencie s metabolickými dráhami, prípadne sa ukladajú v rôznych tkanivách a orgánoch. Ťažké kovy sú silne toxické pre človeka, pre zvieratá, ale aj pre rastliny. Ich nebezpečnosť zvyšuje sumačný účinok, lebo sa ukladajú, akumulujú v organizmoch. Problém spočíva v tom, že ťažké kovy zvieratá a človek svojimi zmyslami v potrave nie sú schopní priamo rozpoznať. Ani vyššie koncentrácie zmyslami nezistia. Preto sa prijímaniu takýchto látok nevedia priamo a bezprostredne brániť. Človek sa musí spoliehať na celospoločenskú ochranu, ktorá okrem iného spočíva v monitorovaní výskytu týchto látok v životnom prostredí všeobecne a špeciálne v potravinovom reťazci. Zákernosť pôsobenia ťažkých kovov spočíva v tom, že okrem akútnych intoxikácií, ktoré sú vzácne, sa tieto látky v tele hromadia, kumulujú a organizmus postupne menia (Soylak et al., 2006; López-Alonso et al., 2007).

Skúmal sa vzťah medzi obsahom niektorých stopových prvkov v tkanive žalúdka a rakovinou tohto orgánu. Analýzou koncentrácií kadmia, niklu, medi, zinku, železa, horčíka

a vápniku sa zistilo, že v rakovinovom tkanive sa nachádzajú významne vyššie koncentrácie niklu, medi a železa, než v normálnom tkanive. Priemerné koncentrácie vápnika boli významne nižšie v rakovinovom tkanive žalúdka. Zvýšené koncentrácie zinku ($207 - 826 \text{ mg.kg}^{-1}$) sa zistili v oboch typoch tkaniva (Yaman et al., 2007).

V neposlednom rade ďalším zdrojom zvýšeného výskytu ťažkých kovov je voda, ktorá niekedy obsahuje stopové prvky v toxickej koncentrácii. Ďalším zdrojom zvýšeného príjmu týchto prvkov, hlavne u ošipáných a hydiny sú antibakteriálne prídavky a rastové faktory (McDowell, 1993).

Meď sa akumuluje v pečeni, viaže sa na metalothioneín (MT) a potom nie je toxická. U pacientov, ktorí trpia Wilsonovou chorobou, sa meď netransportuje do Golgiho komplexu v pečeni. Výsledkom je, že meď, ktorá sa má naviazať na ceruloplazmín v Golgiho komplexe pred glykozyzáciou, nie je k dispozícii. Ceruloplazmín sa vylúči do krvi vo forme apo-ceruloplazmínu. Meď, ktorá sa kumuluje v pečeni, spôsobuje hepatitídu. Existuje však určitá rozdielnosť v koncentrácii medi v jednotlivých hepatocytoch. Aj keď sú hepatocyty, ktoré kumulujú viac medi, než je syntetická kapacita MT poškodené, iné hepatocyty, ktoré akumulujú menej medi môžu prevziať funkciu v pečeni, takže akútna hepatitída nemusí byť smrteľná (Komatsu et al., 2002).

Koncentrácia ťažkých kovov v insemináčnych dávkach resp. ejakulátoch je veľmi rôznorodá a je výrazne ovplyvnená od fyziologického stavu organizmu ako aj obsahu sledovaných prvkov v environmentálnych emisiách. V súčasnosti sa ťažké kovy zriedka sledujú vo veterinárnej andrológii. V súčasnosti sú známe základné mechanizmy toxicity jednotlivých prvkov, no v interakcii s inými stopovými prvkami dochádza v mnohých prípadoch k ťažko definovaným zmenám. Väčšina ťažkých kovov pôsobí na zvýšenú peroxidáciu lipidov ako aj tvorbu reaktívnych foriem kyslíka. Na druhej strane iné stopové prvky ako zinok, selén, meď, železo sú aktívnou súčasťou celej škály antioxidantných enzýmov (Cu/Zn SOD, GUPx, feritín), čiže prítomnosť týchto prvkov má protektívny efekt na prípadnú bunkovú smrť vyvolanú vysokými hladinami voľných radikálov (Agarwal et al., 2006; Lukáč et al., 2007).

Meď má toxický účinok na semenotvorný epitel ako aj na imunitný systém (Gummow et al., 1991). Gamčík et al. (1992) popisujú po 30 – 40 dňoch kŕmenia baranov

zvýšeným obsahom medi z priemyselnej emisie zníženú motilitu spermii na 40 – 50%. Zvýšil sa počet morfológických malformácií spermii na 22,8 – 31,4%, čo korešponduje aj s našimi výsledkami a korelačnými analýzami.

Z našich výsledkov vyplýva, že najvyššia koncentrácia medi bolo zistená v inseminačných dávkach baranov a to $2,565 \mu\text{g.ml}^{-1}$, nižšia koncentrácia bola zistená u býkov a to $1,694 \mu\text{g.ml}^{-1}$ a najnižšia koncentrácia bola zistená u kancov – $1,678 \mu\text{g.ml}^{-1}$. Popri sledovaní koncentrácie medi v inseminačných dávkach baranov, býkov a kancov sme sledovali jednotlivé korelácie medzi meďou a ďalšími sledovanými ťažkými kovmi resp. patologickými formami spermii. V inseminačných dávkach býkov sme zistili strednú pozitívnu koreláciu medzi meďou a olovom, meďou a niklom a meďou a kľbkom bičika. V inseminačných dávkach baranov sme zistili silnú negatívnu koreláciu medzi meďou a niklom a meďou a hlavičkami bez bičika. Strednú negatívnu koreláciu preukázala korelačná analýza v inseminačných dávkach baranov medzi meďou a morfológicky zmenenými spermiami, meďou a kľbkom bičika. V inseminačných dávkach kancov sme zistili strednú pozitívnu korelačnú závislosť medzi meďou a olovom. Strednú negatívnu koreláciu v inseminačných dávkach kancov sme zistili medzi meďou a morfológicky zmenenými spermiami.

Škodlivé a deštruktívne účinky medi na gonády baranov po intoxikácii oxidom meďnatým z priemyselného exhalátu opísali Vrzgulová a Bíreš (1993). Histologické vyšetrenie ukázalo atrofiu semenotvorných kanálikov. Lamelárna vrstva bazálnej membrány bola zvlhnená a nastala vakuolizácia cytoplazmy buniek vo všetkých vývojových štádiách zárodočných buniek. Poškodené boli aj Sertoliho bunky.

Študoval sa účinok emisií medi pochádzajúcich zo závodov na jej spracovanie na koncentráciu v krvnom sére, ejakuláte, pečeni a semenníkoch baranov. Maximálna hladina koncentrácie medi v krvnom sére bola na 40. resp. 50. deň. Signifikantné rozdiely v hladine medi v ejakuláte kontrolných a pokusných baranov boli zistené na 18., 30., a 40. deň. Pravý a ľavý semenník mali u pokusných jedincov až dvojnásobné množstvo medi ako u kontrolných jedincov. Toxický účinok medi na semennú plazmu sa prejavil v poklese pohyblivosti spermii a vo zvýšení počtu malformovaných spermii. Pokles tvorby

zárodočných buniek sa prejavil aj v zníženej tvorbe spermii a vo zvýšenom počte patologických spermii (Vrzgulová et al., 1993; Cevik et al., 2007).

Niektoré štúdie ukázali, že meď má negatívne účinky na spermie králika v podmienkach *in vitro* (Roychoudhury a Massányi, 2008). Ich rozsah závisí od toho, či ejakulát alebo spermie sú zbavené semennej plazmy. Spermicídny účinok medi v podmienkach *in vitro* na spermie sa preukázal. Spermie vystavené meďnatým kovom viažu len malé množstvá (asi 17 %) iónov medi, ktoré sa uvoľnia z medi. Avšak táto meď je viazaná veľmi pevne a len málo sa zo spermii uvoľní po opakovanom premývaní. To poukazuje na fakt, že ióny medi prenikajú do spermii, alebo sú pevne naviazané na vonkajšie alebo vnútorné komponenty spermii. Pri posudzovaní toxicity medi na spermie je treba mať na zreteli fakt, že podmienky pri pokusoch *in vitro* sú odlišné od tých, kde sa spermie nachádzajú v samičích pohlavných orgánoch. Obsah bielkovín v sekrétoch v samičom pohlavnom aparáte je známy a bolo zistené, že jeho zvýšený obsah v prostredí zvyšuje stupeň uvoľňovania, pravdepodobne viazaním iónov a tak znižovaním koncentrácie iónov voľnej medi. Bolo zistené, že čím viac medi bolo uvoľnené do prostredia tým boli spermie odolnejšie. Z predošlých analýz vyplýva, že spermie v ejakuláte nie sú tak citlivé na meď i kadmium ako spermie bez semennej plazmy (Scialli a Zinaman, 1993). Podľa Šimoníka et al. (1990) už koncentrácia 0,01 μg medi *in vitro* vyvoláva zastavenie pohyblivosti spermii.

V organizme novonarodených teliat sa nachádza okolo 60 mg železa v 1 kg ž. hm. (ARC, 1980). Prevažný podiel železa je v priebehu rastu využívaný na syntézu hemoglobínu a myoglobínu. Podobne ako u ostatných druhov zvierat, je potrebné aj u hovädzieho dobytku venovať osobitnú pozornosť železu v období mliečnej výživy. Aj napriek určitým zásobám železa v pečeni pri narodení teliat je obsah železa v mlieku 0,55 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ veľmi nízky. Preto sa pre teľatá odporúča skrmovať okolo 100 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ železa prijatej sušiny krmív. Nižšie dávky železa umožňujú síce normálny vývoj hmotnosti a tvorbu krvi, pričom je ale nedostatočná syntéza myoglobínu v svalovom tkanive zvierat. U dospelého dobytku je pomerne málo prác, ktoré sa zaoberajú potrebou železa. V praktickom kŕmení nedochádza za normálnych okolností k príznakom nedostatku železa. Tolerančná

hodnota maximálneho množstva železa je okolo 500 mg.kg^{-1} krmiva (Schenkel a Flachowsky 1998).

Z našich výsledkov vyplýva, že najvyššia koncentrácia železa bolo zistená v inseminačných dávkach baranov – $41,530 \text{ } \mu\text{g.ml}^{-1}$, nižšia koncentrácia bola zistená u býkov a to $39,295 \text{ } \mu\text{g.ml}^{-1}$ a najnižšia koncentrácia bola zistená u kancov – $16,511 \text{ } \mu\text{g.ml}^{-1}$. Popri sledovaní koncentrácie železa v inseminačných dávkach baranov, býkov a kancov sme sledovali jednotlivé korelácie medzi železom a ďalšími sledovanými ťažkými kovmi resp. patologickými formami spermii. V inseminačných dávkach býkov sme zistili silnú pozitívnu koreláciu medzi železom a zinkom, strednú pozitívnu koreláciu medzi železom a zlomeným bičíkom, železom a retenciou cytoplazmatickej kvapky, železom a inými abnormálnymi spermiami, strednú negatívnu koreláciu medzi železom a hlavičkou bez bičika. Korelačná analýza preukázala silnú negatívnu koreláciu v inseminačných dávkach baranov medzi železom a torzom bičika, strednú pozitívnu koreláciu preukázala korelačná analýza medzi železom a hlavičkou bez bičika, strednú negatívnu koreláciu preukázala korelačná analýza medzi železom a retenciou cytoplazmatickej kvapky. V inseminačných dávkach kancov sme nezistili na základe korelačnej analýzy žiadnu koreláciu medzi železom a ďalšími sledovanými ťažkými kovmi resp. patologickými formami spermii.

Zaujímavé sú zistenia Forda et al. (1997, 2001), že kance s väčšími semenníkmi majú nižšiu sérovú koncentráciu sérového FSH ako kance s menšími semenníkmi (Meishanské plemeno). Koncentrácia FSH sa zvyšuje lineárne so znižujúcimi sa semenníkmi (Lunstra et al., 1997). Wise et al. (1999) a Ford et al. (2001) zistili rozdielnosť sfarbenia semenníkov kancov vo vzťahu k veľkosti semenníkov. Ak sú semenníky menšie u dospelých kancov farba je tmavšia až tmavo červená, pričom väčšie semenníky sú ružového sfarbenia, čo pravdepodobne súvisí s obsahom železa v testikulárnom tkanive.

Wise et al. (2003) dokázali výrazné rozdielnosti v hladinách feritínu a obsahu železa v semenníkoch rôznych veľkostí. Zistili, že testikulárna koncentrácia feritínu sa zvyšovala úmerne s hladinami FSH a železa. Zaujímavé sú následky zvyšovania testikulárnej koncentrácie železa, ktorá spôsobuje pokles produkcie spermii na gram semenníka, resp. celkovú dennú produkciu spermii. Taktiež dokázali výrazný vzťah v zastúpení železa v Leydigových bunkách. Tmavší vzhľad týchto buniek na histologickom preparáte

spôsobuje pravdepodobne železo. Hladina hemoglobínu neovplyvňuje farebné rozdielosti semenníkov kancov. Železo sa nachádza v centre molekuly feritínu a pravdepodobne je nedostupné pri farebných reakciách ferokyanidom (Harrison a Arosio, 1996). Každá molekula feritínu obsahuje obrovské množstvo železa (23% feritínu je tvorené železom) (Farrant, 1954) a molekula feritínu obsahuje 4500 atómov železa (Andrews et al., 1988). Toebosch et al. (1987) zistili rozdielosti v zásobných formách železa v testikulárnych bunkách. V Leydigových bunkách je železo vo forme feritínu, čo udržiava homeostázu železa a tvorí primárny zdroj železa pre Sertolihov bunky a vyvíjajúce sa spermie.

Zinok je esenciálny prvok pre všetky druhy žijúcich organizmov. Zinok je známy esenciálny kov potrebný pre funkciu enzýmov (Elinder, 1986). Je dôležitou súčasťou viac ako 200 metaloenzýmov, prostredníctvom ktorých zasahuje do všetkých životne dôležitých funkcií. Deficit zinku môže vzniknúť pri nedostatočnom prísune v potrave alebo pri jeho zníženej absorpcii. Vstrebávanie zinku v organizme prebieha v tenkom čreve. Deje sa na základe kompetitívnej reakcie s kovmi nachádzajúcimi sa v obsahu čreva. Dôležité postavenie pri využiteľnosti zinku v kŕmnej dávke tvoria ostatné makro- a mikroprvky. Zvýšenie obsahu vápnika v diéte má za následok zníženie koncentrácie zinku v krvnej plazme. Podobne jeho využiteľnosť negatívne ovplyvňuje nadbytok fosforu (Sorensen et al., 1999).

Zinok je integrálnou súčasťou alebo aktivátorom enzýmov a ostatných bielkovín a zúčastňuje sa na celom rade funkcií v bunkách. Predovšetkým sa podieľa na dobrom vývoji tkanív, na rýchlej obnove buniek a tkanív ako imunokomponent buniek a kože. Pri suboptimálnych dávkach vznikajú poruchy rastu, zníži sa využitie krmív, zhoršia sa reprodukčné parametre a zníži sa odolnosť voči infekciám. Dávky zinku 25 – 30 mg.kg⁻¹ sušiny pre teľatá a mladý dobytok dostatočne pokrývajú potreby zvierat. Odporúčané množstvo 50 mg zinku na kg sušiny kŕmnej dávky pre odchov dobytka a dojnice zabezpečuje potrebu aj pre vysokú produkciu zvierat v podmienkach praxe (Underwood a Suttle, 1999). Uvedená potreba zinku nie je pokrývaná v dostatočnej miere objemovými a jadrovými krmivami. Z toho dôvodu sa odporúčajú prídavky zinku v doplnkoch kŕmnych dávok. V prípade, že je v kŕmnych dávkach výrazne zvýšené množstvo vápnika, medi,

alebo železa, môže sa významne znížiť resorbovateľnosť zinku. Tolerančná kapacita pre zinok je u hovädzieho dobytku asi desaťnásobok odporúčanej dávky (NRC 1980).

Z našich výsledkov vyplýva, že najvyššia koncentrácia zinku bolo zistená v inseminačných dávkach kancov a to $175,659 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, nižšia koncentrácia bola zistená u býkov a to $85,893 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a najnižšia koncentrácia bola zistená u baranov – $62,274 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Popri sledovaní koncentrácie zinku v inseminačných dávkach baranov, býkov a kancov sme sledovali jednotlivé korelácie medzi zinkom a ďalšími sledovanými ťažkými kovmi resp. patologickými formami spermii. V inseminačných dávkach býkov a baranov sme nezistili na základe korelačnej analýzy žiadnu koreláciu medzi zinkom a ďalšími sledovanými ťažkými kovmi resp. patologickými formami spermii. V inseminačných dávkach kancov sme zistili strednú pozitívnu korelačnú závislosť medzi zinkom a zlomeným bičikom.

Nižšia využiteľnosť zinku pri vyššom obsahu kadmia v krmnej dávke je výsledkom kompetitívnej inhibície so zinkom na dôležitých väzobných miestach v bunkách organizmu. Podobný korelačný vzťah zaznamenali aj Horký et al. (1998) medzi kadmio a zinkom, prejavujúci sa predovšetkým v bunkách semenníkov. Taký istý antagonistický vzťah sa pozoroval medzi meďou a zinkom. Zinok sa preto úspešne používa ako antidotum pri otrave meďou. Vysoká dávka zinku v krmnej dávke spôsobuje nahromadenie železa a pokles medi v pečeni, ako aj pokles vápnika, fosforu a sodíka v organizme. Nie je závislosť medzi hladinami medi alebo zinku a hmotnosťou semenníkov. Je však známe, že zinok môže ovplyvňovať metabolizmus železa, medi a kadmia.

Zinok sa zúčastňuje na stavbe bunkových a organelových membrán a zároveň ich chráni pred vonkajšími vplyvmi, čo je zvlášť dôležité z pohľadu spermie v procese spracovania ejakulátu na inseminačnú dávku (Lukáč et al., 2007). Hypozinkémia mladých samcov spôsobuje atrofiu semenotvorného epitelu, poškodzuje sa vývod gonád, čo sa primárne prejaví hypogonadizmom. U pohlavne dospelých samcov deficit zinku spôsobuje poruchy v priebehu spermatogenézy. Pri sledovaní vybraných spermilogických ukazovateľov sa zistilo, že pri zníženej koncentrácii zinku v krvi je nižšia hustota a aktivita spermii, je znížená prežívateľnosť spermii ako aj vyšší výskyt patologických spermii. Pozorovania na úrovni elektrónovej mikroskopie bližšie odhalili rôzne morfológické zmeny na spermiiach (Cigánková et al., 1993; 2000).

V práci Mocého et al. (2000) zistili pozitívny vplyv pridávania zinku do krmiva potkanom, pričom doplnok 35 až 100 ppm zinku zvýšil objem ejakulátu ako aj koncentráciu spermií v porovnaní s kontrolou bez zinkového doplnku.

Sledovali sa aj spermio toxické účinky iónov vybraných prvkov – medi, chrómu a zinku a zistilo sa, že so zvyšujúcou sa koncentráciou týchto prvkov v kultivačnom médiu (Ringerov roztok) čas prežívania spermií býka sa skrakuje. Rozdielna je i rezistencia spermií dvoch býkov na rovnakú koncentráciu chemických prvkov v Ringerovom roztoku. Účinok kombinácie prvkov, ale hlavne zinku sa popisuje v ejakulátoch žrebčov (Danek et al., 2001; Krumrych et al., 2001). V inseminačných dávkach žrebčov zistili signifikanciu medzi množstvom zinku a celkovým počtom patologických spermií, čo sa v niektorých prípadoch preukázalo aj v našej práci.

Plemenníci s nedostatkom zinku produkujú ejakuláty s klesajúcou motilitou, hustotou a percentom prežívajúcich spermií, v dôsledku čoho je znížená aj ich fertilita. Výsledkom je potom celková porucha spermatogenézy (Cigánková et al., 1994), čo sa prejaví nižšou oplodňovacou schopnosťou produkovaného semena (Bíreš a Vrzgula, 1985).

Kadmium je kumulatívny kov, ktorý sa hromadí najmä v obličkách a v pečeni živočíchov (Ginter a Nagyová, 1991; Massányi et al., 1995; Kramárová et al., 2005; Kolesárová et al., 2008). Do organizmov bylinožravcov sa dostávajú toxické prvky priamo potravou. Všeobecne sa najviac kadmia zaznamenáva z orgánov hospodárskych zvierat v obličkách hovädzieho dobytku a ošípaných.

Sú práce, ktoré popisujú a exaktne dokazujú toxický účinok kadmia na parenchýmové orgány ako aj na pohlavnú sústavu (semenníky a vaječníky) (Toman et al., 2002, 2005; Massányi et al., 2007; Zhang et al., 2008; Holovská et al., 2009; Lee et al., 2009). Je dokázané, že nízke dávky kadmia (okolo $0,1 \text{ mg.kg}^{-1}$ Cd vo forme CdCl_2) podávané intraperitoneálne raz týždenne nevyvolávajú výrazné funkčné poruchy semenníkov (Hew et al., 1993), ale jednorázová dávka 1 mg.kg^{-1} telesnej hmotnosti vyvoláva poruchy spermiácie a poškodenie testikulárneho tkaniva (Xu et al., 1996).

Niektoré výsledky potvrdzujú negatívny účinok kadmia na plodnosť samcov, pričom sú teórie, ktoré popisujú prítomnosť kadmia v chromatine spermií (Cassawell et al., 1987). Tieto dohady boli vyvrátené – Bench et al. (1999) potvrdili najvyššiu akumuláciu

kadmia v semenníkoch po intraperitoneálnom chronickom podávaní myšiam, ale v spermiiach a spermatídach týchto zvierat sa pomocou vysoko senzitivnej x-ray analýzy nepotvrdila prítomnosť kadmia v chromatiné vyšetřovaných buniek.

Signifikantné korelácie boli pozorované medzi koncentraciou kadmia a objemom ejakulátu, defektmi v strednej časti bičíka spermie a nezrelými formami spermii. Vysoké koncentrácie hladiny kadmia majú vplyv aj na spermatogézu (Toman a Massányi, 1997; Koréneková et al. 2002).

Z našich výsledkov vyplýva, že najvyššia koncentrácia kadmia bola zistená v inseminačných dávkach kancov a to $0,521 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, nižšia koncentrácia bola zistená u baranov a to $0,124 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a najnižšia koncentrácia bola zistená v inseminačných dávkach býkov – $0,103 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Popri sledovaní koncentrácie kadmia v inseminačných dávkach baranov, býkov a kancov sme sledovali jednotlivé korelácie medzi kadmim a ďalšími sledovanými ťažkými kovmi resp. patologickými formami spermii. V inseminačných dávkach býkov sme zistili strednú pozitívnu koreláciu závislosť medzi kadmim a kľúčkovitým stočením bičíka ako špecifickou morfológickou abnormalitou. V inseminačných dávkach baranov sme zistili strednú pozitívnu koreláciu medzi kadmim a torzom bičíka. V inseminačných dávkach kancov sme zistili strednú pozitívnu koreláciu medzi kadmim a niklom a kadmim a hlavičkou bez bičíka. Taktiež u kancov sme zistili strednú negatívnu koreláciu medzi kadmim a zlomeným bičíkom, čo je priamym dôkazom negatívneho dopadu koncentrácie kadmia v ejakuláte na kvalitu spermii v podmienkach *in vivo*.

Zo štúdií mnohých autorov je jasné, že v toxikológii kadmia sú dôležité vzťahy medzi kadmim a zinkom, čo potvrdujú aj naše výsledky. Ochranná úloha vyššieho príjmu zinku v potrave počas intoxikácie kadmim a vyššia akumulácia a toxicita kadmia v prípade deficitu zinku ukazujú, že regulovaním spotreby zinku je možné modulovať metabolizmus a účinok kadmia v organizme. Je preto dôležité, aby najmä v oblastiach kontaminovaných kadmim ľudia prijímali optimálne alebo aj vyššie dávky zinku (Brzóška a Moniuszko-Jakoniuk, 2001).

Vo vzťahu k reprodukčným orgánom a bunkám sa väčšinou popisuje nekróza zárodočných buniek semenotvorného epitelu po akútnej intoxikácii kadmim a niektoré

práce uvádzajú apoptózu ako jeden z včasných mechanizmov akútneho poškodenia tkaniva semenníkov a ventrálnej prostaty kadmíom. Apoptóza semenníkov sa vyskytuje aj pri dávkach asi $5 \mu\text{M.kg}^{-1}$. Potenciálny mechanizmus tohto javu môže byť v tom, že organizmus má schopnosť účinne eliminovať všetky poškodené reprodukčné bunky apoptózou, aby sa ochránila genetická stabilita DNA. Intersticiálne bunky však apoptóze nepodliehajú, a preto veľmi ľahko vznikajú nádory týchto buniek účinkom kadmia (Zhou et al., 1999).

Olovo sa do organizmu dostáva hlavne cez tráviaci trakt a inhaláciou. Vstrebané olovo sa portálnym obehom dostáva do pečene, z ktorej sa krvným obehom dostáva do celého tela. Časť sa ukladá do obličiek, časť sa močom vylúči z tela. Predpokladá sa i jeho prechod do mlieka a málo do slín. Do mlieka sa dostáva len pri veľmi vysokých koncentráciách v krmive (na 100 mg.kg^{-1} sušiny krmiva). Olovo v cirkulujúcej krvi sa z 90% viaže na červené krvinky, časť sa viaže na bielkoviny. U potkanov sa zistil transplacentárny prechod olova. Negatívny účinok olova na vývoj zárodka nebol zistený.

Niektoré kovy vyskytujúce sa vo veľmi nízkych koncentráciách, aby viditeľne poškodili dospelé vtáky, môžu vážne ovplyvniť embryo, ktoré je omnoho citlivejšie na účinky kontaminantov. Chróm, mangán a olovo sú toxické kovy a môžu prenikať cez organizmus sliepky do vajec. Vo veľmi znečistených mestách sú často vysoké koncentrácie týchto kovov v ovzduší. V USA sa skúmal vplyv týchto kovov vo veľkých mestách, ako je San Francisco, Los Angeles a Riverside na embryá hydiny. Zistil sa hlavne vyšší prestup olova do vajec v hladinách, ktoré poškodili embryo. Tieto vplyvy však nesúviseli priamo s kontamináciou ovzdušia, ale skôr s kontamináciou potravy (Hui, 2002).

Olovo po intoxikácii matiek počas gravidity môže pôsobiť na vývoj pohlavného systému plodu. V experimente s potkanmi sa zistilo, že ak boli matky intoxikované dávkou 300 mg Pb.l^{-1} vody, samčie potomstvo malo menšiu hmotnosť mechúrikovitej žľazy a semenníkov. Zmenšila sa hrúbka semenotvorného epitelu, ako dôsledok redukcie počtu spermatogónií a spermatocytov. Zistili sa však aj biochemické zmeny semenníka, prisemenníka a mechúrikovitej žľazy, čím sa narušil normálny vývoj zárodočných buniek (Corpas et al., 2002).

Z našich výsledkov vyplýva, že najvyššia koncentrácia olova bolo zistená v inseminačných dávkach baranov a to $0,361 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, nižšia koncentrácia bola zistená u býkov ($0,062 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) a najnižšia koncentrácia bola zistená v inseminačných dávkach kancov – $0,020 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Popri sledovaní koncentrácie olova v inseminačných dávkach býkov, baranov a kancov sme sledovali jednotlivé korelácie medzi zinkom a ďalšími sledovanými ťažkými kovmi resp. patologickými formami spermií. V inseminačných dávkach býkov sme zistili strednú pozitívnu koreláciu medzi olovom a niklom, olovom a hlavičkou bez bičíka, olovom a torzom bičíka. Korelačná analýza preukázala silnú pozitívnu koreláciu v inseminačných dávkach baranov medzi olovom a kadmium. Strednú pozitívnu koreláciu preukázala korelačná analýza v inseminačných dávkach baranov medzi olovom a torzom bičíka. V inseminačných dávkach kancov sme zistili strednú pozitívnu koreláciu medzi olovom a niklom a strednú negatívnu koreláciu medzi olovom a inými abnormálnymi spermiami.

Massányi et al. (2007) zistili výrazný vplyv olova na semenníky potkanov. Popisujú pokles relatívneho objemu semenotvorného epitelu pri vysokej koncentrácii ($50 \text{ mg Pb}(\text{NO}_3)_2\cdot\text{kg}^{-1}$ podanej i.p.), pričom o polovicu nižšia dávka $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ vyvoláva výraznejšie zmeny ako predchádzajúca vyššia dávka. Krasovskii (1979) a Chowdhury et al. (1984) zistili výrazný účinok olova na množstvo spermií a pohyblivosť spermií potkanov. Morfológické zmeny spermií sú jedným z hlavných parametrov pre pohyblivosť spermií. Signifikantné zvýšenie počtu abnormálnych spermií zistil Acharya et al. (2003) po podaní olova pričom došlo aj k zvýšenej peroxidácii lipidov. Znížená pohyblivosť spermií môže byť spôsobená zvýšeným výskytom spermií s morfológickými abnormalitami (Kasker, 1994).

Napriek tomu, že toxicita niklu a jeho zlúčenín je známa len odnedávna, záujem o štúdium toxického účinku tohoto prvku neustále stúpa. Stále širšie použitie niklu v rôznych oblastiach priemyslu a zvlášť v zdravotníctve predurčuje hlbšie štúdium vplyvu tohoto prvku na biologické systémy. Údaje opisujúce účinok niklu na reprodukčnú sústavu sú strohé a minimálne. U laboratórnych zvierat nikel vyvoláva morfológické zmeny (degenerácia zárodočného epitelu semenníkov) testikulárne sarkómy a funkčné poruchy (inhibícia spermatogenézy) alebo totálna sterilita, pokles syntézy testosterónu (Lee et al., 1983).

Toxicita niklu vyvoláva veľký záujem kvôli rozšírenému výskytu niklu v prostredí. Možným vysvetlením ako nikel spôsobuje poškodenie a smrť buniek je peroxidácia lipidov a tvorba reaktívnych foriem kyslíka. V experimentoch sa už po 1 hodine od aplikácie niklu ľudským lymfocytom zistila zvýšená tvorba hydroxylových radikálov, čo hrá úlohu pri oxidatívnom poškodení ľudských lymfocytov akútnym účinkom niklu (Chen et al., 2003).

Sú známe narušenie reprodukčných orgánov vplyvom niklu. Účinkom niklu na semenníky sa zaoberali Sobti a Gill (1989), pričom sledovali vplyv aj na semenné vajíčky a prostatu. Vplyv na spermie sledovali Pandey a Srivastava (2000), ktorí zisťovali pohyblivosť spermií a morfológické zmeny spermií, čo sú hlavné ukazovatele fertility u samcov. Zistili, že perorálne podávanie niklu (NiSO_4) spôsobuje pokles motility spermií ako aj zníženie koncentrácie spermií. Vysoko významné sú výsledky experimentálnych zvierat (podané $20 \text{ mg NiSO}_4 \cdot \text{kg}^{-1}$ ž. hm.) v porovnaní s neošetrenými (kontrolnými jedincami). Obdobný trend zaznamenali aj pri sledovaní výskytu abnormálnych spermií. Množstvo abnormálnych spermií získaných od zvierat v experimentálnej skupine bolo až šesťkrát vyššie ako v kontrolnej skupine.

Pandey et al. (1999) taktiež potvrdili zvýšené zastúpenie patologických spermií myši ošetrených experimentálnymi dávkami niklu so zvýšenými hladinami testikulárnych enzýmov ako laktátdehydrogenázy a gama-glutamyltranspeptidázy. Danadevi et al. (2003) taktiež zistili obdobné výsledky ako v našej štúdií. Dokázali preukaznú pozitívnu koreláciu medzi percentuálnym výskytom defektov bičíka a koncentráciou niklu v krvi.

Z našich výsledkov vyplýva, že najvyššia koncentrácia niklu bolo zistená v inseminačných dávkach baranov a to $0,320 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$, nižšia koncentrácia bola zistená v inseminačných dávkach býkov ($0,124 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$) a najnižšia koncentrácia bola zistená u kancov – $0,082 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$. Popri sledovaní koncentrácie niklu v inseminačných dávkach býkov, baranov a kancov sme sledovali jednotlivé korelácie medzi niklom a ďalšími sledovanými ťažkými kovmi resp. patologickými formami spermií. Na základe našej štúdie korelačná analýza v inseminačných dávkach býkov preukázala silnú pozitívnu koreláciu medzi niklom a hlavičkami bez bičíka, strednú pozitívnu koreláciu medzi obsahom niklu a morfológicky zmenenými spermiami, niklom a torzom bičíka, niklom a kĺbkom bičíka a niklom a retenciou cytoplazmatickej kvapky. V inseminačných dávkach býkov bola zistená

stredná negatívna korelácia medzi koncentráciou zinkom a hlavičkou bez bičika. V inseminačných dávkach baranov korelačná analýza preukázala silnú pozitívnu koreláciu medzi niklom a hlavičkami bez bičika, strednú pozitívnu koreláciu medzi niklom a morfológicky zmenenými spermiami a niklom a retenciou cytoplazmatickej kvapky. Stredná negatívna korelácia bola preukázaná v inseminačných dávkach baranov medzi niklom a torzom bičika. V inseminačných dávkach kancov bola zistená stredná pozitívna korelácia medzi niklom a hlavičkou bez bičika, stredná negatívna korelácia bola zistená medzi niklom a inými abnormálnymi spermiami.

Sledoval sa vplyv niklu (NiCl_2) na štruktúru semenníka myší. Zvieratá boli rozdelené na skupiny, ktoré intraperitoneálne dostali jednorazovú dávku $20 \text{ mg NiCl}_2 \cdot \text{kg}^{-1}$ živej hmotnosti (skupina A), $40 \text{ mg NiCl}_2 \cdot \text{kg}^{-1}$ (skupina B) a skupina C bez podania niklu slúžila ako kontrola. Zvieratá boli usmrtené 48 hodín po podaní niklu. Váženie nepreukázalo žiadne preukazné rozdiely v hmotnosti zvierat pred pokusom a po podaní niklu. Nezistil sa ani rozdiel v pomere hmotnosti semenníkov v celkovej hmotnosti. V oboch pokusných skupinách sme zistili preukazný pokles relatívneho objemu semenotvorného epitelu v porovnaní s kontrolou. Podobne sa zistil aj preukazný rozdiel medzi skupinou A a B. Relatívny objem interstícia bol nepreukazne vyšší v oboch pokusných skupinách. Relatívny objem bol vyšší po podaní niklu. Kvalitatívnym hodnotením sa zistila dilatácia krvných ciev v interstíciu, undulácia bazálnej membrány a v semenotvornom epiteli sa vyskytovali prázdne miesta. Priemer semenotvorného kanálika bol preukazne vyšší v oboch pokusných skupinách v porovnaní s kontrolou. Podobne výška semenotvorného epitelu preukazovala výrazný pokles po podaní niklu. Naopak, hodnotenie priemeru lúmenu semenotvorného kanálika bolo signifikantne vyššie v oboch pokusných skupinách. TUNEL analýza preukázala vyššiu frekvenciu apoptózy v interstíciu zvierat po podaní niklu v porovnaní s kontrolnou skupinou. Dosiahnuté výsledky jasne dokazujú negatívny účinok niklu na štruktúru ako aj funkciu semenotvorného epitelu s hľadiska produkcie spermii (Massányi et al., 2008).

6 NÁVRH NA VYUŽITIE POZNATKOV PRE ĎALŠÍ ROZVOJ VEDY

Naša štúdia a jej výsledky boli zamerané na vzájomné vzťahy medzi obsahmi jednotlivých ťažkých kovov vzájomne a vzťahmi medzi obsahmi jednotlivých ťažkých kovov a druhmi morfológicky zmenených spermii v ejakulátoch býkov, baranov a kancov. Uvedené výsledky signalizujú silnú pozitívnu koreláciu v ejakulátoch medzi obsahom železa a obsahom zinku a taktiež medzi obsahom olova a obsahom kadmia. Uvedené výsledky teda potvrdzujú, že zvýšením obsahu železa stúpa v ejakuláte aj obsah zinku, resp. zvýšením obsahu olova stúpa aj obsah kadmia v ejakuláte. Taktiež v našich výsledkoch bola zistená silná pozitívna korelácia medzi obsahom niklu a počtom hlavičiek bez bičíka v ejakuláte, čo potvrdzuje, že so zvýšením obsahom niklu v ejakuláte stúpa aj počet hlavičiek bez bičíka. Silná negatívna korelácia bola zistená medzi obsahom medi a obsahom niklu, obsahom medi a počtom hlavičiek bez bičíka a obsahom železa a torzom bičíka. Silná negatívna korelácia je charakteristická tým že zvýšením obsahu medi klesá obsah niklu v ejakuláte, zvýšením obsahu medi klesá počet hlavičiek bez bičíka a zvýšením obsahu železa klesá počet torz bičíka. Na základe uvedených výsledkov u býkov, baranov a kancov možno povedať, že zistené výsledky nie sú porovnateľné s inými druhmi zvierat resp. s výsledkami u človeka. U každého druhu zvierat resp. u človeka sú výsledky rozdielne a vždy ich možno porovnávať v rámci druhu.

Taktiež naša štúdia sa zameriavala na koncentrácie jednotlivých prvkov v inseminačných dávkach resp. na percentuálny počet morfológicky zmenených spermii v ejakulátoch. Stanovovanie ťažkých kovov bolo sledované v ejakulátoch zvierat, ktoré boli odchovávané v bežných chovateľských podmienkach. Na základe našich štúdií možno povedať, že aj v bežných chovateľských podmienkach dochádza k toxikácii zvierat. Ako jeden z najdôležitejších informátorov o toxicite je ejakulát samotných samcov. Na základe zistených skutočností by sa mal výskum v tomto smere zameriavať na zisťovanie príčin uvedených hladín ťažkých kovov v ejakulátoch samcov.

U samcov využívajúcich sa na insemináciu by bolo potrebné zisťovať hladiny ťažkých kovov v pravidelných intervaloch a tým zisťovať či hladiny ťažkých kovov v ejakulátoch stúpajú resp. klesajú vplyvom veku. Na základe uvedených skutočností

potom porovnávať taktiež v časových intervaloch či s ejakulátu samcov vekom sa zvyšuje počet vyrobených dávok z jedného odberu resp. či počet vyrobených dávok z odberu klesá. Taktiež na základe našej štúdie je možné v praxi vyhodnocovať uvedenou metódou aj počet morfologicky zmenených spermii voči normálnym spermiam.

Uvedená skutočnosť ovplyvňuje aj samotný počet vyrobených dávok z jedného odberu. Samotné výsledky možno aplikovať aj v humánnom výskume pri neplodnosti mužov. Na druhej strane je potrebné sa zamyslieť aj nad pôvodom uvedených ťažkých kovov s využitím analýz stanovovania ťažkých kovov v krmive, vode a v ovzduší.

7 ZÁVER

V predloženej práci uvádzame obsah ťažkých kovov (meď, železo, zinok, kadmium, olovo, nikel) v inseminačných dávkach plemenníkov ako aj ich vplyv na kvalitu spermíí.

V práci sme použili 150 hlboko zmrazených inseminačných dávok od 15 dospelých plemenných býkov plemena Slovenské strakaté, 90 hlboko zmrazených inseminačných dávok od 9 dospelých plemenných baranov plemena Zošľachtená valaška a 19 čerstvých ejakulátov od dospelých plemenných kancov plemena Biela ušľachtilá.

Z dosiahnutých výsledkov vyplynulo nasledovné:

- najvyššia koncentrácia medi bola zistená v inseminačných dávkach baranov – $2,565 \pm 0,198 \text{ } \mu\text{g.ml}^{-1}$, najnižšia koncentrácia bola u kancov – $1,678 \pm 0,271 \text{ } \mu\text{g.ml}^{-1}$,
- najvyššia koncentrácia železa bola zistená v inseminačných dávkach baranov $41,530 \pm 10,812 \text{ } \mu\text{g.ml}^{-1}$, najnižšia koncentrácia bola zistená u kancov – $16,511 \pm 10,345 \text{ } \mu\text{g.ml}^{-1}$,
- najvyššia koncentrácia zinku bola zistená v inseminačných dávkach kancov – $175,659 \pm 65,722 \text{ } \mu\text{g.ml}^{-1}$, najnižšia koncentrácia bola zistená v inseminačných dávkach baranov – $62,274 \pm 35,356 \text{ } \mu\text{g.ml}^{-1}$,
- najvyššia koncentrácia kadmia bola zistená v inseminačných dávkach kancov – $0,521 \pm 0,041 \text{ } \mu\text{g.ml}^{-1}$, najnižšia koncentrácia bola zistená u býkov – $0,103 \pm 0,141 \text{ } \mu\text{g.ml}^{-1}$,
- najvyššia koncentrácia olova bola zistená v inseminačných dávkach baranov – $0,361 \pm 0,069 \text{ } \mu\text{g.ml}^{-1}$, najnižšia koncentrácia bola zistená u kancov – $0,020 \pm 0,019 \text{ } \mu\text{g.ml}^{-1}$,
- najvyššia koncentrácia niklu bola zistená v inseminačných dávkach baranov – $0,320 \pm 0,192 \text{ } \mu\text{g.ml}^{-1}$, najnižšia koncentrácia bola zistená u kancov – $0,082 \pm 0,060 \text{ } \mu\text{g.ml}^{-1}$,
- Korelačná analýza preukázala silnú pozitívnu koreláciu v ejakulátoch :
 - býkov medzi koncentráciou železa a koncentráciou zinku (0,72),
 - baranov medzi koncentráciou olova a koncentráciou kadmia (0,98),
 - baranov medzi koncentráciou niklu a hlavičkami bez bičíka (0,76),
 - býkov medzi koncentráciou niklu a hlavičkami bez bičíka (0,77).

- Korelačná analýza preukázala silnú negatívnu koreláciu v inseminačných dávkach:
- baranov medzi koncentráciou medi a koncentráciou niklu (-0,71),
 - baranov medzi koncentráciou medi a hlavičkami bez bičíka (-0,70),
 - baranov medzi koncentráciou železa a torzom bičíka (-0,67).

8 POUŽITÁ LITERATÚRA

1. ACHARYA, U.R. – ACHARYA, S. – MISHRA, M, M. 2003. Lead Acetate Induced Cytotoxicity in Male germinal Cells of Swiss Mice. In: *Ind. Health*, vol. 41, 2003, s. 291-294.
2. AGARWAL, A. – GUPTA, S. – SIKKA, S. 2006. The role of free radicals and antioxidants in reproduction. In: *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.*, vol. 18, 2006, s. 325-332.
3. AGRICULTURAL RESEARCH COUNCIL (ARC) 1980 The nutrient requirements of ruminant livestock Farnham Royal, Slough, England. Commonwealth Agricultural Bureaux, 1980, p. 75-82.
4. AMANN R.P. 2010. Tests to measure the quality of spermatozoa at spermiation. In: *Asian J. Androl.*, vol. 12, 2010, p. 71-78.
5. ANDRABI S.M. 2009 Factors affecting the quality of cryopreserved buffalo (*Bubalus bubalis*) bull spermatozoa. In: *Reprod. Domest. Anim.*, vol. 44, 2009, p. 552-569.
6. ANEL, L. – ALVAREZ, M. – MARTINEZ-PASTOR, F. – GARCIA-MACIAS, V. – ANEL, E. – DE PAZ, P. 2006. Improvement strategies in ovine artificial insemination. In: *Reprod. Domest. Anim.*, vol. 41, 2006, p. 30-42.
7. ANDREWS, S.C. – BRADY, C.M. – TREFFRY, A. – WILLIAMS, J.M. – MANN, S. – CLETON, M.I. – DE BRUIJN, W. – HARRISON, P.M. 1988. Studies on haemosiderin and ferritin from iron-loaded rat liver. In: *Biol. Metab.*, vol. 1, 1988, p. 33-42.
8. AUGER, J. 2010. Assessing human sperm morphology: top models, underdogs or biometrics? In: *Asian J. Androl.*, vol. 12, 2010, p. 36-46.
9. BARRATT, C.L. – DAVIES, A.G. – BANSAL, M.R. – WILLIAMS M.E. 1989. The effect of lead on the male rat reproductive system. In: *Andrologia*, vol. 21, 1989, p. 161-166.
10. BEDFORD, J.M. 1983. Significance of the need of sperm capacitation before fertilization in eutherian mammal. In: *Biol. Reprod.*, vol. 28, 1983, p. 108-120.
11. BELGAIED, J.E. 2003 Release of heavy metals from Tunisian traditional earthenware. In: *Food Chem. Toxicol.*, vol. 41, 2003, p. 95-98.

12. BENCH, G. – CORZETT, M.H. – MARTINELLI, R. – BATHORN, R. 1999. Cadmium concentration in the testes, sperm and spermatids of mice subject to long-term cadmium chloride exposure. In: *Cytometry*, vol. 35, 1999, p. 30-36.
13. BENCKO, V. – CIRKT, M. – LENER, J. 1995. Toxické kovy v životním a pracovním prostředí člověka. In: GRADA Publishing, Praha, 1995, 288 pp.
14. BENEŠ, S. 1988. Některé zdroje kontaminace půd těžkými kovy. In: *Zemědělská výroba v průmyslové oblasti*. VÚRV, Praha, 1988, 47-51 pp.
15. BÍREŠ, J. – VRZGULA, L. 1985. Klinický a biologický význam zinku pro přežívavce. In: *Veterinářství*, vol. 35, 1985, p. 62-64.
16. BISHOP, M. W. H. – WALTON, A. 1960. Spermatogenesis and the structure of mammalian spermatozoa. In: *Marshall's physiology of reproduction*, 2-nd edition, A. S. Parkes, London, 1960, p. 323-360.
17. BOCHENEK, M. – SMORAG, Z. – PILCH J. 2001. Sperm chromatin structure assay of bulls qualified for artificial insemination. In: *Theriogenology*, vol. 56, 2001, p. 557-567.
18. BREYL, I. 1987. Reziduá těžkých kovů v orgánech a tkáních poľovnej zveri. Závěrečná správa. In: *ÚEVM*, Košice, 1987, 25 pp.
19. BRZÓSKA, M.M. – MONIUSZKO-JAKONIUK, J. 2001. Interactions between cadmium and zinc in the organism. In: *Food Chem. Toxicol.*, vol. 39, 2001, p. 967-980
20. CAPLUN, E. – PETIT, B.S.D. – PICCITTO, E. 1984. Lead in petrol. In: *Environ.*, vol. 8, 1984, p. 144-153.
21. CARRASCAL MORENO, F. – CANO MATA, M. – RAMOS VEGAS, M. – ARENAS CABELLO, J.M. 2005. Contents in As, Cd, Pb, Cu and Zn in the muscle and liver of the mare (*Lepus europaea*) captured in the Guadiamar Green Corridor. In: *Rev. Toxicol.*, vol. 22, 2005, p. 19-24.
22. CASSAWELL, T.H. – BJORND AHL, L. – KVIST, U. 1987. Cadmium interacts with the zinc depend stability of human sperm chromatin. In: *J. Trace Elem. Electrol. Health Dis.*, vol. 1, 1987, p. 85-87.
23. CEVIK, M. – TUNCER, P.B. – TASDEMIR, U. – OZGURTAS, T. 2007. Comparison of spermatological characteristics and biochemical seminal plasma parameters

of normozoospermic and oligoasthenozoospermic bulls of two breeds. In: Turkish J. Vet. Anim. Sci., vol. 31, 2007, p. 381-387.

24. CHEN, C.Y. – WANG, Y.F. – LIN, Y.H. – YEN, S.F. 2003. Nickel-induced oxidative stress and effect of antioxidants in human lymphocytes. In: Arch. Toxicol., vol. 77, 2003, p. 123-130.

25. CHOWDHURY, A.R. – DEWAN, A. – GANDHI, D.N. 1984. Toxic effect of lead on testis of rat. In: Biomed. Biochim. Acta, vol. 43, 1984, p. 95-100.

26. CIBULKA, J. – SOVA, Z. – TRAFNÝ, D. 1980. Problematika otráv olovem u hospodářských zvířat. In: Veterinářství, vol. 30, 1980, p. 506-508.

27. CIBULKA, J. – SOVA, Z. – MADER, P. 1985. Problematika sloučenin olova, kadmia a rtuti v zemědělské výrobě a v biosféře. In: VŠZ Praha, 1985, s. 6-62.

28. CIBULKA, J. – DOMAŽLÍČLÁ, E. – KOZÁK, J. – KUBIZŇÁKOVÁ, J. – MADER, P. – MACHÁLEK, E. – MAŇKOVSKÁ, B. – MUSIL, J. – PAŘÍZEK, J. – PÍŠA, J. – POHUNKOVÁ, J. – REISNEROVÁ, H. – SVOBODOVÁ, Z. 1991. Pohyb olova, kadmia a rtuti v biosféře. In: Academia, Praha, 1991, 426 pp.

29. CIGÁNKOVÁ, V. – MESÁROŠ, P. – BÍREŠ, J. 1993. Vplyv zinku na mikroskopickú a submikroskopickú štruktúru semenníkov býkov pri deficiencii zinku a vplyv aplikácie prípravku Zindep inj. na obnovu spermatogenézy. In: 35. zjazd Českej a Slovenskej anatomickej spoločnosti a Sekcie bunkovej biológie Čs. bilogickej spoločnosti. Nitra: VŠP, 1993, p. 34.

30. CIGÁNKOVÁ, V. – MESÁROŠ, P. – BÍREŠ, J. – TOMAJKOVÁ, E. – ČERNOTA, S. 1994. Morfológická štruktúra semenníkov býkov pri deficiencii zinku a vplyv aplikácie prípravku Zindep inj. na obnovu spermatogenézy. In: Slov. vet. čas., vol. 19, 1994, s. 134-138.

31. CIGÁNKOVÁ, V. – MESÁROŠ, P. – BÍREŠ, J. – RAVASOVÁ, O. – ČERNOTA, S. – TOMAJKOVÁ, E. 1997. Vplyv zinku na morfológiu a prežívateľnosť spermii hlbokozmrazeného semena býkov. In: Slov. vet. čas., vol. 22, 1997, p. 266-269.

32. CIGÁNKOVÁ, V. – MESÁROŠ, P. – BÍREŠ, J. – LEDECKÝ, V. – CIGÁNEK, J. – TOMAJKOVÁ, E. 1998. Morfológické zmeny semenníkov žrebcov pri deficite zinku. In: Slov. vet. čas., vol. 23, 1998, p. 98-100.

33. CIGÁNKOVÁ, V. – BÍREŠ, J. - MESÁROŠ, P. 2000. Zinok a reprodukčné funkcie samcov. In: KOVÁČIK, J. (Ed): Rizikové faktory potravného reťazca človeka. Nitra: SPU, 2000, p. 117-124.
34. CLERMONT, J. 1972. Kinetics of spermatogenesis in mammals: Seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. In: *Physiol. Rev.*, vol. 82, 1972, s. 198-236.
35. CORPAS, I. – CASTILLO, M. – MARQUINA, D. – BENITO, M.J. 2002. Lead intoxication in gestational and lactation periods alters the development of male reproductive organs. In: *Ecotoxicol. Environ. Safety*, vol. 53, 2002, p. 259-266.
36. CYBULSKI, W. – JAROSZ, Ł. – CHALABIS-MAZUREK, A. – JAKUBCZAK, A. – KOSTRO, K. – KURSA, K., 2009. Contents of zinc, copper, chromium and manganese in silver foxes according to their age and mineral supplementation. In: *Pol. J. Vet. Sci.*, vol. 12, 2009, p. 339-345.
37. ČELECHOVSKÁ, O. – LITERÁK, I. – ONDRUŠ, S. – POSPÍŠIL, Z. 2006. Heavy metals in brown bears from the central European Carpathians. In: *Acta Vet. Brno*, vol. 75, 2006, p. 501-506.
38. ČELECHOVSKÁ, O. – SVOBODOVÁ, Z. – ŽLÁBEK, V. – MACHARÁČKOVÁ, B. 2007. Distribution of metals in tissues of the common carp (*Cyprinus carpio* L.). In: *Acta Vet. Brno*, vol. 76, 2007, p. 93-100.
39. ČELECHOVSKÁ, O. – MALOTA, L. – ZIMA, S. 2008. Entry of heavy metals into food chains: A 20-year comparison study in Northern Moravia (Czech Republic). In: *Acta Vet. Brno*, vol. 77, 2008, p. 645-652.
40. DANADEVI, K.- ROZATI, R. – REDDY, P.P. – GROVER, P. 2003. Semen quality of Indian welders occupationally exposed to nickel and chromium. In: *Reprod. Toxicol.*, vol. 17, 2003, p. 451-456.
41. DANEK, J. – KRUMRYCH, W. – GEHRKE, M. 2001. Magnesium concentration in stallion blood serum and seminal plasma and its correlation with semen characteristics. In: *Bull. Vet. Inst. Pulawy*, vol. 45, 2001, p. 307-313.
42. DEMIREL, S. – TUZEN, M. – SARACOGLU, S. – SOYLAK, M. 2008. Evaluation of various digestion procedures for trace element contents of some food material. In: *J. Hazard. Mat.*, vol. 152, 2008, p. 1020-1026.

43. DERR, R. – FAHIM, Z. – YOUSEF, M. – FAHIM, M. 1976. Enviromental interaction of lead cadmium on reproduction and metabolism of male rats. Res. Commun. Chem. Path. In: Pharmacol, vol. 14, 1976, p. 684-713.
44. EGHBALI, M. – ALAVI-SHOUSHTARI, S.M. – ASRI REZAI, S., 2008. Effects of copper and superoxide dismutase content of seminal plasma on buffalo semen characteristics. In: Pakistan J. Biol. Sci., vol. 11, 2008, p. 1964-1968.
45. ELINDER, C.G. 1986. Other toxic effects. In: FRIBERG, L. – KJELLSTROM, T. (ed.): Cadmium and health: a toxicological and epidemiological appraisal. Boca Raton, CRC Press, vol. 2, 1986, p. 159-204.
46. ESCRICH, L. – GRAU, N. – MESEGUER, M. – PELLICER, A. – ESCRIBA MJ. 2009. Morphologic indicators predict the stage of chromatin condensation of human germinal vesicle oocytes recovered from stimulated cycles. In: Fertil. Steril., 2009, in press. [Epub ahead of print]
47. FAHIM, M.S. – KHARE, N.K 1980. Effects of subtoxic levels of lead and cadmium on urogenital organs of male rats. In: Arch. Anat., vol. 4, 1980, p. 357-362.
48. FARRANT, J.L. 1954. An electron microscopic study of ferritin. In: Biochem. Biophys. Acta, vol. 13, 1954, p. 569-576.
49. FAWCETT, D.W. 1975. The mammalian spermatozoon. In: Dev. Biol., vol. 44, 1975, p. 394-436.
50. FERENČÍK, M. – ŠKÁRKA, B. – NOVÁK, M. – TURECKÝ, L. 2000. Biochémiá. Bratislava: SAP, 2000, 924 s. ISBN 80-88908-58-2
51. FINDEJSOVÁ, M. – HALAČKA, K. – SPONAR, J. – ŠEFFLOVÁ, K. 1982. K problematike ovplyvnenia potravinového reťazca kadmíom a olovom v priemyselných hnojivách. In: Čs. hygiena, vol. 27, 1982, p. 440-444.
52. FORD, J.J. – WISE, T. – LUNSTRA, D.D. – ROHRER, G.A. 2001. Interrelationships of porcine X and Y chromosomes with pituitary gonadotropins and testicular size. In: Biol. Reprod., vol. 65, 2001, p. 906-912.
53. FORD, J.J. – WISE, T. – LUNSTRA, D.D. 1997. Negative relationship between blood concentration of follicle-stimulating hormone and testicular size in mature boars. In: J. Anim. Sci., vol. 75, 1997, p. 790-795.

54. FORGACS, ZS. – NEMETHY, ZS. – REVESZ, CS. – LAZAR, P. 2001. Specific amino acids moderate the effects of Ni²⁺ on the testosterone production of mouse Leydig cells in vitro. In: *J. Toxicol. Environ. Health*, vol. A62, 2001, p. 349 – 358.
55. GAMČÍK, P. – KOZUMPLÍK, J. – MESÁROŠ, P. – SCHVARC, F. – VLČEK, Z. – ZIBRÍN, M. 1992. Andrológia a umelá inseminácia hospodárskych zvierat. In: *Príroda*, Bratislava, 1992, 299 pp.
56. GINTER, E. – NAGYOVÁ, A. 1991. Kadmium. Metabolizmus a mechanizmus toxického pôsobenia. In: *Čs. fyziol.*, vol. 40, 1991, p. 575-585.
57. GOULD, K.G. – MARTIN, D.E. – HAFEZ, E.S.E. 1975. Mammalian spermatozoon. In: HAFEZ, E.S.E. (Ed.): *Scanning electron microscopic atlas of mammalian reproduction*. Stuttgart, Georg Thieme, 1975, p. 58-67.
58. GREGOR MC, A.J. – MASON, H.J. 1990. Chronic occupational lead exposure and testicular endocrine function. In: *Human Exp. Toxicology*, vol. 9, 1990, p. 371-376.
59. GUMMOW, B. – BOTHA, C.J. – BASSON, A.T. – BASTIANELLO, S.S. 1991. Cooper toxicity in ruminants: air pollution as a possible cause Onderstepoort. In: *J.Vet. Res.*, vol. 58, 1991, p. 33-39.
60. HARRISON, P.M. – AROSIO, P. 1996. The ferritins: Molecular properties, iron storage function and cellular regulation. In: *Biochem. Biophys. Acta*, vol. 1275, 1996, p. 161-203.
61. HARRISON, L.G. – KASINSKY, H.E. – RIBES, E. – CHIVA, M. 2005. Possible mechanisms for early and intermediate stages of sperm chromatin condensation patterning involving phase separation dynamics. In: *J. Exp. Zool. A Comp. Exp. Biol.*, vol. 303, 2005, p. 76-92.
62. HARSTAD, E.B. – KLAASSEN, C.D. 2002. iNOS-null mice are not resistant to cadmium chloride-induced hepatotoxicity. In: *Toxicol.*, vol. 175, 2002, p. 83-90.
63. HESS, R.A. – DE FRANCA, R.L. 2008. Spermatogenesis and cycle of the seminiferous epithelium. In: *Adv. Exp. Med. Biol.*, vol. 636, 2008, p. 1-15.
64. HEW, K.W. – HEATH, G.L. – JIWA, A. – WELSH, M.J. 1993. Cadmium in vivo causes disruption of tight junction-associated microfilaments in rat Sertoli cell. In: *Biol. Reprod.*, vol. 49, 1993, p. 840-849.

65. HILDEBRAND, D.C. – DER, R. – GRIFFIN, W.T. – FAHIM, M.S. 1973. Effect of lead acetate on reproduction. In: *Amer. J. Obstet. Gynecol.*, vol. 115, 1973, p. 1058-1065.
66. HOLOVSKÁ, K. – CIGÁNKOVÁ, V. – ALMÁŠIOVÁ, V. – SOBEKOVÁ, A. – NAŘ, P. – SKALICKÁ, M. 2009. Ultrastructural and biochemical changes in the turkeys liver after the chronic cadmium exposure. In: *Acta Vet.*, vol. 59, 2009, p. 167-175.
67. HORKÝ, D. – ILLEK, J. – PECHOVÁ, A. 1998. Distribution of heavy metals and their ultrahistochemical determination in the organs of calves. In: *Acta Vet. Brno*, vol. 67, 1998, p. 51-58.
68. HUI, C.A. 2002. Concentrations of chromium, manganese, and lead in air and in avian eggs. In: *Environ. Poll.*, vol. 120, 2002, p. 201-206.
69. JANČOVÁ, A. – MASSÁNYI, P. – NAŘ, P. – KORÉNEKOVÁ, B. – SKALICKÁ, M. – DRÁBEKOVÁ, J. – BALÁŽ, I. 2006. Accumulation of heavy metals in selected organs of yellow-necked mouse (*Apodemus flavicollis*). In: *Ekologia (Bratislava)*, vol. 25, 2006, p. 19-26.
70. KASKER, H.T. 1994. The relationship between morphology, motility, and zona pellucida binding potential of human spermatozoa. In: *Andrologia*, vol. 26, 1994, p. 1-4.
71. KLEIN G.L. – SNODGRASS, W.R. 2003. *Heavy metal toxicology*. Academic Press, Oxford, 2003, p. 3050-3056.
72. KLIKA, E. – DVOŘÁK, M. – KAPELLEK, K. – VACEK, Z. 1988. *Histológia*. In: Osveta, Martin, 1988.
73. KOJIMA, Y. 1978. Fine structure of boar sperm abnormality: Tightly coiled tail. In: *Jap. J. Anim. Reprod.*, vol. 24, 1978, p. 89-90.
74. KOLESÁROVÁ, A. – SLAMEČKA, J. – JURČÍK, R. – TATARUCH, F. – LUKÁČ, N. – KOVÁČIK, J. – CAPCAROVÁ, M. – VALENT, M. – MASSÁNYI, P. 2008. Environmental levels of cadmium, lead and mercury in brown hares and their relation to blood metabolic parameters. In: *J. Environ. Sci. Health*, vol. A43, 2008, p. 653-657.
75. KOMATSU, Y. – OGRA, Y. – SUZUKI, K.T. 2002. Copper balance and ceruloplasmin in chronic hepatitis in a Wilson disease animal model, LEC rats. In: *Arch. Toxicol.*, vol. 76, 2002, p. 502-508.

76. KOSANOVIC, M. – HASAN, M.Y. – SUBRAMANIAN, D. – AL AHBABI, A.A.F. – AL KATHIRI, O.A.A. – ALEASSA, E.M.A.A. – ADEM, A. 2007. Influence of urbanization of the western coast of the United Arab Emirates on trace metal content in muscle and liver of wild Red-spot emperor (*Lethrinus lentjan*). In: *Food Chem. Toxicol.*, vol. 45, 2007, p. 2261-2266.
77. KORÉNEKOVÁ, B. – SKALICKÁ, M. – NAĎ, P. 2002. Cadmium exposure of cattle after long-term emission from polluted area. In: *Trace Elem. Electrolytes*, vol. 19, 2002, p. 97-99.
78. KRAMÁROVÁ, M. – MASSÁNYI, P. – JANČOVÁ, A. – TOMAN, R. – SLAMEČKA, J. – TATARUCH, F. – KOVÁČIK, J. – GAŠPARÍK, J. – NAĎ, P. – SKALICKÁ, M. – KORÉNEKOVÁ, B. – JURČÍK, R. – ČUBOŇ, J. – HAŠČÍK, P. 2005a. Concentration of cadmium in the liver and kidneys of some wild and farm animals. In: *Bull. Vet. Inst. Pulawy*, vol. 49, 2005, p. 465-469.
79. KRAMÁROVÁ, M. – MASSÁNYI, P. – SLAMEČKA, J. – TATARUCH, F. – JANČOVÁ, A. – GAŠPARÍK, J. – FABIŠ, M. – KOVÁČIK, J. – TOMAN, R. – GÁLOVÁ, J. – JURČÍK, R. 2005b. Distribution of cadmium and lead in liver and kidney of some wild animals in Slovakia. In: *J. Environ. Sci. Health*, vol. A40, p. 593-600.
80. KRASOVSKII, G.N. – VASAKOVICH, L.H. – CHARIEV, O.C. 1979. Experimental study of biological effects of lead and aluminium oral administration. In: *Environ. Health. Perspect.*, vol. 30, 1979, p. 47-56.
81. KRÁTKÝ, F. – ZIKOVÁ, E. – ČEŘOVSKÝ, J. 1995. Vliv příjmu kadmia krmnou dávkou na kvalitu ejakulátu plemenných kanců. In: *Živoč. Výr.*, vol. 40, 1995, p. 71-74.
82. KRUMRYCH, W. – WISNIEWSKI, E. – DANEK, J. – GEHRKE, M. 2001. Influence of multiple endotoxin injections on Fe, Zn and Cu concentrations in blood serum in horses. In: *Bull. Vet. Inst. Pulawy*, vol. 45, 2001, p. 243-252.
83. KULÍŠEK, V. – HLUCHÝ, S. – TOMAN, R. 2006. *Cytológia, histológia a embryológia*. Slovenská poľnohospodárska univerzita, 2006, 196 pp.
84. LANCRANJAN, I. – POPESCU, H.I. – GAVANESCU, O. – KLEPSCH, I. – SERBANESCU, P. 1975. Reproductive ability of workmen occupationally exposed to lead. In: *Arch. Environ. Health*, vol. 30, 1975, p. 396-401.

85. LAZARUS, M. – ORCT, T. – BLANUŠA, M. – VICKOVIĆ, I. – ŠOŠTARIĆ, B. 2008. Toxic and essential metal concentrations in four tissues of red deer (*Cervus elaphus*) from Baranja, Croatia. In: *Food Add. Contamin.*, vol. 25, 2008, p. 270-283.
86. LEBLOND, G.P. - CLERMONT, Y. 1952. Spermiogenesis of rat mouse, hamster and guinea pig as revealed by the “periodic acid - fuchsin sulfurous acid” technique. In: *Am. J. Anat.*, vol. 90, 1952, p. 167-216.
87. LEE, I.P. – CLARKSON, T.W. – NORDBERG, G.F. – SAGER, P.R. 1983. Effects of environmental metals on male reproduction. In: *Reproductive and Developmental Toxicity of Metals*. New York and London: Plenum Press, 1983, p. 253-278.
88. LEE, C.K. – LEE, J.T. – YU, S.J. – KANG, S.G. – MOON, C.S. – CHOI, Y.H. – KIM, J.H. – KIM, D.H. – SON, B.C. – LEE, C.H. – KIM, H.D. – AHN, J.H. 2009. Effects of cadmium on the expression of placental lactogens and Pit-1 genes in the rat placental trophoblast cells. In: *Mol. Cell. Endocrinol.*, vol. 298, 2009, p. 11-18.
89. LÓPEZ-ALONSO, M. – MIRANDA, M. – GARCÍA-PARTIDA, P. – CANTERO, F. – HERNÁNDEZ, J. – BENEDITO, J.L. 2007. Use of dogs as indicators of metal exposure in rural and urban habitats in NW Spain. In: *Sci. Total Environ.*, vol. 372, 2007, p. 668-675.
90. LUCESOLI, F. – CALIGIURI, M. – ROBERTI, M.F. – PERAZZO, J.C. – FRAGA, C.C. 1999. Dose dependent increase of oxidative damage in the testes of rats subjected in acute iron overload. In: *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 372, 1999, p. 37-43.
91. LUKÁČ, N. – BULLA, J. – CIGÁNKOVÁ, V. – FLEŠÁROVÁ, S. – KOVÁČIK, J. – MASSÁNYI, P. – NAĎ, P. – SKALICKÁ, M. – STAWARZ, R. – TRANDŽÍK, J. 2007. Stopové prvky a kvalita spermií. Nitra: Slovenská poľnohospodárska univerzita, 2007, 118 pp.
92. LUKÁČ, N. – MASSÁNYI, P. – KROČKOVA, J. – NAĎ, P. – SLAMEČKA, J. – ONDRUŠKA, Ľ - FORMICKI, G. – TRANDŽÍK, J. 2009. Relationship between trace element concentrations and spermatozoa quality in rabbit semen. In: *Slovak J. Anim. Sci.*, vol. 42, 2009, p. 46-50.
93. LUNSTRA, D.D. – FORD, J.J. – KLINDT, J. – WISE, T.H. 1997. Physiology of the Meishan boar. In: *J. Reprod. Fertil. (Suppl.)*, vol. 52, 1997, p. 181-193.

94. LV, Z.M. – WANG, M. – XU, C. 2010. Antifertility characteristics of the N-terminal region of mouse equatorial segment protein. In: *Anat. Rec.*, vol. 293, 2010, p. 171-181.
95. MARTINIAKOVÁ, M. – KUNA, R. – OMELKA, R. – JANČOVÁ, A. – MASSÁNYI, P. 2008. *Všeobecná cytológia a histológia*. Nitra: Univerzita Konštantína Filozofa, 2008, 204 pp.
96. MASSÁNYI, L. 1991. Funkčná morfológia spermie. In: *Veda, vydavateľstvo SAV*, Bratislava, 1991, 194 s.
97. MASSÁNYI, L. – JANOVIČOVÁ, O. – BAKITOVÁ, Ľ. – PAŠKA, J. – TOMAN, R. 1991. Rizikové faktory prostredia pôsobiace na spermatogézu. Kadmium. In: *Poľnohospodárstvo*, vol. 37, 1991, p. 830-848.
98. MASSÁNYI, L. – JANISCH, R. 1993. Molecular organization of the plasma membrane in the post-acrosomal region of some farm animals. In: *Andrologia*, 1993, 25, p. 83-87.
99. MASSÁNYI, P. – TOMAN, R. – UHRÍN, V. 1995. Distribution of cadmium in selected organs of rabbits after an acute and chronic administration. In: *Ital. J. Food Sci.*, vol. 7, 1995, p. 311-316.
100. MASSÁNYI, P. – LUKÁČ, N. – TRANDŽÍK, J. 1996a. In vitro inhibition of the motility of bovine spermatozoa by cadmium chloride. In: *J. Environ. Sci. Health*, vol. A31, 1996, p. 1865-1879.
101. MASSÁNYI, P. – LUKÁČ, N. – MASSÁNYIOVÁ, K. 1996b. Sezónny výskyt patologických spermíí u býkov. In: *Poľnohospodárstvo*, vol. 42, 1996, p. 628-637.
102. MASSÁNYI, P. – CIGÁNKOVÁ, V. – FABIŠ, M. – KOVÁČIK, J. – MASSÁNYIOVÁ, K. – TOMAN, R. 1999a. Reprodukčná toxikológia. In: *SPU, Nitra*, 1999, 147 s.
103. MASSÁNYI, P. – MASSÁNYIOVÁ, K. – PIZZI, F. – TRANDŽÍK, J. – TOMAN, R. 1999b. Time – dependent influence of low cadmium dose on bovine spermatozoa motion after refreezing. In: *Poľnohospodárstvo*, vol. 45, 1999, p. 287-295.
104. MASSÁNYI, P. – TOMAN, R. – LUKÁČ, N. – DANKO, J. – CIGÁNKOVÁ, V. – TRANDŽÍK, J. – HORNIÁKOVÁ, E. – ČUPKA, P. 2000a. Ťažké kovy a ich vzťah

k reprodukcií zvierat. In: KOVÁČIK, J. (Ed): Rizikové faktory potravného reťazca človeka. In: SPU, Nitra, 2000, p. 77-92.

105. MASSÁNYI, P. – TRANDŽÍK, J. – LUKÁČ, N. – PIZZI, F. – TOMAN, R. – BÁRDOS, L. – TÓBIÁS, S. 2000b. Kadmium a funkčné zmeny spermií. In: KOVÁČIK, J. (Ed): Rizikové faktory potravného reťazca človeka. In: SPU, Nitra, 2000, p. 103-106.

106. MASSÁNYI, P. – SLAMEČKA, J. – LUKÁČ, N. – JURČÍK, R. 2000c. Seasonal variations in the morphometric analysis of the testis, testosterone production, and occurrence of pathological spermatozoa in the brown hare (*Lepus europaeus*). In: J. Anim. Feed Sci., vol. 9, 2000, p. 709-719.

107. MASSÁNYI, P. – TOMAN, R. – LUKÁČ, N. – TRANDŽÍK, J. 2001. Kadmium a funkčné zmeny spermií. In: Infovet, vol. 8, 2001, p. 20-21.

108. MASSÁNYI, P. – KISS, Z. – TOMAN, R. – BÁRDOS, L. 2002. Effect of acute cadmium exposure on testicular tissue and testicular retinoid and β -carotene content. In: Magy. Allatorv. Lapja, vol. 124, 2002, p. 688-692.

109. MASSÁNYI, P. – TRANDŽÍK, J. – NAĎ, P. – LUKÁČ, N. – SKALICKÁ, M. – KORÉNEKOVÁ, B. – CIGÁNKOVÁ, V. – TOMAN, R. – HALO, M. – STRAPAK, P. 2004. Semen concentration of trace elements in stallions and relation to the spermatozoa quality. In: Trace Elem. Electrolytes, vol. 21, 2004, p. 229-231.

110. MASSÁNYI, P. – TRANDŽÍK, J. – NAĎ, P. – SKALICKÁ, M. – KORÉNEKOVÁ, B. – LUKÁČ, N. – FABIŠ, M. – TOMAN, R. 2005. Seminal concentration of trace elements in fox and relationships to spermatozoa quality. In: J. Environ. Sci. Health, vol. A40, 2005, p. 1097-1105.

111. MASSÁNYI, P. – LUKÁČ, N. – MAKAREVICH, AV. – CHRENEK, P. – FORGACS, ZS. – ZAKREWSKI, M. – STAWARZ, R. – TOMAN, R. – LAZOR, P. – FLESAROVÁ, S. 2007a. Lead induced alterations in rat kidney and testes in vivo. In: J. Environ. Sci. Health, vol. A42, 2007, 612-623.

112. MASSÁNYI, P. – LUKÁČ, N. – ZEMANOVÁ, J. – MAKAREVICH, A. V. – CHRENEK, P. – CIGÁNKOVÁ, V. – FLEŠÁROVÁ, S. – TOMAN, R. – FORGÁCS, Z. – SOMOSY, Z. – LAZOR, P. 2007b. Effect of nickel administration in vivo on the testicular structure in male mice. In: Acta Vet. Brno, vol. 76, 2007, p. 223-229.

113. MASSÁNYI, P. – LUKÁČ, N. – UHRÍN, V. – TOMAN, R. – PIVKO, J. – RAFAY, J. – FORGÁCS, Z. – SOMOSY, Z. 2007c. Female reproductive toxicology of cadmium. In: *Acta Biol. Hung.*, vol. 58, 2007, p. 287-299.
114. MASSÁNYI, P. – LUKÁČ, N. – KOVÁČIK, J. – TOMAN, R. – STAWARZ, R. – CIGÁNKOVÁ, V. – CIAGLO, A. 2008. Heavy metals effects on testicular structure in vivo. In: *Slovak J. Anim. Sci.*, vol. 41, 2008, p. 208.
115. McDOWELL, L.R. 1993. Soil, plant, animal relationship and environmental aspects of trace elements. In: ANKE, M. – MEISSNERM, C.F. – MILLS, V. (eds): *Trace Elements in Man and Animals – TEMA 8*, 1993, p. 413-421.
116. McLAUGHLIN, M.J. – PARKER, D.R. – CLARKE, J.M. 1999. Metals and micronutrients – food safety issues. *Field Crops Res.*, vol. 60, 1999, p. 143-163.
117. MERKER, H.J. – VORMANN, J. – GUNTHER, T. 1996. Iron-induced injury of rat testis. In: *Andrologia*, vol. 28, 1996, p.267-273.
118. MILACIC, R. – KRALJ, B. 2003. Determination of Zn, Cu, Cd, Pb, Ni and Cr in some Slovenian foodstuffs. In: *Europ. Food Res. Technol.*, vol. 217, 2003, p. 211-214.
119. MOCÉ, E. – AROUCA, M. – LAVARA, R. – PASCUAL, J.J. 2000. Effect of dietary zinc and vitamin supplementation on semrn characteristics of high growth rate males during Summer season. In: *World Rabbit Congress, 7, 2000, Valencia. Proceedings. CD-ROM*.
120. MYSŁEK, P., KALISIŃSKA, E. 2006. Contents of selected heavy metals in the liver, kidneys and abdominal muscle of the brown hare (*Lepus europaeus* Pallas, 1778) in Central Pomerania, Poland. In: *Pol. J. Vet. Sci.*, vol. 9, 2006, p. 31-41.
121. NAVA-HERNÁNDEZ, M.P. – HAUAD-MARROQUÍN, L.A. – BASSOL-MAYAGOITIA, S. – GARCÍ-ARENAS, G. – MERCADO-HERNÁNDEZ, R. – ECHÁVARRI-GUZMÁN, M.A. – CERDA-FLORES, R.M. 2009. Lead-, cadmium-, and arsenic-induced DNA damage in rat germinal cells. In: *DNA Cell Biol.*, vol. 28, 2009, p. 241-248.
122. NRC (NATIONAL RESEARCH COUNCIL), 1980. *Drinking water and health, Volume 3* Washington DC, National Academy Press, pp. 415.

123. NI, L. – LI, S. 2008. Effects of organic matters coming from Chinese tea on soluble copper release from copper teapot. In: *Sci. Total Environ.*, vol. 389, 2008, p. 202-207.
124. OYEYEMI, M.O. – OLUKOLE, S.G. – ESAN, O. 2008. Sperm morphological studies of the West African Dwarf Buck treated with pumpkin plant (*Cucurbita pepo*). In: *Internat. J. Morphol.*, vol. 26, 2008, p. 121-126.
125. PANDEY, R. – SRIVASTAVA, S.P. 2000. Spermatotoxic Effects of Nickel in Mice. In: *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, vol. 64, 2000, p. 161-167.
126. PANDEY, R. – KUMAR, R. – SINGH, S.P. – SAXENA, D.K. – SRIVASTAVA, S.P. 1999. Male reproductive effect of nickel sulphate in mice. In: *Biometals*, vol. 12, 1999, p. 339-346.
127. PENNA, S. – POCINO, M. – MARVAL, M.J. – LLORETA, J. – G LLARDO, L. – VILA, J. 2009. Modifications in rat testicular morphology and increases in IFN- γ serum levels by the oral administration of subtoxic doses of mercuric chloride. In: *Systems Biol. Reprod. Med.*, vol. 55, 2009, p. 69-84.
128. PISKÁČ, A. – KAČMÁR, P. – BARTÍK, M. – PROCHÁZKA, Z. – SVOBODOVÁ, Z. – ŠIKULA, J. 1985. Veterinární toxikologie. In: *SZN Praha*, 1985, 254 pp.
129. POKORNY, B. – RIBARIČ-LASNIK, C. 2002. Seasonal variability of mercury and heavy metals in roe deer (*Capreolus capreolus*) kidney. In: *Environ. Poll.*, vol. 117, 2002, p. 35-46.
130. RAHMAN, M.S. – SASANAMI, T. – MORI, M. 2007. Effects of cadmium administration on reproductive performance of Japanese quail (*Coturnix japonica*). In: *J. Poultry Sci.*, vol. 44, 2007, p. 92-97.
131. REEVES, P.G. – NIELSEN, E.J. – O'BRIEN-NIMENS, C. – VANDERPOOL, R.A. 2001. Cadmium bioavailability from edible sunflower kernels: A long-term study with men and women volunteers. In: *Environ. Res.*, vol. 87, 2001, p. 81-91.
132. REYES, J.G. – ARRATE, M.P. – SANTANDER, M. – GUZMAN, L. – BENOS, D.J. 1993. Zn (II) transport and distribution in rat spermatids. In: *Am. J. Physiol.*, vol. 265, 1993, p. 893-900.

133. ROCHA, A. – OLIVEIRA, E. – VILHENA, M.J. – DIAZ, J. – SOUSA, M. 2006. A novel apical midpiece defect in the spermatozoa of a bull without an apparent decrease in motility and fertility. A case study. In: *Theriogenology*, vol 66, 2006, p. 913-922.
134. ROOSEN – RUNGE, E. 1962. The process of spermatogenesis in mammals. In: *Biol Rev.*, vol. 37, 1962, p. 343-377.
135. ROJAS, E. – HERRERA, L.A. – POIRER, L.A. – WEGMAN-OSTROSKY, P. 1999. Are metals carcinogens? *Mutat. Res.*, vol. 443, 1999, p. 157-181.
136. ROYCHOUDHURY, S. – MASSÁNYI, P. 2008. In vitro copper inhibition of the rabbit spermatozoa motility. In: *J. Environ. Sci. Health*, vol. A43, 2008, p. 658-663.
137. SADIK, N.A.H. 2008. Effect of diallyl sulfide and zinc on cadmium-induced oxidative damage and trace elements level in the testes of male rats. In: *J. Food Biochem.*, vol. 32, 2008, p. 672-691.
138. SALAMON, S. – MAXWELL, W.M. 2000. Storage of ram semen. In: *Anim. Reprod. Sci.*, vol. 62, 2000, p. 77-111.
139. SALIM, A. – HASSANIN, M.A – ZOHAIR, A. 2003. A simple procedure for reducing lead content in fish. In: *Food Chem. Toxicol.*, vol. 41, 2003, p. 595-597.
140. SÁNCHEZ-CHARDI, A. – MARQUES, C.C. – NADAL, J. – DA LUZ MATHIAS, M. 2007. Metal bioaccumulation in the greater white-toothed shrew, *Crocidura russula*, inhabiting an abandoned pyrite mine site. In: *Chemosphere*, vol. 67, 2007, p. 121-130.
141. SATARUG, S. – BAKER, J.R. – URBENJAPOL, S. – ELKINS, M.H. – REILLY, P.E.B. – WILLIAMS, D.J. – MOORE, M.R. 2003. A global perspective on cadmium pollution and toxicity in non-occupationally exposed population. *Toxicol. Lett.*, vol. 1-2, 2003, p. 65-83.
142. SCHENKEL, H. – FLACHOWSKY, G. 1998. Bewertung zulässiger Spurenelementhöchstgehalte aus Sicht der Tierernährung. In : *Kreisläufe erwünschter und unerwünschter Stoffe – ihre Bedeutung in der Nahrungskette*. Schriftenreihe des Bundesministeriums für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten, Reihe A: Angewandte Wissenschaft, Heft 483, p. 67-95.
143. SCIALLI, R.A. – ZINAMAN, J.M. 1993. Reproductive toxicology and infertility. In: McGraw-Hill Inc., New York, 1993, 338 pp.

144. SHIMADA, H. – YAMAGUCHI, S. – MURATA, H. – OTAGIRI, H. – IMAMURA, Y. 2002. Cadmium exposure decreases androgen-dependent metabolism of acetohexamide in liver microsomes of male rats through its testicular toxicity. In: Arch. Toxicol., vol. 76, 2002, p. 8-12.
145. SKALICKÁ, M. – KORÉNEKOVA, B. – NAĎ, P. 2002. Lead in livestock from polluted areas. In: Trace Elem Electrolytes, vol. 19, 2002, p. 94-96.
146. SKALICKÁ, M. – KORÉNEKOVÁ, B. – NAĎ, P. 2008. Distribution of trace elements in liver and muscle of Japanese quails. In: Slovak J. Anim. Sci., vol. 41, 2008, p. 187-189.
147. SOBTI, R.C. – GILL, R.K. 1989. Incidence of micronuclei and abnormalities in the head of spermatozoa caused by the salts of heavy metal nickel. In: Cytologia, vol. 54, 1989, p. 249-254.
148. SLANINA, Ľ. – BARTKO, P. – ČÁNECKÝ, P. – FRIED, K. – HANÁK, J. – KOCÍ, J. – HOJOVCOVÁ, M. – HOFÍREK, B. – LEHOCKÝ, J. 1985. Klinická diagnostika vnútorných chorôb hospodárskych zvierat. In: Príroda, Bratislava, 1985, 493 pp.
149. SOKOL, J. – UHRÍN, V. – MASSÁNYI, P. – BREYL, I. – KOŠUTZKÝ, J. – UHRÍN, P. 1998. Kadmium a jeho výskyt v organizmoch živočíchov. In: ŠVS SR, Bratislava, 1998, 116 pp.
150. SORENSEN, M.B. – STOLTENBERG, M. – DANSCHER, G. – ERNST, E. 1999. Chelation of intracellular zinc ions affects human sperm cell motility. In: Mol. Human Reprod., vol. 5, 1999, p. 338-341.
151. SOYLAK, M. – COLAK, H. – TURKOGLU, O. – DOGAN, M. 2006. Trace metal content of snacks and appetizers consumed in Turkey. In: Bull. Environ. Contam. Toxicol., vol. 76, 2006, p. 436-441.
152. ŠIMONÍK, I. – PAVELKA, J. – KUDLÁČ, E. 1990. The spermiotoxicity of selected chemical elements (Cr, Cu, Zn) in vitro. In: Reprod. Dom. Anim., vol. 25, 1990, p. 242-246.

153. TAYLOR, A. – BRANCH, S. – DAY, M.P. – PATRIARCA, M. – WHITE, M. 2002. Atomic spectrometry update. Clinical and biological materials, foods and beverages, In: *J. Anal. At. Spectrom.*, vol. 17, 2002, p. 414-455.
154. TAYLOR, A. – BRANCH, S. – DAY, M.P. – PATRIARCA, M. – WHITE, M. 2004. Atomic spectrometry update. Clinical and biological materials, foods and beverages, In: *J. Anal. At. Spectrom.*, vol. 19, 2004, p. 505-556. .
155. TAYLOR, A. – BRANCH, S. – DAY, M.P. – PATRIARCA, M. – WHITE, M. 2005. Atomic spectrometry update. Clinical and biological materials, foods and beverages, In: *J. Anal. At. Spectrom.*, vol. 20, 2005, p. 323-369.
156. TAYLOR, A. – BRANCH, S. – DAY, M.P. – PATRIARCA, M. – WHITE, M. 2006. Atomic spectrometry update. Clinical and biological materials, foods and beverages. In: *J. Anal. At. Spectrom.*, vol. 21, 2006, p. 439-491.
157. THOMPSON, J. – BANNIGAN, J. 2008. Cadmium: Toxic effects on the reproductive system and the embryo. In: *Reprod. Toxicol.*, vol. 25, 2008, p. 304-315.
158. TODD, E. 2003. Contamination of food. Academic Press, Oxford, 2003, p. 1593-1600.
159. TOEBOSCH, A.M. – KROOS, M.J. – GROOTEGOED, J.A. 1987. Transport of transferrin-bound iron into rat Sertoli cells and spermatids. In: *Int. J. Androl.*, vol. 10, 1987, p. 753-764.
160. TOMAN, R. – MASSÁNYI, P. 1997. Štruktúrne zmeny semenníka a prisemenníka po podaní kadmia. In: SPU, Nitra, 1997, 83 pp.
161. TOMAN, R. – MASSÁNYI, P. – UHRÍN, V. – HLUCHÝ, S. 2000. Kadmiu a reprodukčné funkcie samcov. In: KOVÁČIK, J. (Ed): Rizikové faktory potravinového reťazca človeka. In: SPU, Nitra, 2000, p. 93-102.
162. TOMAN, R. – MASSÁNYI, P. – UHRÍN, V. 2002. Changes in the testis and epididymis of rabbits after an intraperitoneal and peroral administration of cadmium. *Trace Elem. Electrolytes*, vol. 19, 2002, p. 114-117.
163. TOMAN, R. – MASSÁNYI, P. – LUKÁČ, N. – DUCSAY, L. – GOLIAN, J. 2005. Fertility and content of cadmium in pheasant (*Phasianus colchicus*) following cadmium intake in drinking water. In: *Ecotoxicol. Environ. Safety*, vol. 62, 2005, p. 112-117.

164. TÜRKDOĞAN, M.K. – KILICEL, F. – KARA, K. – TUNCER, I. – UYGAN, I. 2003. Heavy metals in soil, vegetables and fruits in the endemic upper gastrointestinal cancer region of Turkey. In: *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, vol. 13, 2003, p. 175-179.
165. UNDERWOOD, E.J. – SUTTLE, N.F. 1999. *The mineral nutrition of livestock*. 3rd Edition. CABI Publishing, New York, 1999.
166. VELÍŠEK, J. 2002. *Chemie potravín 2*. Osis, Tábor, 2002, 320 pp.
167. VELÍŠEK, J. 2002. *Chemie potravín 3*. Osis, Tábor, 2002, 368 pp.
168. VRZGULA, L. – ALIJEV, A.A. – BAREJ, W. 1990. *Poruchy látkového metabolizmu hospodárskych zvierat a ich prevencia*. Príroda, Bratislava, 1990, 503 pp.
169. VRZGULOVÁ, M. – BÍREŠ, J. – VRZGULA, L. 1993. The effects of copper from industrial emission on the seminiferous epithelium in rams. In: *Reprod. Dom. Anim.*, vol. 28, 1993, p. 108-118.
170. VRZGULOVÁ, M. – BÍREŠ, J. – VRZGULA, L. 1995. The microscopic structure of the testes in breeding rams after experimental copper oxide intoxication from industrial emissions. In: *Folia Vet.*, vol. 39, 1995, p. 101-106.
171. WILLIAMS, C.H. 1977. Trace metals and superphosphate: Toxicity problems. In: *Austr. Inst. Agric. Sci.*, vol. 43, 1977, p. 99-109.
172. WISE, T.H. – LUNSTRA, D.D. – FORD, J.J. 1999. Relationships of FSH concentrations and testicular weight sperm production and testicular ferritin and iron concentrations. 15th NIH Testis Workshop, Louisville. 1999, Proceeding, p. 72-75.
173. WISE, T.H. – LUNSTRA, D.D. – ROHRER, G.A. – FORD, J.J. 2003. Relationships of testicular iron and ferritin concentrations with testicular weight and sperm production in boars. In: *J. Anim. Sci.*, vol. 81, 2003, p. 503-511.
174. XU C. – JOHNSON, J.E. – SINGH, P.K. – JONES, M.M. – YAN, H. – CARTER, C.E. 1996. In vivo studies of cadmium-induced apoptosis in testicular tissue of rat and its modulation by a chelating agent. In: *Toxicology*, vol. 107, 1996, p. 1-8.
175. YAMAN, M. – KAYA, G. – YEKELER, H. 2007. Distribution of trace metal concentrations in paired cancerous and non-cancerous human stomach tissues. *World J. Gastroenterol.*, vol. 13, 2007, p. 612-618.

176. YUYAN, L. – JUNQING, W. – WEI, Y. – WEIJIN, Z. – ERSHENG, G. 2008. Are serum zinc and copper levels related to semen quality? In: *Fertil. Steril.*, vol. 89, 2008, p. 1008-1011.

177. ZHANG, W. – PANG, F. – HUANG, Y. – YAN, P. – LIN, W. 2008. Cadmium exerts toxic effects on ovarian steroid hormone release in rats. In: *Toxicol. Lett.*, vol. 182, 2008, p. 18-23.

178. ZHOU, T. – ZHOU, G. – SONG, W. – EGUCHI, N. – LU, W. – LUNDIN, E. – JIN, T. – NORDBERG, G. 1999. Cadmium-induced apoptosis and changes in expression of p53, c-jun and MT-I genes in testes and ventral prostate of rats. In: *Toxicol.*, vol. 142, 1999, p. 1-13.

URL – http://www.toxi.com/Archiv/archiv_prvky.htm

URL – http://www.agroporadenstvo.sk/zv/hd/ziviny_hd/ziviny5.htm

URL – http://fpv.ucm.sk/katedry/biotechnolog/...4.../11_Egyudova.pdf

9 ZOZNAM PUBLIKOVANÝCH PRÁC AUTORA SÚVISIACICH S RIEŠENOU PROBLEMATIKOU

Autor: Turčan Ján

Voľby: číslovanie kategórií publ.činnosti; Štatistika: kategória publikačnej činnosti;
Triedenie: kategória publikačnej činnosti; Zobrazovací formát: E - personálna bibliografia
(podľa ISBD - bez záhlavia)

ADC Vedecké práce v zahraničných karentovaných časopisoch

ADC01 Concentration of copper, iron, zinc, cadmium, lead and nickel in boar semen and relation to the spermatozoa quality / Peter Massányi, Jozef Trandžík, Pavol Naď, B. Koréneková, Magdaléna Skalická, Róbert Toman, Norbert Lukáč, Peter Strapák, Marko Halo, Ján Turčan. In: Journal of environmental science and health. Part A, Toxic hazardous substances and environmental engineering. - New York ; Philadelphia : Marcel Dekker Journals : Taylor & Francis, 1997-. - ISSN 1093-4529. - Roč. 38, č. 11 (2003), s. 2643-2651

AFD Publikované príspevky na domácich vedeckých konferenciách

AFD01 Štrukturálne zmeny vo vajcovode po podaní kadmia / M. Kolenkáš, Ján Turčan, Peter Massányi, Róbert Toman. In: Rizikové faktory potravinového reťazca : Zborník prác z medzinárodnej vedeckej konferencie : Nitra 26.9.2002. - Nitra : Slovenská poľnohospodárska univerzita, 2002. - ISBN 80-8069-076-6. - s. 64-66

AFD02 Zmeny hmotnosti niektorých orgánov a živej hmotnosti potkanov vplyvom kadmia prijímaného v potrave od odstavu do pohlavnej zrelosti / Róbert Toman, Peter Massányi, Peter Čupka, Norbert Lukáč, Ladislav Ducsay, M. Kolenkáš, Ján Turčan, Peter Haščík. In: Rizikové faktory potravinového reťazca : Zborník prác z medzinárodnej vedeckej konferencie : Nitra 26.9.2002. - Nitra : Slovenská poľnohospodárska univerzita, 2002. - ISBN 80-8069-076-6. - s. 154-157

AFD03 Štrukturálne zmeny maternice vyvolané kadmiiom / Ján Turčan, Peter Massányi, Róbert Toman, M. Kolenkáš. In: Rizikové faktory potravinového reťazca :

Zborník prác z medzinárodnej vedeckej konferencie : Nitra 26.9.2002. - Nitra : Slovenská poľnohospodárska univerzita, 2002. - ISBN 80-8069-076-6. - s. 168-172

AFD04 Vybrané stopové rizikové prvky v ejakulátoch kancov / Norbert Lukáč a kol. - Požiadavky na systém: Windows 95 a vyššie; CD-ROM mechanika. - Spôsob prístupu: www.slpk.sk/eldo/rizikove_factory03/lukac.pdf. In: Rizikové faktory potravného reťazca [elektronický zdroj] = Risk factors of food chain : zborník vedeckých prác z 3. medzinárodnej vedeckej konferencie, Nitra 3. december 2003 / zostavovatelia: Peter Massanyi, Róbert Toman, Norbert Lukáč. - V Nitre : Slovenská poľnohospodárska univerzita, 2003. - ISBN 80-8069-282-3. - S. 86-88

AFD05 Application PCR - based polymorphism of leptin gene as QTL for milk production traits in dairy cattle in Slovakia / Jakobová D., Trandžík J., Haško M., Massányi P., Kozlík P., Chrastina J., Jakab F., Turčan J., Kukurová L., Bulla J. - Požiadavky na systém: Windows 95 a vyššie; CD-ROM mechanika. - Spôsob prístupu: http://www.slpk.sk/eldo/2005/002_05/jakabova.pdf. In: VI. Celoslovenský seminár z fyziológie živočíchov [elektronický zdroj] : zborník z vedeckého seminára s medzinárodnou účasťou, 8.-9. júna 2005, Nitra, Slovenská republika. - Nitra : Slovenská poľnohospodárska univerzita, 2005. - ISBN 80-8069-526-1

AFD06 Detekcia DNA polymorfizmu u holsteinských býkov na Slovensku. = Detection of DNA polymorphism in Holstein bulls in Slovakia. / Jakobová D., Trandžík J., Ostrolucká A., Haško M., Massányi P., Zajačiková L., Kozlík P., Jakab F., Turčan J., Chrastina J., Bulla J. - Požiadavky na systém: Windows 95 a vyššie; CD-ROM mechanika. - Spôsob prístupu: www.slpk.sk/eldo/2005/007_05/023_Jakabova.pdf. In: Rizikové faktory potravného reťazca [elektronický zdroj] = Risk factors of food chain : zborník vedeckých prác zo 4. medzinárodnej vedeckej konferencie, Nitra, 7. október 2004. - Nitra : Slovenská poľnohospodárska univerzita, 2004. - ISBN 80-8069-416-8. - S. 87-89

AFD07 Kontaminácia inseminačných dávok býkov kadmíom, meďou, olovom a zinkom a jej vzťah ku kvalite spermií = Contamination of bovine insemination doses with cadmium, copper, lead and zinc and its relation to semen activity / Massányi P., Mareta M., Trandžík J., Jakobová D., Lukáč N., Toman R., Turčan J., Strapák P., Kováčik J., Kramárová M., Kolesárová A. - Požiadavky na systém: Windows 95 a vyššie; CD-ROM

mechanika. - Spôsob prístupu: www.slpk.sk/eldo/2005/007_05/044_Massanyi.pdf. In: Rizikové faktory potravinového reťazca [elektronický zdroj] = Risk factors of food chain : zborník vedeckých prác z 4. medzinárodnej vedeckej konferencie, Nitra 7. október 2004. - Nitra : Slovenská poľnohospodárska univerzita, 2004. - ISBN 80-8069-416-8. - S. 163-166

AFD08 Application of DNA test for sex identification of the emu (*Dromaius novaehollandiae*) in Slovakia / Jakobová D., Trandžík J., Ostrolúcka A., Židek R., Haško M., Massányi P., Kozlík P., Chrastina J., Jakab F., Turčan J. - Požiadavky na systém: Windows 95 a vyššie; CD-ROM mechanika. - Spôsob prístupu: www.slpk.sk/eldo/2006/006_06/Jakabova.pdf. In: Rizikové faktory potravinového reťazca V. [elektronický zdroj] = Risk factors of food chain V. - Nitra : Slovenská poľnohospodárska univerzita, 2005. - ISBN 80-8069-549-6. - S. 108-109

AFH Abstrakty príspevkov z domácich konferencií

AFH01 Selected risk trace elements in boar semen / Lukáč, N., Massányi, P., Trandžík, J., Turčan, J., Toman, R., Naď, P., Skalická, M., Koréneková, B. In: Rizikové faktory potravinového reťazca = Risk factors of food chain : zborník abstraktov z 3. medzinárodnej vedeckej konferencie, Nitra 3. december 2003 = proceedings book (abstracts) of 3-rd international scientific conference, Nitra December 3-rd, 2003 / [zostavovatelia: Peter Massányi, Róbert Toman, Norbert Lukáč]. - V Nitre : Slovenská poľnohospodárska univerzita, 2003. - ISBN 80-8069-281-5. - S. 26-27

BDF Odborné práce v domácich nekarentovaných časopisoch

BDF01 Kadmium a štruktúrne zmeny vajcovodu / Peter Massányi ; Róbert Toman, M. Kolenkáš, Ján Turčan, Norbert Lukáč.

In: Infövet. - Prešov : M&M, 1994-. - ISSN 1335-1907. - Roč. 10, č. 1, (2003), s. 34-35

BDF02 Kadmium a štruktúrne zmeny maternice / Peter Massányi ; Róbert Toman, Jozef Turčan, M. Kolenkáš, Norbert Lukáč.

In: Infövet. - Prešov : M&M, 1994-. - ISSN 1335-1907. - Roč. 10, č. 2 (2003), s. 40-41

Štatistika: kategória publikačnej činnosti

ADC	Vedecké práce v zahraničných karentovaných časopisoch	1
AFD	Publikované príspevky na domácich vedeckých konferenciách	8
AFH	Abstrakty príspevkov z domácich konferencií	1
BDF	Odborné práce v domácich nekarentovaných časopisoch	2
Súčet		12