

UČINAK RADIOFREKVENCIJSKOG ELEKTROMAGNETSKOG ZRAČENJA FREKVENCije 2500 MHZ NA GIBLJIVOST I MORFOLOGIJU IN VITRO OZRAČENOG SJEMENA NERASTA

Senaši, Kim

Master's thesis / Diplomski rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Veterinary Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Veterinarski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:178:138673>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-12**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Veterinary Medicine -
Repository of PHD, master's thesis](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
VETERINARSKI FAKULTET

Kim Senaši

UČINAK RADIOFREKVENCIJSKOG ELEKTROMAGNETSKOG
ZRAČENJA FREKVENCije 2500 MHz NA GIBLJIVOST I
MORFOLOGIJU *IN VITRO* OZRAČENOG SJEMENA NERASTA

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, 2022.

Rad je izrađen na Zavodu za fiziologiju i radiobiologiju te na Klinici za porodništvo i reprodukciju Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom doc. dr. sc. Ivone Žura Žaje i prof. dr. sc. Marinka Vilića.

Zavod za fiziologiju i radiobiologiju

Predstojnik: prof. dr. sc. Marinko Vilić

Klinika za porodništvo i reprodukciju

Predstojnik: prof. dr. sc. Marko Samardžija

Mentori rada:

doc. dr. sc. Ivona Žura Žaja

prof. dr. sc. Marinko Vilić

Članovi povjerenstva za obranu diplomskog rada:

1. izv. prof. dr. sc. Silvijo Vince
2. prof. dr. sc. Marinko Vilić
3. prof. dr. sc. Suzana Milinković Tur
4. doc. dr. sc. Ivan Folnožić (zamjena)

ZAHVALA

Iskreno i najljepše se zahvaljujem svojim mentorima doc. dr. sc. Ivoni Žura Žaja te prof. dr. sc. Marinku Vilić kao i izv. prof. dr. sc. Silviju Vince na savjetima, pomoći te uloženom trudu i vremenu tijekom pisanja ovog diplomskog rada. Također zahvaljujem dr. sc. Ivanu Butkoviću, dr. med. vet. radi ustupanja dijela uzoraka razmaza nerasta te dijela arhiviranih podataka uzetih za potrebe izrade njegovog doktorskog rada pod naslovom „Učinak radiofrekvencijskog elektromagnetskog zračenja na pokazatelje kakvoće, antioksidacijski status i oštećenje DNK-a *in vitro* ozračenog sjemena rasplodnih nerasta“ pod mentorstvom doc. dr. sc. Ivan Folnožić i doc. dr. sc. Ivona Žura Žaja. Posebne zahvale dugujem svojim roditeljima, bratu te kolegama, prijateljima i dečku na pruženoj podršci tijekom studija.

POPIS PRILOGA

SLIKE

| | |
|---|----|
| Slika 1. Spolni sustav nerasta..... | 2 |
| Slika 2. Građa spermija..... | 5 |
| Slika 3. Shematski prikaz elektromagnetskog vala..... | 6 |
| Slika 4. Spektar frekvencija radiofrekvencijskog elektromagnetskog zračenja i pripadajuća energija ionizirajućeg elektromagnetskog zračenja..... | 7 |
| Slika 5. Utjecaj radiofrekvencijskog zračenja na muški spolni sustav..... | 9 |
| Slika 6. Sustav za analizu slike..... | 15 |
| Slika 7. GTEM komora..... | 19 |
| Slika 8. Grijača ploča i fiksator sa pripadajućim razmazima..... | 20 |
| Slika 9. Spermij nerasta obojen SPERMAC metodom..... | 21 |
| Slika 10. Dvije subpopulacije spermija nerasta..... | 31 |
| Slika 11. Udio subpopulacija spermija između kontrolne i pokusne skupine..... | 33 |

TABLICE

| | |
|---|----|
| Tablica 1. Sastav krmne smjese za neraste..... | 17 |
| Tablica 2. Deskriptivni pokazatelji morfometrijskih osobitosti glave spermija nerasta..... | 23 |
| Tablica 3. Deskriptivni pokazatelji morfometrijski osobitosti spojnog dijela repa i repa spermija..... | 24 |
| Tablica 4. Deskriptivni pokazatelji različitih morfometrijskih odnosa glave i repa spermija neraste..... | 25 |
| Tablica 5. Deskriptivni pokazatelji morfometrijskih osobitosti glave spermija nerasta između kontrolne i pokusne skupine..... | 26 |
| Tablica 6. Deskriptivni pokazatelji morfometrijskih osobitosti spojnog dijela repa i repa spermija nerasta između kontrolne i pokusne skupine..... | 27 |
| Tablica 7. Deskriptivni pokazatelji različitih morfometrijskih osobitosti glave i repa spermija nerasta između pokusne i kontrolne skupine..... | 28 |
| Tablica 8. Multipla analiza varijance – testni kriterij i egzaktna F statistika za hipotezu da nema ukupnog učinka skupine..... | 29 |

| | |
|---|----|
| Tablica 9. Karakteristične vrijednosti (eigenvalues) morfometrijskih pokazatelja glave i repa spermija u analizi glavnih komponenata..... | 30 |
| Tablica 10. Subpopulacije spermija nerasta dobivene pomoću analize grupiranja morfometrijskih pokazatelja glave i spojnog dijela spermija..... | 32 |

POPIS KRATICA

RF-EMZ: radiofrekvencijsko elektromagnetsko zračenje (engl. *radiofrequency electromagnetic radiation*)

GTEM komora: gigahercna transverzalna elektromagnetska komora (engl. *gigahertz transverse electromagnetic chamber*)

ASMA: računalno potpomognuta morfometrijska analiza sperme (engl. *computer-assisted sperm morphometry analysis*)

CASA: računalno potpomognuta analiza spermija (engl. *computer-assisted sperm analysis*)

SADRŽAJ

| | |
|--|-----------|
| 1. UVOD..... | 1 |
| 2. PREGLED REZULTATA DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA..... | 2 |
| 2.1. Anatomija i funkcija muškog spolnog sustava nerasta | 2 |
| 2.2. Morfološke osobitosti spermija i ejakulata | 4 |
| 2.2. Elektromagnetsko zračenje | 6 |
| 2.3. Utjecaj elektromagnetskog radiofrekvencijskog zračenja na muški reproduktivni sustav | 9 |
| 2.4. Utjecaj radiofrekvencijskog elektromagnetskog zračenja na reproduktivni endokrini sustav | 10 |
| 2.5. Istraživanja utjecaja elektromagnetskog zračenja na sjeme ljudi i životinja | 10 |
| 2.6. Morfometrija | 12 |
| 3. MATERIJALI I METODE ISTRAŽIVANJA..... | 16 |
| 3.1. Životinje, smještaj i hranidba..... | 16 |
| 3.2. Dizajn pokusa i postupci sa životinjama..... | 17 |
| 3.3. Polučivanje i postupak sa ejakulatom | 18 |
| 3.3.1. Polučivanje ejakulata | 18 |
| 3.3.2. Postupak sa ejakulatom i ocjena ejakulata | 18 |
| 3.4. Izlaganje uzoraka radiofrekvencijskom elektromagnetskom zračenju u laboratorijskim uvjetima | 19 |
| 3.5. Postupak bojenja razmaza ejakulata | 20 |
| 3.6. Morfometrijska analiza spermija | 21 |
| 3.7. Statistička obrada podataka..... | 22 |
| 4. REZULTATI..... | 23 |
| 4.1. Pojedinačni morfometrijski pokazatelji glave i repa spermija | 23 |
| 4.2. Subpopulacije spermija na osnovu morfometrijskih pokazatelja glave i repa spermija | 29 |
| 5. RASPRAVA..... | 34 |
| 6. ZAKLJUČCI..... | 37 |
| 7. LITERATURA | 38 |
| 8. SAŽETAK | 48 |
| 9. SUMMARY | 49 |
| 10. ŽIVOTOPIS | 50 |

1. UVOD

U današnje vrijeme ljudi i životinje su izloženi različitim izvorima elektromagnetskog zračenja. Kao jedan od najčešće spominjanih i najkontroverznijih učinaka suvremene tehnologije svakako je utjecaj elektromagnetskog zračenja radiofrekvencijskog spektra. Elektromagnetsko zračenje kao pojam predstavlja elektromagnetske valove svih frekvencija koja se šire brzinom svjetlosti (WDOWIAK i sur., 2017.), a dijele se na gama zračenja, rendgensko zračenje, ultraljubičasto zračenje, vidljivi dio spektra, infracrveno zračenje, mikrovalno zračenje i radiofrekvencijsko zračenje. Radiofrekvencijsko zračenje se dijeli prema frekvencijama i ima različitu upotrebu, a najznačajnija je bežično odašiljanje i primanje informacija na veću ili manju udaljenost. Iako je upotreba takve tehnologije značajno poboljšala kvalitetu života, ne može se isključiti da je istovremeno i uzrok mnogih tegoba i bolesti.

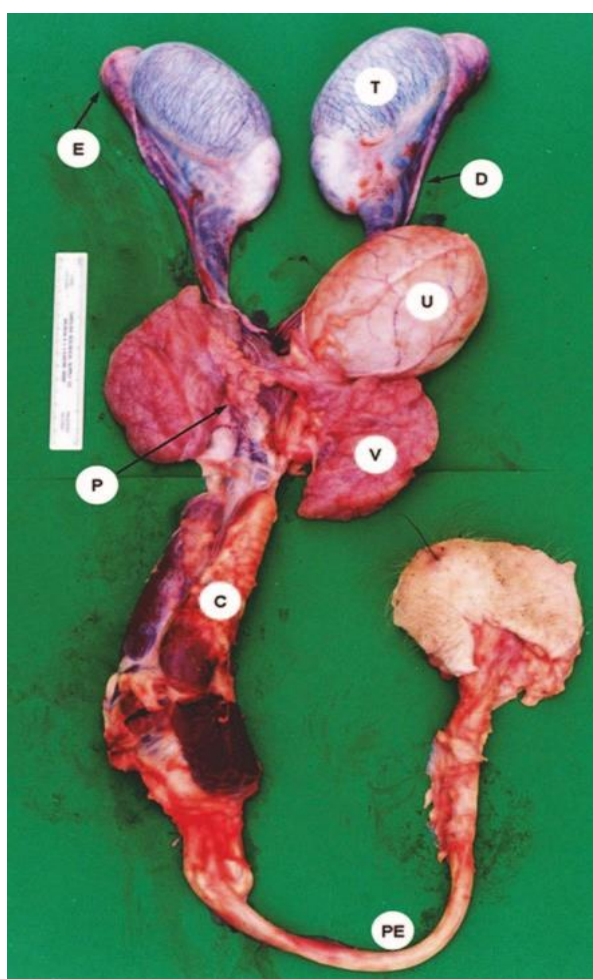
Štetni učinak radiofrekvencijskog elektromagnetskog zračenja (RF-EMZ) može se očitovati na većinu organskih sustava, međutim jedan od najosjetljivijih organskih sustava jest muški spolni sustav (LIU i sur., 2015.). Dosadašnja su znanstvena istraživanja većinom proučavala učinke RF-EMZ na reproduktivni sustav ljudi (FALZONE i sur., 2011.; GUTSCHI i sur., 2011.) i laboratorijskih životinja tj. miševa i štakora (WANG i sur., 2003.; DASDAG i sur., 2015.). Tako je poznato, primjerice, da radiofrekvencijsko elektromagnetsko zračenje smanjuje kvalitetu sjemena u ljudi (LI i sur., 2010.) te da ima štetan utjecaj na plodnost mužjaka štakora kao i na sposobnost izlijeganja jaja u ptica (FERNIE i sur., 2000.; AL-AKHRAS i sur., 2001.). Međutim, treba naglasiti, da do danas u znanstvenoj i stručnoj literaturi gotovo da i nema rezultata učinka RF-EMZ na reproduktivni sustav različitih vrsta domaćih životinja.

Intenzivni genetski napredak i dinamički razvoj umjetnog osjemenjivanja rezultirao je značajnim smanjenjem broja rasplodnih mužjaka i to ponajviše u industriji svinja. S obzirom da je RF-EMZ antropogenog podrijetla te je prisutno svuda oko nas, za učinkovitost stočarske proizvodnje i uzgoj svinja od iznimne važnosti je odrediti učinak takvog zračenja na reproduktivni sustav mužjaka. Osim toga uspješnost u oplodnji, odnosno prodiranja spermija u jajnu stanicu imat će spermiji normalne morfologije/morfometrije. Stoga cilj ovog diplomskog rada bio je istražiti učinak RF-EMZ frekvencije od 2500 MHz-a na gibljivost spermija te morfometrijske pokazatelje sjemena rasplodnih nerasta ozračenih *in vitro*.

2. PREGLED REZULTATA DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA

2.1. Anatomija i funkcija muškog spolnog sustava nerasta

Muški spolni sustav nerasta sastoji se od parnih reproduktivnih žlijezda, testisa (*testes*), parnih pasjemenika (*epididimis*), parnih sjemenovoda (*ductus deferens*), mokraćne cijevi (*uretra*) te njezinih pripadajućih pomoćnih spolnih žlijezda u koje ubrajamo dva sjemena mjehurića (*glandulae vesiculosae*), prostatu (*glandula prostatica*) i dvije bulbouretralne žlijezde (*glandulae bulbourethrales*) ili Cowperove žlijezde te kopolatornog organa (*penis*) (Slika 1.) (HAFEZ, 2000.; BADIA, 2003.; BONET i sur., 2013.).



Slika 1. Spolni sustav nerasta. Slovicima na slici označeni su dijelovi muškog spolnog sustava nerasta. T – testis, E – epididimis, D – sjemenovod, U – mokraćni mjehur, V – sjemeni mjehurić, P – prostata, C – bulbouretralne žlijezde (Cowperove žlijezde), PE – penis (BONET i sur., 2013.).

Anatomsko-fiziološke karakteristike jajovoda, estursni ciklus te sezonalnost reprodukcije zaslužne su za anatomske i funkcionalne razlike između spolnog sustava raznih vrsta sisavaca (BONET i sur., 2013.). Jedna od karakterističnih anatomskih značajki je sigmoidni zavoj (*flexura sigmoideae*) penisa koji se prilikom erekcije ispravlja uz pomoć relaksacije parnog mišića *m. retractor penis*. Također, glans penis je karakterističnog izgleda u nerasta, oblika svrdla. Nerasti u odnosu na druge domaće životinje, predvode u volumenu sjemena kojemu doprinose dobro razvijene bublouretralne i mjehurićaste žlijezde. Također, nerasti predvode i u veličini testisa u odnosu na tjelesnu masu. Testisi su smješteni u mošnjama, koje se u nerasta nalaze kaudalno od anusa (ŽURA ŽAJA, 2015.). Nerasti imaju najveći volumen ejakulata u odnosu na ostale vrste životinja, a kreće se od 150 do 500 mL, točnije u prosjeku iznosi oko 250 mL (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.). Međutim, kvaliteta i količina ejakulata ovise o čimbenicima poput primjerice pasmine ili dobi (SMITAL, 2009.).

Testisi su muške spolne žlijezde čija je glavna uloga u reproduktivnom sustavu proizvodnja spermija i lučenje hormona. Sazrijevanje spermija kojim se stječe potrebna progresivna gibljivost te sposobnost oplodnje, transport te skladištenje spermija odvijaju se u epididimisu, točnije najkaudalnijem dijelu gdje se zreli spermiji pohranjuju do ejakulacije. Pomoćne spolne žlijezde, odnosno egzokrine žlijezde, izlučuju sekret u uretru pod utjecajem androgena. Nestaničnu frakciju ejakulata, odnosno sjemenu plazmu, čine većinom sekreti pomoćnih spolnih žlijezda. Glavne funkcije muškog reproduktivnog sustava su proizvodnja koja se odvija pod utjecajem hormona, sazrijevanje spermija te ejakulacija (BONET i sur., 2013.).

Osim funkcije proizvodnje, sazrijevanja te skladištenja za koju su zaduženi epididimis i testisi, od velikog značaja za reproduktivni sustav je i endokrina funkcija, odnosno sinteza i izlučivanje androgena, odnosno testosterona za što su zadužene Leydigove stanice smještene u intersticiju testisa te sinteza i izlučivanje inhibina i aktivina koji su produkt Sertolijevih stanica, odnosno stanica sjemenih kanalića (HAFEZ i sur., 2000.; GARCIA-GIL, 2002.; BONET i sur., 2013.).

Nakon proizvodnje spermija u sjemenim kanalicima testisa, koji se spajaju u sabirnu cijev (lat. *rete testis*) koja transportira spermije sve do epididimisa koji predstavlja bitnu ulogu u skladištenju i sazrijevanju sjemena (KNOX, 2001.). Spermiji sposobnost gibanja postižu prolaskom kroz rep epididimisa te se sve do procesa ejakulacije ne gibaju u velikoj mjeri (ŽURA ŽAJA, 2015.).

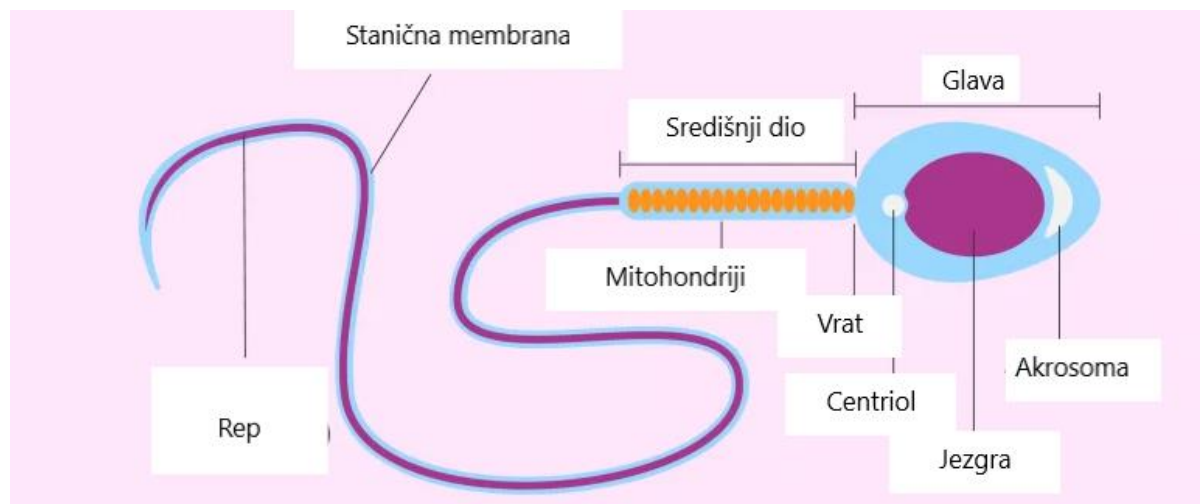
U trenutku pojave sinkronizirane kontrakcije epididimisa, sjemenovoda, pomoćnih spolnih žlijezda i uretre nastupa ejakulacija, te se sperma iz kaudalne regije epididimisa, pomiješana s izlučevinama iz sjemenih mjehurića, prostate i bulbouretralnih žlijezda izbacuje iz urogenitalnih organa (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ i sur., 2009.). Ejakulacije u nerasta traje od 5 do 20 minuta, u prosjeku 8 minuta, te je njeno trajanje znatno duže u odnosu na ostale vrste životinja (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.).

Ejakulat se može podijeliti na prespermatičnu frakciju koja se sastoji od sekreta pomoćnih spolnih žlijezda, staničnih ostataka, urina i smegme iz prepucija te je obično prozirna, spermatičnu frakciju mliječno bijele boje koja je bogata spermijima te postspermatičnu frakciju blijedo bijele boje siromašnu spermijima koja označuje kraj ejakulacije (SANCHO, 2002.; BADIA, 2003.; YESTE, 2008.; BONET i sur., 2013.). Najmanji udio volumena ejakulata čine sekreti testisa te epididimisa (2-5 %), a najveći udio čine sekreti pomoćnih spolnih žlijezda i to: sekreti sjemenih mjehurića (15-20 %), sekreti bulbouretralnih žlijezda odnosno Cowperovih žlijezda (10-25 %) te prostate (55%-75 %) (SANCHO, 2002.; BADIA, 2003.; BONET i sur., 2013.).

2.2. Morfološke osobitosti spermija i ejakulata

Spermiji su muške spolne stanice koje se stvaraju spermatogenezom i spermiogenezom u testisima. Nemaju sposobnost diobe i rasta, ali ih karakterizira sposobnost sposobnost samostalnog gibanja i održivosti izvan organizma u aerobnim i anaerobnim uvjetima. Spermiji su stanice koje su specifične za svaku životinjsku vrstu, međutim ipak ih povezuju određene karakteristike. Sastoje se od tri glavna dijela, glave, središnjeg dijela (vrat i tijelo) i repa (Slika 2.). Glava spermija sastoji se od jezgre i oskudne citoplazme. Jezgra ima tanaku membranu, a sastoji se od genetskog materijala, DNK-a, ribonukleinske kiseline (RNK), alkalne fosfataze, kromatina te bjelančevina. Na prednjem dijelu glave spermija smještena je akrosoma, odnosno opna formirana iz Golgijevog aparata. Hijaluronidaza i akrozin su najvažniji enzimi akrosome jer sudjeluju u penetraciji kroz međustanični matriks folikularnih stanica (*zona pellucida*). Vrat spermija je kratak te se sastoji od proksimalnog centriola sastavljenog od devet segmenata, centralne i spiralne fibrile koje se protežu kroz tijelo te sve do repa spermija. Tijelo je također kratko, sadrži centralnu i spiralnu fibrilu te povezuje glavu i rep spermija. Oko centralne fibrile smješteni su mitohondriji koji su važni za gibanje spermija, odnosno igraju ulogu u pokretanju repa spermija. Rep spermija sastoji se od središnjeg, glavnog i završnog dijela. Najdulji je dio

spermija te se sastoji od centralne fibrile koja je u središnjem dijelu omotana spiralnom mitohondrijskom ovojnicom, a koja završava na samom kraju repa poput kista. Rep spermija ima važnu ulogu u oplodnji, odnosno zaslužan je za gibljivost spermija (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006., ŽURA ŽAJA, 2015.).



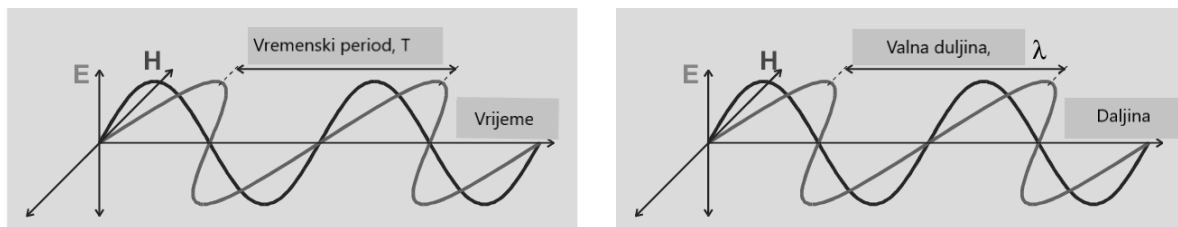
Slika 2. Građa spermija (Preuzeto od: inviTRA, BARBERÁ, A., E.G. SÁNCHEZ, Z. SALVADOR, S. FERNÁNDEZ (2018.): <https://www.invitra.com/en/sperm-cell/>, 28.1.2022.).

Ejakulat je mliječno bijele boje, sivo-žučkaste nijanse, konzistencije vrhnja ili kiselog mlijeka. Sastoji od korpuskularnih elemenata (spermija i epitelnih stanica) i tekućeg dijela (sjemene plazme) te se stvara i izlučuje ejakulacijom ili polucijom od početka spolne zrelosti sve do senilnosti. Sjemena plazma ima ulogu u transportu, prehrani i aktivaciji sperme, a sastoji se od sekreta pomoćnih spolnih žlijezda, epididimisa, sjemenovoda i uretre. Osobitosti ejakulata nerasta uključuju veliki volumen (150-500 mL) zbog velike duljine rogovca maternice u krmača, manju gustoću (25-300 milijuna spermija u mL) te blago kiseli do blago lužnati pH (6,4-7,4). Ejakulacija u nerasta traje u prosjeku osam minuta te se odvija frakcionirano. U nerasta ejakulacija se odvija frakcionirano što omogućuje hvatanje poželjnih frakcija tijekom ejakulacije. Prva frakcija sastoji se od manje količine (10-20 mL) uretralnih žlijezda i njena funkcija je ispiranje urogenitalnog sustava te se iz tog razloga ne skuplja u staklene posude (spermohvatač) u svrhu umjetnog osjemenjivanja. Druga frakcija je spermijima najbogatija frakcija te se izlučuje netom nakon prve. Treća frakcija je oskudna spermijima, ali je po volumenu najveća frakcija. Druga i treća frakcija koriste se u svrhu umjetnog osjemenjivanja,

odnosno hvataju se u spermohvatače te se potom pripremaju doze čiji volumen mora biti minimalno 100 mL, dok broj spermija u dozama mora biti najmanje 2 do 3 milijarde spermija (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.).

2.2. Elektromagnetsko zračenje

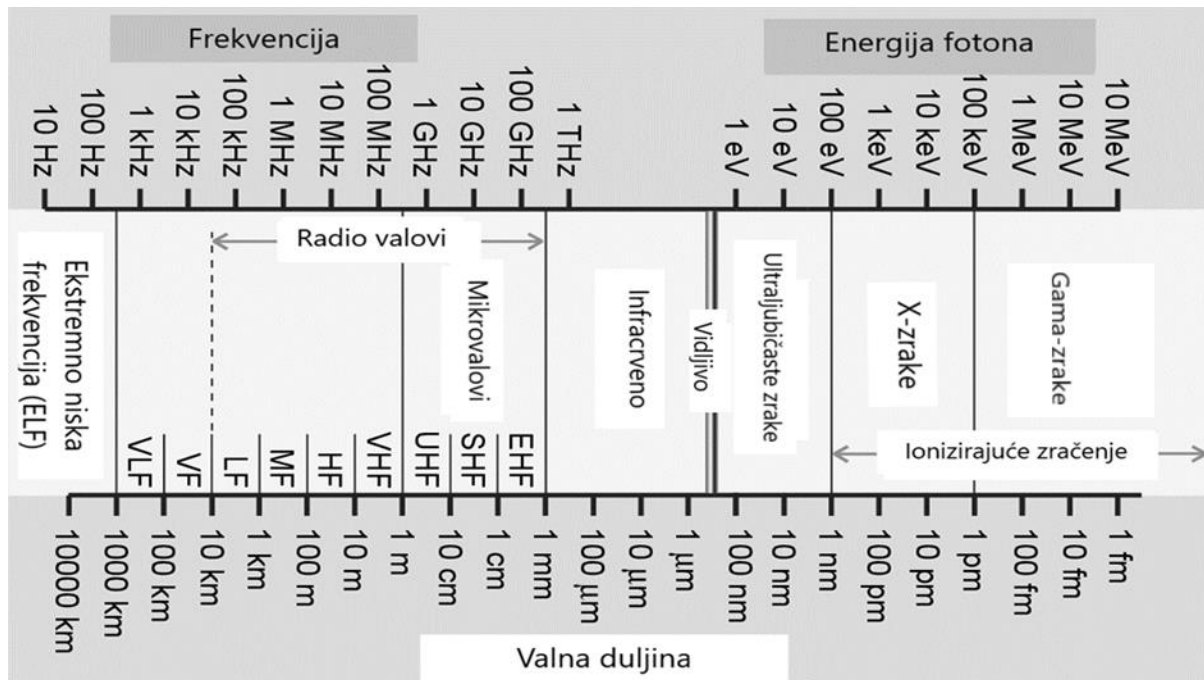
Elektromagnetsko zračenje je pojam za prijenos energije u obliku elektromagnetskih valova koji su definirani električnim (E) i magnetskim (M) poljem dok jačina spomenutih polja ovisi o izvoru valova (IARC MONOGRAPHS, 2013.). Elektromagnetski valovi opisuju se frekvencijom i valnom duljinom. Frekvencija elektromagnetskog vala je broj ciklusa (titraja) u jedinici vremena i izražava se hercima (Hz) (SCENIHR, 2015.). U zraku te slobodnom prostoru elektromagnetski valovi putuju brzinom svjetlosti (c), no prolazeći kroz tjelesna tkiva brzina im se usporava (IARC MONOGRAPHS, 2013.). Prema formuli $\lambda = v/f$ (λ =valna duljina; v =brzina; f =frekvencija) vidljivo je da su valna duljina (udaljenost između uzastopnih vrhova vala) (Slika 3.) i frekvencija u obrnuto proporcionalnom odnosu, tj. što je viša frekvencija to je kraća valna duljina, i obrnuto (DURNEY i sur., 1986.; IARC MONOGRAPHS, 2013.).



Slika 3. Shematski prikaz elektromagnetskog vala. Slovo E označuje električno polje, dok slovo H označuje magnetsko polje (Prema: IARC MONOGRAPHS, 2013.).

Elektromagnetsko zračenje na temelju iznosa energije dijeli se na ionizirajuće (x i gama zrake) i neionizirajuće. Ionizirajuće elektromagnetsko zračenje predstavlja energiju koja ima sposobnost ionizirati atome i molekule medija kroz koji prolazi (MAARTENS i sur., 2014.). Izvori ionizirajućeg zračenja su kozmičko zračenje, radionuklidi, prirodni ili umjetni te brojni uređaji koji emitiraju takvo zračenje zbog različitih svrha, primjerice dijagnostičkih (medicina), terapijskih (medicina), sterilizacijskih (gospodarstvo, medicina), konzervirajućih (prehrambena industrija), proizvodnje električne energije i dr. (MAARTENS i sur., 2014.).

Elektromagnetsko zračenje koje nema sposobnost ionizirati atome i molekule pri međusobnom sudaru (neionizirajući dio elektromagnetskog spektra) podijeljen je na radiofrekvencijski i optički dio. Radiofrekvencijski pak dio pokriva frekvenciju od 0 do 300 GHz i podijeljen je na područja ekstremno dugog vala i ekstremno kratkog vala (ITU, 2008.) (Slika 4.)



Slika 4. Spektar frekvencija radiofrekvencijskog elektromagnetskog zračenja (Prema: IARC MONOGRAPHS, 2013.) i pripadajuća energija ionizirajućeg elektromagnetskog zračenja.

Radiofrekvencijsko elektromagnetsko zračenje je dio elektromagnetskog spektra frekvencijskog raspona 10 MHz–300 GHz u čije se izvore ubrajaju dalekovodi (50-60 Hz), računala (60-90 Hz), AM radio prijenosnici, odnosno prijenosnici amplitudalne modulacije (530-1600 kHz), FM radio prijenosnici, odnosno prijenosnici frekvencijalne modulacije (88-108 MHz), televizija (50-700 MHz), mobiteli (850 MHz-2,4 GHz), mikrovalne pećnice (2,45 GHz), prijenosna računala te bežična tehnologija poput Wi-Fi-ja (2,4 GHz) (KESARI i sur., 2018.).

Prema Pravilniku o izmjenama i dopunama Pravilnika o zaštiti od elektromagnetskih polja (NN 31/2019) fizikalne veličine i pripadajuće mjerne jedinice koje se koriste u svrhu zaštite od izlaganja neionizirajućem elektromagnetskom zračenju podjeljene su na: a) temeljne fizikalne veličine i b) referentne veličine. Temeljne fizikalne veličine predstavljaju one veličine

koje su izravno povezane s zdravstvenim učincima elektromagnetskog polja, a izražene su kao unutarnje (inducirano) električno polje [V/m], gustoća magnetskog toka [T], gustoća struje [A/m²], specifična gustoća apsorbirane snage (engl. *specific absorption rate* - SAR) [W/kg] i gustoća snage [W/m²]. Od temeljnih veličina u praksi se najčešće koristi specifična gustoća apsorbirane snage (SAR), odnosno mjera brzine apsorbiranja energije po jedinici mase biološkog tkiva, a izražava se u vatima po kilogramu (W/kg) (BALZANO, 1999.). Referentne veličine su pak mjerljive veličine čijim nadzorom se posredno osigurava zadovoljenje temeljnih ograničenja, a izražene kao jakost električnog polja [V/m], gustoća magnetskog toka [T], dodirna struja [mA] i gustoća snage [W/m²].

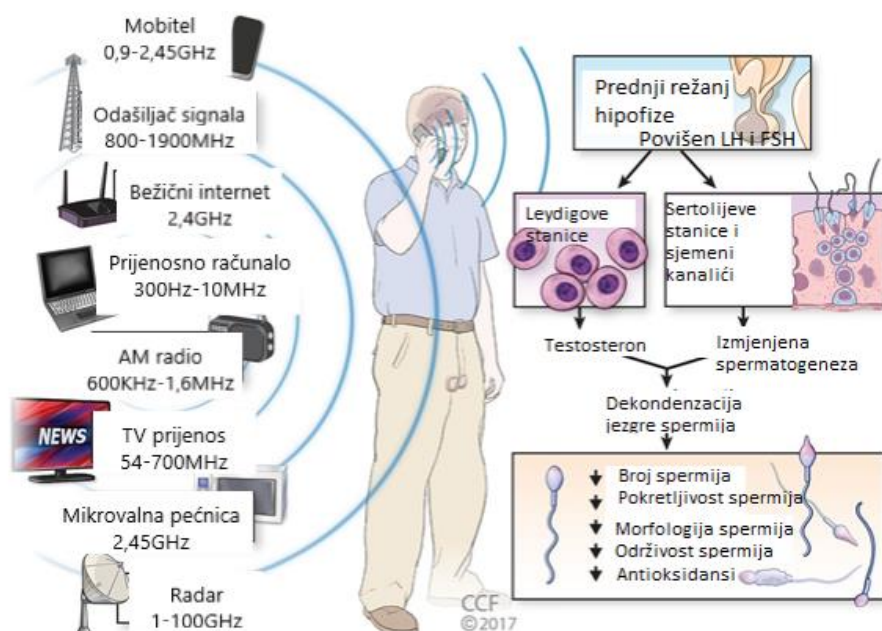
Radiofrekvencijsko elektromagnetsko zračenje u organizmu može uzrokovati toplinski i ne-toplinski učinak (CHALLIS, 2005.). Toplinski učinak tj. zagrijavanje tkiva povezan je s lokalnom proizvodnjom topline, odnosno povećanjem temperature, dok su netoplinski učinci danas povezani s nekim drugim promjenama u tkivu kao što su dokazi o mogućem uzroku karcinoma ili učincima na reproduktivni i živčani sustav (CHALLIS, 2005.; POURLIS, 2009.; SCENIHR, 2015.). Zagrijavanje tkiva pri izlaganju radiofrekvencijskom elektromagnetskom zračenju ovisi o nekoliko čimbenika poput frekvencije, vremena trajanja ozračivanja, površine izloženog tkiva te sposobnosti tkiva da djelotvorno odvodi toplinu. Tako primjerice, zbog slabe prokrvljenosti tj. sporije sposobnosti odvođenja topline, oči i testisi su naročito osjetljivi na RF-EMZ-a što se u konačnici može očitovati kao katarakta odnosno privremena neplodnost (KITCHEN, 2001.).

Na temelju toplinskog učinka postavljene su i granične vrijednosti izloženosti čovjeka RF-EMZ-u, a mjera za tu apsorbiranu energiju u tijelu nakon izlaganja RF-EMZ-u jest specifična gustoća apsorbirane snage – SAR. No, napominjemo, iako su sva propisana ograničenja postavljena ispod uzrokovanja toplinskog učinka time se ne isključuje pak mogući netoplinski biološki učinak.

S druge strane dubina prodiranja RF-EMZ varira između različitih tkiva i organa, odnosno ovisi o karakteristikama tkiva između kože i ozračene regije te o dubini regije ispod kože (DE IULIIS i sur., 2012.; MARKOV i GRIGORIEV, 2015.).

2.3. Utjecaj elektromagnetskog radiofrekvencijskog zračenja na muški reproduktivni sustav

Elektromagnetsko radiofrekvencijsko zračenje može štetno utjecati na zdravlje, osobito reproduktivno (MARKS i sur., 1995.) te na plodnost životinja (AL-AKHRAS i sur., 2001.). Jedan je od najosjetljivijih sustava organizma na RF-EMZ je muški spolni sustav (LIU i sur., 2015.), odnosno testis kao organ (BONDE i sur., 1996.) te Leydigove stanice što može imati negativan utjecaj na spermatogenezu (WANG i sur., 2003.) (Slika 5.). Naime, brojna istraživanja o utjecaju RF-EMZ zračenja na reproduktivno zdravlje životinje pokazala su da izloženost životinja takvoj vrsti elektromagnetskog zračenja uzrokuje smanjenu plodnost, smanjenje broja i gibljivosti spermija (MAILANKOT i sur., 2009.; KESARI i BEHARI, 2010.). Nadalje, EROGUL i sur. (2006.) te AGARWAL i sur. (2008.) također su utvrdili da RF-EMZ frekvencije mobilnih uređaja uzrokuje pad broja spermija, smanjenu gibljivost i održivost spermija te mijenja morfologiju spermija. Navedeni štetni učinci RF-EMZ u korelaciji su s vremenom izlaganja (AGARWAL i sur., 2008.). Nadalje, smanjenje kvalitete sjemena u čovjeka očituje se također i pri izlaganju sjemena *ex vivo* prijenosnom računalu spojenog na bežičnu mrežu, odnosno Wi-Fi frekvencije 2,4 GHz u trajanju od 4 sata (AVENDANO i sur., 2012.).



Slika 5. Utjecaj radiofrekvencijskog zračenja na muški spolni sustav. Djelovanjem navedenih izvora zračenja dolazi do smanjenog broja spermija, gibljivosti spermija, narušene morfologije, smanjene održivosti spermija te smanjenja antioksidansa (Prema: KESARI i sur., 2018.).

2.4. Utjecaj radiofrekvencijskog elektromagnetskog zračenja na reproduktivni endokrini sustav

Radiofrekvencijsko elektromagnetsko zračenje može štetno djelovati na funkcioniranje reproduktivnog endokrinog sustava preko središnjeg živčanog sustava povratnim neuroendokrinim mehanizmom koji djeluju na principu izlučivanja gonadotropnog oslobađajućeg hormona (GnRH) koji potom stimulira hipofizne hormone, folikulo-stimulirajući hormon (FSH) te luteinizirajući hormon (LH) (KESARI i sur., 2018.). No, s druge strane do danas nije još utvrđen učinak RF-EMZ na izlučivanje hormona rasta, stimulirajućeg hormona štitnjače, adrenokortikotropnog hormona, folikulostimulirajućeg hormona te prolaktina (BORTKIEWICZ, 2001.). Izlaganje štakora RF-EMZ smanjuje broj Leydigovih stanica te posljedično tome javlja se smanjena serumska koncentracija testosterona (KESARI i sur., 2018.). Također, akutno i subkronično izlaganje magnetskom polju frekvencije 50 i 60 Hz u štakora i hrčaka dovelo je do smanjene razine plazminog i epifiznog melatonina (KATO i sur., 1993.; YELLON, 1994.). Naime, poznato je da melatonin, hormon kojega luči epifiza, regulira lučenje hormona adenohipofize, odnosno smanjuje lučenje gonadotropnih hormona, točnije folikulo-stimulirajući hormon (FSH) te luteinizirajući hormon (LH), stoga je pri smanjenom lučenju epifize zaustavljeno lučenje gonadotropnih hormona (AL-AKHRAS i sur., 2006.; GUYTON i HALL, 2012.) odnosno dolazi do promjena u sintezi spolnih hormona adenohipofize (CIANI i sur., 2021.). Melatonin djeluje na principu antigonadotropnog učinka (JACKSON i sur., 1984.; VANECEK, 1998.; KELL i STEHLE, 2005.) što rezultira smanjenom proizvodnjom testosterona (OZGUNER i sur., 2005.).

2.5. Istraživanja utjecaja elektromagnetskog zračenja na sjeme ljudi i životinja

Prema rezultatima znanstvenih istraživanja poznato je da izlaganje muškaraca RF-EMZ putem različitih uređaja, primjerice, uređajima mobilne telefonije, bežičnog interneta i prijenosnog računala uzrokuje abnormalnu morfologiju spermija, povišenu razinu testosterona, sniženu razinu luteinizirajućeg hormona, smanjenu gibljivost spermija te povećanu fragmentaciju DNK-a spermija (GUTSCHI i sur., 2011.; RAGO i sur., 2013.; YILDIRIM i sur., 2015.). Nadalje, zanimljivo je da istovremeno korištenje prijenosnog računala povezanog na bežični internet uzrokuje smanjenje progresivne gibljivosti spermija te povećanje

fragmentacije DNK-a, tim više ako je korišteno računalo smješteno u blizini muškog spolnog sustava (AVENDANO i sur., 2012.). Smanjen broj progresivno gibljivih spermija, te povećan broj neprogresivno gibljivih kao i postotak fragmentacije DNK-a utvrdio je također i GORPINCHENKO i sur., (2014.) na *in vitro* uzorcima ljudskog sjemena izloženih zračenju mobilnog uređaja frekvencije 900/1800 MHz tijekom 5 sati.

Smanjen broj gibljivih spermija, povišena lipidna peroksidacija (LPO) te smanjena količina glutationa (GSH) u testisima i epididimisu zabilježeni su u štakora tijekom izlaganja radiofrekvencijskom elektromagnetskom zračenju 1 h dnevno tijekom 28 dana frekvencije 0,9/1,8 GHz podrijetlom od mobilnog uređaja (MAILANKOT i sur., 2009.). DASDAG i sur. (2015.). utvrdili su pak povišen postotak oštećenih glava spermija epididimisa, smanjenu težinu epididimisa te sjemenih mjehurića, smanjen promjer sjemenih tubula te smanjena debljina tunike albugine u štakora izloženih 24-satnom RF-EMZ-u frekvencije od 2,4 GHz-a tijekom godine dana. Izloženost bežičnom internetu 24 sata dnevno tijekom 20 tjedana čija frekvencija iznosi 2,45 GHz-a u štakora je uzrokovala promjene na testisima te oštećenja DNK-a (ATASOY i sur., 2013.). Nadalje, u odraslih mužjaka štakora Sprague-Dawley nakon polusatnog izlaganja RF-EMZ frekvencije od 900 MHz na dan tijekom 5 dana u tjednu u sveukupnom trajanju od 5 tjedana utvrđen je smanjen promjer sjemenih tubula, smanjena srednja visina zametnog epitela kao i razina ukupnog testosterona u serumu (OZGUNER i sur., 2005.), dok u mužjaka štakora Sprague-Dawley tokom izloženosti RF-EMZ-u frekvencije 848.5 MHz 90 min/dan, 5 dana u tjednu, tijekom 12 tjedana nisu uočeni štetni učinci na muški reproduktivni sustav, odnosno promjene u težini testisa, epididimisa te promjera sjemenih tubula (LEE i sur., 2010.).

Oštećenje Leydigovih stanica u miševa, odnosno smanjen broj Leydigovih stanica i povećan postotak apoptoze stanica sjemenih tubula u štakora nakon izlaganja miševa i štakora RF-EMZ utvrdili su WANG i sur. (2003.), KESARI i BEHARI (2010.) te SAYGIN i sur. (2011.).

Elektromagnetsko zračenje mobilnih uređaja na frekvenciji od 900 MHz i 1800 MHz smanjuje razine folikulo-stimulirajućeg hormona, luteinizirajućeg hormona te testosterona (OYEWOPU i sur., 2017.). Međutim, ista frekvencija u miševa i štakora uzrokuje povišenu razinu testosterona uslijed čega dolazi do preuranjenog puberteta u štakora (FORGACS i sur., 2006.; NISBET i sur., 2012.) koji je prema ZAREEN, (2009.) rezultat preranog pokretanja osi

hipotalamus - hipofiza što dovodi do ranije spermatogeneze te razvoja sekundarnih spolnih karakteristika.

Nadalje, poznato je da izloženost elektromagnetskom zračenju frekvencije 50 Hz-a u štakora dovodi do povišene razina testosterona, proliferacije Leydigovih stanica, povećane težina testisa te smanjene količina zametnih stanica (OZGUNER i sur., 2002.).

S druge strane, SOMMER i sur. (2009.) proveli su istraživanje o dugotrajnom učinku RF-EMZ-a frekvencije 1966 MHz-a na nekoliko generacija miševa te nisu uočili štetno djelovanje navedenog zračenja na reproduktivni sustav, odnosno nije uočena promjena vezana za težinu testisa te pomoćnih žlijezda, kao ni negativna promjena vezana za broj spermija.

2.6. Morfometrija

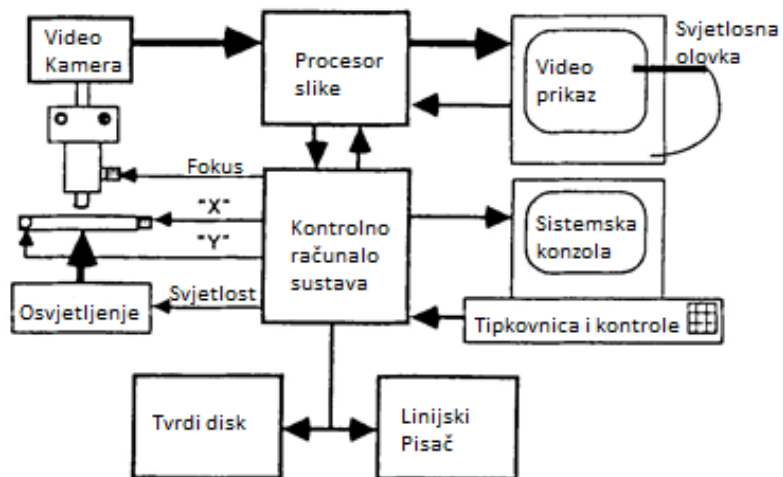
Za utvrđivanje plodnosti te dijagnostiku narušene plodnosti i neplodnosti životinja, procjena kvalitete sjemena od velike je važnosti (HIDALGO i sur., 2006.). Procjena gibljivosti i morfologije bitne su karakteristike u određivanju kvalitete sjemena čija se procjena bazirala na upotrebi klasičnih metoda subjektivnih procjena pokazatelja poput gibljivosti, morfologije te koncentracije sjemena (VERSTEGEN i sur., 2002.). Različite subjektivne tehnike ocjenjivanja sjemena prouzročile su velike varijacije u mjerenjima, što se može pripisati nedostatku standardizacija metoda u laboratorijima te neobjektivnim pristupima tehničara (JEQUIER i UKOMBE, 1983.; ZAINI i sur., 1985.; OMBELET i sur., 1997.). Uočeno je da su subjektivne procjene morfologije spermija varijabilne te da ih karakterizira nedostatak preciznosti i ponovljivosti (HIDALGO i sur., 2006.). S obzirom na sve veće varijacije u rezultatima prilikom korištenja subjektivnih metoda procjene morfologije, bilo je nužno uvesti objektivnije metode u svrhu vjerodostojnije procjene muške plodnosti, stoga je došlo do razvoja računalne analize morfometrije spermija (ASMA) (KATZ i sur., 1986.). Pojavom računalno potpomognute analize spermija (CASA) došlo je do pomaka u procjeni kvalitete sjemena, omogućivši procjenu pokazatelja poput gibanja, brzine i morfologije (VERSTEGEN i sur., 2002.). Poznato je da rezultati računalne analize morfometrije spermija uvelike ovise o načinu uzorkovanja te metodi bojanja spermija određenih vrsta životinja (HIDALGO i sur., 2006.). Računalno potpomognutom analizom morfometrije spermija uvelike se poboljšala procjena morfologije spermija (HIDALGO i sur., 2005.) te je navedena tehnika omogućila objektivniju i pouzdaniju metodu mjerenja u svrhu rutinske analize sjemena kao i u svrhu

izučavanja muške neplodnosti (JAGOE i sur., 1987.). Korištenjem ASMA sustava dobio se uvid u morfometrijske razlike dimenzija glava spermija između fertilnih i subfertilnih pastuha (CASEY i sur., 1997.). Morfologija spermija jedan je od najbitnijih pokazatelja u određivanju potencijala muške plodnosti (COETZEE i sur., 1998.) te se njena procjena u humane svrhe zbog heterogenosti spermija, određuje udjelom morfoloških nedostataka spermija, dok ejakulat u životinja odlikuje homogenost u pojedinim vrsta (MENKVELD, 2010.). Uzorak sjemena je potrebno fiksirati i obojati kako bi uzorak sjemena bio pogodan za mikroskopsku analizu te procjenu morfologije (ŁAĆKA i sur., 2016.). Također, primjenom ASMA tehnologije i multivarijantne analize uočeno je da u ejakulatu nerasta postoje subpopulacije spermija koje posjeduju različita morfometrijska obilježja koja konvencionalnim subjektivnim metodama nisu uočljiva (PENˆA i sur., 2005.). Primjena CASA sustava započela je u humanoj medicini (DAVIS i sur., 1992.; BONDE i sur., 1996.; KRAUSE i VIETHEN, 1999.; HIDALGO i sur., 2005.; HIDALGO i sur., 2006.) prvenstveno u svrhu umjetne oplodnje kako bi se procjenila kvaliteta sjemena (VERSTEGEN i sur., 2002.). CASA sustavi s vremenom su se počeli upotrebljavati i u veterinarskoj medicini (GRAVANCE i sur., 1995.; GRAVANCE i sur., 1996.; CASEY i sur., 1997.; SANCHO i sur., 1998.; VERSTEGEN i sur., 2002.; HIDALGO i sur., 2005.; PENˆA i sur., 2005.; HIDALGO i sur., 2006.), čija upotreba kao i u humanoj medicini, najviše prevladava u dijagnostici plodnosti kako bi se procijenila kvaliteta sjemena, međutim mali udio zauzima i u eksperimentalne svrhe kako bi se uvidio učinak lijekova na plodnost (VERSTEGEN i sur., 2002.). Standardizacija specifičnih metoda za svaku vrstu poput pažljive pripreme uzorka, fiksacije te bojanja, od iznimne su važnosti za pravilno funkcioniranje i preciznost ASMA sustava kako u humanoj tako i u veterinarskoj medicini (DAVIS i GRAVANCE, 1993.; GRAVANCE i sur., 1995.; GAGO i sur., 1998.; BOERSMA i sur., 2001.; VERSTEGEN i sur., 2002.; HIDALGO i sur., 2005.; GARCÍA-HERREROS i sur., 2006.; HIDALGO i sur., 2006.). Različiti čimbenici mogu utjecati na rezultate morfometrije, stoga u svrhu točnosti rezultata, metode moraju biti standardizirane te potom navedena tehnika može pružiti relevantne informacije u studijama usmjerenim na evolucijsku biologiju, spermatogenezu, procjenu kvalitete sperme, odnosno procjenu plodnosti mužjaka, postupak očuvanja sjemena, odnosno krioprezervaciju sjemena ili učinak toksičnih tvari na reproduktivni sustav (YÁNIZ i sur., 2015.). Različite metode pripreme i bojanja uzoraka koje se koriste u svrhu procjene morfometrije sjemena za određenu vrstu (WYSOKIŃSKA i sur., 2021.) otežavaju usporedbu morfometrije spermija između vrsta pomoću ASMA metoda, odnosno rezultati dobiveni tijekom provedenih istraživanja ne mogu se usporediti (YÁNIZ i sur., 2015.). Spermiji pojedinih vrsta neravnomjerno upijaju boju što također otežava

usporedbu morfometrije spermija između vrsta putem CASMA metoda (GARCÍA-HERREROS i sur., 2006.; YÁNIZ i sur., 2012.). Međutim, često su pogreške sastavni dio ovog sustava s obzirom na obradu premalog broja spermija te na postojeće razlike između ASMA sustava (HIDALGO i sur., 2005.; HIDALGO i sur., 2006.). Morfometrijski rezultati mogu varirati ovisno o unutarnjim čimbenicima poput individualne varijabilnosti, vrste, pasmine, genetskih čimbenika, spolne zrelosti te dobi i vanjskim čimbenicima u koje spadaju okolišni čimbenici, priprema uzorka kao i morfometrijska analiza sjemena (YÁNIZ i sur., 2015.). KONDRACKI i sur. (2005.) proveli su morfometrijska mjerenja na dvijema skupinama nerasta (mlađima od 14 mjeseci i starijima od 18 mjeseci) te su došli do zaključka da su u starijih nerasta mjere sjemena bile veće. Za procjenu morfometrije spermija najčešće korištena metoda je svjetlosna mikroskopija u kombinaciji sa specifičnim softverom, međutim koriste se i druge metode poput elektronske mikroskopije, fazno-kontrastna pozitivna te negativna mikroskopija i fluorescentna mikroskopija (YÁNIZ i sur., 2015.).

Morfometrijske pokazatelje možemo svrstati u primarne, pokazatelje oblika te ostale pokazatelje. Primarni pokazatelji morfometrije spermija obično uključuju površinu, opseg, duljinu, širinu, minimalni polumjer, maksimalni polumjer te se izražavaju kao jedinične vrijednosti. Pokazatelji oblika odnose se na pravilnost (engl. *regularity*), naboranost (engl. *rugosity*) te eliptičnost (engl. *ellipticity*) i elongacija ili izduljenost (engl. *elongation*) koji se odnose na omjer dužine i širine. Ostali pokazatelji u koje spadaju različite mjere i omjeri poput duljine spermija (duljina glave + duljina repa); duljina glave / duljina spermija, duljina glave / duljina repa, duljina repa / duljina spermija, opseg glave / duljina spermija, površina glave / duljina spermija, duljina glave x širina glave / duljina spermija (HIDALGO i sur., 2005.; RAKIĆ, 2018.).

Morfometrija je računalna verzija planimetrije, ujedno i najjednostavniji oblik slikovne citometrije, koja se odnosi na mjerenje različitih staničnih struktura i njihov prikaz u dvodimenzionalnom obliku. Slikovna citometrija i morfometrija od velike su važnosti za dijagnostiku jer detektiraju određene stanične abnormalnosti ako postoje te ih potom svrstavaju u određene skupine, odnosno kategorije pomoću statističke analize. Sustav za analizu slike sastoji se od mikroskopa, visokokvalitetne video kamere, monitora u boji te mikroračunala s pločom za obradu slike (Slika 6.). Svjetlosna mikroskopska slika se video kamerom pretvara u analogni elektronički signal koji se potom digitalizira pomoću ploče za snimanje u mikroračunalu te potom koristi za analizu (RUSSACK, 1994.).



Slika 6. Sustav za analizu slike. Sastoji se od mikroskopa, visokokvalitetne video kamere, monitora u boji te mikroručunala s pločom za obradu slike (Prema: MAYALL, 1988.).

3. MATERIJALI I METODE ISTRAŽIVANJA

Temeljem članka 31. Statuta Veterinarskoga fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Fakultetsko vijeće Veterinarskoga fakulteta Sveučilišta u Zagrebu na prijedlog Povjerenstva za etiku u veterinarstvu, na 5. redovitoj sjednici održanoj 19. veljače 2020. godine donijelo je odluku da se odobrava provođenje ovog istraživanja (klasa:640-01/17-17/9[IŽŽ1], ur. br.: 251-61-44-20-02).

3.1. Životinje, smještaj i hranidba

U istraživanju je sudjelovalo sveukupno 12 nerasta pripadajućih pasmina landras i pietrain, smještenih u Veterinarskoj stanici d.d. Varaždin (Stočar d.o.o., Trg I. Perkovca 24, 42000 Varaždin) čija se starost kreće od jedne i pol do tri i pol godine. Uzorci svježe razrijeđenog sjemena nerasta su prikupljeni u sklopu izrade doktorske disertacije te provođenja neeksperimentalnog kliničkog rada. Veterinarska stanica d.d. Varaždin izdala je odobrenje o korištenju navedenih uzoraka za potrebe doktorskog rada kao i objavu krajnjih podataka.

Nerasti su bili smješteni pojedinačno u boksevima površine od 12 m² (4m x 3m) čiji su podovi prekriveni slamnom steljom i osvijetljeni prirodnim svjetlom. Hranidba nerasta obavlja se dva puta dnevno, oko šest sati ujutro prije naskakivanja te oko dva sata poslijepodne sa smjesom proizvedenom u Veterinarskoj stanici d.d. Varaždin (Tablica 1.) (Stočar d.o.o., Trg I. Perkovca 24, 42000 Varaždin). Dnevne potrebe nerasta iznose otprilike dva kilograma smjese.

Krv se nerastima uzimala jednom godišnje u skladu sa Naredbom o mjerama zaštite zdravlja životinja od zaraznih i nametničkih bolesti i njihovom financiranju u 2020. godini (NN 7/2020). Jednom godišnje nerasti su se tretirali Dectomaxom u sklopu suzbijanja parazitoza čiji je put aplikacije parenteralan, kao i Vit AD₃E koji se također primjenjuje jednom godišnje.

Tablica 1. Sastav krmne smjese za neraste (BUTKOVIĆ, 2021.)

| | |
|----------------------|---------------|
| sirovi proteini | 17,15% |
| sirova mast | 3,13% |
| sirova celuloza | 6,29% |
| Pepeo | 5,30% |
| metabolička energija | 12,49 MJ/kg |
| Lizin | 1,24 % |
| Metionin | 0,47 % |
| Triptofan | 0,18 % |
| metionin + cistin | 0,76 % |
| Cink | 126 mg/kg |
| Magnezij | 56 mg/kg |
| probavljivi proteini | 38,28% |
| Bakar | 31,50 mg/kg |
| Selen | 0,42 mg/kg |
| Kalcij | 0,83 % |
| fosfor ukupni | 0,53 % |
| fosfor iskoristivi | 0,22 % |
| Natrij | 0,23 % |
| vitamin D3 | 1750,01 IJ/kg |
| vitamin A | 9100 IJ/kg |
| vitamin E | 70 IJ/kg |

3.2. Dizajn pokusa i postupci sa životinjama

Prikupljanje uzoraka sjemena dvanaest nerasta od kojih osam čine pasminu pietren, a četiri pasminu njemačkog landrasa, starosti od jedne i pol do tri i pol godine, vlasništva Veterinarske stanice d.d. Varaždin (Stočar d.o.o., Trg I. Perkovca 24, 42000 Varaždin) provodilo se u jutarnjim satima, točnije oko 7.00 sati ujutro. U transportnim kutijama tijekom prijevoza uzoraka sjemena do Klinike za porodništvo i reprodukciju Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu kontrolirala se temperatura pomoću digitalnog termometra. U navedenoj veterinarskoj stanici, sjeme se prikupljalo jednom tjedno radi umjetnog osjemenjivanja krmača

i to svakom nerastu na određeni dan u tjednu. Sjeme nerasta ozračeno je RF-EMZ na frekvenciji od 2500 MHz i jakosti elektromagnetskog polja od 10 V/m tijekom 2 sata.

3.3. Polučivanje i postupak sa ejakulatom

3.3.1. Polučivanje ejakulata

Postupak polučivanja ejakulata izvodio se metodom manualne fiksacije penisa na način da se ruka osobe koja izvodi postupak, postavila na ventralni dio abdomena kranijalno od orificijuma prepucija te se penis nerasta postavio u ruku radi jačeg pritiska. Za stimulaciju polučivanja koje se obavljalo jednom tjedno u svakog nerasta, koristili su se fantomi krmača koji su rezultirali pojavom spolnih refleksa. Refleks približavanja nastupio je zbog same prisutnosti fantoma u odjeljku, u koji su se nerasti dovodili jedan po jedan, odnosno stimulacije osjetila vida, sluha i njuha. Nakon navedenog nastupio je refleks erekcije kojeg slijedi refleks opasivanja. Refleks je opasivanja rezultirao naskakivanjem nerasta na način da je prednjim ekstremitetima, odnosno prednjim dijelom tijela obuhvatio većinski dio fantoma. Nakon refleksa opasivanja uslijedio je niz spolnih pokreta te ejakulacija, potpomognuta manualnom fiksacijom, koja je trajala u prosjeku oko sedam minuta.

3.3.2. Postupak sa ejakulatom i ocjena ejakulata

Sjeme se tijekom ejakulacije nerasta hvatalo u staklene posude širokog grla. Nakon navedenog postupka, volumen je ejakulata određivan pomoću menzure, a zatim koncentracija spermija u ejakulatu nerasta pomoću „Accucell photometer tip 60CI0394“ (IMV technologies, Normandija, Francuska). Masovna gibljivost se određivala u nativnom ejakulatu pomoću „Olympus BX50F“ (Olympus, Tokyo, Japan) mikroskopa sa ugrađenim spermotermom. Nakon određivanja koncentracije spermija te masovne gibljivosti u ejakulat je dodana količina Cronos razrjeđivača (Medi-Nova, Italija) koja je bila određena fotometrom tako da u svakoj dozi bude koncentracija spermija od 2,5 milijuna/mL. Nakon dodavanja razrjeđivača sjeme se prebacilo u plastične boce volumena 80 mL. Nakon navednih postupaka uzorci svježe razrijeđenog sjemena transportirani su na Klinike za porodništvo i reprodukciju Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

3.4. Izlaganje uzoraka radiofrekvencijskom elektromagnetskom zračenju u laboratorijskim uvjetima

Prije izlaganja sjemena radiofrekvencijskom elektromagnetskom zračenju uzorci su svakog nerasta bili razdijeljeni u Petrijeve zdjelice. Uzorci su sjemena ozračivani pomoću gigahercne transversalne elektromagnetske komore (GTEM) (Slika 7.) tijekom 2 sata, izrađene na Zavodu za radiokomunikacije i visokofrekvencijsku elektroniku Fakulteta elektrotehnike i računarstva Sveučilišta u Zagrebu, unutar koje se nalazio i digitalni termometar čija je uloga bila mjerenje temperature uoči nestanka toplinskog učinka. Uz komoru, koristili su se HP 8657A generator signala i RFGA0101-05 linearno pojačalo kako bi se postigla veća jakost elektromagnetskog polja.

GTEM-komora je prijenosna linija koja je temeljena na TEM-komorama. GTEM-komora je prilagodljivi, odnosno piramidalni dio TEM-komore impedancije iznosa 50Ω . Uz komoru potrebno je koristiti generator, pojačalo i Petrijeve zdjelice (MALARIĆ, 2016.).



Slika 7. GTEM komora. Prikaz GTEM komore u kojoj su smješteni uzorci spermija nerasta zajedno sa digitalnim termometrom. (fotografirao dr.sc. Ivan Butković, dr. vet. med.).

3.5. Postupak bojenja razmaza ejakulata

Nakon ozračivanja uzoraka sjemena, ozračeno i neozračeno se sjeme koristilo za izradu razmaza na stakalcu te potrebe bojanja Spermac metodom za dijagnostičko bojanje stanica spermija koje se generalno koristi za vizualizaciju glave, akrosoma, ekvatorijalnog područja, središnjeg dijela te repa spermija kako bi eventualne morfološke abnormalnosti navedenih dijelova mogle identificirati. Na prethodno očišćeno i odmašćeno stakalce učinjen je tanki razmaz koji je potom stavljen u fiksator u trajanju od 5 minuta. Nakon učinjene fiksacije, stakalca su stavljena na grijaču ploču na 37 °C u trajanju od 15 minuta (Slika 8.). Zatim su se stakalca ispirala destiliranom vodom te je uslijedilo bojanje na način da se razmaz: a) uronio u 50 mL crvene tekućine (Spermac "A") u trajanju od 1 minute, b) nakon toga ispirao destiliranom vodom, c) uronio u 50 mL blijedozelene tekućine (Spermac "B") u trajanju od 1 minute, d) ispirao destiliranom vodom, e) uronio u 50 mL tamnozeleno tekućine (Spermac "C") također u trajanju od 1 minute te f) ispiranje destiliranom vodom. Nakon bojanja uslijedilo je završno sušenje preparata na grijačkoj ploči pri temperaturi od 37 °C.



Slika 8. Grijača ploča i fiksator sa pripadajućim razmazima. Lijevo na slici prikazana je prozirna posudica sa fiksatorom u koju su uronjeni uzorci nakon učinjenog razmaza u trajanju od 5 minuta. Desno na slici prikazana je grijača ploča gdje su nakon učinjene fiksacije stavljena stakalca u trajanju od 15 minuta na prikazanoj temperaturi od 37 °C (fotografirala studentica Paulina Martinec).

3.6. Morfometrijska analiza spermija

Analizirano je 24 obojanih razmaza ozračenih i neozračenih uzoraka sjemena, s time da je po svakom razmazu izmjereno cca 70 spermija. Morfometrijska analiza spermija provedena je uz pomoć kompjuterskog programa za obradu i analizu slika, „SFORM“ (VAMSTEC, Zagreb, Hrvatska). Mjerenje spermija bilo je bazirano na onima koji nisu bili grupirani te koji nisu imali nedostatke prouzročene manipulacijom tijekom izrade razmaza. Manualnom metodom, pomoću računalnog miša, označavali su se dijelovi spermija, glava, središnji dio te rep (Slika 9.) točno tim redosljedom te su potom izračunati podaci ispisani u tablici programa. Površina (μm^2), opseg (μm), minimalni polumjer (μm), maksimalni polumjer (μm), ispupčenost (μm), duljina (μm) te širina (μm) morfometrijski su pokazatelji izmjereni za glavu i središnji dio spermija, dok je za rep izmjerena samo duljina. Eliptičnost (engl. *ellipticity*; duljina/širina), naboranost (engl. *rugosity*; $4\pi \times \text{površina}/\text{opseg}^2$), elongacija (engl. *elongation*; duljina – širina)/(duljina + širina) i pravilnost (engl. *regularity*; $\pi \times \text{duljina} \times \text{širina}/4 \times \text{površina}$) morfometrijski su pokazatelji glave izračunati prema HIDALGO i sur. (2005.) uz pomoć duljine, širine, površine te opsega, odnosno primarnih pokazatelja. Također su izračunati i različiti odnosi morfometrijskih pokazatelja poput ukupne duljine spermija koja iznosi zbroj duljine glave te duljine repa spermija, zatim duljina glave/ukupna duljina, duljina glave/duljina repa, duljina repa/ukupna duljina, opseg glave/ukupna duljina, površina glave/ukupna duljina te duljina glave x širina glave/ukupna duljina.



Slika 9. Spermij nerasta obojen SPERMAC metodom. Prikaz spermija nerasta obojenog SPERMAC metodom u svrhu jasne vizualizacije dijelova spermija, odnosno glave, središnjeg dijela repa te repa spermija. Obojani spermiji bili su podvrgnuti morfometrijskog analizi pomoću računalnog programa „SFORM“, u kojem su bili izmjereni morfometrijski pokazatelji glave, središnjeg dijela repa te repa spermija.

3.7. Statistička obrada podataka

Statistička naliza podataka napravljena je pomoću programskog paketa SAS 9.4 (Statistical Analysis Software 2002–2012 by the SAS Institute Inc., Cary, USA). Deskriptivna analiza podataka učinjena je pomoću procedura MEANS i FREQ. Neki primarni morfometrijski pokazatelji veličine glave spermija su iskorišteni kako bi se izračunali morfometrijski pokazatelji oblika glave spermija pomoću sljedećih formula: eliptičnost = duljina/širina; elongacija = $[(\text{duljina} - \text{širina})/(\text{duljina} + \text{širina})]$; naboranost = $[4\pi \times \text{površina}/\text{opseg}^2]$; pravilnost = $[\pi \times \text{duljina} \times \text{širina}/4 \times \text{površina}]$.

Zavisni parametri između skupina analizirani su multivarijantnom analizom varijance (MANOVA) temeljene na kriteriju Wilksove lambde pomoću GLM procedure. Rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti najmanjih kvadrata (LSM - least squares means) i 95%-tni interval pouzdanosti. Za usporedbu srednjih vrijednosti korištena je Tukey-Kramer-ova metoda višestrukih usporedbi na razini statističke značajnosti $P < 0,05$.

Multivarijantne analize grupiranja (CLUSTERI) podataka rađene su kroz nekoliko koraka kako bi se dobile subpopulacije spermija na osnovu podataka glavnih morfometrijskih pokazatelja glave i repa spermija. Prvi korak je bila analiza glavnih komponenata (PROC FACTOR) kako bi se dobile karakteristične vrijednosti (eigenvalues) morfometrijskih pokazatelja koristeći Kaiserov kriterij ($\lambda \geq 1$) pomoću kojih se odredio broj glavnih komponenata. U određivanju broja subpopulacija koristile su se K-srednje vrijednosti, analize najvažnijih pokazatelja svake komponente pomoću HPCLUS procedure, koja odabire najbolju k-vrijednost (broj subpopulacije) korištenjem vrijednosti izjednačenog box kriterija (Slika 10.). Treći korak je bio da se načini grupiranje podataka pomoću nehijerarhijske analize (metoda K-srednjih vrijednosti i Euklidove udaljenosti) najvažnijih pokazatelja za svaku komponentu iz prethodne analize koristeći FASTCLUS proceduru. Kako bi se bolje interpretirali podatci dobivenih subpopulacija spermija učinjena je postupna diskriminacijska analiza (PROC STEPDISC) i testiranje netipičnih vrijednosti (PROC FASTCLUS). Testiranje razlika u distribuciji subpopulacija spermija između kontrolne i ozračene skupine ejakulata učinjeno je korištenjem Hi-kvadrat i Mantel-Haenszel Hi-kvadrat testa (PROC FREQ).

4. REZULTATI

4.1. Pojedinačni morfometrijski pokazatelji glave i repa spermija

Morfometrijska analiza određena je na sveukupno 1691 spermija, od kojih na kontrolnoj (neozračenoj) skupini 839 spermija (49,6%) te 852 spermija pokusne (ozračene) skupine (50,4%). Deskriptivna analiza provedena je na svim pojedinačnim morfometrijskim pokazateljima glave, spojnog dijela i repa spermija te različitim odnosima morfometrijskih pokazatelja bez obzira na skupinu (Tablica 2, 3 i 4).

Tablica 2. Deskriptivni pokazatelji morfometrijskih osobitosti glave spermija nerasta

| MORFOMETRIJSKI POKAZATELJI SPERMIJA | N | Srednja vrijednost | Medijan | Standardna devijacija | Raspon minimalne i maksimalne vrijednosti | Raspon 95% intervala pouzdanosti | Koeficijent varijacije (%) |
|---|------|-----------------------|---------|--------------------------|--|--|----------------------------------|
| Površina (μm^2) | 1691 | 46,77 | 46,03 | 4,74 | 35,49-65,78 | 46,55-47,00 | 10,14 |
| Opseg (μm) | 1691 | 27,28 | 27,15 | 1,49 | 23,59-33,67 | 27,21-27,36 | 5,48 |
| Minimalni polumjer (μm) | 1691 | 2,48 | 2,48 | 0,19 | 1,85-3,09 | 2,47-2,49 | 7,76 |
| Maksimalni polumjer (μm) | 1691 | 5,34 | 5,34 | 0,38 | 4,45-6,99 | 5,32-5,36 | 7,09 |
| Ispupčenost (μm) | 1691 | 47,41 | 46,68 | 4,85 | 35,77-66,62 | 47,18-47,64 | 10,23 |
| Duljina (μm) | 1691 | 10,31 | 10,27 | 0,7 | 8,42-13,33 | 10,27-10,34 | 6,82 |
| Širina (μm) | 1691 | 5,45 | 5,44 | 0,38 | 4,29-6,7 | 5,43-5,47 | 6,91 |
| Eliptičnost | 1691 | 1,89 | 1,9 | 0,17 | 1,44-2,55 | 1,89-1,91 | 8,96 |
| Naboranost | 1691 | 0,79 | 0,79 | 0,03 | 0,66-0,88 | 0,787-0,789 | 4,08 |
| Elongacija | 1691 | 0,31 | 0,31 | 0,04 | 0,18-0,44 | 0,306-0,309 | 13,2 |
| Pravilnost | 1691 | 0,94 | 0,94 | 0,02 | 0,87-1,03 | 0,942-0,944 | 2,18 |

Eliptičnost = duljina / širina

Naboranost = $[4\pi \times \text{površina} / \text{opseg}^2]$

Elongacija = $[(\text{duljina} - \text{širina}) / (\text{duljina} + \text{širina})]$

Pravilnost = $[\pi \times \text{duljina} \times \text{širina} / 4 \times \text{površina}]$

Tablica 3. Deskriptivni pokazatelji morfometrijski osobitosti spojnog dijela repa i repa spermija

| MORFOMETRIJSKI POKAZATELJI SPERMIJA | N | Srednja vrijednost | Medijan | Standardna devijacija | Raspon minimalne i maksimalne vrijednosti | Raspon 95% intervala pouzdanosti | Koeficijent varijacije (%) | |
|---|--|-------------------------------|----------------|----------------------------------|--|---|---|-------|
| Morfometrijski pokazatelji spojnog dijela repa i repa spermija | Površina spojnog dijela (μm^2) | 1691 | 19,45 | 19,24 | 1,87 | 12,73-29,36 | 19,36-19,54 | 9,61 |
| | Opseg spojnog dijela (μm) | 1691 | 30,39 | 30,33 | 1,72 | 21,99-40,47 | 30,31-30,48 | 5,66 |
| | Minimalni polumjer spojnog dijela (μm) | 1691 | 0,39 | 0,4 | 0,18 | 0-0,84 | 0,38-0,40 | 46,3 |
| | Maksimalni polumjer spojnog dijela (μm) | 1691 | 6,77 | 6,75 | 0,44 | 4,64-9,20 | 6,75-6,79 | 6,43 |
| | Ispupčenost spojnog dijela (μm) | 1691 | 24,75 | 24,48 | 3,83 | 13,86-43,70 | 24,57-24,93 | 15,49 |
| | Duljina spojnog dijela (μm) | 1691 | 13,23 | 13,19 | 0,84 | 8,98-17,78 | 13,19-13,27 | 6,32 |
| | Širina spojnog dijela (μm) | 1691 | 2,07 | 2,03 | 0,42 | 1,2-4,23 | 2,05-2,09 | 20,18 |
| | Duljina repa (μm) | 1691 | 33,98 | 34,1 | 3,07 | 21,37-43,07 | 33,83-34,13 | 9,04 |

Tablica 4. Deskriptivni pokazatelji različitih morfometrijskih odnosa glave i repa spermija nerasta

| MORFOMETRIJSKI POKAZATELJI SPERMIJA | N | Srednja vrijednost | Medijan | Standardna devijacija | Raspon minimalne i maksimalne vrijednosti | Raspon 95% intervala pouzdanosti | Koeficijent varijacije (%) |
|--|----------|-------------------------------|----------------|----------------------------------|--|---|---|
| Ukupna duljina | 1691 | 44,29 | 44,38 | 3,42 | 31,64-54,53 | 44,13-44,45 | 7,71 |
| Duljina glave/ukupna duljina | 1691 | 0,23 | 0,23 | 0,02 | 0,18-0,32 | 0,233-0,234 | 7,01 |
| Duljina glave/duljina repa | 1691 | 0,31 | 0,3 | 0,03 | 0,22-0,48 | 0,30-0,31 | 9,29 |
| Duljina repa/ukupna duljina | 1691 | 0,77 | 0,77 | 0,02 | 0,68-0,82 | 0,766-0,767 | 2,14 |
| Opseg glave/ukupna duljina | 1691 | 0,62 | 0,61 | 0,04 | 0,49-0,83 | 0,616-0,620 | 6,47 |
| Površina glave/ukupna duljina | 1691 | 1,06 | 1,05 | 0,09 | 0,80-1,46 | 1,05-1,06 | 8,61 |
| Duljina glave x širina glave/ukupna duljina | 1691 | 1,27 | 1,26 | 0,11 | 0,95-1,76 | 1,27-1,28 | 8,75 |

Ukupna duljina=duljina glave + duljina repa

Statističkom analizom pojedinačnih morfometrijskih pokazatelja spermija između pokusne skupine ejakulata koja je bila izložena radiofrekvencijskom zračenju frekvencije od 2500 MHz i kontrolne skupine (Tablica 5, 6 i 7) nije uočena statistički značajna razlika. Jedini morfometrijski pokazatelj čija je vrijednost bila blizu statističke značajnosti je ispučenost spojnog dijela ($P=0,06$).

Gibljivost spermija određena pomoću kompjuterski potpomognute analize spermija između pokusne i kontrolne skupine nije bila statistički značajno različita. Ipak, uočena je smanjena gibljivost pokusne skupine (74,7 %) u odnosu na kontrolnu skupinu spermija (85,7 %). Progresivna gibljivost spermija je bila statistički značajno smanjena ($p<0,001$) u pokusne skupine spermija (35,0 %) u odnosu na kontrolnu skupinu (60,1 %).

Tablica 5. Deskriptivni pokazatelji morfometrijskih osobitosti glave spermija nerasta između kontrolne i pokusne skupine

| MORFOMETRIJSKI POKAZATELJI SPERMIJA | SKUPINA | | | | P Vrijednost |
|---|-----------------------|-----------------------------|-----------------------|--------------------------------|-----------------|
| | KONTROLNA | | POKUSNA | | |
| | Srednja vrijednost | 95% Interval pouzdanosti | Srednja vrijednost | 95% Interval pouzdanosti | |
| Površina (μm^2) | 46,79 | 46,47-47,11 | 46,75 | 46,43-47,07 | 0,84 |
| Opseg (μm) | 27,31 | 27,21-27,41 | 27,26 | 27,16-27,36 | 0,49 |
| Minimalni polumjer (μm) | 2,48 | 2,47-2,49 | 2,48 | 2,47-2,49 | 0,81 |
| Maksimalni polumjer (μm) | 5,34 | 5,32-5,37 | 5,34 | 5,32-5,37 | 0,93 |
| Ispupčenost (μm) | 47,39 | 47,06-47,72 | 47,43 | 47,11-47,76 | 0,85 |
| Duljina (μm) | 10,31 | 10,26-10,36 | 10,3 | 10,26-10,35 | 0,86 |
| Širina (μm) | 5,45 | 5,42-5,47 | 5,45 | 5,42-5,47 | 0,89 |
| Eliptičnost | 1,9 | 1,89-1,91 | 1,89 | 1,89-1,91 | 0,78 |
| Naboranost | 0,79 | 0,785-0,789 | 0,79 | 0,787-0,791 | 0,27 |
| Elongacija | 0,31 | 0,305-0,311 | 0,31 | 0,30-0,31 | 0,8 |
| Pravilnost | 0,94 | 0,941-0,944 | 0,94 | 0,94-0,95 | 0,26 |

Eliptičnost = duljina / širina

Naboranost = $[4\pi \times \text{površina} / \text{opseg}^2]$

Elongacija = $[(\text{duljina} - \text{širina}) / (\text{duljina} + \text{širina})]$

Pravilnost = $[\pi \times \text{duljina} \times \text{širina} / 4 \times \text{površina}]$

Tablica 6. Deskriptivni pokazatelji morfolometrijskih osobitosti spojnog dijela repa i repa spermija nerasta između kontrolne i pokusne skupine

| MORFOMETRIJSKI POKAZATELJI SPERMIJA | SKUPINA | | | | P vrijednost | |
|---|--|-----------------------------|-----------------------|-----------------------------|-----------------|------|
| | KONTROLNA | | POKUSNA | | | |
| | Srednja vrijednost | 95% Interval pouzdanosti | Srednja vrijednost | 95% Interval pouzdanosti | | |
| Morfometrijski pokazatelji spojnog dijela repa i repa | Površina spojnog dijela (μm^2) | 19,42 | 19,29-19,55 | 19,48 | 19,35-19,60 | 0,52 |
| | Opseg spojnog dijela (μm) | 30,44 | 30,32-30,56 | 30,35 | 30,23-30,46 | 0,27 |
| | Minimalni polumjer spojnog dijela (μm) | 0,39 | 0,37-0,39 | 0,39 | 0,38-0,40 | 0,66 |
| | Maksimalni polumjer spojnog dijela (μm) | 6,78 | 6,75-6,81 | 6,76 | 6,73-6,78 | 0,25 |
| | Ispupčenost spojnog dijela (μm) | 24,58 | 24,32-24,84 | 24,92 | 24,67-25,18 | 0,06 |
| | Duljina spojnog dijela (μm) | 13,25 | 13,19-13,30 | 13,2 | 13,15-13,26 | 0,27 |
| | Širina spojnog dijela (μm) | 2,05 | 2,03-2,08 | 2,08 | 2,05-2,11 | 0,21 |
| | Duljina repa (μm) | 34,05 | 33,84-34,26 | 33,92 | 33,71-34,12 | 0,37 |

Tablica 7. Deskriptivni pokazatelji različitih morfometrijskih osobitosti glave i repa spermija nerasta između pokusne i kontrolne skupine

| MORFOMETRIJSKI POKAZATELJI SPERMIJA | SKUPINA | | | | P vrijednost |
|--|-----------------------|-----------------------------|-----------------------|-----------------------------|-----------------|
| | KONTROLNA | | POKUSNA | | |
| | Srednja vrijednost | 95% Interval pouzdanosti | Srednja vrijednost | 95% Interval pouzdanosti | |
| Ukupna duljina | 44,36 | 44,13-44,59 | 44,22 | 43,99-44,45 | 0,4 |
| Duljina glave / Ukupna duljina | 0,23 | 0,232-0,234 | 0,23 | 0,23-0,24 | 0,52 |
| Duljina glave / Duljina repa | 0,31 | 0,30-0,31 | 0,31 | 0,30-0,31 | 0,53 |
| Duljina repa/ Ukupna duljina | 0,77 | 0,766-0,768 | 0,77 | 0,765-0,767 | 0,52 |
| Opseg glave / Ukupna duljina | 0,62 | 0,615-0,621 | 0,62 | 0,616-0,621 | 0,78 |
| Površina glave / Ukupna duljina | 1,06 | 1,05-1,06 | 1,06 | 1,05-1,07 | 0,75 |
| Duljina glave x širina glave / Ukupna duljina | 1,27 | 1,26-1,28 | 1,27 | 1,27-1,28 | 0,53 |

Različiti odnosi morfometrijskih pokazatelja

Ukupna duljina=duljina glave + duljina repa

Gledajući sveukupno sve morfometrijske pokazatelje glave, spojnog dijela i repa spermija između skupina, sva četiri pokazatelja korištenih statističkih multivarijantnih analiza varijance (Wilks' Lambda, Pillai's Trace, Hotelling-Lawley Trace i Roy's Greatest Root) pokazuju statističku značajnost ($P < 0,05$) (Tablica 8).

Tablica 8. Multipla analiza varijance – testni kriterij i egzaktna F statistika za hipotezu da nema ukupnog učinka skupine

| Statistika | Vrijednost | F vrijednost | Broj stupnjeva slobode | P vrijednost |
|------------------------|------------|--------------|------------------------|--------------|
| Wilks' Lambda | 0.9754 | 1,75 | 24 | 0,0134 |
| Pillai's Trace | 0.0246 | 1,75 | 24 | 0,0134 |
| Hotelling-Lawley Trace | 0.0253 | 1,75 | 24 | 0,0134 |
| Roy's Greatest Root | 0.0253 | 1,75 | 24 | 0,0134 |

4.2. Subpopulacije spermija na osnovu morfometrijskih pokazatelja glave i repa spermija

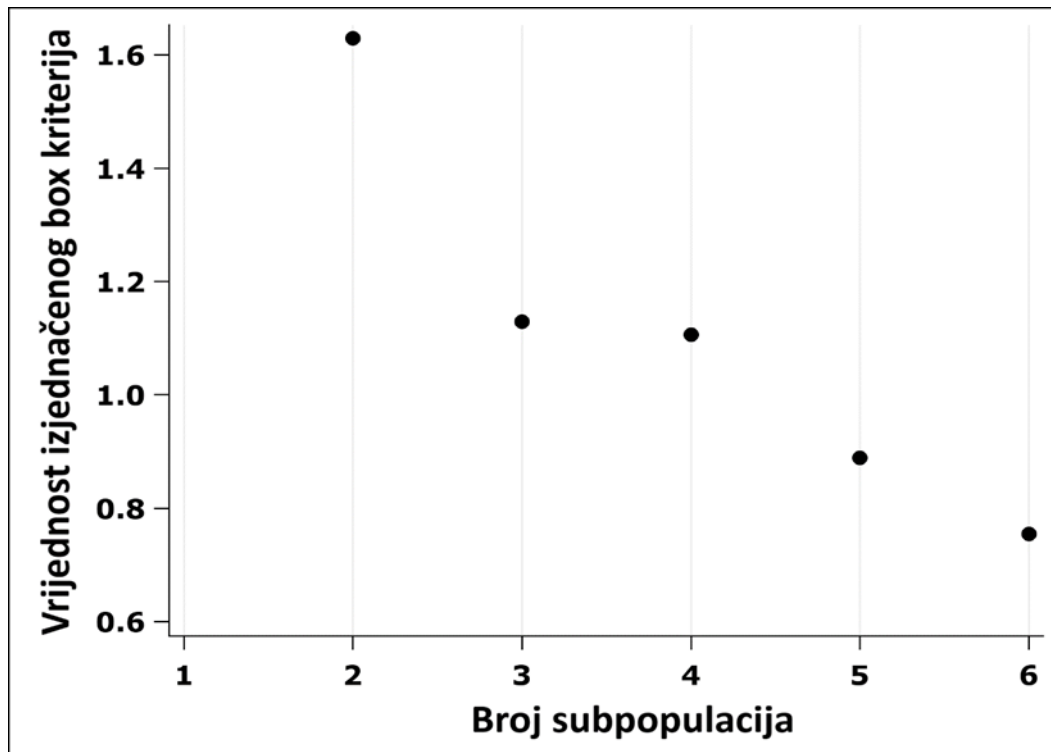
Analizom glavnih komponenata prije grupiranja zadržane su 4 komponente (faktor 1, 2, 3 i 4) s karakterističnom vrijednosti ($\lambda \geq 1$). Sve 4 komponente ukupno objašnjavaju 84,6 % varijance morfometrijskih pokazatelja glave, spojnog dijela i repa spermija (Tablica 9).

Tablica 9. Karakteristične vrijednosti (eigenvalues) morfometrijskih pokazatelja glave i repa spermija u analizi glavnih komponentata. Zadržane su četiri komponente (faktor 1, 2, 3, 4) s karakterističnim korijenom $\lambda \geq 1$ - Kaiserov kriterij.

| Parametri spermija | Faktor 1 | Faktor 2 | Faktor 3 | Faktor 4 |
|--|-------------|-------------|-------------|------------|
| Duljina glave | 0,93* | | | |
| Širina glave | | 0,97* | | |
| Površina glave | 0,62 | | | |
| Opseg glave | 0,83 | | | |
| Eliptičnost | 0,72 | | | |
| Naboranost | -0,69 | | | |
| Elongacija | 0,72 | | | |
| Pravilnost | | | | 0,89* |
| Duljina spojnog dijela | | | 0,70 | |
| Širina spojnog dijela | | 0,39 | | |
| Površina spojnog dijela | | 0,65 | | |
| Opseg spojnog dijela | | | 0,72* | |
| Duljina repa | 0,39 | | | |
| Karakteristični korijen (λ) i objašnjena varijanca (%) | 4,78 (36,8) | 3,66 (28,2) | 1,53 (11,8) | 1,01 (7,8) |

* Najvažniji pokazatelji za svaki faktor

Iz prethodne tablice iz svake komponente odabran je najvažniji pokazatelj (duljina glave, širina glave, opseg spojnog dijela repa i pravilnost glave spermija). Konačan broj subpopulacija dobiven je pomoću vrijednosti „izjednačenog box kriterija“. Ovom analizom je utvrđeno da su dvije subpopulacije najoptimalnije jer je vrijednost „izjednačenog box kriterija“ najveća (Slika 10.).



Slika 10. Dvije subpopulacije spermija nerasta. Na slici je vidljivo da su pomoću vrijednosti izjednačenog box kriterija dobivene dvije optimalne subpopulacije.

Analizom grupiranja dobivene su dobro definirane razlike između duljine, širine i pravilnosti glave te opsega spojnog dijela repa u dvije subpopulacije spermija (S1 subpopulacija – spermiji manje duljine i pravilnijeg oblika glave te manjeg opsega spojnog dijela repa te S2 subpopulacija – spermiji veće duljine i izduljenijeg oblika glave te većeg opsega spojnog dijela repa) (Tablica 10).

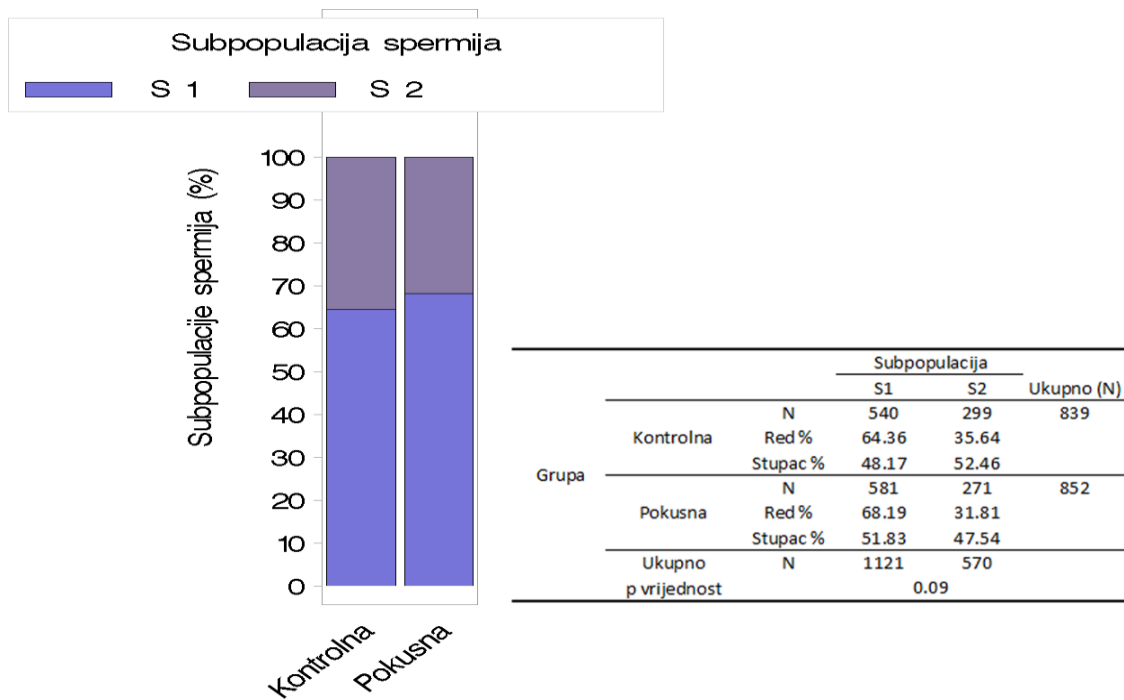
Tablica 10. Subpopulacije spermija nerasta (S1 – S2) dobivene pomoću analize grupiranja morfometrijskih pokazatelja glave i spojnog dijela spermija (podaci su izraženi kao srednja vrijednost i standardna devijacija).

| Subpopulacije spermija | Pokazatelji glave i spojnog dijela spermija | | | | |
|------------------------|---|--------------------|-------------------|---------------------------|------------|
| | N % | Duljina glave (µm) | Širina glave (µm) | Opseg spojnog dijela (µm) | Pravilnost |
| S1 | 942 (55,71) | 10,16±0,65 | 5,44±0,38 | 29,67±1,17 | 0,943±0,02 |
| S2 | 749 (44,29) | 10,77±0,68 | 5,45±0,35 | 32,66±1,09 | 0,941±0,02 |

S1 - Spermiji manje duljine i pravilnijeg oblika glave te manjeg opsega spojnog dijela repa

S2 - Spermiji veće duljine i izduljenijeg oblika glave te većeg opsega spojnog dijela repa

Statističkom analizom dobivenih subpopulacija između kontrolne i pokusne skupine spermija ustanovljeno je da je pokusna skupina imala nešto veći postotak spermija S1 subpopulacije (68,2% vs 64,4%) te manji postotak poželjnije S2 subpopulacije (31,8% vs 35,6%) što je blizu statističke značajnost ($P=0,09$) (Slika 11).



Slika 11. Udio subpopulacija spermija između kontrolne i pokusne skupine. Na slici je vidljivo da pokusna skupina ima veći postotak spermija S1 subpopulacije (68,2% vs 64,4%), a manji postotak poželjnije S2 subpopulacije (31,8 vs 35,6%) što je blizu statističke značajnost (P=0,09).

5. RASPRAVA

Rezultati ovog istraživanja pokazali su da izlaganje sperme rasplodnih nerasta *in vitro* RF-EMZ na frekvenciji od 2500 MHz i jakosti električnog polja od 10 V/m u trajanju od 2 sata ne uzrokuje morfometrijske promjene spermija i gibljivost spermija, dok nasuprot tomu uzrokuje statistički značajno smanjenu progresivnu gibljivost spermija.

Premda je poznato da RF-EMZ štetno utječe na reproduktivni sustav, odnosno smanjuje broj Leydigovih stanica, smanjuje gibljivost i broj spermija te mijenja morfologiju spermija u ljudi i životinja (AGARWAL i sur., 2008.; DE IULIIS i sur., 2009.; AGARWAL i sur., 2011.; SAYGIN i sur., 2011.; GYE i PARK, 2012.; AL-BAYYARI, 2017.; KIVRAK i sur., 2017.), rezultati dobiveni u ovom radu teško su usporedivi s njima. Razlog tomu je, prije svega, primjena različitih dizajna (protokola) tijekom izvođenja eksperimenta, različitih vrsta i dobi životinja te upotrebe različitih metoda analize. Tako, primjerice, WYSOKIŃSKA i sur. (2009.) su na uzorcima spermija prikupljenih od 35 nerasta pasmine poljskog landrasa u dobi od 7 do 8 mjeseci koristeći Bydgosku metodu bojanja prema KONDRACKI i sur. (2006.) proveli morfometrijsku analizu spermija pomoću paketa za kompjutersku analizu slike (Screen Measurement v. 4.1, Laboratory Imaging S.r.o. LIM Republika Češka, Prag) te su pokazali manju izmjerenu srednju vrijednost za duljinu, širinu, površinu i opseg glave spermija te veću srednju vrijednost za ukupnu duljinu spermija kao i duljinu repa spermija u odnosu na dobivene rezultate kontrolne skupine ovog istraživanja (podebljane vrijednosti): duljina glave 9,07-9,27 vs. **10,31** (μm), širina glave 4,67-4,75 vs. **5,45** (μm), površina glave 39,94-41,53 vs. **46,79** (μm^2), opseg glave 23,36-23,79 vs. **27,31** (μm), duljina repa 44,92-45,71 vs. **34,05** (μm) te ukupna duljina 54,01-54,98 vs. **44,36** (μm). Obzirom da je u ovom istraživanju za provedbu morfometrijske analize korišten kompjuterski program naziva SFORM (VAMSTEC, Zagreb, Hrvatska) o kojem u dostupnoj literaturi nema podataka o korištenju u svrhu morfometrijske analize spermija nerasta, moguće je da je razlici u navedenim vrijednostima doprinijela razlika u programima za morfometrijsku analizu kao i razlike u metodama bojenja, dobi te pasmini nerasta.

Nadalje, GÓRSKI i sur. (2017.) također su pokazali manju srednju vrijednost za duljinu, širinu, površinu i opseg glave spermija te veću srednju vrijednost za ukupnu duljinu spermija i duljinu repa spermija nerasta u odnosu na dobivene rezultate kontrolne skupine ovog istraživanja (podebljane vrijednosti): duljina glave 9,30-9,39 vs. **10,31** (μm), širina glave 4,66-4,74 vs. **5,45** (μm), opseg glave 23,72-23,90 vs. **27,31** (μm), površina glave 40,03-40,43 vs.

46,79 (μm^2), duljina repa 44,13-44,86 vs. **34,05** (μm) te ukupna duljina 53,49-54,16 vs. **44,36** (μm). Navedeni autori u svom istraživanju proveli su morfometrijsku analizu spermija na uzorcima ejakulata prikupljenih od 12 nerasta pasmine Duroc, obojanih metodom prema KONDRACKI i sur. (2005.), koristeći računalni sustav za analizu slike Screen Measurement v. 4.1. u svrhu morfometrijskih mjerenja spermija te su podaci bili analizirani pomoću Statistica 10 PL (StatSoft, SAD). Uzrok razlikama dobivenih rezultata naše kontrolne skupine spermija i rezultata istraživanja opisanih autora teško je reći. No, jedan od razloga može svakako biti razlika u metodi bojenja, pasmini životinja te korištenoj metodi analize.

Rezultati progresivne gibljivosti spermija u ovom radu tj. nakon izlaganja ejakulata nerasta *in vitro* RF-EMZ na frekvenciji od 2500 MHz pokazali su statistički značajan pad. U skladu s ovim rezultatima donekle su i rezultati istraživanja MAILANKOT i sur. (2009.). Oni su, naime, pokazali da ozračivanje štakora RF-EMZ 1 h dnevno tijekom 28 dana na frekvenciji od 900 i 1800 MHz podrijetlom od mobilnih uređaja uzrokuje pad broja gibljivih spermija kao i smanjenu progresivnu gibljivost spermija. Nadalje, ONI i sur. (2011.) i GORPINCHENKO i sur. (2014.) istražujući pak učinak elektromagnetskog zračenja na frekvenciji mobilne telekomunikacije (900/1800 MHz) i prijenosnog računala (2,45 GHz) na *in vitro* uzorcima ljudskog sjemena, pokazali su da ozračivanje navedenim frekvencijama također smanjuje broj gibljivih te progresivno gibljivih spermija.

S druge pak strane, postoje rezultati istraživanja koji ne pokazuju promjenu gibljivost spermija nakon dugotrajnog izlaganja RF-EMZ frekvencije 2,4 GHz-a (DASDAG i sur., 2015.).

Rezultati načinjenog pokusa pokazali su da radiofrekvencijsko zračenje na frekvenciji od 2500 MHz-a mogao bi negativno utjecati i na uspješnost oplodnje. Navedenu pretpostavku temeljim na dobivenim postocima subpopulacije spermija nakon izlaganja RF-EMZ-u. Naime, analizom grupiranja obivenih morfometrijskih pokazatelja spermija utvrđene su dvije subpopulacije spermija te je ustanovljeno da je pokusna skupina imala veći postotak nepoželjnije subpopulacije koje karakteriziraju spermiji manje duljine i pravilnijeg oblika glave te manjeg opsega spojnog dijela repa (S1 subpopulacija) u odnosu na poželjniju (S2 subpopulaciju) koju karakteriziraju spermiji veće duljine i izduljenijeg oblika glave te većeg opsega spojnog dijela repa. S obzirom da u dostupnoj literaturi ne postoje istraživanja o utjecaju RF-EMZ-a na subpopulacija spermija nerasta dobivene prema morfometrijskim pokazateljima te su generalno istraživanja na temu morfometrije spermija nerasta oskuda, nije moguća

usporedba dobivenih rezultata. Međutim, BARQUERO i sur. (2021.) istražujući morfometriju spermija nerasta bez izlaganja RF-EMZ-u, su pomoću analize glavnih komponenti i klaster analize ustanovili četiri subpopulacije spermija.

Mehanizam koji dovodi do smanjenja gibljivosti spermija nakon izlaganja sperme RF-EMZ-u je narušena vitalnosti spermija, odnosno sniženi potencijal mitohondrija ili oksidativni stres (DE IULIIS i sur. 2009.; GHANBARI i sur., 2013.). Naime, rezultati brojnih istraživanja o utjecaju RF-EMZ, koji se, doduše, ne odnose na neraste, ukazuju da elektromagnetsko zračenje na frekvenciji mobilne telefonije može uzrokovati nastanak reaktivnih kisikovih spojeva te time i oksidacijski stres. Naime, poznato je da je u aerobnih organizama za oksidativno-redukcijsku ravnotežu potrebna ravnoteža antioksidativnih procesa i nastalih reaktivnih spojeva jer u suprotnom, pri oksidacijskom stresu višak reaktivnih kisikovih spojeva dovodi do oštećenja brojnih molekula. U skladu s ovim rezultatima donekle su i rezultati istraživanja KUMAR i sur. (2011.) i MEENA i sur. (2014.). Oni su, naime, pokazali da ozračivanje štakora RF-EMZ frekvencijama od 2,45 GHz-a i 10 GHz-a 2 sata na dan tijekom 45 dana dovodi do oštećenja stanica posredovanog oksidativnim stresom, odnosno uzrokuje povećanje koncentracije reaktivnih kisikovih spojeva, povećanje postotka apoptoze u testisima i spermatozoida te uzrokuje oštećenje DNK-a.

Prema tome, može se pretpostaviti da radiofrekventijsko elektromagnetsko zračenje na frekvenciji od 2500 MHz tijekom izloženosti u trajanju od 2 sata, negativno utječe na morfometrijske pokazatelje spermija, gibljivost spermija te samim time i na uspješnost oplodnje. No, bitno je naglasiti da su daljnja istraživanja o učinku RF-EMZ na različite pasmine nerasta, kao i na različite životinjske vrste, posebno domaće životinje, od iznimne važnosti kako za kvalitetu sjemena i oplodnje, tako i za daljnju proizvodnju te uzgoj domaćih životinja.

6.ZAKLJUČCI

Na temelju dobivenih rezultata dobiveni su sljedeći zaključci:

1. Radiofrekvencijsko elektromagnetsko zračenje frekvencije od 2500 MHz tijekom 2 sata ne uzrokuje statistički značajne promjene morfoloških pokazatelja spermija nerasta.

2. Radiofrekvencijsko elektromagnetsko zračenje frekvencije od 2500 MHz tijekom 2 sata ne utječe na gibljivost spermija, dok statistički značajno smanjuje progresivnu gibljivost spermija.

3. Na temelju primjenjene analitičke metode grupiranja dobivene su dvije subpopulacije spermija i u kontrolnoj i u pokusnoj skupini.

4. Iako nema statistički značajne razlike u postotku subpopulacija spermija između kontrolne i pokusne skupine, pokusna skupina pokazala je ipak nešto veći postotak spermija S1 subpopulacije, a manji postotak S2 subpopulacije.

7.LITERATURA

1. AGARWAL, A., A. SINGH, A. HAMADA, K. KESARI (2011): Cell phones and male infertility: a review of recent innovations in technology and consequences. *Int. Braz. J. Urol.* 37, 432–454.
2. AGARWAL, A., F. DEEPINDER, R. SHARMA, G. RANGA, J. LI (2008): Effect of cell phone usage on semen analysis in men attending infertility clinic: an observational study. *Fertil. Steril.* 89, 124–128.
3. AL-AKHRAS, M.A., A. ELBETIEHA, M.K. HASAN, I. AL-OMARI, H. DARMANI, B. ALBISS (2001): Effects of extremely low frequency magnetic field on fertility of adult male and female rats. *Bioelectromagnetics* 22, 340–344.
4. AL-AKHRAS, M., H. DARMANI, A. ELBETIEHA (2006): Influence of 50 Hz magnetic field on sex hormones and other fertility parameters of adult male rats. *Bioelectromagnetics* 27, 127-131.
5. ANONYMUS (2019): Pravilnik o izmjenama i dopunama pravilnika o zaštiti od elektromagnetskih polja (Narodne novine 31/2019).
6. AL-BAYYARI, N. (2017): The effect of cell phone usage on semen quality and fertility among Jordanian males. *Middle East Fertil. Soc. J.* 22, 178 – 182.
7. ATASOY, H.I., M.Y. GUNAL, P. ATASOY, S. ELGUN, G. BUGDAYCI (2013): Immunohistopathologic demonstration of deleterious effects on growing rat testes of radiofrequency waves emitted from conventional Wi-Fi devices. *J. Pediatr. Urol.* 9, 223-229.
8. AVENDAN˜O, C., A. MATA, C.A. SANCHEZ SARMIENTO, G.F. DONCEL (2012): Use of laptop computers connected to internet through Wi-Fi decreases human sperm motility and increases sperm DNA fragmentation. *Fertil. Steril.* 97, 39-45.
9. BADIA, E. (2003): Estudi Estructural, Ultraestructural I Histoquímic de les Glàndules Sexuals Accessòries del Mascle Reproductor Porcí. Doctoral Thesis. Ed Universitat de Girona, Girona, España.
10. BALZANO, Q. (1999): Exposure metrics for RF epidemiology: cellular phone handsets. *Radiat. Prot. Dosim.* 83, 165–169.
11. BANASZEWSKA, D., K. ANDRASZEK (2021): Assessment of the morphometry of heads of normal sperm and sperm with the Dag defect in the semen of Duroc boars. *J. Vet. Res.* 65, 239-244.

12. BARBERÁ, A., E.G. SÁNCHEZ, Z. SALVADOR, S. FERNÁNDEZ (2018): What's the Function of a Sperm Cell? – Definition & Structure. inviTRA. <https://www.invitra.com/en/sperm-cell/>, 28.1.2022.
13. BARQUERO, V., E. R. S. ROLDAN, C. SOLER, J. L. YÁNIZ, M. CAMACHO, A. VALVERDE (2021): Predictive Capacity of Boar Sperm Morphometry and Morphometric Sub-Populations on Reproductive Success after Artificial Insemination. *Animals* 11, 920, 1-15.
14. BOERSMA, A., R. RASSHOFER, R. STOLLA (2001): Influence of sample preparation, staining procedure and analysis conditions on bull sperm head morphometry using the morphology analyser integrated visual optical system. *Reprod. Domest. Anim.* 36, 222–229.
15. BONDE, J.P., A. GIWERCMAN, E. ERNST (1996): Identifying environmental risk to male reproductive function by occupational sperm studies: logistics and design options. *Occup. Environ. Med.* 53, 511-519.
16. BONET, S., E. GARCIA, L. SEPÚLVEDA (2013): The Boar Reproductive System. In: *Boar Reproduction*. (Bonet, S., I. Casas, W. Holt, M. Yeste, Eds.), Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 65-107.
17. BORTKIEWICZ, A. (2001): A study on the biological effects of exposure mobile-phone frequency EMF. *Med. Pr.* 52, 101–106.
18. BUTKOVIĆ, I. (2021): Učinak radiofrekvencijskog elektromagnetskog zračenja na pokazatelje kakvoće, antioksidacijski status i oštećenje DNK-a in vitro ozračenog sjemena rasplodnih nerasta. Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, Hrvatska.
19. CASEY, P.J., C.G. GRAVANCE, R.O. DAVIS, D.D. CHABOT, I.K.M. LIU (1997): Morphometric differences in sperm head dimensions of fertile and subfertile stallions. *Theriogenology* 47, 575-582.
20. CERGO LJ, M., M. SAMARDŽIJA (2006): Veterinarska andrologija. Veterinarski fakultet. Zagreb.
21. CHALLIS, L.J. (2005): Mechanisms for Interaction Between RF Fields and Biological Tissue. *Bioelectromagnetics* 7, 98-106.
22. CIANI, E., T. M. HAUG, G. MAUGARS, F.A. WELTZIEN, J.FALCÓN, R. FONTAINE (2021): Effects of Melatonin on Anterior Pituitary Plasticity: A Comparison Between Mammals and Teleosts. *Front. Endocrinol.* 11, 1-20.

23. COETZEE, K., T.F. KRUGER, C.J. LOMBARD (1998): Predictive value of normal sperm morphology: a structured literature review. *Hum. Reprod. Update* 4, 73–82.
24. DASDAG, S., M. TAŞ, M. ZULKUF AKDAG, K. YEGIN (2015): Effect of long-term exposure of 2.4 GHz radiofrequency radiation emitted from Wi-Fi equipment on testes functions. *Electromagn. Biol. Med.* 34, 37–42.
25. DAVIS, R.O., C.G. GRAVANCE (1993): Standardization of specimen preparation, staining, and sampling methods improves automated sperm-head morphometry analysis. *Fertil. Steril.* 59, 412–417.
26. DAVIS, R.O., D.E. BAIN, R.J. SIEMERS, D.M. THAL, J.B. ANDREW, C.G. GRAVANCE (1992): Accuracy and precision of the CellForm-Human Automated sperm morphometry instrument. *Fertil. Steril.* 58, 763–769.
27. DE IULIIS, G.N., B.V. KING, R.J. AITKEN (2012): Electromagnetic radiation and oxidative stress in the male germ line. In: *Studies on Men's Health and Fertility, Oxidative Stress, Oxidative Stress in Applied Basic Research and Clinical Practice.* (Agarwal, A., R. Aitken, J. Alvarez Eds.), Humana Press, pp. 3-20.
28. DE IULIIS, G. N., R. J. NEWAY, B. V. KING, R. J. AITKEN (2009): Mobile Phone Radiation Induces Reactive Oxygen Species Production and DNA Damage in Human Spermatozoa In Vitro. *PLoS One* 4, 1 – 9.
29. DURNEY, C., H. MASSOUDI, M.F. ISKANDER (1986): Some Basics of Electromagnetics. In: *Radiofrequency Radiation Dosimetry Handbook.* 4th ed. (Durney, C., H. Massoudi, M.F. Iskander, Eds.), The University of Utah, Salt Lake City, pp. 19-70.
30. EROGUL, O., E. OZTAS, I. YILDIRIM, T. KIR, E. AYDUR, G. KOMESLI, H.C. IRKILATA, M.K. IRMAK, A.F. PEKER (2006): Effects of electromagnetic radiation from a cellular phone on human sperm motility: an in vitro study. *Arch. Med. Res.* 37, 840-843.
31. FALZONE, N., C. HUYSER, P. BECKER, D. LESZCZYNSKI, D.R. FRANKEN (2011): The effect of pulsed 900–MHz GSM mobile phone radiation on the acrosome reaction, head morphometry and zona binding of human spermatozoa. *Int. J. Androl.* 34, 20–26.
32. FERNIE, K.J., D.M. BIRD, R.D. DAWSON, P.C. LAGUE (2000): Effects of electromagnetic fields on the reproductive success of American Kestrels. *Physiol. Biochem. Zool.* 73, 60–65.

33. FORGACS, Z., Z. SOMOSY, G. KUBINYI, J. BAKOS, A. HUDAK, A. SURJAN, G. THUROCZY (2006): Effect of whole-body 1800 MHz GSM-like microwave exposure on testicular steroidogenesis and histology in mice. *Reprod. Toxicol.* 22, 111–117.
34. GAGO, C., F. PE´REZ-SA´NCHEZ, C.H. YEUNG, L. TABLADO, T.G. COOPER, C. SOLER (1998): Standardization of sampling and staining methods for the morphometric evaluation of sperm heads in the cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) using computer-assisted image analysis. *Int. J. Androl.* 21, 169–176.
35. GARCIA-GIL, N. (2002): Estructura I Ultraestructura Testicular del Mascle Reproductor Porcí. Doctoral Thesis. Ed Universitat de Girona, Girona, España.
36. GARCÍA-HERREROS, M., I. M. APARICIO, F. J. BARÓN, L. J. GARCÍA-MARÍN, M. C. GIL (2006): Standardization of sample preparation, staining and sampling methods for automated sperm head morphometry analysis of boar spermatozoa. *Int. J. Androl.* 29, 553-563.
37. GHANBARI, M., S. B. MORTAZAVI, A. KHAVANIN, M. KHAZAEI (2013): The Effects of Cell Phone Waves (900 MHz-GSM Band) on Sperm Parameters and Total Antioxidant Capacity in Rats. *Int. J. Fertil. Steril.* 7, 21–28.
38. GORPINCHENKO, I., O. NIKITIN, O. BANYRA, A. SHULYAK (2014): The influence of direct mobile phone radiation on sperm quality. *Cent. European J. Urol.* 67, 65–71.
39. GÓRSKI, K., S. KONDRACKI, A. WYSOKIŃSKA (2017): Ejaculate traits and sperm morphology depending on ejaculate volume in Duroc boars. *J. Vet. Res.* 61, 121-125.
40. GRAVANCE, C. G., K.M. LEWIS, P.J. CASEY (1995): Computer automated sperm head morphometry analysis (ASMA) of goat spermatozoa. *Theriogenology* 44, 989–1002.
41. GRAVANCE, C. G., R. VISHWANATH, C. PITT, P.J. CASEY (1996): Computer automated morphometric analysis of bull sperm heads. *Theriogenology* 46, 1205–1215.
42. GUTSCHI, T., B. MOHAMAD AL-ALI, R. SHAMLOUL, K. PUMMER, H. TRUMMER (2011): Impact of cell phone use on men's semen parameters. *Andrologia* 43, 312-316.
43. GUYTON, A. C., J. E. HALL (2012): Reprodukcijske i hormonske funkcije u muškaraca; funkcija epifize. U: *Medicinska fiziologija*. (Guyton, A. C., J. E. Hall, Eds.), Medicinska naklada, Zagreb, str. 973-985.
44. GYE, M. C., C. J. PARK (2012): Effect of electromagnetic field exposure on the reproductive system. *Clin. Exp. Reprod. Med.* 39, 1-9.

45. HAFEZ, E.S.E. (2000): Anatomy of Male Reproduction. In: Reproduction in farm animals. (Hafez, E.S.E., B. Hafez, Eds.), Lippincott Williams & Wilkins, Kiawah Island, South Carolina, pp. 3-12.
46. HAFEZ, E.S.E., M.R. JAINUDEEN, AND Y. ROSNINA (2000): Hormones, Growth Factors, Reproduction. In: Reproduction in farm animals. (Hafez, E.S.E., B. Hafez, Eds.), Lippincott Williams & Wilkins, Kiawah Island, South Carolina, pp. 33-54.
47. HIDALGO, M., I. RODRI'GUEZ, J. DORADO, C. SOLER (2005): Effect of sample size and staining methods on stallion sperm morphometry by the Sperm Class Analyzer. *Vet. Med.* 50, 24–32.
48. HIDALGO, M., I. RODRI'GUEZ, J. DORADO (2006): Influence of staining and sampling procedures on goat sperm morphometry using the Sperm Class Analyzer. *Theriogenology* 66, 996–1003.
49. IARC MONOGRAPHS (The International Agency for Research on Cancer) (2013): Exposure data. In: Non-Ionizing Radiation, Part 2: Radiofrequency Electromagnetic Fields. International Agency for Research on Cancer, Lyon, 102, pp. 37-127.
50. ITU (International Telecommunication Union) (2008): Radio Regulations. International Telecommunication Union. Volume 1, pp. 1-429.
51. JACKSON, F. L., J. J. HEINDEL, J. P. PRESLOCK, A. S. BERKOWITZ (1984): Alterations in hypothalamic content of luteinizing hormone-releasing hormone associated with pineal mediated testicular regression in the golden hamster. *Biol. Reprod.* 31, 436–445.
52. JAGOE, J. R., N. P. WASBROOK, L. PRATSIK, E. A. HUDSON (1987): Sperm morphology by image analysis compared with subjective assessments. *Brit. J. Urol.* 60, 457–462.
53. JEQUIER, A. M., E. B. UKOMBE (1983): Errors inherent in the performance of routine semen analysis. *Brit. J. Urol.* 55, 434–436.
54. KATO, M., K. HONMA, T. SHIGEMITSU, Y. SHIGA (1993): Effects of exposure to a circularly polarized 50-Hz magnetic field on plasma and pineal melatonin levels in rats. *Bioelectromagnetics* 14, 97-106.
55. KATZ, D. F., J. W. OVERSTREET, S. J. SAMUELS, P. W. NISWANDER, T. D. BLOOM, E. L. LEWIS (1986): Morphometric analysis of spermatozoa in the assessment of human male fertility. *J. Androl.* 7, 203–210.
56. KELL, C. A., J. H. STEHLE (2005): Just the two of us: Melatonin and adenosine in rodent pituitary function. *Ann. Med.* 37, 105–120.

57. KESARI, K. K., A. AGARWAL, R. HENKEL (2018): Radiations and male fertility. *Reprod. Biol. Endocrin.* 16, 118, 1-16.
58. KESARI, K. K., J. BEHARI (2010): Effects of microwave at 2.45 GHz radiations on reproductive system of male rats. *Toxicol. Environ. Chem.* 92, 1135–1147.
59. KITCHEN, R. (2001): Effects of radio frequency radiation. In: *RF and Microwave Radiation Safety Handbook*. (Kitchen, R., Eds.), Newnes, Oxford, pp. 64-65.
60. KIVRAK, E. G., K. K. YURT, A. A. KAPLAN, I. ALKAN, G. ALTUN (2017): Effects of electromagnetic fields exposure on the antioxidant defense system. *J. Microsc. Ultrastruct.* 5, 167 – 176.
61. KNOX, R. V. (2001): *The Anatomy & Physiology of Sperm Production in Boars*. Dostupno na: http://www.ansci.wisc.edu/jjp1/pig_case/html/library/boara&p.pdf (Pristupljeno 1.1.2022.)
62. KONDRACKI, S., D. BANASZEWSKA, A. WYSOKIŃSKA, A. SADOWSKA (2006): Ejaculate traits and spermatozoa morphology as related to spermatozoa concentration in ejaculates of Polish Large White boars. *Anim. Sci. Pap. Rep.* 24, 111-119.
63. KONDRACKI, S., D. BANASZEWSKA, C. MIELNICKA (2005): The effect of age on the morphometric sperm traits of domestic pigs (*Sus scrofa domestica*). *Cell. Mol. Biol. Lett.* 10, 3–13.
64. KRAUSE, W., G. VIETHEN (1999): Quality assessment of computer-assisted semen analysis (CASA) in the andrology laboratory. *Andrologia* 31, 125-129.
65. KUMAR, S., K. K. KESARI, J. BEHARI (2011): Influence of microwave exposure on fertility of male rats. *Fertil. Steril.* 95, 1500-1502.
66. ŁĄCKA, K., S. KONDRACKI, M. IWANINA, A. WYSOKIŃSKA (2016): Assessment of stallion semen morphology using two different staining methods, microscopic techniques, and sample sizes. *J. Vet. Res.* 60, 99-104.
67. LEE, H. J., J. K. PACK, T. H. KIM, N. KIM, S. Y. CHOI, J. S. LEE, S. H. KIM, Y. S. LEE (2010): The lack of histological changes of CDMA cellular phone-based radio frequency on rat testis. *Bioelectromagnetics* 31, 528-534.
68. LI, D. K., B. YAN, Z. LI, E. GAO, M. MIAO, D. GONG, X. WENG, J. R. FERBER, W. YUAN (2010): Exposure to magnetic fields and the risk of poor sperm quality. *Reprod. Toxicol.* 29, 86–92.
69. LIU, Y., W. LIU, K. J. LIU, L. AO, J. L. ZHONG, J. CAO, J. Y. LIU (2015): Effect of 50Hz Extremely Low-Frequency Electromagnetic Fields on the DNA Methylation and

- DNA Methyltransferases in Mouse Spermatocyte-Derived Cell Line GC-2. *Biomed. Res. Int.* 2015, 1-10.
70. MAARTENS, P. J., M. FLINT, S. S. DU PLESSIS (2014): Ionizing Radiation. In: *Male Infertility: A Complete Guide to Lifestyle and Environmental Factors.* (Du Plessis, S.S., A. Agarwal, E. S. Sabanegh, Jr., Eds.), Springer, New York, pp. 211-223.
71. MAILANKOT, M., A.P. KUNNATH, H. JAYALEKSHMI, B. KODURU, R. VALSALAN (2009): Radio frequency electromagnetic radiation (RF-EMR) from GSM (0.9/1.8GHz) mobile phones induces oxidative stress and reduces sperm motility in rats. *Clinics* 64, 561–565.
72. MALARIĆ, K., D. ŠIMUNIĆ, R. ZENTNER (2016): *Ekonomija i ekologija radiokomunikacijskih sustava.* Merkur A.B.D., Zagreb.
73. MARKOV, M., Y. GRIGORIEV (2015): Protect children from EMF. *Electromagn. Biol. Med.* 34, 251–256.
74. MARKS, T. A., C. C. RATKE, W. O. ENGLISH (1995): Stray Voltage and developmental, reproductive and other toxicology problems in dogs, cats and cows: a discussion. *Vet. Hum. Toxicol.* 37, 163–172.
75. MAYALL, B. H. (1988): Current Capabilities and Clinical Applications of Image Cytometry. *Cytometry Suppl.* 3, 78-84.
76. MEENA, R., K. KUMARI, J. KUMAR, P. RAJAMANI, H. N. VERMA, K. K. KESARI (2014): Therapeutic approaches of melatonin in microwave radiations-induced oxidative stress-mediated toxicity on male fertility pattern of Wistar rats. *Electromagn. Biol. Med.* 33, 81–91.
77. MENKVELD, R. (2010): Clinical significance of the low normal sperm morphology value as proposed in the 5th WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. *Asian J. Androl.* 12, 47–58.
78. NISBET, H. O., C. NISBET, A. AKAR, M. CEVIK, M. O. KARAYIGIT (2012): Effects of exposure to electromagnetic field (1.8/0.9 GHz) on testicular function and structure in growing rats. *Res. Vet. Sci.* 93, 1001–1005.
79. OMBELET, W., H. POLLET, E. BOSMANS, A. VEREECKEN (1997): Results of a questionnaire on sperm morphology assessment. *Hum. Reprod.* 12, 1015–1020.
80. ONI, O. M., D. B. AMUDA, C. E. GILBERT (2011): Effects of radiofrequency radiation from wifi devices on human ejaculated semen. *IJRRAS* 9, 292-294.

81. OYEWOPO, A. O., S. K. OLANIYI, C. I. OYEWOPO, A. T. JIMOH (2017): Radiofrequency electromagnetic radiation from cell phone causes defective testicular function in male Wistar rats. *Andrologia* 49, 1-6.
82. OZGUNER, I. F., H. DINDAR, A. YAGMURLU, C. SAVAS, I. H. GOKCORA, S. YUCESAN (2002): The effect of electromagnetic field on undescended testis after orchiopexy. *Int. Urol. Nephrol.* 33, 87–93.
83. OZGUNER, M., A. KOYU, G. CESUR, M. URAL, F. OZGUNER, A. GOKCIMEN, N. DELIBAS (2005): Biological and morphological effects on the reproductive organ of rats after exposure to electromagnetic field. *Saudi. Med. J.* 26, 405-410.
84. PEÑA, F. J., F. SARAVIA, M. GARCÍA-HERREROS, I. NÚÑEZMARTÍNEZ, J. A. TAPIA, M. WALLGREN, H. RODRIGUEZ-MARTINEZ, A. JOHANNISSON (2005): Identification of Sperm Morphometric Subpopulations in Two Different Portions of the Boar Ejaculate and Its Relation to Postthaw Quality. *J. Androl.* 26, 716–723.
85. POURLIS, A. F. (2009): Reproductive and developmental effects of EMF in vertebrate animal models. *Pathophysiology* 16, 179–189.
86. RAGO, R., P. SALACONE, L. CAPONECCHIA, A. SEBASTIANELLI, I. MARCUCCI, A. E. CALOGERO, R. CONDORELLI, E. VICARI, G. MORGIA, V. FAVILLA, S. CIMINO, A. F. ARCORIA, S. LA VIGNERA (2013): The semen quality of the mobile phone users. *J. Endocrinol. Invest.* 36, 970-974.
87. RAKIĆ, K. (2018): Učinak egzogenog melatonina na morfometrijske osobitosti spermija jarčeva izvan rasplodne sezone. Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, Hrvatska.
88. RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H., U. KVIST, F. SARAVIA, M. WALLGREN, A. JOHANNISSON, L. SANZ, F. J. PEÑA, E. A. MARTÍNEZ, J. ROCA, J. M. VÁZQUEZ, J. J. CALVETE (2009): The physiological roles of the boar ejaculate. *Soc. Reprod. Fertil. Suppl.* 66, 1-21.
89. RUSSACK, V. (1994): Image Cytometry: Current Applications and Future Trends. *Crit. Rev. Cl. Lab. Sci.* 31, 1-34.
90. SANCHO, S. (2002): Efectes del Fotoperíode sobre la Qualitat Espermàtica de Mascles Porcins *Sus domesticus*. Doctoral Thesis. Ed Universitat de Girona, Girona, España.
91. SANCHO, M., P. PE´REZ-SAN´CHEZ, L. TABLADO, J.J. DE MONSERRAT, C. SOLER (1998): Computer-assisted morphometric analysis of ram sperm heads: evaluation of different fixative techniques. *Theriogenology* 50, 27–37.

92. SAYGIN, M., S. CALISKAN, N. KARAHAN, A. KOYU, N. GUMRAL, A. UGUZ (2011): Testicular apoptosis and histopathological changes induced by a 2.45 GHz electromagnetic field. *Toxicol. Ind. Health.* 27, 455-463.
93. SCENIHR (Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks) (2015): Glossary. In: Potential health effects of exposure to electromagnetic fields (EMF). Scientific Committee, Luxembourg, pp. 230-232.
94. SMITAL, J. (2009): Effects influencing boar semen. *Anim. Reprod. Sci.* 110, 335–346.
95. SOMMER, A. M., K. GROTE, T. REINHARDT, J. STRECKERT, V. HANSEN, A. LERCHL (2009): Effects of radiofrequency electromagnetic fields (UMTS) on reproduction and development of mice: a multi-generation study. *Radiat. Res.* 171, 89–95.
96. VANECEK, J. (1998): Melatonin inhibits release of luteinizing hormone (LH) via decrease of $[Ca^{2+}]_i$ and cyclic AMP. *Physiol. Res.* 47, 329–335.
97. VERSTEGEN, J., M. IGUER-OUADA, K. ONELIN (2002): Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology* 57, 149–179.
98. WANG, S. M., D. W. WANG, R. Y. PENG, Y. B. GAO, Y. YANG, W. H. HU, H. Y. CHEN, Y. R. ZHANG, Y. GAO (2003): Effect of electromagnetic pulse irradiation on structure and function of Leydig cells in mice. *Natl. J. Androl.* 9, 327–330.
99. WADOWIAK, A., A. PAWEŁ, A. MAZUREK, I. B. WADOWIAK (2017): Effect of electromagnetic waves on human reproduction. *Ann. Agric. Environ. Med.* 24, 13–18.
100. WYSOKIŃSKA, A., E. WÓJCIK, A. CHŁOPIK (2021): Evaluation of the Morphometry of Sperm from the Epididymides of Dogs Using Different Staining Methods. *Animals* 11, 227, 1-11.
101. WYSOKIŃSKA, A., S. KONDRACKI, D. BANASZEWSKA (2009): Morphometrical characteristics of spermatozoa in Polish Landrace boars with regard to the number of spermatozoa in an ejaculate. *Reprod. Biology* 9, 271-282.
102. YÁNIZ, J. L., C. SOLER, P. SANTOLARIA (2015): Computer assisted sperm morphometry in mammals: A review. *Anim. Reprod. Sci.* 156, 1–12.
103. YÁNIZ, J. L., S. VICENTE-FIEL, S. CAPISTRÓS, I. PALACÍN, P. SANTOLARIA (2012): Automatic evaluation of ram sperm morphometry. *Theriogenology* 77, 1343–1350.
104. YELLON, S. M. (1994): Acute 60 Hz magnetic field exposure effects on the melatonin rhythm in the pineal gland and circulation of the adult Djungarian hamster. *J. Pineal. Res.* 16, 136–144.

105. YESTE, M. (2008): New insights into boar sperm function and survival from integrated field and laboratory studies. Doctoral Thesis. Ed Universitat de Girona, Girona, España.
106. YILDIRIM, M. E., M. KAYNAR, H. BADEM, M. CAVIS, O. F. KARATAS, E. CIMENTEPE (2015): What is harmful for male fertility: Cell phone or the wireless internet? *Kaohsiung J. Med. Sci.* 31, 480-484.
107. ZAINI, A., M. G. JENNINGS, H. W. G. BAKER (1985): Are conventional sperm morphology and motility assessments of predictive value in subfertile men. *Int. J. Androl.* 8, 427–435.
108. ZAREEN, N. (2009): Testicular morphology: effects of mobile phone induced electromagnetic fields on mice testes. *Professional Med. J.* 16, 289–292.
109. ŽURA ŽAJA, I. (2015): Pokazatelji antioksidacijskoga sustava u sjemenoj plazmi i spermijima rasplodnih nerasta različitih pasmina. Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, Hrvatska.

8. SAŽETAK

UČINAK RADIOFREKVENCIJSKOG ELEKTROMAGNETSKOG ZRAČENJA FREKVENCIJE 2500 MHz NA GIBLJIVOST I MORFOLOGIJU *IN VITRO* OZRAČENOG SJEMENA NERASTA

Radiofrekvencijsko elektromagnetsko zračenje (RF-EMZ) može utjecati na kvalitetu sjemena u ljudi te plodnost. No, rezultati istraživanja RF-EMZ-a na reproduktivni sustav različitih vrsta domaćih životinja, osobito nerasta su vrlo oskudna. Stoga cilj ovog istraživanja bio je utvrditi učinak elektromagnetskog radiofrekvencijskog zračenja frekvencije 2500 MHz-a na *in vitro* ozračene uzorke sjemena rasplodnih nerasta, odnosno na gibljivost spermija te na udio subpopulacija spermija primjenom analize glavnih komponenti i klaster analize prema morfometrijskim pokazateljima glave i repa. Polučivanje ejakulata, odnosno prikupljanje uzoraka izvodilo se metodom manualne fiksacije penisa od sveukupno 12 nerasta te su uzorci sjemena svakog nerasta potom bili raspoređeni u Petrijeve zdjelice na pokusnu i kontrolnu skupinu. Sjeme nerasta ozračeno je u gigahercnoj transverzalnoj elektromagnetskoj (GTEM) komori na frekvenciji od 2500 MHz-a i jakosti električnog polja od 10 V/m u trajanju od dva sata. Nakon ozračivanja, razmazi sjemena obojani su Spermac metodom u svrhu jasnije vizualizacije morfoloških djelova spermija. Morfometrijska analiza provedena je uz pomoć kompjuterskog programa SFORM. Razlika između pojedinačnih morfometrijskih pokazatelja spermija kao i gibljivost spermija pokusne i kontrolne skupine nisu bili statistički značajni. Ipak, uočena je smanjena gibljivost pokusne skupine (74,7 %) u odnosu na kontrolnu skupinu spermija (85,7 %). Progresivna gibljivost spermija je bila statistički značajno smanjena ($p < 0,001$) u pokusnoj skupini spermija (35,0 %) u odnosu na kontrolnu skupinu (60,1 %). Analizom glavne komponente otkrivene su 4 komponente (dužina i širina glave, pravilnost glave te opseg srednjeg dijela), dok su klaster analizom otkrivene 2 subpopulacije spermija (S1 subpopulacija) koju karakteriziraju spermiji manje duljine i pravilnijeg oblika glave te manjeg opsega spojnog dijela repa te (S2 subpopulacija) koju karakteriziraju spermiji veće duljine i izduljenijeg oblika glave te većeg opsega spojnog dijela repa. Pokusna skupina imala je veći udio S1 subpopulacije spermija (51,83 %) u usporedbi sa kontrolnom skupinom (48,7 %), kao i manji udio S2 subpopulacije (47,54 %) naspram kontrolne skupine (52,47 %). Učinak radiofrekvencijskog zračenja frekvencije od 2500 MHz-a može negativno utjecati na gibljivost spermija kao i na uspješnost oplodnje.

Ključne riječi: nerasti, elektromagnetsko radiofrekvencijsko zračenje, morfometrijska analiza, subpopulacije spermija

9. SUMMARY

EFFECT OF RADIO FREQUENCY ELECTROMAGNETIC RADIATION WITH A FREQUENCY OF 2500 MHz ON THE MOBILITY AND MORPHOLOGY OF *IN VITRO* IRRADIATED SEMEN OF BOAR

Radiofrequency electromagnetic radiation (RF-EMZ) can affect semen quality and fertility in humans. However, the results of RF-EMZ research on the reproductive system of different species of domestic animals, especially boars, are very scarce. Therefore, the aim of this study was to investigate the influence of electromagnetic radiofrequency radiation at 2500 MHz on *in vitro* exposed semen samples of breeding boars, *ie* on spermatozoa motility and on the share of spermatozoa subpopulations using principal component and cluster analysis according to morphometric parameters of head and tail. Ejaculation, *ie* collection of samples, was performed by the method of manual fixation of the penis from a total of 12 boars, and semen samples of each boar were then distributed in Petri dishes to the experimental and control groups. Boar semens were irradiated in a gigahertz transverse electromagnetic (GTEM) chamber at a frequency of 2500 MHz and an electric field strength of 10 V / m for two hours. After irradiation, semen smears were stained with the Spermac method for the purpose of clearer visualization of morphological parts of spermatozoa. Morphometric analysis was performed with the computer program SFORM. The difference between individual spermatozoa morphometric parameters as well as spermatozoa motility of the experimental and control groups were not statistically significant. However, reduced motility of the experimental group (74.7%) compared to the control group of spermatozoa (85.7%) was observed. Progressive spermatozoa motility was statistically significantly reduced ($p < 0.001$) in the experimental group of spermatozoa (35.0%) compared to the control group (60.1%). The analysis of the principal component revealed 4 components (head length and width, head regularity and middle circumference), while cluster analysis revealed 2 spermatozoa subpopulations (S1 subpopulation) characterized by spermatozoa of smaller length and more regular head shape and smaller midpiece circumference and (S2 subpopulation) characterized by spermatozoa of longer and more elongated head shape and higher circumference of the spermatozoa midpiece. The experimental group had a higher share of S1 subpopulation of spermatozoa (51.83%) compared to the control group (48.7%), as well as a lower share of S2 subpopulation (47.54%) compared to the control group (52.47%). The effect of radiofrequency

radiation at a frequency of 2500 MHz can negatively affect spermatozoa motility as well as the success of fertilization.

Keywords: boars, electromagnetic radiofrequency radiation, morphometric analysis, spermatozoa subpopulations

10. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 13.11.1996. godine u Zagrebu, Hrvatskoj. Po završetku osnovne škole Luka Sesvete, upisujem opću gimnaziju Tituša Brezovačkog u Zagrebu. Godine 2015. upisujem integrirani preddiplomski i diplomski studij na Veterinarskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Stručnu praksu odradila sam u ambulanti za male životinje u Sesvetama pod nazivom Mala ambulanta.