

PROMJENE KOLIČINE NEKIH LIPIDA U SPERMIJIMA I SJEMENOJ PLAZMI BIKOVA OVISNE O NJIHOVOJ DOBI I PLODNOSTI

Melita Herak, M. Herak, B. Premzl, Bojana Gradinski-Vrbanac, R. Mihajlović

Uvod

Do sada su izvršena brojna istraživanja količine različitih lipida koje sadrži sperma bikova i ostalih domaćih životinja. Ta su istraživanja ukazala na važnost prisustva lipida u spermijama za njihovo preživljavanje *in vitro*, a posebice je utvrđen odnos u frakcijama lipida sperme s mogućnošću konzerviranja sperme dubokim zamrzavanjem. Isto tako izvršen je veći broj istraživanja o odnosu sposobnosti spermija za oplodnju i dobi bikova od kojih je sperma potjecala. Navedeni radovi potvrđuju da se s dobi bikova smanjuje postotak progresivno pokretljivih spermija a raste volumen ejakulata, kao i koncentracija spermija u 1 mililitru. Više je autora ustanovilo da se postotak progresivno pokretljivih spermija u ejakulatima poslije 6 godina starosti počinje smanjivati, a kod većine bikova starijih od 7 godina smanjuje se uspjeh "non returna" s izuzetkom vrlo kvalitetnih bikova (klasa A₁ i elita) koji osim fenotipskih imaju i ostala bolja svojstva od drugih rasplodnjaka. Navedeni pokazivači ponukali su nas da istražimo da li se s dobi bikova mijenja i lipidni sastav spermija i sjemene plazme, te kakav je odnos tih pokazivača prema veličini "non returna" bikova.

Pregled literature

Istražujući promjene koncentracije nekih lipida u ejakulatima bikova u pojedinim mjesecima godine i njihov utjecaj na kvalitetu sperme, Herak i suradnici (1989.) utvrdili su značajne promjene koncentracije nekih lipida u ejakulatima bikova u srpnju i kolovožu, kada je kvaliteta sperme tako loša da se teško može konzervirati, pa se u tim mjesecima sperma ni ne uzima za konzerviranje. To nas je navelo na zaključak da postoji direktan odnos između sposobnosti spermija za oplodnju i razine nekih lipida u spermijama i sjemenoj plazmi. Slična su istraživanja izvršili Jain i Anand (1976.a.i b.) i dobili rezultate koji se u cjelosti podudaraju s našim prije opisanim rezultatima. Martig i Almqvist (1969.) istraživali su visinu "non returna" u bikovima različite dobi, te su ustanovili u bikova starih 53 do 72 sedmice "non return" od 68%, onih u dobi od 73 do 88 sedmica povećao se na 74%, da bi u starosti od 89 do 104 tjedna iznosio 73%. Logično je za zaključiti da je taj porast "non returna" bio uslovljen poboljšanjem kvalitete spermatozoida. Mann i Cecilia Lutwak-Mann (1981.) upozoravaju da razlike u količini lipida u spermi bikova mogu ovisiti o pasmini bika, sezoni parenja, prisutnosti abnormalnih spermija u ejakulatu, kao i u načinu ishrane rasplodnjaka. Za razliku

Dr Melita Herak, red.prof.; dr Miroslav Herak, red.prof.; dr Bojana Gradinski-Vrbanac, Veterinarski fakultet u Zagrebu; dr Božidar Premzl, Radoslav Mihajlović, dipl.vet., Centar za reprodukciju u stočarstvu Hrvatske, Zagreb - Zavod Križevci.

od njih Pursel i Graham (1967.) nisu našli signifikantnih razlika u razini lipida u ejakulatima bikova različitih pasmina.

Vlastiti rad

Uzorke ejakulata uzimali smo tijekom tri godine od bikova simentalke pasmine, jednako držanih i hranjenih s podjednakim režimom iskorištavanja u Centru za umjetno osjemenjivanje.

Ejakulati su potjecali od bikova različite dobi, pa smo ih zbog toga svrstali u tri dobne skupine. U prvoj skupini bilo je 15 mladih bikova od 1 do 2 godine starosti, od kojih je uzeto 20 ejakulata. U drugoj skupini bila su 22 bika stara od 2 do 6 godina starosti, od kojih je uzeto 59 ejakulata. U trećoj skupini bili su stariji bikovi, njih 27, od 6 do 9 godina starosti, od kojih je uzeto 50 ejakulata.

Prema "non return" testu ejakulati svih bikova nisu se pokazali jednako kvalitetnima, pa smo ih prema uspjehu osjemenjivanja podijelili u dvije skupine. U prvoj skupini bilo je pretraženo 40 uzoraka ejakulata od 25 bikova s "non returnom" 45% - 65%. "Non return" preko 65% pa do 85% imalo je 27 bikova od kojih je pretraženo 70 uzoraka ejakulata.

Sperma je polučivana pomoću umjetne vagine, a nakon rutinske ocjene ejakulata (boja, miris, koncentracija, broj progresivno pokretljivih, pH) on je centrifugiran i odvojena je sjemena plazma. Na sedimentirane spermije dodana je destilirana voda u količini sjemene plazme. Zbog hipotonije došlo je do razaranja spermija pa je drugog dana ponovnim centrifugiranjem odvojen ekstrakt spermija. U svakom uzorku sjemene plazme i ekstrakta spermija određena je količina ukupnih lipida po fotometrijskoj metodi Zöllner-a i Kirsch-a (1962.). Isto tako određena je i količina fosfolipida po metodi Bogatzkog (1938.) koju su 1950. modificirali Zilwersmit i Davis. Beta-lipoproteidi određivani su Böhringrovim test reagensijama po metodi Bursteina, a ukupni kolesterol po fotometrijskoj metodi Zak-a i sur. (1954.), te Watson-a (1960.).

Zbog različite gustoće ejakulata svi rezultati o količinama lipida koji se odnose na spermije preračunani su na miligrame u 100 miliona spermija (10^9), dok su koncentracije lipida u sjemenjnoj plazmi izražene u miligramima na mililitar plazme.

Dobiveni rezultati obrađeni su uobičajenim statističkim metodama (Petz, 1970.) a određena je i signifikantnost razlika između pojedinih grupa t-testom.

Rezultati istraživanja prikazani su na grafikonima.

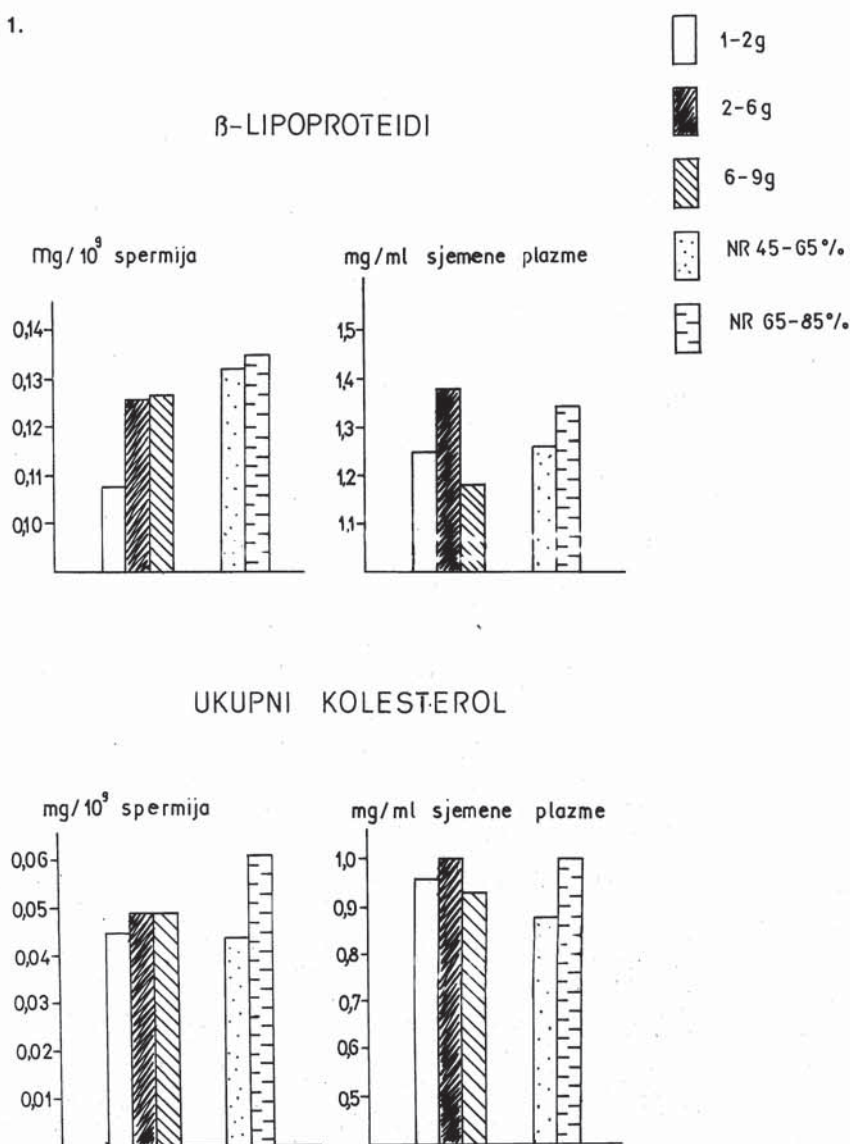
Rezultati i diskusija

Odnos promjena količine lipida i starosti bikova izražen je kemijskim određivanjem ukupnih lipida, beta-lipoproteida, fosfolipida i ukupnog kolesterola u spermijima i sjemenjnoj plazmi 129 ejakulata koji su potjecali od 64 bika podijeljenih u tri dobne skupine (1-2 g., 2-6 g., 6-9 g.). Uspoređujući dobivene rezultate po dobnim skupinama utvrdili smo da količina ukupnih lipida raste s dobi bikova u

spermijima (od 0,272 mg do 0,340 mg u 10^9 spermija) i u sjemenjnoj plazmi (od 3,58 do 4,6 mg na ml).

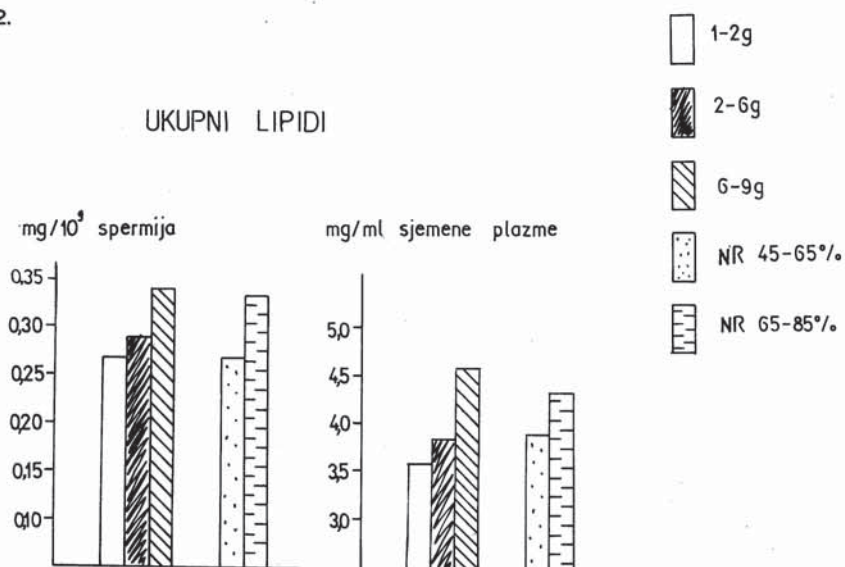
Ta je razlika u količini ukupnih lipida između najmlađih i bikova srednje dobi neznatna u spermijima i u sjemenjnoj plazmi, što je i logično jer su razlike u količini ukupnih lipida za te dvije skupine u spermijima iznosile svega 6,2%, a u sjemenjnoj plazmi 7,5%. Nasuprot tome porast količine ukupnih lipida u skupini najstarijih

Graf. 1.

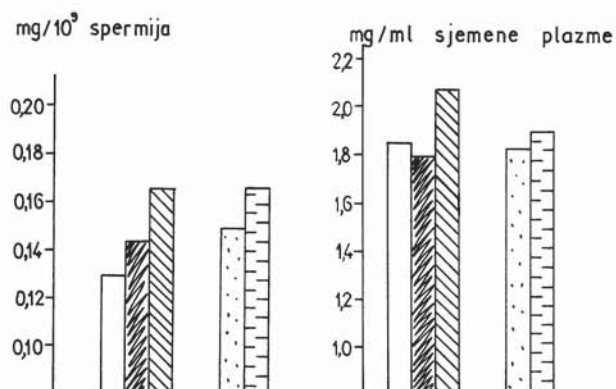


bikova bio je u spermijima viši za 25%, a u sjemenjnoj plazmi viši za 28,2% u odnosu na najmlađe bikove, te 17,6% odnosno 18,9% prema vrijednostima u spermijima i sjemenjnoj plazmi bikova srednje dobi. Te su se razlike pokazale značajnim ($P < 0,05$, $P < 0,025$, te $P < 0,05$) osim za količinu ukupnih lipida u sjemenjnoj plazmi između bikova srednje i najstarije grupe.

Graf. 2.



FOSFOLIPIDI



Razlika između količine fosfolipida prve i druge dobne skupine bila je nesig-nifikantna u spermijima i sjemenjnoj plazmi jer je u spermijima količina povećana za 9%, a u sjemenjnoj plazmi za svega 3%. Količina fosfolipida u spermijima naj-starijih bikova u odnosu na najmlađe bila je povećana za 25,7% ($P < 0,05$), dok je u sjemenjnoj plazmi ta razlika nesig-nifikantna i iznosila je 12,3%.

Što se tiče količine beta-lipoproteida i ukupnog kolesterina zabilježili smo nji-hov porast u spermijima i sjemenjnoj plazmi usporedo sa starošću bikova, no te promjene bile su nesig-nifikantne. Zanimljivo je da je količina beta-lipoproteida porasla u spermijima bikova srednje dobi za 16,6%, a kod najstarijih bikova porast je bio beznačajan (0,7%). U sjemenjnoj plazmi taj je porast u drugoj grupi iznosio 10,4% a u trećoj 15,2%. Porast ukupnog kolesterina iznosio je 8,8% u spermijima i 5,2% u sjemenjnoj plazmi bikova srednje dobi, dok je u starijih bikova količina ukupnog kolesterina ostala nepromijenjena u spermijima, a u plazmi je porasla za svega 3,2%.

Posebice smo prikazali odnos plodnosti bikova na osnovi "non returna" i količine lipida u spermijima i sjemenjnoj plazmi bez obzira na dob bikova. Količina ukupnih lipida (0,271, 0,335 mg u 10^9) u spermijima bikova s nižim i višim "non returnom" razlikovala se za 26% i ta se razlika pokazala značajnom ($P < 0,025$). U sjemenjnoj plazmi razlika količine ukupnih lipida iznosila je 10,7% (3,91 i 4,33 mg na ml) i nije bila sig-nifikantna.

Količina fosfolipida u spermijima bila je za 12% povišena (0,149, 0,167 mg u 10^9), a u sjemenjnoj plazmi za 8,7% (1,83, 1,99 mg na ml). Obje razlike pokazale su se značajne.

Promjene količine beta-lipoproteida bile su beznačajne u spermijima i sjemenjnoj plazmi.

Količina ukupnog kolesterina bila je veća u spermijima plodnijih bikova (0,044, 0,061 mg u 10^9) za 38% i ta je razlika bila jako sig-nifikantna ($P < 0,001$). Porast količine ukupnog kolesterina u sjemenjnoj plazmi plodnijih bikova iznosio je 18,2% (0,88, 1,04 mg na ml) i bio je isto tako značajan ($P < 0,05$).

Ova istraživanja kao i navodi drugih istraživača potvrdili su da prisutnost lipida u spermijima i sjemenjnoj plazmi ima znatan utjecaj na kvalitetu spermija i sposobnost za oplodnju.

Taj podatak sukladan je s istraživanjima Pickett-a i Komrek-a (1964.), te Herak-a i sur. (1978.), koji su utvrdili smanjenje količine fosfolipida u sper-mijima i povećanje u sjemenjnoj plazmi poslije smrzavanja ejakulata dok se istovremeno količina ukupnih lipida i beta-lipoproteida povećala. Herak i sur. (1989.) našli su promjene količine lipide u spermijima i sjemenjnoj plazmi tijekom godine, ovisno o promjenama kvalitete spermija, odnosno ejakulata, pa se razlike u sastavu lipida u spermijima i sjemenjnoj plazmi bikova s različitim "non returnom" čine lo-gičnim, osobito zbog sig-nifikantnog povećanja ukupnih lipida i kolesterina u eja-kulatima plodnijih bikova.

Zaključci

U ejakulatima starijih bikova (6-9 g.) značajno je povećana količina ukupnih lipida i fosfolipida u spermijima i sjemenoj plazmi u odnosu na mlade bikove (1-2 i 2-6 god.). Istovremeno povećana količina beta-lipoproteida i ukupnog kolesterola pokazala se značajnom.

U plodnijih bikova, bez obzira na dob, s "non returnom" od 65 do 85% sig-nifikantno je povećana količina ukupnih lipida i kolesterina u spermijima, te kolesterina u sjemenoj plazmi.

LITERATURA

1. Bogatzki G. (1938): Archiv für das Eisenhüttenwesen 12, 195.
2. Herak M., Herak Melita, Tanev G., Naumov N., Gradinski-Vrbanac Bojana (1978): Utjecaj dubokog smrzavanja sperme na promjene količine ukupnog lipida, fosfolipida i beta-lipoproteida u spermijima bika. Vet.arhiv. 48, (Suppl.) S 15-17.
3. Herak Melita, Herak M., Gradinski-Vrbanac Bojana, Premzl B., Dejanović Dubravka (1989): Promjene koncentracije nekih lipida u ejakulatima bikova i njihov utjecaj na kvalitetu sperme. Stočarstvo 43: 1989 (9-10) 371-376.
4. Jain Y., Anad S. (1976.a): The lipid of Buffalo spermatozoa and seminal plasma. J.Reprod. Fertil. 47, 255.
5. Jain Y., Anad S. (1976.b): Fatty acids and fatty aldehydes of buffalo seminalplasma and sperm lipids. J.Reprod.Fertil. 47, 261.
6. Mann T., Lutwak-Mann Cecilia (1981): Male reproductive function and semen. Spring-Verlag Berlin, Heidelberg, New York.
7. Martig R.C., Almquist J.O. (1969): Reproductive Capacity of Beef Bulls. III. postpubertal Changes in fertility and sperm morphology at different Ejaculation Frequencies. J.Anim.Sci. 28, 3, 375-378.
8. Petz B. (1964): Osnovne statističke metode. Škola narodnog zdravlja "Andrija Štampar" Medicinskog fakulteta u Zagrebu, Zagreb.
9. Zilversmit D.B., Davis A.K. (1950): J.lab.Clin.Med. 35, 155.
10. Zöllner N., Kirsch Katarina (1962): Über die quantitative bestimmung von Lipoiden (Mikromethode) mittels der vielen natürlichen Lipoiden (allen bekannten Plasmalipoiden) gemeinsamen Sulfophosphorovanilin-Reaktion. Z.ges.exp.med. 135, 545.
11. Watson D. (1960): A simple method for the determination of cholesterol. Clin.Chim.Acta 5, 673.

PROMJENE KOLIČINE NEKIH LIPIDA U SPERMIJIMA I SJEMENOJ PLAZMI BIKOVA OVISNE O NJIHOVOJ DOBI I PLODNOSTI

Sažetak

U 129 ejakulata od 64 bika iz Centra za umjetno osjemenjivanje uobičajenim laboratorijskim metodama određena je količina ukupnih lipida, beta-lipoproteida, fosfolipida i ukupnog kolesterola u spermijima i sjemenoj plazmi. Pretraženo je 20 ejakulata 15 bikova u dobi od 1-2 god., 22 bika bila su u dobi od 2-6 god., a pretraženo je 59 ejakulata. Pretraženo je 50 ejakulata od najstarijih bikova od 6-9 god. Pretrage su pokazale da količina svih lipida raste

s dobi bika, te da je količina ukupnih lipida u spermijima i sjemenoj plazmi najmladih u odnosu na najstarije bikove signifikantna ($P < 0,05$, $P < 0,025$).

Porast količine fosfolipida u spermijima i sjemenoj plazmi bio je značajan samo u spermijima najstarijih bikova u odnosu na najmlađe ($P < 0,05$). Beta-lipoproteidi i ukupni kolesterol neznačajno je porastao u ejakulatima bikova usporedo s dobi.

S obzirom na plodnost pretraženo je 40 ejakulata od 25 bikova s "non returnom" od 45 do 65%, i 70 ejakulata od 27 bikova s "non returnom" od 65 do 85%. U plodnijih bikova bez obzira na dob signifikantno je povećana količina ukupnih lipida i kolesterina u spermijima ($P < 0,025$, $P < 0,001$), te kolesterina u sjemenoj plazmi ($P < 0,05$).

CHANGES OF SOME LIPIDS QUANTITIES IN THE SPERMS AND SEMEN PLASMA OF BULLS IN RELATION WITH THEIR AGE AND FERTILITY

Summary

In 129 of ejaculates of 64 bulls from the Center for artificial insemination by using customary chemical methods quantity of total lipids, beta-lipoproteins, phospholipids and total cholesterol was determined in the sperms and semen plasma separately. From 15 bulls in the age from 1 to 2 years 20 ejaculates were used for investigation, from 22 bulls in the age from 2 to 6 years lipids were determined in 59 ejaculates, and from the oldest bulls (age from 6 to 9 years) in the 50 ejaculates. Quantity of total lipids in ejaculates increasing with the age of bulls. Quantity of total lipids in the sperms and semen plasma of youngest and oldest bulls was significantly different ($p < 0,05$, $p < 0,025$). Rise of phospholipids quantity in the sperms and semen plasma was significantly higher only in the sperms of oldest bulls in relation with the youngest ($p < 0,05$). Beta-lipoproteins and total cholesterol increasing nonsignificantly in the ejaculates abreast with age of bulls.

In connection fertility above mentioned lipids were determined in 40 ejaculates which were taken from 25 bulls with "non return" of 45-65%, and in 70 ejaculates from 27 bulls with "non return" of 65-85%. In the bulls with higher "non return" without connection with age quantity of total lipids and cholesterol were significantly higher in the sperms ($p < 0,025$, $p < 0,001$) and only cholesterol in the semen plasma ($p < 0,05$).