



УНИВЕРЗИТЕТ У БАЊОЈ ЛУЦИ
UNIVERSITY OF BANJA LUKA

ПОЉОПРИВРЕДНИ ФАКУЛТЕТ
FACULTY OF AGRICULTURE



PROCJENA MORFOLOŠKOG INTEGRITETA SPERMATZOIDA SVJEŽE RAZRIJEĐENOG SJEMENA NERASTA

Master rad

Mentor: Prof. dr Stoja Jotanović

Kandidat: Siniša Mandić

Banja Luka, 2018. godina



УНИВЕРЗИТЕТ У БАЊОЈ ЛУЦИ
UNIVERSITY OF BANJA LUKA

ПОЉОПРИВРЕДНИ ФАКУЛТЕТ
FACULTY OF AGRICULTURE



ASSESSMENT OF THE MORPHOLOGICAL INTEGRITY OF SPERMATOZOA IN FRESH DILUTED BOAR SPERM

MASTER THESIS

Mentor: Stoja Jotanović, PhD, Full Professor

Candidate: Siniša Mandić

Banja Luka, 2018

Komisija za odbranu magistarskog rada:

Prof. dr Stoja Jotanović, redovni profesor,
uža naučna oblast Reprodukција i sterilitet životinja i Stočarstvo,
Univerzitetu Banjoj Luci, Poljoprivredni fakultet, mentor

Doc. dr Đorđe Savić, docent,
uža naučna oblast Anatomija i fiziologija životinja i
Zoohigijena i zdravstvena zaštita životinja,
Univerzitet u Banjoj Luci, Poljoprivredni fakultet, predsjednik

Prof. dr Milenko Šarić, vanredni profesor,
uža naučna oblast Anatomija i fiziologija životinja,
Univerzitet u Banjoj Luci, Poljoprivredni fakultet, član

SADRŽAJ

1.	UVOD	10
2.	PREGLED DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA	13
2.1.	Anatomija polnih organa nerasta	13
2.2.	Uzimanje sperme.....	14
2.3.	Sastav sperme nerasta.....	15
2.4.	Pregled i ocjena kvaliteta ejakulata nerasta	17
2.5.	Formiranje i skladištenje inseminacionih doza.....	21
2.6.	Uloga antibiotika u razrjeđivačima za sjeme nerasta	25
3.	MATERIJAL I METODE RADA	27
3.1.	Materijal rada	27
3.2.	Metode rada	28
3.2.1.	Određivanje koncentracije spermatozoida	28
3.2.2.	Procjena morfološkog integriteta spermatozoida.....	28
3.2.3.	Biometrička analiza.....	29
4.	REZULTATI ISTRAŽIVANJA.....	30
4.1.	Prosječan broj spermatozoida u dozi.....	30
4.2.	Procjena morfološkog integriteta spermatozoida.....	30
5.	DISKUSIJA	39
6.	ZAKLJUČCI.....	45
7.	LITERATURA	47
8.	PRILOZI.....	62

SKRAĆENICE

BSA	Bovine Serum Albumin
BTS	Beltsville Thawing Solution
EDTA	Ethylenediamine-Tetra-Acetic Acid
HOS	Hypoosmotic Swelling Test
HRT	Hyperosmotic Resistance/Swelling Test
ORT	Osmotic Resistance Test
PUFA	Polysaturated Fatty Acids
sHOST	short Hypoosmotic Swelling Test
TRIS	Tris (Hydroxymethyl) Acids
VO	vještačko osjemenjavanje

SAŽETAK

Cilj istraživanja bio je da se ispita koncentracija i morfologija spermatozoida svježe razrijeđenog nerastovskog sjemena sa i bez antibiotskog dodatka razrjeđivaču tokom perioda skladištenja. Ejakulati su uzeti od dva nerasta sa privatne farme. Istraživanje je obuhvatalo ukupno 60 doza svježe razrijeđenog sjemena nerasta i sprovedeno je u Laboratoriji za reprodukciju životinja Poljoprivrednog fakulteta, Univerziteta u Banjoj Luci. U kontrolnoj grupi nerastovsko sjeme je razrijeđeno sa komercijalnim razrjeđivačem (BTS), dok su u oglednoj grupi ejakulati uzimani direktno u dodatak razrjeđivaču, a zatim je razrijeđivan sa komercijalnim razrjeđivačem. U ovom istraživanju korišten je dodatak razrjeđivaču, komercijalnog naziva Dicol (Magapor, Španija), koji u sebi sadrži koktel antibiotika i namijenjen je za očuvanje vijabilnosti sperme kroz duže čuvanje, kao i za spriječavanje razvoja bakterija. Morfologija spermatozoida je ocjenjena pomoću HOS testa, dok je koncentracija spermatozoida određena pomoću standardne metode u Birkerovoj komori. Ispitivanje morfologije spermatozoida vršeno je prvog dana, tj. unutar 24 časa od uzimanja sperme, zatim nakon 72, 120 i 144 časa. Rezultati istraživanja pokazali su da je prosečna koncentracija spermatozoida u dozi iznosila 3×10^9 u kontrolnoj grupi, odnosno $3,4 \times 10^9$ u oglednoj grupi. Pomoću HOS testa dobijeni su rezultati morfološkog integriteta spermatozoida koji pokazuju da je procenat živih spermatozoida u kontrolnoj grupi prema danima skladištenja bio manji (87,7; 81,98; 69,96; 61,38) u odnosu na oglednu grupu (89,83; 86,56; 78,41; 70,55). Procenat spermatozoida sa oštećenom intaktnom membranom bio je veći u kontrolnoj grupi (2,33; 3,56; 6,16; 7,33) u odnosu na oglednu grupu (1,31; 1,81; 3,08; 3,98) tokom svih dana skladištenja. Uočeno je da je procenat spermatozoida uginulih tokom bojenja veći u kontrolnoj grupi (4,71; 6,03; 8,18; 8,05) tokom svih dana skladištenja u odnosu na oglednu grupu (3,51; 4,46; 6,25; 6,71). Prema dobijenim rezultatima procenat mrtvih spermatozoida bio je veći u kontrolnoj grupi (0,81; 1,98; 4,75; 8,20) tokom svih dana, osim prvog dana skladištenja, u odnosu na oglednu grupu (0,86; 1,48; 3,00; 5,90). Procenat abnormalnih spermatozoida bio je veći u kontrolnoj grupi (4,45; 6,43; 10,93; 15,03) tokom svih dana, osim prvog dana skladištenja, u odnosu na oglednu grupu (4,46; 5,66; 9,25; 12,85).

Prema dobijenim rezultatima možemo zaključiti da antibiotski dodatak razrjeđivaču Dicol povoljnije utiče na očuvanje morfologije spermatozoida tokom skladištenja u odnosu na komercijalni razrjeđivač BTS bez Dikola, što potvrđuje hipotezu od koje polazi istraživanje.

Ključne riječi: ejakulat, sperma, morfologija, koncentracija

Naučna oblast: Reprodukcijska i sterilitet životinja

Naučno polje: Veterinarske nauke

Klasifikaciona oznaka: B 400, B 750

(CC BY-ND)

UDK 636.4.082.454.2 (043.2)

ABSTRACT

The aim of study was to determine concentration and morphology of spermatozoa in fresh diluted boar semen with and without the additive to diluent during the storage period. The ejaculates are taken from two boars from a private farm. The study included a total of 60 doses of fresh diluted boar semen and it was carried in the Laboratory for Domestic Animal Reproduction of the Faculty of Agriculture, University of Banja Luka. In the control group boar semen was diluted with a commercial extender (BTS), while in the experimental group ejaculates were taken directly into the additive to diluent, and then diluted with a commercial diluent. In this study it was used an additive to the diluent, commercially named Dicol (Magapor, Spain), which contains a cocktail of antibiotics and is intended to preserve the viability of the sperm during prolonged storage, as well as to prevent the development of bacteria. The morphology of spermatozoa is determined by HOS test, while the concentration of spermatozoa is determined by standard method in Burker chamber. Assaying of the spermatozoa morphology was performed on the first day (within 24 hours of collecting sperm), then after 72, 120 and 144 hours. The results of study shows that the average concentration of spermatozoa in the dose was 3×10^9 in the control group and $3,4 \times 10^9$ in the experimental group. Results of the HOS test showed lower percentage of live sperm cells in all days during the storage time in the control group (87,70; 81,98; 69,96; 61,38) comparing to the experimental group (89,83; 86,56; 78,41; 70,55). The percentage of spermatozoa with damaged intact membrane was higher in the control group (2,33; 3,56; 6,16; 7,33) comparing to the experimental group (1,31; 1,81; 3,08; 3,98) during all days of storage. It was observed that the percentage of dead sperm during staining was higher in the control group (4,71; 6,03; 8,18; 8,05) during all days of storage comparing to the experimental group (3,51; 4,46; 6,25; 6,71). According to the results the percentage of dead spermatozoa was higher in the control group (0,81; 1,98; 4,75; 8,20) during all days, except for the first day of storage, comparing to the experimental group (0,86; 1,48; 3,00; 5,90). The percentage of the abnormal spermatozoa was higher in the control group (4,45; 6,43; 10,93; 15,03) during all days, except for the first day of storage, comparing to the experimental group (4,46; 5,66; 9,25; 12,85).

According to the results we can conclude that the additive to diluent (Dicol) gives better effects for preserving of the spermatozoa morphology during storage time in comparing to commercial diluent BTS without Dicol, which confirms the hypothesis from which the research starts.

Key words: Ejaculate, Sperm, Morphology

Scientific area: Reproduction and infertility of domestic animals

Scientific field: Veterinary sciences

Classification mark: B 400, B 750

(CC BY-ND)

UDK 636.4.082.454.2 (043.2)

1. UVOD

Tehnologija u stočarskoj proizvodnji napreduje iz godine u godinu, a najveći uspjeh industrijske proizvodnje postignut je u uzgoju živine i svinja. Upotreba vještačkog osjemenjavanja je od posebnog značaja za svinjarstvo i uveliko se koristi. Vještačko osjemenjavanje je reproduktivna tehnologija koja je dala veliki doprinos u pogledu unapređenja genetike. Vještačkim osjemenjavanjem sa jednim ejakulatom može se osjemeniti veći broj krmača, dok je u prirodnom parenju osjemenjena samo jedna krmača (*Dominguez i sar., 2006*). Pored toga, vještačko osjemenjavanje je dosta uspješno i veoma ekonomično. Ako se uzme u obzir da se od jednog nerasta mogu dobiti dva ejakulata sedmično, tj. oko 96 ejakulata godišnje, moguće je osjemeniti 20 krmača računajući da se na svaku krmaču potroši 5 ejakulata godišnje. Ukoliko se krmače vještački osjemenjavaju, od samo jednog ejakulata može se dobiti prosječno 14,6 inseminacionih doza, volumena 100 ml, sa po 3×10^9 spermatozoida, što nerasta čini značajnijim u odnosu na krmaču (*Stančić i sar., 2009*).

Vještačkim osjemenjavanjem ograničava se direktan kontakt životinja i smanjuje se rizik od prenošenja raznih bolesti, ali se taj rizik ne može potpuno eliminisati (*Guerin, 1996; van Rijn i sar., 2004; Boender i sar., 2007*).

Prednosti vještačkog osjemenjavanja su višestruke: sprječava se širenje mnogih zaraznih bolesti, dobijanje većeg broja potomaka od genetski superiornog priplodnjaka i bolja evidencija o porijeklu, mogućnost čuvanja sjemena na duže vrijeme, itd. Pored navedenog, ostvaruju se i velike ekonomske uštede u transportu doza u odnosu na transport živog priplodnjaka, kao i zarada u prodaji doza za vještačko osjemenjavanje.

Prvi koji je pokušao izvesti vještačko osjemenjavanje svinja bio je Ivanov iz Rusije (*Ivanov, 1907*). Međutim, prvo uspješno vještačko osjemenjavanje izvedeno je u Japanu (*Ito i sar., 1948*).

U praksi se ejakulati nerasta najčešće dobijaju pomoću vještačke vagine, manuelnom fiksacijom penisa i metodom elektroejakulacije (*Perry, 1963*).

Ispitivanje kvaliteta dobijenog ejakulata se izvodi na dva načina. Prvi način, tj. makroskopski parametri kvaliteta ejakulata, uključuju volumen ejakulata (200-300 ml),

gustinu, boju ejakulata (plavkasto-bijela do žućkasto-bijela), miris kao i prisustvo stranih materija u ejakulatu i izvodi se bez upotrebe posebnih instrumenata. Mikroskopski parametri kvaliteta ejakulata uključuju koncentraciju spermatozoida u ejakulatu (po 1ml), zatim morfologiju i motilitet spermatozoida, kao i integritet akrozomalne membrane.

Ejakulat se pored spermatozoida sastoji i od spermalne plazme koja spermatozoidima obezbjeđuje hranljive materije, elektrolite, osmotski pritisak (izotoničan), puferne sisteme (neophodne za održavanje pH), proteine, fermente, hormone. U svrhu vještačkog osjemenjavanja ejakulati se mješaju sa razrjeđivačima koji zamjenjuju spermalnu plazmu. Njihova uloga je da obezbijede sve potrebne uslove za što duže preživljavanje u *in vitro* uslovima (*Stanković, 2011*), te da istovremeno omoguće formiranje većeg broja inseminacionih doza sjemena.

Do danas su stvoreni mnogi razrjeđivači za čuvanje razrijeđene sperme, a mogu se podijeliti na kratkotrajne (namijenjene za čuvanje sperme tokom 1-3 dana) i dugotrajne (namijenjene za čuvanje sperme tokom 4-14 dana) razrjeđivače (*Stančić, 2006*). Razrijeđenu nerastovsku spermiju najbolje je čuvati na temperaturi od 17 °C. Temperatura ispod 15 °C dovodi do hladnog šoka kod spermatozoida, dok se na temperaturi iznad 20 °C spermatozoidi progresivno kreću pri čemu troše energetske materije. Od posebnog značaja je da razrjeđivač prije kontakta sa spermom bude zagrijan na 37 °C kako bi se spriječile nagle promjene temperature u ejakulatu kao i pojava aglutinacije spermatozoida.

Da bi se spriječila bakterijska kontaminacija u razrjeđivače se dodaju antibiotici. Bakterije utiču na fertilizacionu sposobnost spermatozoida, dok se plotkinje mogu zaraziti preko zaraženog nerastovskog sjemena, ukoliko su u ejakulatu prisutne patogene bakterije. Zbog toga antibiotici igraju važnu ulogu u vještačkom osjemenjavanju i očuvanju kvaliteta nerastovskog sjemena.

Određivanje koncentracije, tj. broja spermatozoida u ejakulatu vrši se pomoću Birkerove komore. Pored Birkerove komore za određivanje koncentracije spermatozoida koristi se eritrocitni melanžer, plastični špric, pokrovno stakalce i 3% hipertonični rastvor NaCl. Vodeni rastvor 3% NaCl je hipertoničan i veoma brzo umrtvi spermatozoide koji postaju nepokretni i tada ih je lako prebrojati (*Miljković, 1998*).

Doze sjemena za vještačko osjemenjivanje krmača uglavnom se formiraju u pakovanjima od 80-100 ml koje sadrže približno 3×10^9 spermatozoida. Preporučuje se da fertilna doza za vještačko osjemenjivanje treba da sadrži najmanje $2-3 \times 10^9$ spermatozoida (*Martin-Rillo i sar., 1996; Alm i sar., 2006*).

Ocjena morfološkog integriteta spermatozoida vrši se pomoću HOS testa (Hypoosmotic swelling test), tj. supravitalnog bojenja spermatozoida po Blomu eozin nigrozinom, sa ciljem da se ustanovi procenat živih, mrtvih i abnormalnih spermatozoida. Membrana živih spermatozoida je intaktna i ne prima boju tokom HOS testa, dok je membrana oštećenih i mrtvih spermatozoida podložna bojenju. HOS rastvor dobija se miješanjem natrijum citrata, fruktoze i destilovane vode. Pored HOS testa u primjeni je i skraćeni HOS test (short HOST, sHOS), test hiperosmotske rezistencije (The Hyperosmotic Resistance/Swelling Test, HRT) i test hiperosmotske rezistencije (The Osmotic Resistance Test, ORT).

Cilj rada je da se ispita koncentracija i morfologija spermatozoida svježe razrijeđenog nerastovskog sjemena sa i bez antibiotskog dodatka razrjeđivaču tokom perioda skladištenja.

Osnovna hipoteza od koje polazi istraživanje je da će dodatak razrjeđivaču povoljno uticati na očuvanje morfologije spermatozoida svježe razrijeđenog sjemena nerasta tokom perioda skladištenja.

2. PREGLED DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA

2.1. Anatomija polnih organa nerasta

Reproduktivni trakt nerasta sastoji se iz: dva sjemenika (testes), dva pasjemenika (epididymis), dva sjemenovoda (ductus dephrens), uretre (urethra masculina), akcesornih polnih žlijezda (glandulae accessories), mošnje (scrotum) i kopulatornog polnog organa (penis). Glavna funkcija reproduktivnog sistema je proizvodnja ejakulata, tj. spermatozoida i sjemene plazme, koje stvaraju testisi, epididimis i akcesorne polne žlijezde (*Knobil i Neill 2006*).

Veličina testisa nije samo u korelaciji sa dnevnom proizvodnjom spermatozoida već i sa nivoom testosterona (*Ford i sar., 2001; Hemsworth i Tilbrook, 2007; Flowers, 2008*). Nerastovi sa velikim testisima imaju veliku koncentraciju spermatozoida i nivo testosterona, kao i povećan libido (*Flowers, 2008*) i veliki pasjemenik (*Walker i sar., 2004*). *Walker i sar. (2004)* navode da veći pasjemenik ima veći kapacitet skladištenja spermatozoida, što može unaprijediti ukupnu plodnost nerasta. Imajući to u vidu, *Flowers (2008)* smatra da je najbolji način da se unaprijedi proizvodnja i kvalitet nerastovskog sjemena da se nerastovi odaberu prema veličini testisa.

Proizvodnja spermatozoida se odvija u seminiferim tubulima testisa, dok pasjemenik ima nekoliko važnih uloga. On ima funkciju da vrši transport spermatozoida od testisa do sjemenovoda. Prije nego što stignu do sjemenovoda, spermatozoidi se skladište i sazrijevaju u pasjemeniku sve do ejakulacije. Pri ejakulaciji, spermatozoidi iz kaudalnog dijela pasjemenika se miješaju sa sekretima akcesornih polnih žlijezda. Tokom ejakulacije, broj spermatozoida skladištenih u kaudalnom dijelu pasjemenika smanji se za oko 60% (*Hughes i Varley, 1984; Strzezek i sar., 1995; Pruneda, 2006*), što govori o kapacitetu proizvodnje sjemena, bitnom za planiranje ritma eksploatacije nerasta.

Sjemenovod se nastavlja na pasjemenik, prolazi kroz mošnice i sjemeno uže, a zatim se ulijeva u početak uretre koja transportuje spermu i mokraću. Uloga mošnica je da održavaju temperaturu sjemenika i da ih štite od povreda i visokih ili niskih temperatura. Akcesorne polne žlijezde se sastoje iz parnih bulbouretralnih i vezikularnih žlijezda, i neparne prostate. Ove žlijezde luče sekrete koji se u uretri zajedno miješaju sa spermatozoidima, pri čemu nastaje sperma. Kod nerastova 55-75% zapremine ejakulata nastaje sekrecijom prostate

i uretralne žlijezde, 10-25% od sekrecije bulbouretralnih žlijezda, 15-20% od vezikularnih žlijezda, dok samo 2-5% potiče iz kaudalnog dijela pasjemenika (*Dyce i sar., 1999; Badia, 2003*).

Polni organ nerasta je fibroelastičnog tipa, kao i kod bika, ovna i jarca. Za razliku od penisa pastuva (kavernozni tip penisa), koji ima puno sunderastih tkiva, penis nerasta u većoj mjeri sadrži fibroelastična vlakna, zbog čega se ne produžava puno tokom erekcije, ali dobija na čvrstini. Uloga penisa je da izbacuje mokraću i spermiju u spoljašnju sredinu, tj. u polne organe ženke tokom parenja.

2.2. Uzimanje sperme

Prve ejakulacije kod nerastova se dešavaju u pubertetu, između 5-6 mjeseci starosti, kada i počinju da se vježbaju za skokove i uzimanje sjemena. Za nerastove se smatra da su polno zreli tek kad navršše godinu dana, kada bi trebali da budu u punoj eksploataciji (*Martin, 1982; Hugues i Varley, 1984; Sancho, 2002; Cordova-Izquierdo i sar., 2004*). Period eksploatacije nerastova na farmama traje kraće u odnosu na one u reprocentrima za proizvodnju komercijalnih doza sjemena, jer poslije određenog perioda dolazi do uzgoja u srodstvu, te je potrebno izvršiti njihovu zamjenu. Ukoliko se radi o kvalitetnim nerastovima, visokog genetskog potencijala, oni u eksploataciji mogu da ostanu i više godina, sve dok na tržištu postoji potražnja za njihovim sjemenom.

Postoji više načina za uzimanje sperme kod nerastova. U praksi se najčešće koristi vještačka vagina i manuelna fiksacija penisa. Pored ove dvije metode u upotrebi su i elektroejakulacija i masaža akcesornih polnih žlijezda.

Vještačka vagina treba da obezbijedi uslove jednake kao i u vagini krmače. To obuhvata temperaturu, skliskost i pritisak kako bi se izazvala ejakulacija kod nerasta. Temperatura u vještačkoj vagini postiže se tako što se u međuprostor sipa voda zagrijana na 39 °C, a unutrašnjost se premaže pH neutralnom mašću kako bi se obezbijedila skliskost. Od velike je važnosti da vještačka vagina, a pogotovo spermosabirač budu zaštićeni od svjetlosti i uticaja spoljašnje temperature. Upotreba vještačke vagine se u praksi nije najbolje pokazala, jer kod ove metode nerast ima slabiji refleks ejakulacije i daje spermiju lošijeg kvaliteta. Razlog je u tome što ejakulacija kod nerasta duže traje i potreban je veći pritisak za stimulaciju refleksa ejakulacije. Zbog toga je manuelna fiksacija penisa metoda koja se najčešće koristi za uzimanje sperme kod nerasta. Kod ove metode se nakon erekcije, rukom u

rukavici, hvata glans penisa i čvrsto ritmički stišće sve dok se ejakulacija kompletno ne završi.

Metoda elektroejakulacije se koristi kada od nerasta nije moguće dobiti ejakulat pomoću drugih metoda (oboljenja papaka i lokomotornog sistema, stariji i teški nerastovi koji se teško kreću). Elektroejakulacija se izvodi tako što se u rektum mužjaka uvede bipolarna elektroda koja niskofrekventnom strujom stimuliše centar za ejakulaciju, koji je smješten u lumbosakralnom dijelu kičme. Električni nadražaji traju 5-6 sekundi sa pauzama istog trajanja i ponavljaju se nekoliko puta.

Uvođenje ruke u rektum nerasta i masiranje akcesornih polnih žlijezda predstavlja još jednu metodu za uzimanje ejakulata. Ova metoda u upotrebi je kod priplodnjaka koji nisu sposobni izvesti skok. Dobra strana ove metode je što nije potrebna nikakva oprema, ali su dobijeni ejakulati lošijeg kvaliteta.

2.3. Sastav sperme nerasta

Ejakulat nerasta se sastoji iz dva dijela, sjemene frakcije koja sadrži spermatozoide i čini 10-30% zapremine i tečnog dijela koji sadrži sjemenu plazmu i predstavlja ostalih 70-90% od ukupnog ejakulata.

Kao i kod drugih sisara, ejakulirani spermatozoidi nerasta sastoje se iz dva dijela i to: glave koja sadrži DNA i akrozome, i repa koji im omogućuje kretanje. Zreo spermatozoid nerasta ima dužinu od 43-45 μm i sadrži dva regiona, glavu i rep, između kojih se nalazi kratki dio koji se zove vrat (*Briz, 1994; Holt i sar., 2010*).

Nezreo spermatozoid se razlikuje od zrelog po tome što sadrži citoplazmatičnu kapljicu, koja se može zapaziti na spoju glave i repa, tj. na proksimalnoj poziciji spermatozoida ili na sredini repa, odnosno distalnom dijelu na Jensen-ovom prstenu (*Cooper i Yeung, 2003; Cooper, 2005*).

Cummins i Woodall (1985) navode da spermatozoidi nerasta imaju glavu dužine 8.5 μm , srednji dio od 10.00 μm i rep dužine 36.1 μm . Na oblik glave spermatozoida najviše utiče akrozom, koji ima glavnu ulogu u penetraciji spermatozoida u jajnu ćeliju. Rep predstavlja lokomotorni aparat koji omogućuje spermatozoidima da se kreću. Brzina kretanja spermatozoida zavisi od sastava medijuma u kojem se nalaze i temperature. Pod uticajem niske temperature spermatozoidi padaju u hladni šok, dok visoka temperatura dovodi do

progresivnog kretanja spermatozoida pri čemu se troše hranljive materije i na kraju dolazi do uginuća spermatozoida.

Brouwers i sar. (2005) navode da su srednji dio i rep osjetljiviji na lipidnu peroksidaciju u odnosu na glavu spermatozoida nerasta i da su živi spermatozoidi intenzivno peroksidirani poslije zamrzavanja i otapanja.

Gonzalez-Urdiales i sar. (2006) navode da svi spermatozoidi sa citoplazmatičnom kapljicom nisu abnormalni. Prema ovim autorima, razlika je u poziciji citoplazmatične kapljice. Samo spermatozoidi sa proksimalnom citoplazmatičnom kapljicom su označeni kao malformacije (abnormalnosti) u ejakulatu nerasta. Znači, samo nezreli spermatozoidi sa proksimalnom citoplazmatičnom kapljicom mogu dovesti do smanjenja fertilizacione sposobnosti ejakulata u prirodnim uslovima. Ejakulati koji sadrže preko 5% proksimalnih citoplazmatičnih kapljica dovode do smanjenja fertilizacione sposobnosti ejakulata, s tim da između procenta spermatozoida sa distalnom citoplazmatičnom kapljicom i fertilizacione sposobnosti ejakulatanema direktne korelacije.

Ejakulat nerasta trebao bi da sadrži između 80-95% zrelih spermatozoida, oko 5-15% nezrelih i oko 1-5% abnormalnih spermatozoida (*Martin, 1982; Briz, 1994; Bonet i sar., 2000*).

Sjemeni plazma sadrži organske i neorganske sastojke, ugljene hidrate, masti, aminokiseline i proteine (*Pursel i sar., 1973; Mann i Lutwak-Mann, 1982*). Osnovni izvor šećera čine fruktoza, glukoza i sorbitol. Ove komponente su važan izvor energije, neophodne za kretanje i metabolizam spermatozoida. Između naučnika koji su radili na ispitivanju sperme i uslova za opstanak spermatozoida postoji saglasnost da su kod zrelih spermatozoida glavni izvor energije monosaharidi. Više naučnika je opisalo kako su spermatozoidi nerasta sposobni da metabolišu različite monosaharide, od glukoze do manje uobičajenih šećera, kao što je fruktoza (*Mann, 1975; Jones i Connor, 2000; Rigau i sar., 2002; Marin i sar., 2003; Medrano i sar., 2006a*).

Martin (1982) navodi da viskoznost ejakulata zavisi od sekrecije akcesornih polnih žlijezda. Temperatura ejakulata neposredno nakon uzimanja iznosi oko 37 °C, a pH vrijednost 6.85-7.9, dok osmolarnost ejakulata zavisi od sastava sjemeni, koji je povezan sa brzinom lučenja testosterona iz testisa.

Pored pomenutih ekstracelularnih supstrata spermatozoidi nerasta za dobijanje energije mogu iskoristiti i druge, kao što je npr. glicerol, laktat, citrat i piruvat (*Jones i sar., 1992; Jones, 1997; Medrano i sar., 2006b*).

Marin i sar. (2003) navode da je najvažniji metabolički put kojim zreo spermatozoid nerasta dobija energiju, glikoliza. U istraživanju je zapaženo da približno 95% energije porijeklom iz glukoze u nerastovskom sjemenu nastaje glikolitičkim putem.

2.4. Pregled i ocjena kvaliteta ejakulata nerasta

Kvalitet nerastovskog sjemena rutinski se procjenjuje određivanjem volumena sjemena, koncentracije spermatozoida, ukupnog broja spermatozoida po ejakulatu, kao i pokretljivosti i morfologije spermatozoida (*Pruneda i sar., 2005; Casas i sar., 2009, 2010*).

Odmah po uzimanju vrši se makroskopski pregled ejakulata nerasta, kako bi se ustanovilo da li zadovoljava kriterijume za dalji rad, odnosno razrjeđenje i formiranje inseminacionih doza sjemena. Prilikom makroskopskog pregleda ejakulata vrši se njegov vizuelni pregled (boja, prisustvo stranih primjesa, volumen) i procjena gustine, odnosno koncentracije spermatozoida.

Ejakulat nerasta bi trebao da bude mliječno bijele boje, i bez ikakvih vidljivih primjesa (krv, mokraća, gnoj, nečistoće), na čije prisustvo najčešće ukazuje promijenjena boja. Ejakulati sa stranim primjesama se odbacuju i ne uzimaju u dalji rad.

Volumen ejakulata se rutinski mjeri vaganjem ejakulata s obzirom da je 1 gram jednak 1 ml. Druga mogućnost je mjerenje volumena u graduisanoj posudi. Prilikom mjerenja volumena ejakulata vizuelno se procjenjuje i njegova gustina, uzimajući pri tome u obzir ujednačenost boje ejakulata (ejakulat zadovoljavajuće gustine bi trebao biti neprovidan i ujednačene boje).

Sljedeća faza makroskopskog pregleda ejakulata je određivanje koncentracije spermatozoida, kako bi se mogao pravilno odrediti stepen razrjeđenja ejakulata i dobiti zadovoljavajući broj spermatozoida u formiranim inseminacionim dozama sjemena. Vizuelna procjena je subjektivna metoda i daje grubu sliku o koncentraciji spermatozoida. U praksi se koncentracija spermatozoida najčešće određuje metodom brojanja uz pomoć hemocitometra i Birkerove komorice za brojanje, a u novije vrijeme postoje i posebni aparati, kao što je

fotospektrometar ili računarski programi, kao što je CASA (Computer Assisted Sperm Analysis).

Jednokratne komore za izračunavanje koncentracije spermatozoida imaju niži koeficijent varijacije, ali one daju lošiju sliku o koncentraciji spermatozoida u odnosu na višekratnu upotrebu komore (Tomlinson i sar., 2001; Bjorndahl i Barratt, 2005; Christensen i sar., 2005). Još uvijek je otvorena rasprava koji je najbolji tip komore za određivanje koncentracije spermatozoida (Christensen i sar., 2005; Maes i sar., 2010). U svakom slučaju, vizuelno određivanje koncentracije sperme kao i korištenje jednokratnih komora je prilično dugotrajano, jer zahtijeva računanje relativno velikog broja imobiliziranih spermija kako bi se postigao prihvatljiv stupanj preciznosti (Christensen i sar., 2005; Svjetska zdravstvena organizacija, 2010).

Višekratnom upotrebom stakla hemocitometar se smatra kao zlatni standard (Rijsselaere i sar., 2003; Prathalingam i sar., 2006; Svjetska zdravstvena organizacija, 2010). Dostupno je višekomercijalno različitih hemocitometara poput Neubauer, Thoma ili Bürker (Christensen i sar., 2005). Nisu primjećene veće varijacije u rasponu od 4% do 20% korištenjem hemocitometra. Ako postoje, one se mogu pripisati nepravilnom uzorkovanju, pipetiranju, punjenju komorica za brojanje ili razrijeđenju ispod ili iznad dozvoljene granice (Hansen i sar., 2002; Knox, 2004).

Varijacije u koncentraciji spermatozoida između rasa treba uzeti u obzir prilikom pripreme doze jer su one evidentne (Johnson i sar., 2000; Kommisrud i sar., 2002). Koncentracija spermatozoida u ejakulatu varira zavisno od rase, tako da je kod durok rase zapažena visoka koncentracija spermatozoida, dok je kod velike bijele niska koncentracija spermatozoida (Wolf, 2009; Wolf i Smital, 2009). Kennedy i Wilkins (1984) u svom radu navode da su ustanovili da nerastovi rase veliki jorkšir imaju najbolji stepen progresivne pokretljivosti spermatozoida, nerastovi rase hempšir najveći volumen ejakulata, a nerastovi rase durok najveću koncentraciju spermatozoida po 1 ml ejakulata i najveći broj živih spermatozoida u ejakulatu.

Ocjena morfološkog integriteta spermatozoida je jedan od najvažnijih parametara mikroskopskog pregleda sjemena, jer se njome određuje procenat živih i fertilno sposobnih, odnosno oštećenih i mrtvih spermatozoida, a time procjenjuje i ukupna fertilizaciona sposobnost ejakulata.

Ispitivanje morfološkog integriteta spermatozoida predstavlja kvalitativnu i kvantitativnu klasifikaciju morfološki normalnih i abnormalnih, odnosno oštećenih

spermatozoida. Ova klasifikacija se sprovodi pomoću optičkog mikroskopa i jednostavne tehnike bojenja, kao npr. sa eosin nigrosin, Trypan Blue, Giemsa, Papanicolaou ili Diff – Quick (*Foxcroft i sar., 2008*). Korištenje bojenja eozin-nigrozinom u analizi nerastovskog sjemena je široko raspostranjeno, jer se lako izvodi i pokazuje morfološki integritet spermatozoida, kao i rezultate u korelaciji sa plodnošću svinja (*Bjorndahl i sar., 2004; Tsakmakidis i sar., 2010*). Funkcionisanje metoda bojenja spermatozoida u procjeni njihovog morfološkog integriteta zasniva se na tome da spermatozoidi sa intaktnom ćelijskom membranom ne primaju boju, odnosno ostaju nebojeni, dok se oni sa različitim oštećenjima membrane boje navedenim bojama i kao takvi identifikuju prilikom mikroskopskog pregleda.

Metoda bojenja spermatozoida na navedeni način u praksi se najčešće kombinuje sa ispitivanjem njihove osmotske tolerancije, odnosno reakcije na izlaganje promjeni osmotskog pritiska. Razvijeno je nekoliko metoda za testiranje spermatozoida nerasta na promjenu osmotskog pritiska. Ove metode predstavljaju indikator kvaliteta sjemena i u njih se ubraja *Hypo-Osmotic Swelling Test (HOST)*, *Hyperosmotic Resistance/Swelling Test (HRT)* i *Osmotic Resistance Test (ORT)*. Navedene metode fokusirane su na odgovor membrane spermatozoida na iznenadnu promjenu osmotskog pritiska u zavisnosti od medijuma u kojem se nalaze, pri čemu se ta reakcija procjenjuje nakon bojenja pomenutim bojama.

Spermatozoidi nerasta su osjetljivi na promjene osmotskog pritiska, odnosno izlaganje hipotoničnoj i hipertoničnoj sredini. *Christensen i sar. (2005)* navode da istraživanja osmotske otpornosti spermatozoida ukazuju na to da su vijabilnost i morfologija spermatozoida u većoj korelaciji sa fertilitetom nego pokretljivost spermatozoida.

Kod nerastova se izotoničan rastvor postiže sa osmotskom koncentracijom od 300-400 mOsm/Kg (*Petrukina i Topfer-Petersen, 2000; Petrukina i sar., 2000; Fraser i sar., 2001*). Sposobnost reagovanja na osmotski stres može biti dobar pokazatelj fiziološkog stanja ćelije (*Yeste i sar., 2010*). *Christova i sar. (2002)* navode da osmotski šok utiče na difuziju fosfolipida u dvoslojnoj membrani spermatozoida. Kada se spermatozoidi izlože visokom osmotskom pritisku gube pokretljivost i dolazi do oštećenja akrozoma (*Curry i Watson, 1994; Revell i Mrode, 1994; Liu i Foote, 1998; Rossato i sar., 2002; Chantleri Abraham-Peskir, 2004; Yeste i sar., 2010*).

Jeyendran i sar. (1984) su stvorili HOST. Oni navode da je HOST tehnika prvi put opisana kod ljudi i da je zasnovana na procjeni odgovora spermatozoida na hipoosmotski rastvor (ispod 300 mOsm/Kg). Ukoliko je ćelijska membrana spermatozoida funkcionalna, u hipoosmotskom rastvoru će tečnost proći kroz nju u citoplazmu. Kada se posmatraju pod

mikroskopom, ovakvi spermatozoidi će imati otečenu glavu (*Perez-Llano i sar., 2001*). Način na koji spermatozoidi otiču kada se izlože hipoosmotskom stresu može se posmatrati i ocjeniti kao test funkcionalnog integriteta plazmine membrane (*Vazquez i sar., 1995*). U ovom slučaju je lakše posmatrati rep nego glavu spermatozoida, zato što je plazmina membrana koja okružuje rep slabije pričvršćena (*Jeyendran i sar., 1984; Takahashi i sar., 1990; Vazquez i sar., 1997*). Oticanje spermatozoida manifestuje se karakterističnim savijanjem repa i varira u zavisnosti od više faktora kao što je individualna tolerancija ili sastav medijuma i predstavlja brzu i jednostavnu tehniku za procjenu kvaliteta ejakulata (*Gonzales-Urdiales i sar., 2006; Bonet i sar., 2006*).

Samo spermatozoidi sa intaktnom plazminom membranom i intaktnim akrozomom su sposobni za fertilizaciju jajne ćelije *in vivo* (*Yanagimachi, 1994*). Prisustvo mrtvih ili abnormalnih spermatozoida u ejakulatu može imati toksične (*Shannon i Curson, 1972*) i litičke (*Lindemann i sar., 1982*) efekte na ostale spermatozoide. *Shipley (1999)* navodi da procenat spermatozoida sa normalnom morfologijom treba da iznosi najmanje 70%. Normalna morfologija spermatozoida povezana je sa fertilitetom, zbog čega se preporučuje da se nerastovsko sjeme rutinski ispita na morfologiju (*Sanchez i sar., 1998; Xu i sar., 1998; Alm i sar., 2006*). Prema *Donadeu (2004)* u primarne abnormalnosti kod spermatozoida spada abnormalan oblik glave spermatozoida koji nosi genetski materijal, dok sekundarne abnormalnosti čine proksimalna i distalna kapljica, kao i abnormalnosti repa spermatozoida.

Smital i sar. (2004) navode da koeficijent varijacije za parametre morfološkog integriteta membrane spermatozoida između rasa nerastova iznosi 30-40%. U literaturi je dostupan manji broj istraživanja na temu razlika između rasa po pitanju morfološkog integriteta spermatozoida, pokretljivosti i morfologije spermatozoida. *Smital i sar. (2004)* navode da je ukupan broj živih spermatozoida (intaktna membrana) od 86×10^9 spermatozoida po ejakulatu zabilježen je kod velike bijele, 72×10^9 spermatozoida po ejakulatu kod češkog landrasa i prestice black-pied nerastova, 71×10^9 spermatozoida po ejakulatu kod češke velike bijele, 68×10^9 spermatozoida po ejakulatu kod hempšir nerastova, 66×10^9 spermatozoida po ejakulatu kod češke mesnate rase, 64×10^9 spermatozoida po ejakulatu kod pietren nerastova i 59×10^9 spermatozoida po ejakulatu kod durok nerastova.

2.5. Formiranje i skladištenje inseminacionih doza

Weitze (2000) navodi da se u svijetu godišnje iskoristi oko 155 miliona doza nerastovskog sjemena za vještačko osjemenjavanje. Da bi se od ejakulata proizvele inseminacione doze sjemena, on se razrjeđuje, kako bi se povećala zapremina proizvedenog sjemena i omogućilo njena podjela u doze koje će se iskoristiti za osjemenjavanje plotkinja.

Razrjeđivanje ejakulata sprovodi se odmah nakon njegovog pregleda. Za razrjeđivanje se koriste posebni razrjeđivači, koji treba da obezbijede hranljive materije potrebne spermatozoidima za opstanak i očuvanje fertilizacione sposobnosti. Sastav razrjeđivača zavisi od dužine i načina skladištenja razrijeđenog sjemena, a sam stepen razrijeđenja zavisi od odnosa između volumena ejakulata i ukupnog broja spermatozoida u ejakulatu.

Doze za vještačko osjemenjavanje u prosjeku imaju zapreminu od 80-100 ml i sadrže oko 2-3 milijarde spermatozoida. Tako se npr. od ejakulata volumena 250 ml koji sadrži oko 35-40 milijardi spermatozoida može dobiti 12-15 inseminacionih doza. Svi postupci, od uzimanja ejakulata do razrjeđivanja, izvode se na sobnoj temperaturi. Važno je da sve što dolazi u dodir sa spermom (razrjeđivač, pokrovno stakalce, melanžeri, bočice za inseminacione doze) bude zagrijano na približno istu temperaturu, tj. na oko 37 °C.

Ejakulat se razrjeđuje i pakuje u doze, s tim da svaka doza treba da sadrži 2-4 milijarde spermatozoida u ukupnoj zapremini od 80 do 100 ml. Kolika je koncentracija spermatozoida potrebna po dozi određuje se prema tome koliko će se dana doze sjemena skladištiti. Tako npr., ako se doze skladište 2 dana, preporučuje se 2 miliona spermatozoida po dozi, a ukoliko su 3 dana u pitanju, onda je potrebno 3 miliona spermatozoida po dozi itd. (*Althouse, 2007*).

Ukupni i broj fertilno sposobnih spermatozoida u dozama za osjemenjavanje je važan parametar za uspješnu oplodnju, odnosno dobijanje željenih rezultata osjemenjavanja. Iako se tačno ne zna najmanja doza za vještačko osjemenjavanje, današnji kriterijumi zahtjevaju najmanje 80% morfološkinormalnih spermatozoida, tj. dozu koja sadrži 2×10^9 fertilno sposobnih spermatozoida (*Martin-Rillo i sar., 1996; Shipley, 1999*). Doze za vještačko osjemenjavanje imaju zapreminu od 80-100 ml i u prosjeku sadrže oko $2-4 \times 10^9$ spermatozoida (*Saacke i sar., 1991*). *Alm i sar. (2006)* navode da je generalno mišljenje da doza sjemena za vještačko osjemenjavanje treba da sadrži 3×10^9 spermatozoida.

Broj spermatozoida u inseminacionoj dozi treba prilagoditi morfologiji i pokretljivosti spermatozoida, te je opšte prihvaćeno da doza za treba sadržati najmanje $2-3 \times 10^9$

spermatozoida (*Martin-Rillo i sar., 1996; Alm i sar., 2006*). Međutim, kako bi se povećao broj proizvedenih inseminacionih doza, reprocentri imaju tendenciju da se ejakulati razrijeđuju što je više moguće (*Vyt i sar., 2007a*). Istraživanja tokom posljednjih godina bila su usmjerena na smanjenje broja spermatozoida po dozi, a da se pri tome ne ugrožavaju rezultati plodnosti. U pogledu pripreme doza za osjemenjavanje uvijek se stremilo ka tome da doze budu što manje. Zadovoljavajući rezultati kod vještačkog osjemenjivanja postignuti su i sa dozama od 1×10^9 spermatozoida (*Roca i sar., 2003; Roca i sar., 2011*), ukoliko je sjeme aplikovano intrauterino.

Razrjeđivač predstavlja vodeni rastvor određenih supstanci koji se koristi kako bi se povećala zapremina ejakulata za dobijanje doza za vještačko osjemenjavanje (*Gadea, 2003*). Milovanov je predstavio prve razrjeđivače za nerastovsko sjeme u 30-im godina prošlog vijeka, koji su se sastojali od glukoza sulfata i glukoza tartrata (*Milovanov, 1962; Johnson i sar., 2000*). *Polge (1956)* je napravio neke od prvih razrjeđivača, kao npr. žumancetno-fosfatni, žumancetno-citratni i mliječni razrjeđivač. Pursel i Johnson su 1975. godine napravili BTS razrjeđivač (Beltsville Thawing Solution) za odmrzavanje zamrznutog nerastovskog sjemena, ali je kasnije razvijen i usavršen za skladištenje nerastovskog sjemena (*Pursel i Johnson 1975; Johnson i sar. 1998*), te je trenutno jedan od najčešće korištenih komercijalnih razrjeđivača za sjeme nerasta.

Johnson i sar. (2000) navode da razrjeđivači smanjuju metaboličku aktivnost i čuvaju spermatozoide sve do oplodnje. Glavni razlog razrijeđivanja sjemena je da se održi fertilitet spermatozoida tokom skladištenja do osjemenjavanja. Prema tome, razrjeđivač mora da spriječi bakterijski rast, zatim da održi pH vrijednost između 6.8-7.2, da stabilise plazminu membranu i da regulise osmotski pritisak kojem su spermatozoidi izloženi.

Gadea (2003) navodi da je kontrola pH vrijednosti važna jer glikolitički metabolizam spermatozoida dovodi do smanjene unutarćelijske pH, koja potiskuje ćelijski metabolizam. U razrjeđivaču BTS prisutni su puferi, kao što je natrijum citrat i natrijum bikarbonat, koji pomažu održavanje pH vrijednosti.

S obzirom da membrane nerastovskih spermatozoida imaju mnoge nezasićene fosfolipide, koji su osjetljivi na oksidaciju lipida, neophodno je da razrjeđivači sadrže i antioksidanse (*Aitken i Curry, 2011; Am-in i sar., 2011; Martin-Hidalgo i sar., 2011*). Oksidaciono oštećenje spermatozoida tokom skladištenja je više puta opisano u literaturi (*Guthrie i Welch, 2006; Awda i sar., 2009*).

Tačan sastav komercijalnih razrjeđivača je najčešće nepoznat, ali je poznato da sadrže izvor energije, uglavnom glukozu, koji omogućava spermatozoidima da održe osnovnu funkciju, zatim zaštitu od termalnog šoka (npr. BSA, Bovine Serum Albumin), puferne soli kako bi se izbjegli negativni efekti promjene pH vrijednosti (natrijum bikarbonat, natrijum citrat, TRIS), osnovne soli koje obezbjeđuju odgovarajuću osmotsku ravnotežu (NaCl, KCl) i antibiotike koje spriječavaju bakterijski rast (*Gadea i sar., 2004; Gogol i sar., 2009; Paquignon i sar., 1988; Johnson i sar., 2000*).

Almond i sar. (1998) navode da je uobičajena praksa u industrijskoj proizvodnji svinja da sjeme i razrjeđivač tokom miješanja moraju imati istu temperaturu. Na ovaj način hladni šok će biti minimalan, koji se javlja kada se svjež ejakulat prebrzo ohladi. Međutim, veoma je teško zagrijati razrjeđivač na temperaturu ejakulata, jer temperatura dobijenog nerastovskog ejakulata varira od 35°C do 40°C. *Crowell (2009)* u svojim rezultatima istraživanja navodi da nema potrebe da se prati striktno pravilo da temperatura sjemena mora biti ista kao i temperatura razrjeđivača, ukoliko je temperatura sjemena i razrjeđivača između 35 °C i 30 °C.

Althouse i sar. (1998) navode da je kritična temperatura za hladni šok kod spermatozoida nerasta 12 °C. Na temperaturama ispod 10 °C spermatozoidi nerasta su veoma osjetljivi na hladni šok (*Gilmore i sar., 1996*). Membrana glave nerastovskih spermatozoida sadrži manje tečnosti nego membrana repa i kada se hladi i ponovo zagrijava pokazuje diferencijalnu promjenu temperaturene osjetljivosti u tečnosti (*Canvin i Buhr, 1989*). Mora se uzeti u obzir da su spermatozoidi nerasta veoma osjetljivi na hlađenje ispod 15 °C i da je plazmina membrana spermatozoida prvo oštećenje koju izaziva hladnoća (*Watson, 2000; Bailey i sar., 2008*). S druge strane, zagrijavanjem doza stimuliše se aktivnost spermatozoida (*Huo i sar., 2002*) i spermatozoidi počinju da koriste velike količine šećera (*Parrish i sar., 1999; O'Flaherty i sar., 1997*).

Membrana spermatozoida nerasta je primarno mjesto oštećenja izazvano hladnoćom (*Bailey i sar., 2008; Kim i sar., 2011*) i vrlo je osjetljiva na dejstvo temperature i skladištenja (*Waberski i sar., 2011; Casas i Althouse, 2013*). U poređenju sa ljudskim i spermatozoidima goveda, krioprezervacija nerastovskog sjemena je kritičnija zbog relativno niskog nivoa holesterola (*Rath i sar., 2009*) i visokog sadržaja PUFA u plazminoj membrani (*Cerolini i sar., 2000*). Inseminacione doze sjemena bika, ovna i jarca se mogu uspješno čuvati u zamrznutom stanju, dok je zamrzavanje sjemena nerasta mnogo manje uspješno, te se ono dominantno koristi kao svježije razrijeđeno ili eventualno kratkotrajno čuvano.

Maksimalni period skladištenja nerastovskog sjemena zavisi od razrjeđivača i broja spermatozoida u dozi za vještačko osjemenjavanje (*Johnson i sar., 2000*). Na tržištu su dostupni komercijalni razrjeđivači za skladištenje nerastovskog sjemena na temperaturi od 15-17 °C tokom tri ili više dana nakon sakupljanja (*Gadea i sar., 2004*). U praksi se razrjeđivači se obično dijele u dvije grupe: kratkoročni, koji omogućavaju čuvanje od 1-3 dana i dugoročni razrjeđivači za čuvanje na period duži od 4 dana (*Stančić, 2006*). Kratkoročni razrjeđivači se uglavnom koriste kada se sjeme distribuira u lokalnoj komercijalnoj mreži, dok se dugoročni razrjeđivači koriste kada su mjesta osjemenjavanja udaljena od mjesta proizvodnje sjemena (*Gadea, 2003*).

Razblaživanje sjemena sa razrjeđivačem smanjuje koncentraciju proteina u sjemennoj plazmi, što povećava rizik funkcionalnog oštećenja tokom skladištenja, čak i na kratak period (*Waterhouse i sar., 2004; Estienne i sar., 2007; Gogol i sar., 2009; Perez-Llano i sar., 2009*).

Poznato je da duže skladištenje sjemena dovodi do pojave aglutinacije (*Sanchez i sar., 1991; Yeste i sar., 2008b*). Do aglutinacije spermatozoida dolazi kada se spoje glave ili repovi spermatozoida. Pod normalnim uslovima aglutinacija se ne dešava, a kada je prisutna uzrok može biti smanjen imunitet. Do aglutinacije spermatozoida, pored dužine skladištenja, dovode bivalentni i trivalentni katjoni u sjemennoj plazmi (*Sanchez, 1991; Yeste i sar., 2007a*).

Više naučnika došlo je do zaključka da se kratkoročni razrjeđivač BTS do 3, 5 ili 7 dana skladištenja ne razlikuje drastično od dugoročnih razrjeđivača u pogledu očuvanja mnogih karakteristika kvaliteta nerastovskog sjemena, kao što je pokretljivost spermatozoida i fertilitet (*De Ambrogi i sar., 2006; Estienne i sar., 2007; Laforest i Allard, 1995; Vyt i sar., 2004*).

Crowell (2009) navodi da BTS sadrži 37.0 g/L glukoze zbog čega je u prva tri dana pojačana pokretljivost spermatozoida, što je i prednost jer je BTS kratkoročni razrjeđivač. Razrjeđivač BTS sadrži etilendiamin-tetra-sirćetnu kiselinu (EDTA), koja blokira djelovanje kalcijuma kao posrednika kapacitacije spermatozoida i reakcije akrozoma ograničavajući njegovo kretanje kroz plazminu membranu (*Gadea, 2003; Johnson i sar., 2000*). U poređenju sa prethodnim razrjeđivačima sadrži nizak nivo kalijuma koji omogućuje održavanje dotoka natrijuma i kalijuma u sjeme, i zbog toga nema oštećenja pokretljivosti (*Alvarez i Storey, 1982; Johnson i sar., 2000*). Prema podacima koje navode *Alvarez i Storey (1982)* u BTS razrjeđivač se dodaje KCl kako bi se spriječio gubitak kalijuma iz ćelija, čiji nedostatak dovodi do smanjenja pokretljivosti spermatozoida zbog neefikasnosti Na-K pumpe.

2.6. Uloga antibiotika u razrjeđivačima za sjeme nerasta

Da bi se doze pripremile za vještačko osjemenjavanje, sjeme treba da bude sakupljeno po određenim procedurama koje podrazumijevaju visoke higijenske mjere, kako bi se umanjio rizik od bakterijske kontaminacije. Jedno od rješenja problema bakterijske kontaminacije sjemena je dodavanje antibiotika u razrjeđivače za sjeme.

Bakterijska kontaminacija uglavnom dovodi do smanjenja pokretljivosti spermatozoida, aglutinacije spermatozoida, povećanja procenta izmijenjenih akrozoma i smanjenja pH vrijednosti do kiselosti (5.7-6.4) (*Althouse i sar., 2000*). *Althouse i Lu (2005)* navode kako je bakterijska kontaminacija štetna za kvalitet sjemena i dovodi do pojave aglutinacije, kao i smanjene pokretljivosti spermatozoida. *Hofmo i sar. (1999)* navode da bakterijski rast u nerastovskom sjemenu ne utiče loše samo na kvalitet sjemena i na preživljavanje spermatozoida, već i na pH vrijednost medijuma u kojem se nalaze spermatozoidi, što ih i posredno oštećuje. Bakterije mogu uticati na spermatozoide tako što se direktno vezuju za njih i dovode do aglutinacije (*Teague i sar., 1971; Sone i sar., 1992*). Takođe, bakterije u sjemenu troše glukozu, neophodnu za preživljavanje spermatozoida.

Iako bakterijska kontaminacija rijetko izaziva bolest kod mužjaka, prenosom bakterija tokom oplodnje kod ženki može dovesti do smanjene plodnosti i zaraznog endometritisa (*Varner i sar., 1998*). Prema *Maes i sar. (2008)* prisustvo mikroorganizama u sjemenu prouzrokuje loš kvalitet sjemena, smrt embriona ili fetusa i endometritis. Leptospiroza i bruceloza su veoma zarazne bolesti kada su ženke izložene kontaminiranom sjemenu, dok je poznato da bakterijska infekcija sa hlamidijama smanjuje stopu prasenja i veličinu legla (*Maes i sar., 2008*). *Haesebrouck i sar. (2004)* navode da se kontrola bakterijskih bolesti sprovodi putem upotrebe redovne vakcinacije.

Antibiotici koji se dodaju nerastovskom sjemenu smanjuju koncentraciju bakterija i uticaj bakterijskih toksina (*Okazaki i sar., 2010*). Neka istraživanja ukazuju na to da prisustvo antibiotika u razrjeđivačima pri određenoj koncentraciji pojačava preživljavanje spermatozoida, a samim tim i plodnost (*Colenbrander i sar., 1993*). *Sone (1990)* navodi da se antimikrobna sredstva se uglavnom dodaju razrjeđivačima kako bi se spriječila bakterijska kontaminacija i rast bakterija, što omogućuje održavanje spermatozoida danima ili maksimalno dvije sedmice od dana skladištenja na 15-17 °C. Ipak, postoji određen broj rezistentnih bakterija koje uspijevaju preživjeti u razrijeđenom sjemenu uprkos prisustvu antimikroba, smanjujući plodnost.

Gadea (2003) navodi da antibiotik treba dodati razrjeđivaču, jer on sadrži glukozu koja zajedno sa temperaturom, na kojoj su doze sjemena skladištene (15-16 °C), podstiče rast većine gram-negativnih bakterija, uključujući *E.Coli* i neke vrste salmonele. *Yeste (2008)* takođe navodi da se u razrjeđivač dodaju antibiotici kako bi se spriječio bakterijski rast, jer hranljive materije kao što je glukoza i temperatura skladištenja sjemena na oko 15 °C odgovaraju razvoju gram-negativnih bakterija kao što je *Escherichia coli*, *Salmonella sp.* i *Pseudomonas sp.* Jedna od najviše proučavanih bakterija u nerastovskom sjemenu je *E. coli*, jer njena prisutnost u sjemenu dovodi do aglutinacije i oštećenja spermatozoida (*Auroux i sar., 1991; Diemer i sar., 1996*).

Antibiotici se koriste kako bi se spriječio bakterijski rast i njihovo negativno djelovanje na spermatozoide. *Makler i sar. (1981)* navode kako antibiotici nemaju uticaja na održivost i pokretljivost spermatozoida u ljudskom sjemenu zaraženom bakterijama.

Neka istraživanja potvrđuju da je većina bakterija izolovanih iz razrjeđenog sjemena rezistentna na uobičajene antibiotike (*Waltz i sar., 1968; Althouse i sar., 2000; Althouse i Lu 2005; Bolarin, 2011*). U prošlosti su se najčešće koristila kombinacija antibiotika širokog spektra djelovanja, npr. kombinacija streptomicina i penicilina (*Paredis, 1962; Sone i sar., 1982*). U najčešće korištene antibiotike koji se dodavaju razrjeđivačima za nerastovsko sjeme spada gentamicin sulfat i amikacin sulfat (*Sone i sar., 1982; Sone, 1990; Sone i sar., 1992; Althouse i sar., 2000*).

Huerta i sar. (2011) navode da medijum Dikol sadrži 4 baktericida koji djeluju na širok spektar gram-negativnih i gram-pozitivnih bakterija. Dikol je prvenstveno razvijen za sakupljanje sjemena i kao antibiotska prevencija za nerastovsko sjeme prije završnog razrjeđivanja sjemena sa razrjeđivačima.

3. MATERIJAL I METODE RADA

3.1. Materijal rada

Istraživanje je sprovedeno u Laboratoriji za reprodukciju domaćih životinja Poljoprivrednog fakulteta Univerziteta u Banjoj Luci, na komercijalnim inseminacionim dozama sjemena nerasta. Doze sjemena su uzimane manuelnom metodom, od dva nerasta sa privatne farme. Nerastovi su bili rase landras, starosti 36 i 40 mjeseci.

Za istraživanje je od svakog nerasta uzeto po 30 doza sjemena, tj. ukupno 60 doza. Da bi se izbjegao uticaj doze na ispitivane parametre, od svakog dobijenog ejakulata su ispitane po 3 doze sjemena. Dobijene doze su čuvane u klima boksu na temperaturi od 17 °C i svakog dana je 2 puta vršeno lagano okretanje doza, kako bi se izbjeglo taloženje spermatozoida.

Prva grupa doza sjemena je razrijeđivana standardnom metodologijom, komercijalnim razrijeđivačem BTS-om, što je predstavljalo kontrolnu grupu (K), dok su doze u drugoj grupi, koja je predstavljala oglednu grupu (O), pored BTS-a, sadržavale i DICOL, tj. dodatak razrijeđivaču. BTS je komercijalni razrijeđivač za čuvanje sjemena do 5 dana i u sebi sadrži antibiotik gentamicin. U oglednoj grupi ejakulat je uziman u dodatak razrijeđivaču komercijalnog naziva DICOL i ostavljan se 30 minuta kako bi prije razrijeđivanja izvela dekontaminacija sjemena. DICOL (Magapor, Španija) sadrži koktel antibiotika i igra važnu ulogu u spriječavanju bakterijske kontaminacije sjemena i pojave aglutinacije, bez negativnih efekata na viabilnost spermatozoida.

Istraživanje je obuhvatilo određivanje koncentracije spermatozoida u ejakulatu i procjenu morfološkog integriteta spermatozoida.

Koncentracija spermatozoida određivana je pomoću Birkerove komore, dok je za morfološku ocjenu korišten HOS test (Hypoosmotic Swelling Test).

Ocjena morfološkog integriteta spermatozoida vršena je prvog dana, tj. unutar 24 časa od uzimanja ejakulata, zatim nakon 72, 120 i 144 časa.

3.2. Metode rada

3.2.1. Određivanje koncentracije spermatozoida

Određivanje koncentracije spermatozoida je izvođeno za svaku dozu pojedinačno pomoću standardne metode u Birkerovoj komori.

Sjeme je uzimano iz klima boksa i prenošeno u vodeno kupatilo koje je namješteno da zagrijava vodu na 38 °C. Za određivanje koncentracije zagrijano sjeme se pipetom uzima iz vodenog kupatila i prenosi na predmetno stakalce. Zatim se u leukocitarni melanžer uvlači do oznake 0,5, a potom do oznake 11 sa 3% NaCl i lagano miješa u trajanju od 1 minute. Nakon laganog mućkanja spermatozoidi se umrtve i prije stavljanja na Birkerovu komoru istišću se dvije kapi. Spermatozoidi se broje pod mikroskopom, sa uvećanjem od 20 puta, a broj spermatozoida u ml se određuje pomoću formule:

$$C = n \times r \times 50.000$$

C – ukupan broj spermatozoida u 1 ml nativne sperme,

n – broj spermatozoida izbrojan u 5 velikih kvadrata mrežice hemocitometra,

r – stepen razrijeđenja, napravljen u melanžeru,

50.000 – koeficijent komorice za brojanje.

3.2.2. Procjena morfološkog integriteta spermatozoida

Za procjenu morfološkog integriteta spermatozoida korišten je HOS test (Hypoosmotic Swelling Test), tj. supravitalno bojenje spermatozoida po Blomu eozin-nigrozinom. Metoda se zasniva na tome da spermatozoidi sa intaktnom plazminom membranom u toku bojenja ne primaju boju, što nije slučaj kod oštećenih ili mrtvih spermatozoida.

Za morfološku ocjenu spermatozoida, tj. za HOS test prvo se pravi HOS rastvor koji se sastoji od fruktoze, natrijum citrata i destilovane vode. Tačan sastav iznosi:

- 0,735 g $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (natrijum citrat)
- 1,351 g $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ (fruktoza)
- 100 ml destilovane vode

HOS rastvor se u vodenom kupatilu drži 10 minuta, a zatim se dodaje zagrijano sjeme i ostavlja se još 30 minuta u vodenom kupatilu na temperaturi od 38 °C. Potom se pipetom 20 µL stavlja na sahatno stakalce i pomiješa sa 20 µL eozina. Nakon 30 sekundi laganog miješanja dodaje se i 40 µL nigrozina. Na predmetno stakalce se nanosi razmaz od 20 µL dobijenog rastvora i ostavlja se na grejnu ploču. Zatim se posmatra i vrši morfološko ocjenjivanje pod mikroskopom, tj. imerzionim objektivom (100xA/1.25 Oil Ph3 DL) pri čemu se koristi imerziona ulje. Oprema korištena za rad koja je dolazila u dodir sa sjemenom prethodno je zagrijana na grejnoj ploči, kako bi se izbjegao temperaturni šok spermatozoida.

Za ocjenu morfološkog integriteta spermatozoida na jednom predmetnom stakalcu pod mikroskopom je izbrojano najmanje 200 spermatozoida. Pronađeni spermatozoidi su klasifikovani u sljedeće kategorije:

- živi spermatozoidi (bijel spermatozoid sa otečenim repom),
- spermatozoidi sa oštećenom intaktnom membranom (bijel spermatozoid sa ravnim repom),
- spermatozoidi uginuli tokom bojenja (crven spermatozoid sa otečenim repom),
- mrtvi spermatozoidi (crven spermatozoid sa ravnim repom),
- abnormalni spermatozoidi.

3.2.3. Biometrička analiza

Podaci su obrađeni pomoću metoda deskriptivne analize i analize varijanse sa *post hoc* Tukey testom i prikazani tabelarno i grafički.

4. REZULTATI ISTRAŽIVANJA

4.1. Prosječan broj spermatozoida u dozi

Koncentracija spermatozoida je prikazana u tabeli 1. kao prosječna koncentracija spermatozoida u dozi dobijena na osnovu prosječne koncentracije spermatozoida u nativnom ejakulatu na osnovu prosječnog broja doza i prosječne zapremine ejakulata (ml) za sve dane skladištenja sperme (od prvog do šestog dana), posebno za kontrolnu, a posebno za oglednu grupu.

Tabela 1. Prosječan broj spermatozoida u dozi, broj doza po ejakulatu i zapremina ejakulata

Grupa	Prosječan broj spermatozoida u dozi	Prosječan broj doza po ejakulatu	Prosječna zapremina ejakulata (ml)
Kontrolna	3×10^9	17,10	255,00
Ogledna	$3,4 \times 10^9$	17,60	250,00

4.2. Procjena morfološkog integriteta spermatozoida

Tabela 2. Prosječan broj živih spermatozoida

Dani	Kontrolna grupa			Ogledna grupa		
	Prosjek \pm SD	%	Min.-Max.	Prosjek \pm SD	%	Min.-Max.
1.	175,40 \pm 5,68 ^A	87,70	160,00-185,00	179,67 \pm 7,68 ^{EA}	89,83	168,00-195,00
3.	163,97 \pm 9,40 ^B	81,98	146,00-180,00	173,13 \pm 6,48 ^F	86,56	160,00-183,00
5.	139,93 \pm 7,87 ^C	69,96	120,00-156,00	156,83 \pm 8,67 ^G	78,41	140,00-171,00
6.	122,77 \pm 7,71 ^D	61,38	103,00-134,00	141,10 \pm 8,43 ^{HC}	70,55	129,00-160,00

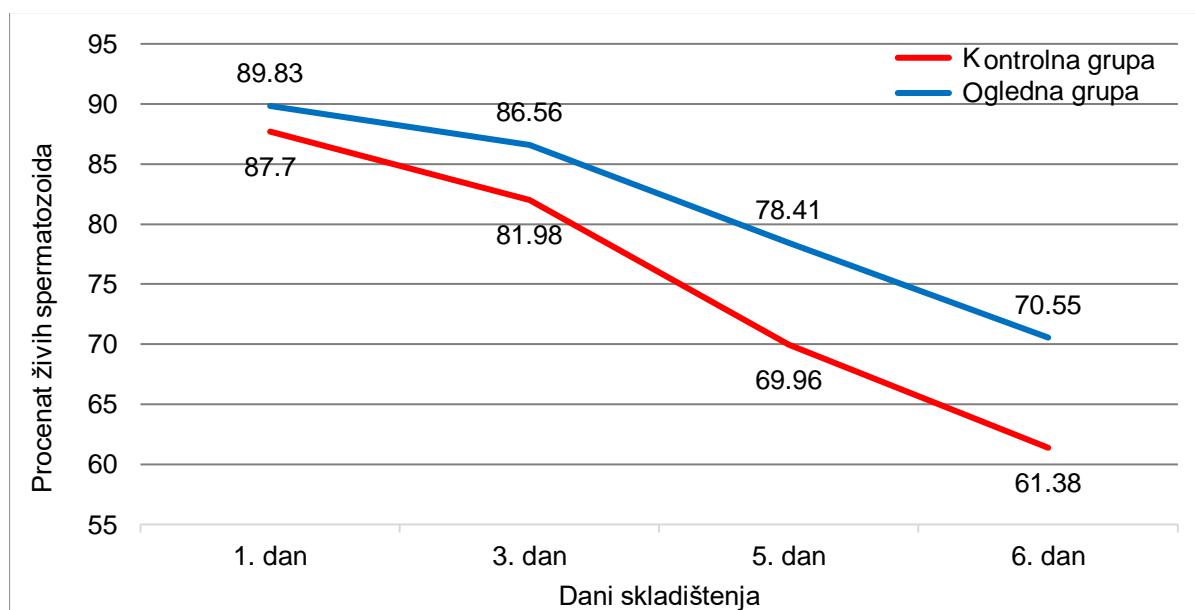
SD- Standardna devijacija; Min.- Minimum; Max.-Maksimum

^{ABC}-Vrijednosti označene različitim slovom statistički značajno se razlikuju na 0,05

Iz podataka prikazanih u tabeli 1. uočava se da je prosječan broj živih spermatozoida u ispitanim uzorcima sjemena kontrolne grupe imao trend postepenog opadanja od prvog (175,40 \pm 5,68) prema šestom danu skladištenja (122,77 \pm 7,71). U uzorcima sjemena ogledne grupe uočava se takođe trend postepenog opadanja broja živih spermatozoida (sa 179,67 \pm 7,68 prvog

do $141,10_{\pm 8,43}$ šestog dana skladištenja), koji je nešto blaži u odnosu na onaj ustanovljen kod kontrolne grupe. Ukoliko se posmatra kretanje procenta živih spermatozoida tokom ispitivanog perioda, uočava se da je on opada u obje grupe, ali je trend njegovog opadanja u kontrolnoj grupi intenzivniji (sa 87,70% prvog na 61,38% šestog dana skladištenja sjemena) u odnosu na oglednu grupu (sa 89,83% prvog na 70,55% šestog dana skladištenja sjemena). Na povoljan uticaj primijenjenog tretmana na očuvanje vitalnosti spermatozoida ukazuju i vrijednosti intervala varijacije za broj živih spermatozoida, koje su u svim danima ispitivanja više kod ogledne u odnosu na kontrolnu grupu uzoraka sjemena.

Obradom podataka iz tabele 2. pomoću analize varijanse sa post hoc Tukey testom, uočava se da postoji statistički značajna razlika ($P < 0,05$) u broju živih spermatozoida unutar ogledne grupe za prvi u odnosu na treći i šesti dan čuvanja sjemena, zatim za treći u odnosu na peti i šesti dan čuvanja sjemena kao i unutar kontrolne grupe između svih dana skladištenja sjemena međusobno. Poređenjem ogledne sa kontrolnom grupom uočava se da postoji statistički značajna razlika u broju živih spermatozoida trećeg, petog i šestog dana čuvanja ($P < 0,05$).



Grafikon 1. Procenat živih spermatozoida tokom svih dana skladištenja

Rezultati ispitivanja morfološkog integriteta spermatozoida prikazanih u grafikonu 1. pokazuju da je procenat živih spermatozoida tokom svih dana skladištenja bio manji u kontrolnoj grupi (87,70; 81,98; 69,96; 61,38%) u odnosu na oglednu grupu (89,83; 86,56;

78,41; 70,55%). Iako je u obje grupe ustanovljen trend opadanja procenta živih spermatozoida, ovi rezultati pokazuju da je antibiotski dodatak razrjeđivaču povoljno uticao na očuvanje vitalnosti spermatozoida tokom perioda čuvanja, zbog čega se može reći da su doze ogledne grupe duže očuvale kvalitet, imaju bolju oplodnu moć i da njihova upotreba pozitivno utiče na veličinu legla.

Tabela 3. Prosječan broj mrtvih spermatozoida

Dani	Kontrolna grupa			Ogledna grupa		
	Prosjek ±SD	%	Min.-Max.	Prosjek±SD	%	Min.-Max.
1.	1,63 _{±1,10} ^A	0,81	0,00-4,00	1,73 _{±1,48} ^A	0,86	0,00-5,00
3.	3,97 _{±2,28} ^A	1,98	0,00-11,00	2,97 _{±1,56} ^A	1,48	0,00-6,00
5.	9,50 _{±4,37} ^B	4,75	2,00-22,00	6,00 _{±3,07} ^{DC}	3,00	0,00-11,00
6.	16,40 _{±5,66} ^C	8,20	8,00-31,00	11,80 _{±4,61} ^E	5,90	4,00-19,00

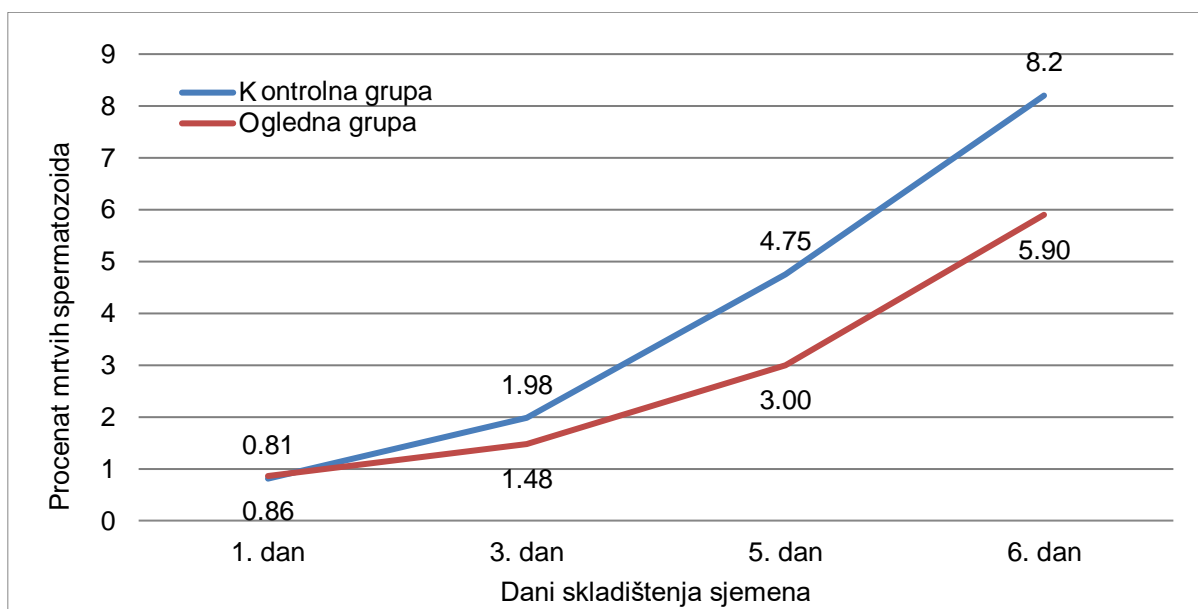
SD– Standardnadevijacija; Min.- Minimum; Max.-Maksimum

^{ABCDE}–Vrijednosti označene različitim slovom statistički značajno se razlikuju na 0,05

Na osnovu podataka prikazanih u tabeli 3. uočava se da je prosječan broj mrtvih spermatozoida u ispitanim uzorcima sjemena kontrolne grupe imao trend postepenog porasta od prvog (1,63_{±1,10}) prema šestom danu skladištenja (16,40_{±5,66}). U uzorcima sjemena ogledne grupe uočava se takođe trend postepenog porasta broja mrtvih spermatozoida (sa 1,73_{±1,48} prvog do 11,80_{±4,61} šestog dana skladištenja), koji je nešto blaži u odnosu na onaj ustanovljen kod kontrolne grupe. Ukoliko se posmatra kretanje procenta mrtvih spermatozoida tokom ispitivanog perioda, uočava se da on raste u obje grupe, ali je trend njegovog porasta u kontrolnoj grupi intenzivniji (sa 0,81% prvog na 8,20% šestog dana skladištenja sjemena) u odnosu na oglednu grupu (sa 0,86% prvog na 5,90% šestog dana skladištenja sjemena). Na povoljan uticaj primijenjenog tretmana na očuvanje vitalnosti spermatozoida ukazuju i vrijednosti intervala varijacije za broj mrtvih spermatozoida, koje su u svim danima ispitivanja više kod kontrolne u odnosu na oglednu grupu uzoraka sjemena.

Obradom podataka iz tabele 3. utvrđeno je da unutar ogledne grupe postoji statistički značajna razlika ($P < 0,05$) u prosječnom broju mrtvih spermatozoida između prvog i petog, prvog i šestog dana čuvanja sjemena, zatim između trećeg, petog i šestog dana čuvanja sjemena međusobno, dok je u kontrolnoj grupi ustanovljena statistički značajna razlika između prvog u odnosu na peti i šesti dan čuvanja sjemena, zatim između trećeg, petog i

šestog dana čuvanja sjemena međusobno. Poređenjem ogledne sa kontrolnom grupom ustanovljene su statistički značajne razlike u prosječnom broju mrtvih spermatozoida za peti i šesti dan čuvanja sjemena.



Grafikon 2. Procenat mrtvih spermatozoida

Procenat mrtvih spermatozoida prikazanih u grafikonu 2. bio je veći u kontrolnoj grupi (0,81; 1,98; 4,75; 8,20%) tokom svih dana, osim prvog dana skladištenja, u poređenju sa oglednom grupom (0,86; 1,48; 3,00; 5,90%).

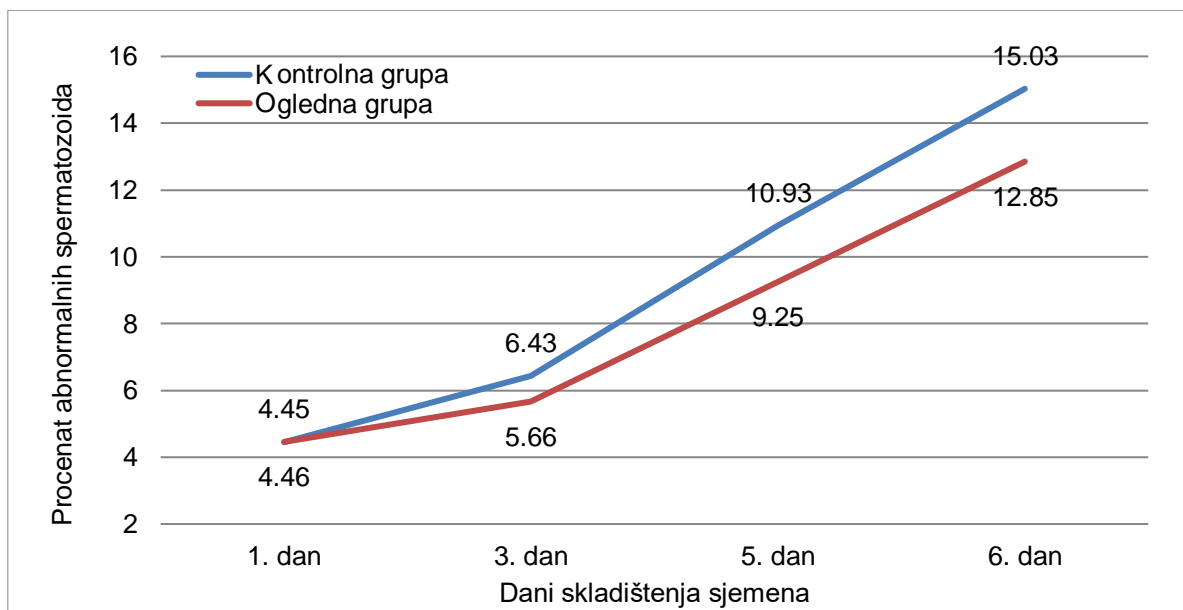
Tabela 4. Prosječan broj abnormalnih spermatozoida

Dani	Kontrolna grupa			Ogledna grupa		
	Prosjeak \pm SD	%	Min.-Max.	Prosjeak \pm SD	%	Min.-Max.
1.	8,90 \pm 2,84 ^A	4,45	1,00-14,00	8,93 \pm 4,39 ^{AG}	4,46	1,00-17,00
3.	12,87 \pm 3,92 ^A	6,43	6,00-22,00	11,33 \pm 4,38 ^{AF}	5,66	3,00-20,00
5.	21,87 \pm 3,56 ^B	10,93	15,00-28,00	18,50 \pm 3,67 ^D	9,25	12,00-25,00
6.	30,07 \pm 5,36 ^C	15,03	21,00-45,00	25,70 \pm 4,45 ^E	12,85	18,00-35,00

SD– Standardnadevijacija; Min.- Minimum; Max.-Maksimum

^{ABCEFG}–Vrijednosti označene različitim slovom statistički značajno se razlikuju na 0,05

Iz podataka prikazanih u tabeli 4. uočava se da je prosječan broj abnormalnih spermatozoida u ispitanim uzorcima sjemena kontrolne grupe imao trend postepenog porasta od prvog ($8,90_{\pm 2,84}$) prema šestom danu skladištenja ($30,07_{\pm 5,36}$). U uzorcima sjemena ogledne grupe uočava se takođe trend postepenog porasta broja abnormalnih spermatozoida (sa $8,93_{\pm 4,39}$ prvog do $25,70_{\pm 4,45}$ šestog dana skladištenja), koji je nešto blaži u odnosu na onaj ustanovljen kod kontrolne grupe. Ukoliko se posmatra kretanje procenta živih spermatozoida tokom ispitivanog perioda, uočava se da on raste u obje grupe, ali je trend njegovog porasta u kontrolnoj grupi intenzivniji (sa 4,45% prvog na 15,03% šestog dana skladištenja sjemena) u odnosu na oglednu grupu (sa 4,46% prvog na 12,85% šestog dana skladištenja sjemena). Na povoljan uticaj primijenjenog tretmana na očuvanje vitalnosti spermatozoida ukazuju i vrijednosti intervala varijacije za broj abnormalnih spermatozoida, koje su u svim danima ispitivanja povoljnije kod ogledne u odnosu na kontrolnu grupu uzoraka sjemena.



Grafikon 3. Procenat abnormalnih spermatozoida

Analizom podataka utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika ($P < 0,05$) u prosječnom broju abnormalnih spermatozoida u oglednoj grupi između prvog i petog kao i prvog i šestog dana, zatim između trećeg, petog i šestog dana čuvanja sjemena međusobno, dok je u kontrolnoj grupi ustanovljena statistički značajna razlika između svih dana čuvanja sjemena međusobno. Poređenjem ogledne sa kontrolnom grupom ustanovljene su statistički

značajne razlike u prosječnom broju abnormalnih spermatozoida peti i šesti dan čuvanja sjemena.

Takođe je i procenat abnormalnih spermatozoida bio veći u kontrolnoj grupi (4,45; 6,43; 10,93; 15,03%), osim prvog dana skladištenja, u poređenju sa oglednom grupom (4,46; 5,66; 9,25; 12,85%).

Tabela 5. Broj spermatozoida sa oštećenom intaktnom membranom

Dani	Kontrolna grupa			Ogledna grupa		
	Prosjek \pm SD	%	Min.-Max.	Prosjek \pm SD	%	Min.-Max.
1.	4,67 \pm 2,17 ^A	2,33	1,00-9,00	2,63 \pm 1,97 ^A	1,31	0,00-8,00
3.	7,13 \pm 4,58 ^A	3,56	1,00-21,00	3,63 \pm 2,5 ^{DA}	1,81	0,00-10,00
5.	12,33 \pm 4,89 ^B	6,16	5,00-26,00	6,17 \pm 2,36 ^{EH}	3,08	1,00-10,00
6.	14,67 \pm 5,71 ^C	7,33	5,00-29,00	7,97 \pm 2,57 ^{FGH}	3,98	2,00-13,00

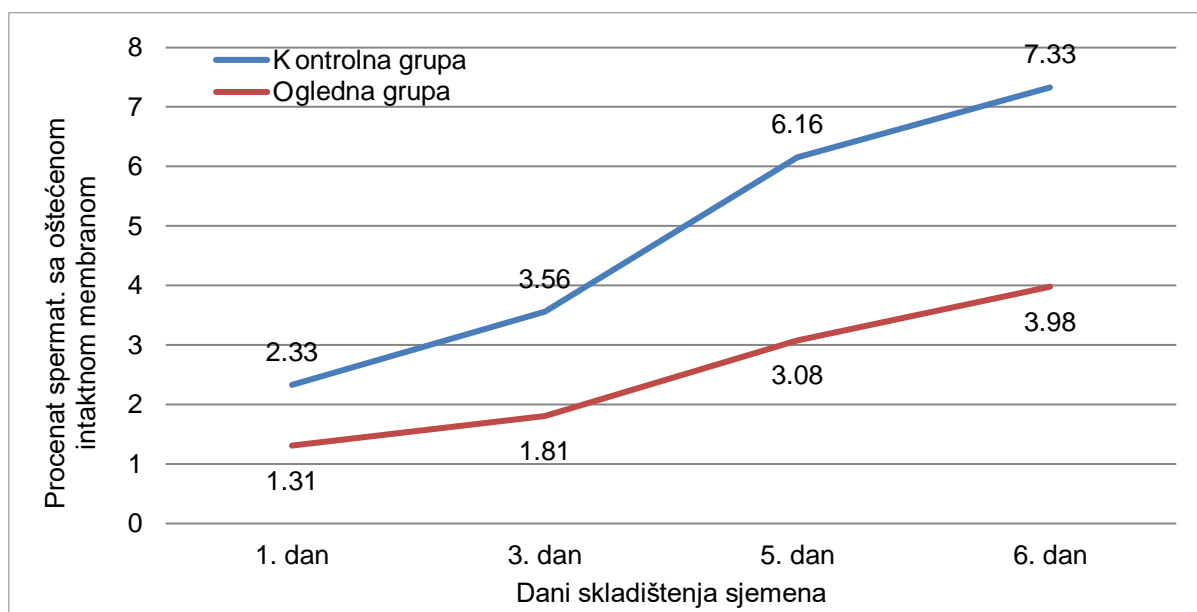
SD– Standardnadevijacija; Min.- minimum; Max.-maksimum

ABCDEF_{GH}–Vrijednosti označene različitim slovom statistički značajno se razlikuju na 0,05

Prema podacima prikazanih u tabeli 5. uočava se da je prosječan broj spermatozoida sa oštećenom intaktnom membranom u ispitanim uzorcima sjemena kontrolne grupe imao trend postepenog porasta od prvog (4,67 \pm 2,17) prema šestom danu skladištenja (14,67 \pm 5,71). U uzorcima sjemena ogledne grupe uočava se takođe trend postepenog porasta broja spermatozoida sa oštećenom intaktnom membranom (sa 2,63 \pm 1,97 prvog do 7,97 \pm 2,57 šestog dana skladištenja), koji je nešto blaži u odnosu na onaj ustanovljen kod kontrolne grupe. Ukoliko se posmatra kretanje procenta spermatozoida sa oštećenom intaktnom membranom tokom ispitivanog perioda, uočava se da on raste u obje grupe, ali je trend njegovog porasta u kontrolnoj grupi intenzivniji (sa 2,33% prvog na 7,33% šestog dana skladištenja sjemena) u odnosu na oglednu grupu (sa 1,31% prvog na 3,98% šestog dana skladištenja sjemena). Na povoljan uticaj primijenjenog tretmana na očuvanje vitalnosti spermatozoida ukazuju i vrijednosti intervala varijacije za broj spermatozoida sa oštećenom intaktnom membranom, koje su u svim danima ispitivanja povoljnije kod ogledne u odnosu na kontrolnu grupu uzoraka sjemena.

Analizom podataka utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika (P<0,05) u prosječnom broju spermatozoida sa oštećenom intaktnom membranom između prvog i petog

kao i prvog i šestog dana, trećeg i šestog dana čuvanja sjemena u oglednoj grupi, dok je u kontrolnoj grupi ustanovljena statistički značajna razlika između prvog u odnosu na peti i šesti dana, zatim između trećeg, u odnosu na peti i šestidan čuvanja sjemena. Poređenjem ogledne sa kontrolnom grupom ustanovljene su statistički značajne razlike za treći, peti i šesti dan čuvanja sjemena.



Grafikon 4. Procenat spermatozoida sa oštećenom intaktnom membranom

Uočeno je da je procenat spermatozoida sa oštećenom intaktnom membranom tokom svih dana skladištenja bio veći u kontrolnoj grupi (2,33; 3,56; 6,16; 7,33%) u odnosu na oglednu grupu (1,31; 1,81; 3,08; 3,98%).

Tabela 6. Prosječan broj spermatozoida uginulih tokom bojenja

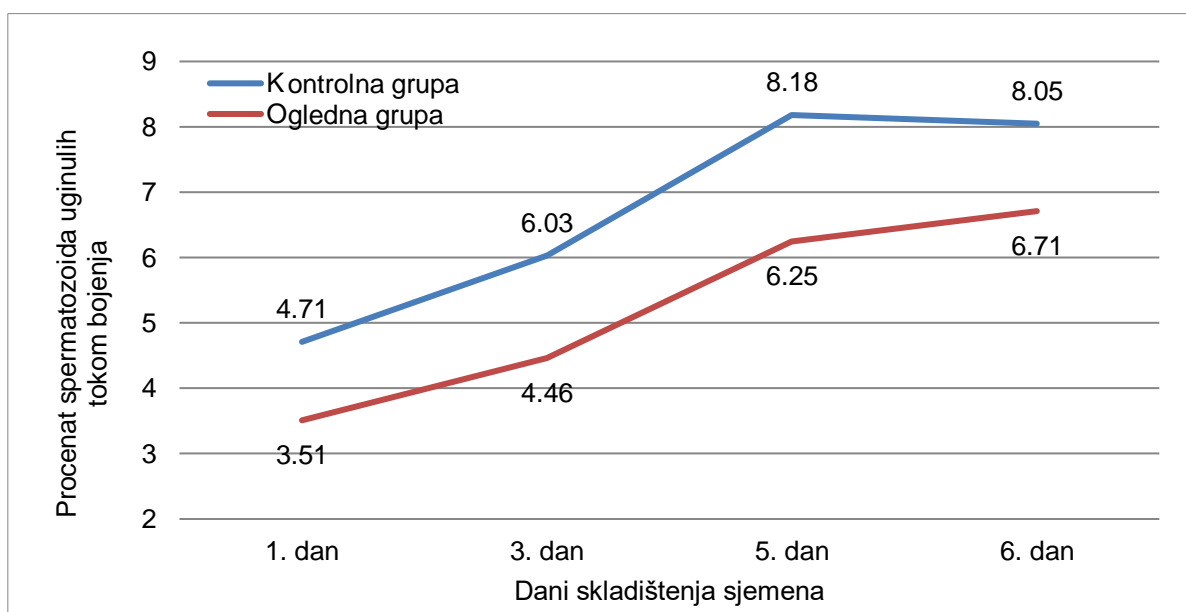
Dani	Kontrolna grupa			Ogledna grupa		
	Prosjeak ±SD	%	Min.-Max.	Prosjeak±SD	%	Min.-Max.
1.	9,43 _{±2,94} ^A	4,71	3,00-18,00	7,03 _{±2,57} ^A	3,51	2,00-11,00
3.	12,07 _{±3,90} ^A	6,03	5,00-22,00	8,93 _{±2,53} ^{AG}	4,46	4,00-15,00
5.	16,37 _{±4,01} ^B	8,18	8,00-24,00	12,50 _{±3,16} ^{DB}	6,25	7,00-19,00
6.	16,10 _{±5,09} ^{CB}	8,05	3,00-25,00	13,43 _{±3,85} ^{FC}	6,71	7,00-21,00

SD– Standardnadevijacija; Min.- Minimum; Max.-Maksimum

ABCDEF–Vrijednosti označene različitim slovom statistički značajno se razlikuju na 0,05

Iz podataka prikazanih u tabeli 6. uočava se da je prosječan broj spermatozoida uginulih tokom bojenja u ispitanim uzorcima sjemena kontrolne grupe imao trend postepenog porasta od prvog ($9,43_{\pm 2,94}$) prema šestom danu skladištenja ($16,10_{\pm 5,09}$). U uzorcima sjemena ogledne grupe uočava se takođe trend postepenog porasta broja živih spermatozoida (sa $7,03_{\pm 2,57}$ prvog do $13,43_{\pm 3,85}$ šestog dana skladištenja), koji je nešto blaži u odnosu na onaj ustanovljen kod kontrolne grupe. Ukoliko se posmatra kretanje procenta spermatozoida uginulih tokom bojenja tokom ispitivanog perioda, uočava se da on raste u obje grupe, ali je trend njegovog porasta u kontrolnoj grupi intenzivniji (sa 4,71% prvog na 8,05% šestog dana skladištenja sjemena) u odnosu na oglednu grupu (sa 3,51% prvog na 6,71% šestog dana skladištenja sjemena). Na povoljan uticaj primijenjenog tretmana na očuvanje vitalnosti spermatozoida ukazuju i vrijednosti intervala varijacije za broj spermatozoida uginulih tokom bojenja, koje su u svim danima ispitivanja povoljnije kod ogledne u odnosu na kontrolnu grupu uzoraka sjemena.

Analizom podataka utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika ($P < 0,05$) u prosječnom broju spermatozoida uginulih tokom bojenja između prvog i petog kao i prvog i šestog dana, zatim između trećeg u odnosu na peti i šesti dan čuvanja sjemena u oglednoj grupi, dok je u kontrolnoj grupi ustanovljena statistički značajna razlika između prvog u odnosu na peti i šesti dan, zatim između trećeg u odnosu na peti i šesti dan čuvanja sjemena. Poređenjem ogledne sa kontrolnom grupom ustanovljene su statistički značajne razlike za treći i peti dan čuvanja sjemena.



Grafikon 5. Procenat spermatozoida uginulih tokom bojenja

Rezultati prikazani u grafikonu 5. pokazuju da je i procenat spermatozoida uginulih tokom bojenja veći u kontrolnoj grupi (4,71; 6,03; 8,18; 8,05%) tokom svih dana skladištenja u odnosu na oglednu grupu (3,51; 4,46; 6,25; 6,71%).

5. DISKUSIJA

Vještačko osjemenjavanje krmača je jedna od osnovnih mjera za unaprjeđenje svinjarstva jedne zemlje i širenje genoma kvalitetnih nerastova u populaciji. Takođe, upotrebom ove biotehnoške metode sprječava se širenje bolesti i ubrzava napredak selekcije, a proizvođači inseminacionih doza sjemena ostvaruju značajnu ekonomsku dobit. Tako *Crowell (2009)* navodi da je u Sjevernoj Karolini 99% krmača obuhvaćeno vještačkim osjemenjavanjem, što iznosi 1,18 od 1,2 miliona krmača u državi. Uzimajući u obzir da se u Sjevernoj Karolini krmače osjemenjavaju dvokratno i da mogu godišnje imati 2,3 legla, može se ostvariti velika ekonomska korist u proizvodnji inseminacionih doza koja bi iznosila oko 14-35 miliona dolara.

Da bi se vještačko osjemenjavanje u svinjarstvu moglo sa uspjehom sprovesti, neophodno je obezbijediti dovoljan broj inseminacionih doza sjemena visokog kvaliteta, porijeklom od nerastova visokog genetskog potencijala. Za obezbjeđenje proizvodnje takvih inseminacionih doza sjemena, neophodan je planski i kontinuirani rad stručnjaka iz oblasti selekcije, ishrane, nadzora nad zdravljem nerastova, ali dominantan faktor je kvalitetan rad reprocentara za proizvodnju ovih doza. Makroskopskim i mikroskopskim analizama kvaliteta ejakulata, zajedno sa kontinuiranim nadzorom nad zdravljem nerastova, smanjuju se šanse za prenos zaraznih bolesti, vrši se bolja selekcija priplodnih nerastova i dobijaju se kvalitetnije doze za vještačko osjemenjavanje.

Vyt (2007) na osnovnu svog istraživanja na nerastovskom sjemenu preporučuje nekoliko važnih savjeta: 1. Tačnost u vizuelnom ispitivanju sjemena je važna za dobijanje tačnih informacija; 2. Povećana pokretljivost spermatozoida znači i povećanje veličine legla; 3. Obratiti pažnju na procjenu koncentracije spermatozoida i kalibraciju fotometra; 4. Saznati više o ejakulatima koristeći objektivne metode; 5. Dugoročni razrjeđivači ne čuvaju uvijek kvalitet sjemena kao što bi trebali; 6. Previše kontakta sa vazduhom utiče na pH vrijednost razrjeđivača, pri čemu dolazi do smanjenja pokretljivosti spermatozoida; 7. Pregled sjemena treba da se izvodi rutinski.

Reproduktivne sposobnosti nerasta zavise od unutrašnjih faktora kao što su rasa (*Smital, 2009; Wolf, 2009*), starost (*Huang i sar., 2010*) i veličina testisa (*Clark i sar., 2003; Pinart i sar., 1999a*). Na ispoljavanje reproduktivnog potencijala nerasta u velikoj mjeri utiču i spoljašnji faktori, kao što su temperatura ambijenta (*Ciereszko i sar., 2000; Yeste i sar.,*

2010), fotoperiod (*Sancho i sar., 2004, 2006; Yeste i sar., 2010*), učestalost uzimanja sjemena (*Pruneda i sar., 2005*), ishrana (*Yeste i sar., 2010, 2011*) i drugi. Svi navedeni faktori utiču i na parametre kvaliteta ejakulata nerasta, od volumena i koncentracije spermatozoida kao najvažnijih stavki makroskopskog pregleda, pa sve do procentualne zastupljenosti različitih kategorija spermatozoida (živi, mrtvi, abnormalni) unutar samog ejakulata, odnosno parametara mikroskopskog pregleda.

Volumen ejakulata i koncentracija spermatozoida predstavljaju parametre za izračunavanje ukupnog broja spermatozoida u ejakulatu, na osnovu kojeg se planira razrijeđenje ejakulata i formiranje inseminacionih doza sjemena, sa dovoljnim brojem vitalnih i fertilno sposobnih spermatozoida. Pri tome je važno naglasiti da su ova dva parametra u negativnoj korelaciji (*Chen i sar., 2003; Zejer i Milewska, 2012*). Heritabilitet za ove osobine ejakulata sličan je kod različitih rasa svinja, a istraživanja pokazuju da volumen sjemena ima najveći heritabilitet, zatim slijede koncentracija spermatozoida i ukupan broj spermatozoida u ejakulatu. Prema nekim istraživanjima, heritabilitet za ukupan broj spermatozoida ima tendenciju da raste zajedno sa dobi nerastova (*Huisman i sar. 2002; Oh i sar. 2006*). Nasuprot pomenutim osobinama, *Wolf (2009, 2010)* navodi da je heritabilitet za osobine pokretljivosti, preživljavanja i morfologije spermatozoida nizak.

Volumen ejakulata nerasta varira između 150-300 ml, a u rijetkim slučajevima i do 500 ml (*Martin, 1982; Garner i Hafez, 1996; Rothschild, 1990; Pinart i sar., 1999; Sancho, 2002*), a ukupan broj spermatozoida u ejakulatu varira između 10×10^9 i 100×10^9 (*Crabo, 1997; Sutkeviciene i sar., 2005*). *Foote (2002)* i *Casas i sar. (2010)* navode da ejakulat nerasta ima zapreminu oko 200-300 ml i sadrži između 10×10^9 i 100×10^9 spermatozoida. Posmatrajući ukupan broj spermatozoida u ejakulatu, *Smital (2009)* u iznadprosječne rase ubraja nerastove pietren, češke mesnate i češke velike bijele svinje, nerastove landrasa, hempšira i jorkšira u prosječne rase, dok su u njegovom istraživanju nerastovi duroka davali ejakulate sa ukupnim brojem spermatozoida ispod prosjeka. S druge strane, *Kennedy i Wilkins (1984)* navode da jorkšir nerastovi rutinski proizvode $10-12 \times 10^9$ više spermatozoida u odnosu na hempšir, landras i durok nerastove.

Prosječan volumen ejakulata u našem istraživanju iznosio je 255 ml kod kontrolne, odnosno 250 ml kod ogledne grupe, što je u skladu sa podacima navedenih autora. Rezultati našeg istraživanja pokazuju da je prosječan broj spermatozoida po dozi u kontrolnoj grupi iznosio 3×10^9 , odnosno $3,4 \times 10^9$ u oglednoj grupi. Na osnovu volumena ejakulata, koncentracije i ukupnog broja spermatozoida u ejakulatu, te standarda kvaliteta reprocentra iz

kojeg su poticale ispitivane doze sjemena, definisan je i broj doza proizvedenih od svakog ejakulata, koji je iznosio prosječno 17,1 doza za kontrolnu i 17,6 doza za ogledu grupu. Pored ostalog, i broj proizvedenih doza po ejakulatu ukazuje na bolje rezultate ostvarene u oglednoj grupi.

Pored koncentracije, ispitivanje morfološkog integriteta spermatozoida je jedan od najvažnijih faktora za ocjenjivanje kvaliteta nerastovskog sjemena. Za određivanje morfološkog integriteta spermatozoida u ovom radu korišten je HOS test. Pomoću HOS testa možemo utvrditi procenat živih, oštećenih, mrtvih i abnormalnih spermatozoida. HOS test je u pozitivnoj korelaciji sa penetracijom zone pelucide (*Jeyendran i sar., 1984*) i stepenom oplodnje *in vitro* (*Brito i sar., 2003; Gadea i Matas, 2000*), ali nije u korelaciji sa fertilitetom *in vivo* kod svinja (*Perez-Llano i sar., 2001*).

Na osnovu rezultata našeg istraživanja uočeno je da je procenat živih spermatozoida tokom svih dana skladištenja u kontrolnoj grupi bio manji (87,70; 81,98; 69,96; 61,38%) u odnosu na oglednu grupu (89,83; 86,56; 78,41; 70,55%). Procenat mrtvih spermatozoida bio je veći u kontrolnoj grupi (0,81; 1,98; 4,75; 8,20) tokom svih dana, osim prvog dana skladištenja, u poređenju sa oglednom grupom (0,86; 1,48; 3,00; 5,90). Prema tome antibiotski dodatak razrjeđivaču Dikol povoljno je uticao na čuvanje nerastovskog sjemena tokom svih dana skladištenja, te su postignuti bolji rezultati u oglednoj grupi u odnosu na kontrolnu grupu. Tokom svih dana skladištenja procenat spermatozoida uginulih tokom bojenja bio je veći u kontrolnoj grupi (4,71; 6,03; 8,18; 8,05) u odnosu na oglednu grupu (3,51; 4,46; 6,25; 6,71). Takođe je i procenat spermatozoida sa oštećenom intaktnom membranom tokom svih dana skladištenja bio veći u kontrolnoj grupi (2,33; 3,56; 6,16; 7,33) u odnosu na oglednu grupu (1,31; 1,81; 3,08; 3,98). U našem istraživanju uočeno je da je procenat abnormalnih spermatozoida bio veći u kontrolnoj grupi (4,45; 6,43; 10,93; 15,03%), osim prvog dana skladištenja, u poređenju sa oglednom grupom (4,46; 5,66; 9,25; 12,85%). Ovi podaci potvrđuju postavljenu hipotezu da će dodatak razrjeđivaču povoljnije uticati na očuvanje morfologije spermatozoida svježeg razrijeđenog sjemena nerasta tokom perioda skladištenja.

Marandici i sar. (2011) su ispitivali procenat spermatozoida sa normalnom morfologijom i došli su do rezultata da je procenat na dan uzimanja sjemena iznosio 52,3%, 3.dana skladištenja 57,5% i 6.dana 47,3%. U našem radu dobijeni su bolji rezultati po pitanju procenta živih spermatozoida i u kontrolnoj, a posebno u oglednoj grupi.

Huo i sar. (2002) navode da su u svom istraživanju koristili BTS za skladištenje sjemena i da je 9. dana skladištenja procenat živih spermatozoida iznosio preko 50%. Ovi rezultati su u skladu sa našim rezultatima koji su pokazali da je 6. dana skladištenja procenat živih spermatozoida iznosio 70,55% (ogledna grupa), te da su inseminacione doze ogledne grupe još uvijek zadovoljavale standarde kvaliteta, odnosno bile upotrebljive za osjemenjavanje krmača.

Integritet membrane je pokazatelj vitalnosti spermatozoida i neophodan je kako bi se očuvala funkcija spermatozoida. Kod procjene integriteta membrane spermatozoida, nerastovski ejakulati trebali bi sadržavati 85 % spermatozoida sa intaktnom membranom da bi se smatrali da su dobrog kvaliteta (*Martin, 1982; Buxade, 1984; Briz, 1994; Bonet i sar., 1995; Briz i sar., 1995; Pinart i sar., 1999; Sancho, 2002*).

Prema *Gadea (2002)* ejakulati fertilno sposobnih nerastova sadrže manje od 10% abnormalnih spermatozoida, dok se ejakulati sa preko 20-25% abnormalnih spermatozoida odbacuju. Rezultati našeg istraživanja pokazuju da je procenat abnormalnih spermatozoida zabilježen 5. dana iznosio 10,93% u kontrolnoj, odnosno 9,25% u oglednoj grupi, što znači da su doze u oglednoj grupi bile za upotrebu i 5. dana. *Briz i sar. (1996)* navode da su abnormalnosti glave i repa kod spermatozoida rezultat aglutinacije spermatozoida u epididimisu.

Lustykova i sar. (2008) su vršili eksperimente tokom 7 godina na 67 nerastova za konzervaciju sakupljenog nerastovskog sjemena. Koncentraciju spermatozoida utvrdili su pomoću citometrijske metode koristeći Birkerovu komoru, a procenat morfološko abnormalnih spermatozoida su ustanovili metodom bojenja po *Čerovsky (1976)* i dobili rezultate: volumen sjemena 190,5 ml, koncentraciju spermatozoida $489,12 \cdot 10^3/\text{mm}^3$ i 19,67% morfološko abnormalnih spermatozoida. U ovom istraživanju dobijeni su bolji rezultati po pitanju procenta morfološko abnormalnih spermatozoida koji je iznosio maksimalno 15,03% (šesti dan, kontrolna grupa).

Yurevna i Venjaminovich (2013) su od 2007-2012 izvodili eksperimente na 60 nerastova landras rase. U svom radu došli su do rezultata da se broj spermatozoida sa normalnom morfoloijom povećao sa godinama starosti nerastova. Rezultati su pokazali da su ejakulati nerastova starosti od 360 dana boljeg kvaliteta od ejakulata nerastova starosti od 180 dana. *Xu i sar. (1998)* došli su do zaključka da je procenat morfološki ispravnih spermatozoida u pozitivnoj korelaciji sa veličinom legla.

Loreta i sar. (2002) u rezultatima svog istraživanja došli su do zaključka da ejakulati nerastova sadrže manji procenat pokretnih i morfološko ispravnih spermatozoida u ljeto i u proljeće, u odnosu na zimu i jesen. Efekat sezone na kvalitet nerastovskog sjemena potvrdili su i drugi autori (*Frydrychová i sar., 2007; Milewska i Falkowski, 2004; Park i Yi, 2002; Zejer i Milewska, 2012*). Isto tako, pokazalo se da stariji nerastovi imaju ejakulate slabijeg kvaliteta u odnosu na mlađe nerastove, dok rasa nema značajnog uticaja na morfološke karakteristike spermatozoida. Neki naučnici navode da sezona nema značajnog uticaja na morfološke karakteristike spermatozoida kod nerastova (*Kunavongkrit i Prateep, 1995; Borg i sar., 1993*).

Način držanja nerastova i tehnologija proizvodnje inseminacionih doza sjemena nerasta neminovno su povezani sa većim ili manjim stepenom kontaminacije sjemena mikroorganizmima, među kojima su na prvom mjestu bakterije. *Baracaldo i Ward (2008)* predlažu da se eksperimenti na nerastovskom sjemenu, zbog rizika na bakteriospermiju, zasnivaju na rutinskoj kontroli kvaliteta razrijeđenog ejakulata kako bi se ispitala bakterijska kontaminacija. Bakteriospermija dovodi do smanjenja kvaliteta sjemena i pokretljivosti spermatozoida, dok kod krmača kontaminacija sjemena može prouzrokovati smanjen fertilitet.

Jedan od osnovnih načina za umanjene štetnog efekta bakterijske kontaminacije sjemena jeste dodavanje antibiotika u sjeme. Većina komercijalnih razrjeđivača za sjeme nerasta u svom sastavu ima i antibiotik, a u novije vrijeme su razvijeni i posebni antibiotski dodaci sjemenu, koji dodatno smanjuju bakterijsku kontaminaciju i umanjuju štetni efekat prisustva bakterija na kvalitet i održivost sjemena. Jedan od takvih dodataka je i Dikol, korišten u našem istraživanju.

Huerta i sar. (2011) su za cilj u svom radu imali da demonstriraju efekte Dikola na kontaminaciju sjemena u *in vitro* uslovima. Uzorci sjemena su inkubirani na sobnoj temperaturi i ocjenjeni na bakterijski sadržaj prema bakterijskoj kulturi poslije 10, 20, 25, 30, 40, 50 minuta i poslije 24h. Poslije 24h, bakterijski sadržaj se drastično smanjio i dostigao je $<10^3$ cfu/ml u svim uzorcima sa Dikolom. Kontrolni uzorci sa standardnim razrjeđivačem pokazali su samo blago smanjenje bakterijskog sadržaja i dostigli su $<10^3$ cfu/ml samo poslije 24h kod *Klebsiella oxytoca* i *Pantoea spp.* Rezultati su pokazali da je u uzorcima sjemena sa Dikolom došlo do značajnog smanjenja bakterijske kontaminacije ($p < 0,0001$). Na ovaj način dokazalo se da je Dikol sredstvo koje pruža kontrolu nad uobičajenom bakterijskom kontaminacijom nerastovskog sjemena.

Zbog lošeg kvaliteta sjemena 12h nakon čuvanja, *Dahmani i sar. (2012)* su izveli eksperiment na sjemenu od 20 nerastova koje je tretirano sa gram negativnom bakterijom *Serratia marcescens* i podijeljeno u dvije grupe. Prva grupa je bila sa standardnom procedurom, dok se u drugu grupu dodao i Dikol. Rezultati ukupnog broja bakterija i sojeva su pokazivali prisustvo bakterije *Serratia marcescens* u sjemenu i sjemenim dozama bez Dikola, ali odsustvo u svim ispitanim uzorcima sa Dikolom.

Dahmani i sar. (2015) su za cilj svog istraživanja imali da demonstriraju efekat Dikola na kontrolu kontaminacije sjemena u *in vitro* uslovima i primjenu razrjeđivača bez antibiotika za završno razrijeđenje. Od 5 nerastova sakupili su 5 ejakulata i podijelili u tri grupe koje su razrijeđene (1:1) sa Dikolom, Vitasemom i Duragenom. Poslije 25-50 minuta izveli su završno razrijeđenje sa Duragenom, Vitasemom ili razrjeđivačem bez antibiotika kako bi postigli 3×10^7 spermatozoida/ml. Uzorke su skladištili na 16°C i dodali bakterije nakon 24h. Rezultati su pokazali da skoro nije bilo rasta bakterija u grupi uzoraka sa Dikolom, čak i u slučaju sa završnim razrijeđenjem sa razrjeđivačem bez antibiotika. Grupa uzoraka sa Duragenom pokazala je mali rast *Serrata marcescens* do 100 ufc/ml. Ipak, grupa sa Vitasemom je bila više osjetljiva na rast bakterija kao što je *Serratia marscense* i *Achromobacter xylosoxidans*. Zaključili su da je Dikol prikladno sredstvo za kontrolu kontaminacije u ejakulatu i da je završno razrijeđivanje sa razrjeđivačem bez antibiotika takođe efikasno.

Suwimonteerabutr i sar. (2011) su ispitivali efikasnost Dikola za hladno skladištenje nerastovskog sjemena. U istraživanju su koristiti 7 ejakulata od 7 različitih nerastova koje je čuvano u 2 različita kontejnera, prvi sa konvencijalnom tehnikom sakupljanja (kontrola), a drugi je čuvan u vreći za sakupljanje sjemena u kojoj je bilo 75 ml Dikola (tretman). Ejakulati sa najmanje 70% pokretnih i 90% morfološko normalnih spermatozoida su razrijeđeni sa 2 različita komercijalna razrjeđivača: kratkoročni (OPTIM-I.A._R) i dugoročni (DURAGEN_R). Temperatura je podešena na 16°C , a kvalitet sjemena je ispitivan 0, 1, 3, 7 i 12 dana nakon hladnog skladištenja. Rezultati su pokazali da je bakterijska kontaminacija bila veća u kontrolnoj grupi (7/7) nego u tretmanskoj (3/7) grupi ($P=0.06$). Na osnovu rezultata došli su do zaključka da Dikol značajno smanjuje bakterijsku kontaminaciju tokom procesa sakupljanja sjemena i da nije ostavilo negativne efekte na sposobnost spermatozoida.

6. ZAKLJUČCI

Na osnovu rezultata istraživanja dobijenih u radu mogu se izvesti sljedeći zaključci:

- Prosječna koncentracija spermatozoida u dozi bila je manja u kontrolnoj grupi (3×10^9) u odnosu na oglednu grupu ($3,4 \times 10^9$);
- procenat živih spermatozoida je tokom svih dana bio manji u kontrolnoj grupi (87,70; 81,98; 69,96; 61,38%) u odnosu na oglednu grupu (89,83; 86,56; 78,41; 70,55%);
- procenat spermatozoida sa oštećenom intaktnom membranom bio je veći u kontrolnoj grupi (2,33; 3,56; 6,16; 7,33%) u odnosu na oglednu grupu (1,31; 1,81; 3,08; 3,98%);
- procenat spermatozoida uginulih tokom bojenja bio je veći u kontrolnoj grupi (4,71; 6,03; 8,18; 8,05%) tokom svih dana skladištenja u odnosu na oglednu grupu (3,51; 4,46; 6,25; 6,71%);
- procenat mrtvih spermatozoida bio je veći u kontrolnoj grupi (0,81; 1,98; 4,75; 8,20%) tokom svih dana skladištenja, osim prvog dana, u odnosu na oglednu grupu (0,86; 1,48; 3,00; 5,90%);
- procenat abnormalnih spermatozoida bio je veći u kontrolnoj grupi (4,45; 6,43; 10,93; 15,03%) tokom svih dana skladištenja, osim prvog dana, u odnosu na oglednu grupu (4,46; 5,66; 9,25; 12,85%);
- antibiotski dodatak razrijeđivaču Dicol daje bolje rezultate u pogledu očuvanja morfologije spermatozoida tokom perioda skladištenja, pogotovo 5. i 6. dana, u odnosu na razrijeđivač bez Dicola;
- rutinsko ispitivanje morfološkog integriteta nerastovskog sjemena na području Republike Srpske doprinijelo bi poboljšanju selekcije priplodnih nerastova, a samim tim i povećanju ekonomske dobiti.

Na osnovu svega navedenog može se izvesti generalni zaključak da upotreba antibiotskog dodatka razrijeđivaču Dicol pozitivno utiče na očuvanje vitalnosti i morfološkog integriteta spermatozoida tokom perioda skladištenja u odnosu na upotrebu samo

komercijalnog razrjeđivača, čineći inseminacione doze nerastovskog sjemena duže upotrebljivim za vještačko osjemenjavanje.

7. LITERATURA

- Aitken, R., J., Currym B., J. (2011): Redox regulation of human sperm function: from the physiological control of sperm capacitation to the etiology of infertility and DNA damage in the germ line. *Antioxid Redox Signal*, 14:367–381.
- Alm, K., Peltoniemi, O., A., Koskinen, E., Andersson, M. (2006): Porcine field fertility with two different insemination doses and the effect of sperm morphology. *ReprodDomestAnim*, 41: 210-213.
- Almond, G., Britt, J., Flowers, B., Glossop, C., Levis, D., Morrow, M. and T. See. (1998): *The Swine A.I. Book*, Raleigh: Morgan Morrow Press.
- Althouse, G. (2007): Artificial insemination in swine: boar stud management. In: *Current therapy in larg animal theriogenology*, 731–738.
- Althouse, G., C., Kuster, C., E., Clark, S., G., Weisiger, R., M. (2000): Field investigations of bacterial contaminants and their effects on extended porcine semen. *Theriogenology*, 53:1167–1176.
- Althouse, G., C., Lu, K., G. (2005): Bacteriospermia in extended porcine semen. *Theriogenology*, 63: 573-584.
- Althouse, G., C., Wilson, M., E., Kuster, C., Parsley, M.(1998): Characterization of lower temperature storage limitations of fresh-extended porcine semen. *Theriogenology*,50:535-543.
- Alvarez, J., G., Storey, B., T. (1982): Spontaneous lipid peroxidation in rabbit epididymal spermatozoa: its effect on sperm motility. *Anim Reprod Sci*, 127:176–182.
- Am-in, N., Kirkwood, R., N., Techakumphu, M., Tantasuparuk, W. (2011): Lipid profiles of sperm and seminal plasma from boars having normal or low sperm motility. *Theriogenology*, 75:897–903.
- Auroux, M., R., Jacques, L., Mathieu, D., Auer, J. (1991): Is the sperm bacterial ratio a determining factor in impairment of sperm motility: an in vitro study in man with *Escherichia coli*. *Intl J Androl*, 14:264–270.
- Awda, B., J., Mackenzie-Bell, M., Buhr, M., M. (2009): Reactive oxygen species and boar sperm function. *Biol Reprod*, 81:553–561.
- Badia, E. (2003): Estudi estructural, ultraestructural i histoquimic de les glandules sexuals accessories del mascle reproductor porci. Doctoral Thesis. Ed Universitat de Girona.

Bailey, J., L., Lessard, C., Jacques, J., Breque, C., Dobrinski, I., Zeng, W., Galantino-Homer, H., L. (2008): Cryopreservation of boar semen and its future importance to the industry. *Theriogenology*, 70:1251–1259.

Baracaldo, M., Ward, J. (2008): Quality control of extended boar semen. Canada.

Bjorndahl, L., Barratt, C., L.(2005): Semen analysis: setting standards for the measurement of sperm numbers. *JAndrol*,26:11.

Bjorndahl, L., Soderlund, I., Johansson, S., Mohammadieh, M., Pourian, M., R., Kvist, U.(2004): Why the WHO recommendations for eosin-nigrosin staining techniques for human sperm vitality assessment must change. *JAndrol*, 25: 671-678.

Boender., G., J., Meester, R., Gies, E., De Jong, M., C. (2007): The local threshold for geographical spread of infectious diseases between farms. *Prev Vet Med*, 82: 90-101.

Bolarin, A., G. (2011): Bacteriologia en semen de porcino. *Av Tecnol Porc VIII* 5:20–30.

Bonet, S., Briz, M., Pinart, E., Camps, R., Fradera, A., Casadevall, M. (1995): Light microscopy characterization of sperm morphology. *Microsc Anal*, 9:29–31.

Bonet, S., Briz, M., Pinart, E., Sancho, S., Garcia-Gil, N., Badia, E. (2000): Morphology of boar spermatozoa. Institut d'Estudis Catalans, Barcelona.

Bonet, S., Martinez, E., Rodriguez, J., E., Barrera, X. (2006): Biotecnologia de la Reproduccion Porcina. Manual de Tecnicas de Reproduccion Asistida en Porcino. Universitat de Girona y Red Tematica de la Reproduccion Porcina.

Borg, K., E., Lunstra, D., D., Christenson, R., K. (1993): Semen characteristics, testicular size, and reproductive hormone concentrations in mature Duroc, Meishan, Fengjing, and Minshu boars. *Biol Reprod*, 49:515–521.

Stanković,B., M. (2011): Procena uspeha dubokog zamrzavanja na osnovu kvaliteta spermatozoida u nativnoj spermi nerasta i fertilitet intrauterino osjemenjenih krmača.

Brito, L., F., Barth, A., D., Bilodeau-Goeseels, S., Panich, P., L., Kastelic, J., P. (2003): Comparison of methods to evaluate the plasmalemma of bovine sperm and their relationship with in vitro fertilization rate. *Theriogenology*, 60:1539–51.

Briz, M. (1994): Microscopical analysis of the ejaculated sperm and the sperm epididymal maturation of sus domesticus. Doctoral Thesis.

Briz, M., Bonet, S., Pinart, E., Camps, R. (1996): Sperm malformations throughout the boar epididymal duct. *Anim Reprod Sci*, 43:221–239.

Briz, M., D., Bonet, S., Pinart, B., Egozcue, J., Camps, R. (1995): Comparative study of boarsperm coming from the caput, corpus, and cauda regions of the epididymis. *J Androl*, 16:175–188.

- Brouwers, J., F., Silva, P., F., N., Gadella, B., M. (2005): New assays for detection and localization of endogenous lipid peroxidation products in living boar sperm after BTS dilution or after freeze-thawing. *Theriogenology*, 63: 458–469.
- Buxade, C. (1984): Ganado Porcino. Sistemas de Explotacion y Tecnicas de Produccion. Mundi- Prensa. Madrid, Spain.
- Canvin, A., T., Buhr, M., M. (1989): Effect of temperature on the fluidity of boar sperm membranes. *J Reprod Fertil*, 85: 553–540.
- Casas, I., Althouse, G., C. (2013): The protective effect of a 17⁰C holding time on boar sperm plasma membrane fluidity after exposure to 5⁰C. *Cryobiology*, 66: 69–75.
- Casas, I., Sancho, S., Ballester, J., Briz, M., Pinart, E., Bussalleu, E., Yeste, M., Fabrega, A., Rodriguez-GiJE, Bonet, S. (2010): The HSP90AA1 sperm content and the prediction of the boar ejaculate freezability.
- Casas, I., Sancho, S., Briz, M., Pinart, E., Bussalleu, E., Yeste, M., Bonet, S. (2009): Freezability prediction of boar ejaculates assessed by functional sperm parameters and sperm proteins. *Theriogenology*, 74:940–950.
- Casas, I., Sancho, S., Briz, M., Pinart, E., Bussalleu, E., Yeste, M., Bonet, S. (2010): Fertility after postcervical artificial insemination with cryopreserved sperm from boar ejaculates of good and poor freezability. *Anim Reprod Sci*, 118:69–76.
- Cerolini, S., Maldjian, A., Surai, P., Noble, R. (2000): Viability, susceptibility to peroxidation and fatty acid composition of boar semen during liquid storage. *Anim Reprod Sci*, 58:99–111.
- Čeřovský, J., (1976): Metoda barveni kančich spermii pro morfologicke hodnoceni. *Živ Vyr*, 21: 361-366.
- Chantler, E., Abraham-Peskir, J., V. (2004): Significance of midpiece vesicles and functional integrity of the membranes of human spermatozoa after osmotic stress. *Andrologia*, 36:87–93.
- Chen, P., Baas, T., J., Dekkers, J., C., M., Koehler, K., J., Mabry, J., W. (2003): Evaluation of strategies for selection for lean growth rate in pigs. *J Anim Sci*, 81: 1150-1157.
- Christensen, P., Boelling, D., Pedersen, K., M., Korsgaard, I., R., Jensen, J. (2005): Relationship between sperm viability as determined by flow citometry and nonreturn rate of dairy bulls. *J Androl*, 26:98-106.
- Christensen, P., Stryhn, H., Hansen, C. (2005): Discrepancies in the determination of sperm concentration using Burker-Turk, Thoma and Makler counting chambers. *Theriogenology*, 63:992-1003.

Christova, Y., James, P., S., Cooper, T., G., Jones, R. (2002): Lipid diffusion in the plasma membrane of mouse spermatozoa: changes during epididymal maturation, effects of pH, osmotic pressure, and knockout of the c-ros gene. *J Androl* 23:384–392.

Ciereszko, A., Ottobre, J., S., Glogowski, J. (2000): Effects of season and breed on sperm acrosin activity and semen quality of boars. *Anim Reprod Sci*, 64:89–96.

Clark, S., G., Schaeffer, D., J., Althouse, G., C. (2003): B-mode ultrasonic evaluation of paired testicular diameter of mature boars in relation to average total sperm numbers. *Theriogenology*, 60:1011–1023.

Colenbrander, B., Feitsma, H., Grooten, H., J. (1993): Optimizing semen production for artificial insemination in swine. *J Reprod Fertil Suppl*, 48:207–215.

Cooper, T., G. (2005): Cytoplasmic droplets: the good, the bad or just confusing? *Hum Reprod*, 20:9–11.

Cooper, T., G., Yeung, C-H. (2003): Acquisition of volume regulatory response of sperm upon maturation in the epididymis and the role of the cytoplasmic droplet. *Microsc Res Techn*, 61:28–38.

Cordova-Izquierdo, A., Munoz-Mendoza, R., Cordova-Jimenez, S., Cordova-Jimenez, A., Perez- Gutierrez, J., F. (2004): Características del semen de verraco y su evaluación práctica. *Porcinocultura*.

Crabo, B., G. (1997): Reproductive examination and evaluation of the boar. In: *Current therapy in large animal theriogenology*. W.B. Saunders Company, Philadelphia.

Crowell, S., S. (2009): Evaluating temperature effects and extension cooling rates on boar semen quality. Raleigh, North Carolina.

Cummins, J.,M., Woodall, P.,F.(1985): On mammalian sperm dimensions. *J Reprod Fertil*, 75: 153–175.

Curry, M., R., Watson, P., F. (1994): Osmotic effects on ram and human sperm membranes in relation on thawing injury. *Cryobiology*, 31:39–46.

Dahmani, Y., Ausejo, R., Mendoza, N, Yeregui, J. (2015): Antibacterial efficiency of Dicol and reduction of antibiotics use in boar semen doses. Magapor, Spain.

Dahmani, Y., Malo, C., Ausejo, R., Huerta, I., Ubeda, J., L. (2012): Control of boar semen doses infections by *Serratia marscecens*. Magapor, Spain.

De Ambrogi, M., Ballester, J., Saravia, F., Caballero, I., Johannisson, A., Wallgren, M., Andersson, M., Rodriguez-Martinez, H.(2006):Effect of storage in short- and long-term commercial semen extenders on the motility, plasma membrane and chromatin integrity of boar spermatozoa. *Int J Androl*, 29: 543-552.

- Diemer, T., Weidner, W., Michelmann, H., W., Schiefer, H., G., Rován, E., Mayer, F. (1996): Influence of *Escherichia coli* on motility parameters of human spermatozoa in vitro. *Int J Androl*, 19:271–277.
- Dominguez, J., C., Alegre, B., Gonzalez, R., Tejerina, F., Pelaez, J., Ferreras, A., Bernal, S., Cardenas, S. (2006): Desarrollo historico de la inseminacion artificial porcina. In: *Porcina* (ed) Serv. Publics.UdG - Red Tematica Nac.Reprod. Manual de Tecnicas de Reproduccion Asistida en Porcina.
- Donadeu, (2004): Advances in male swine artificial insemination (AI) techniques. *Pig J*, 54: 110-122.
- Dyce, K., M., Sack, W., O., Wensing, C., J., G. (1999): *Anatomia Veterinaria*. Mexico, McGraw-Hill Interamericana.
- Estienne, M., J., Harper, A., F., Day, J., L. (2007): Characteristics of sperm motility in boar semen diluted in different extenders and stored for seven days at 18°C. *Reprod Biol*, 7:221–231.
- Flowers, W., L. (2008): Genetic and phenotypic variation in reproductive traits of AI boars. *Theriogenology*, 70:1297–1303.
- Foote, R., H. (2002): Within-herd use of boar semen at 5 degrees C, with a note on electronic monitoring of oestrus. *Reprod Domest Anim*, 37:61–63.
- Ford, J., J., Wise, T., H., Lunstra, D., D., Rohrer, G., A. (2001): Interrelationships of porcine X and Y chromosomes with pituitary gonadotropins and testicular size. *Biol Reprod*, 65:906–912.
- Foxcroft, G., R., Dyck, M., K., Ruiz-Sanchez, A., Novak, S., Dixon, W., T. (2008): Identifying useable semen. *Theriogenology*, 70:1324–1336.
- Fraser, L., Gorszczaruk, K., Strzezek, J. (2001): Relationship between motility and membrane integrity of boar spermatozoa in media varying in osmolality. *Reprod Domest Anim*, 36:325–329.
- Frydrychová, S., Lustyková, A., Čerovský, J., Lipenský, J., Rozkot, M. (2007): Seasonal changes of boar semen production. *Res Pig Breed*, 1: 31-33.
- Gadea, J. (2002): Sperm under the microscope. *Pig Int*, 32, 24–27.
- Gadea, J. (2003): Semen extenders used in the artificial insemination of swine. 1: 17-27.
- Gadea, J., Matas, C. (2000): Sperm factors related to the in vitro penetration of porcine oocytes. *Theriogenology*, 54: 1343–57.

- Gadea, J., Selles, E., Marco, M., A. (2004): The predictive value of porcine seminal parameters on fertility outcome under commercial conditions. *Reprod Dom Anim*, 39:303–308.
- Garner, D., L., Hafez, E., S., E. (1996): Espermatozoides y Plasma seminal. In: *Reproduccion e Inseminacion Artificial en Animales*. McGraw-Hill Interamericana, Mexico, pp. 158–179.
- Gogol, P., Szczesniak-Fabianczyk, B., Wierzchos-Hilczer, A. (2009): The photon emission, ATP level and motility of boar spermatozoa during liquid storage. *Reprod Biol*, 9:39–49.
- Gonzalez-Urdiales, R., Tejerina, F., Dominguez, J., C., Alegre, B., Ferreras, A., Pelaez, J., Bernal, S., Cardenas, S. (2006): Tecnicas de analisis rutinario de la calidad espermatica: motilidad, vitalidad, concentracion, resistencia osmotica y morfologia espermatica. In *Manual de Tecnicas de Reproduccion Asistida en Porcino*, pp 19–38.
- Guerin., B. (1996): Viral excretion in boar semen and potential for contamination. *Reprod Domest Anim*, 31: 217-223.
- Guthrie, H., D., Welch, G., R. (2006): Determination of intracellular reactive oxygen species and high mitochondrial membrane potential in Percoll-treated viable boar sperm using fluorescenceactivated flow cytometry. *J Anim Sci*, 84:2089–2100.
- Haesebrouck, F., Pasmans, F., Chiers, K., Maes, D., Ducatelle, R., Decostere, A. (2004): Efficacy of vaccines against bacterial diseases in swine: What can we expect? *Vet Microbiol*, 100: 255-268.
- Hansen, C., Christensen, P., Stryhn, H., Hedeboe, A., M., Rode, M., Boe-Hansen, G.(2002): Validation of the FACSCount AF system for determination of sperm concentration in boar semen. *ReprodDomestAnim*,37:330-334.
- Hemsworth, P.,H., Tilbrook, A., J. (2007): Sexual behaviour of male pigs. *Horm Behav*, 52:39–44.
- Hofmo, P., O., Kruse, H., Hofshagen, M., Holstad, G.(1999): Characterisation and antimicrobial susceptibility of bacteria isolated from fresh diluted boar semen. 11th European AIVets Meeting, Hamar, Norway.
- Holt, W., V., Hernandez M., Warrell, L., Satake, N. (2010): The long and the short of sperm selection in vitro and in vivo: swim-up techniques select for the longer and faster swimming mammalian sperm. *J Evol Biol*, 23:598–608.
- Huang, Y., H., Lo, L., L., Liu, S., H., Yang, T., S. (2010): Age-related changes in semen quality characteristics and expectations of reproductive longevity in Duroc boars. *Anim Sci J*, 81:432–437.

Huerta, I., Dahmani, Y., Ausejo, R., Ubeda, J., L. (2011): A new tool for control of bacterial contamination in boar semen. Spain.

Hugues, P., E., Varley, M., A. (1984): Reproduccion del Cerdo. Acribia. Zaragoza, Spain.

Huisman, A., E., Veerkamp, R., F., Vand Arendonk, J., A., M. (2002): Genetic parameters for various random regression models to describe the weight data of pigs. *J Anim Sci*, 80:575–582.

Huo, L-J., Ma, X-H., Yang, Z-M., (2002): Assessment of sperm viability, mitochondrial activity, capacitation and acrosome intactness in extended boar semen during long term storage. *Theriogenology*, 58: 1349–1360.

Ito, T., Niwa, T., Kudo, A. (1948): Studies on artificial insemination in swine. *Zootech Exp Sta Res Bull*, 55:1-74.

Ivanow, E., I. (1907): De la fe condation artificielle chez les mammife res. *Arch Sci Biol*, 12:377-511.

Jeyendran, R., S., van der Ven, H., H., Perez-Pelaez, M., Crabo, B., G., Zaneveld, L., J. (1984): Development of an assay to assess the functional activity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J Reprod Fertil*, 70:219–228.

Johnson, L., A. (1998): Current developments in swine semen: preservations, artificial insemination and sperm sexing. *Proc 15th Int Pig Vet Sci Congress*, 1:225–229.

Johnson, L., A., Aalbers, J., G., Groote, H., J., G. (1988): Artificial insemination of swine: fecundity of boar semen stored in beltsville thawing solution (BTS), modified modena (MM), or MR-A and inseminated on one, three and four days after collection. *Zuchthyg*, 23:49–55.

Johnson, L., A., Weitze, K., F., Fiser, P., Maxwell, W., M., C. (2000): Storage of boar semen. *Anim Reprod Sci*, 62:143–172.

Jones, A., R. (1997): Metabolism of lactate by mature boar spermatozoa. *Reprod Fertil Develop*, 9:227–232.

Jones, A., R., Chantrill, L., A., Cokinakis, A. (1992): Metabolism of glycerol by mature boar spermatozoa. *J Reprod Fertil*, 94:129–134.

Jones, A., R., Connor D., E. (2000): Fructose metabolism by mature boar spermatozoa. *J Reprod Fertil*, 94:129–134.

Kennedy, B., W., Wilkins, J., N. (1984): Boar, breed and environmental factors influencing semen characteristics of boars used in artificial insemination. *Can J Anim Sci*, 64: 833 – 843.

Kim, S., Lee, Y., J., Kim, Y., J. (2011): Changes in sperm membrane and ROS following cryopreservation of liquid boar semen stored at 15⁰C. *Anim Reprod Sci*, 124: 118–124.

Knobil, E., Neill, J. (2006): *Physiology of Reproduction*, Academic, Waltham.

Knox, R.(2004): Practicalities and pitfalls of semen evaluation. *Adv Pork Prod*,15:315-322.

Kommisrud, E., Paulenz, H., Sehested, E., Grevle, I., S.(2002): Influence of boar and semen parameters on motility and acrosome integrity in liquid boar semen stored for five days. *Acta VetScand*,43:49-55.

Kunavongkrit, A., Prateep, P. (1995): Influence of ambient temperature on reproductive efficiency in pigs: (1) boar semen quality. *Pig J*, 35: 43-47.

Laforest, J., P., Allard, D.(1995):Comparison of four extenders for long-term storage of fresh boar semen. *Reprod Dom Anim*,31: 275-276.

Lindemann, C., B., Fisher, M., Lipton, M. (1982): A comparative study on the effect of freezing and frozen storage on intact and demembrated bull spermatozoa. *Cryobiol*, 19:20–28.

Liu, Z., Foote, R., H. (1998): Osmotic effects on volume and motility of bull sperm exposed to membrane permeable and nonpermeable agents. *Criobiol*, 37:207–218.

ŠernieneL., RiškivičieneV., BanysA., Žilinskas H.(2002): Effects of age, and season on sperm qualitative parameters in Lithuanian White and Pietren boars.

Lustyková, A., Frydrychová, S. , Lipenský, J., Vejnar, J., Rozkot, M. (2008): Practical aspects of porcine semen collection for conservation and utilization of farm animal genetic resources.

Maes, D., Nauwynck, H., Rijsselaere, T., Mateusen, B., Vyt, P., de Kruif, A., Van Soom, A. (2008): Diseases in swine transmitted by artificial insemination: An overview. *Theriogenology*, 70:1337–1345.

Maes, D., Rijsselaere, T., Vyt, P., Sokolowska, A., Deley, W., Van Soom, A.(2010): Comparison of five different methods to assess the concentration of boar semen. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift*,79:42-48.

Makler, A., Urbach, Y., Lefler, E. Merzbach, D. (1981): Factors affectingsperm motility. VI. Sperm viability under the influence of bacterialgrowth in human ejaculates. *Fertil Steril*, 35: 666-670.

Mann, T. (1975): Biochemistry of semen. In: *Handbook of physiology*. American Physiology Society, Washington, pp 321–347.

Mann, T., Lutwak-Mann, C. (1982): Passage of chemicals into human and animal semen: mechanisms and significance. *Crit Rev Toxicol*, 11:1–14.

Marin, S., Chiang, K., Bassilian, S., Lee, W-NP., Boros, L., G., Fernandez-Novell, J., M., Centelles, J., J., Medrano, A., Rodriguez- Gil, J., E., Cascante, M. (2003): Metabolic strategy of boar spermatozoa revealed by a metabolomic characterization. *FEBS Lett*, 554:342–346.

Martin, R., S. (1982): *Reproduccion e inseminacion artificial porcina*. Aedos, Barcelona.

- Martin-Hidalgo, D., Baron, F., J., Bragado, M., J., Carmona, P., Robina, A., Garcia-Marin, L., J., Gil, M., C. (2011): The effect of melatonin on the quality of extended boar semen after long-term storage at 17 °C. *Theriogenology*, 75:1550–1560.
- Martin-Rillo S., Martinez E., Garcia C., Artiga C., De Alba C. (1996): Boar semen evaluation in practise. *ReprodDomestAnim*, 31: 519-526.
- McNitt, J.,I., First N., L. (1970): Effects of a 72-hour heat stress on semen quality in boars. *Int J Biomet*, 14: 373-380.
- Medrano, A., Fernandez-Novell, J., M., Ramio, L., Alvarez, J., Goldberg, E., Rivera, M., Guinovart, J., J., Rigau, T., Rodriguez-Gil, J., E. (2006b): Utilization of citrate and lactate through a lactate dehydrogenase and ATP-regulated pathway in boar spermatozoa. *Mol Reprod Develop*, 73:369–378.
- Medrano, A., Garcia-Gil, N., Ramio, L., Rivera, M., M., Fernandez-Novell, J., M., Ramirez, A., Pena, A., Briz, M., D., Pinart, E., Concha, I., I., Bonet, S., Rigau, T., Rodriguez-Gil, J., E. (2006a): Hexose specificity of hexokinase and ADP-dependence of pyruvate kinase play important roles in the control of monosaccharide utilization in freshly diluted boar spermatozoa. *Mol Reprod Dev*, 73:1179–1199.
- Milewska, W., Falkowski, J. (2004): Effects of season on some semen characteristics in purebred and crossbred boars. *Anim Sci Papers Rep*, 22: 289-295.
- Milovanov, V., K. (1962): *Biology of reproduction and artificial insemination of animals*. Selhozizdat, Moscow, p 969 (in Russian).
- O’Flaherty, C., Beconi, M., Beorlegui, N. (1997): Effect of natural antioxidants, superoxide dismutase and hydrogen peroxide on capacitation of frozen-thawed bull spermatozoa. *Andrologia*, 29:269–275.
- Oh, S., H., See, M., T., Long, T., E., Galvin, J., M. (2006): Genetic parameters for various model regression models to describe total sperm cells per ejaculate over the reproductive lifetime of boars. *J Anim Sci* 84:538–545.
- Okazaki T., Mihara T., Fujita Y., Yoshida S., Teshima H., Shimada M. (2010): Polymyxin B neutralizes bacteria-released endotoxin and improves the quality of boar sperm during liquid storage and cryopreservation. *Theriogenology*, 74: 1691-1700.
- Paquignon, M., Bussière, J., Bariteau, F. (1988): Efficacité des techniques de conservation de la semence de verrat. *INRA Prod Anim*, 1: 271-280.
- Paredis, F. (1962): Fertility and Artificial Insemination in Pigs. *Internat J Fertil*, 7: 223-233.

- Park, C., S., Yi, Y., J. (2002): Comparison of semen characteristics, sperm freezability and testosterone concentration between Duroc and Yorkshire boars during seasons. *Anim Reprod Sci*, 73:53–61.
- Parrish, J., J., Susko-Parrish, J., L., First, N., L. (1999): Capacitation of bovine sperm by heparin: inhibitory effect of glucose and role of intracellular pH. *Biol Reprod* 41:683–699
- Pertoft H (2000) Fractionation of cells and subcellular particles with Percoll. *J Biochem Biophys Met*, 44:1–30.
- Perez-Llano, B., Lorenzo, J., L., Yenes, P., Trejo, A., Garcia-Casado, P. (2001): A short hypoosmotic swelling test for the prediction of boar sperm fertility. *Theriogenology*, 56: 387-398.
- Perez-Llano, B., Sala, R., Reguera, G., Garcia-Casado, P. (2009): Changes in subpopulations of boar sperm defined according to viability and plasma and acrosome membrane status observed during storage at 15°C. *Theriogenology*, 71:311–317.
- Perry, J., E. (1963): *The Artificial Insemination of Farm Animals*. Rutgers University Press, New Brunswick – New Jersey.
- Petrunkina, A., M., Harrison, R., A., P., Topfer-Petersen, E. (2000): Only low levels of spermadhesin AWN are detectable on the surface of live ejaculated boar spermatozoa. *Reprod Fertil Dev*, 12:361–371.
- Petrunkina, A., M., Topfer-Petersen, E. (2000): Heterogeneous osmotic behaviour in boar sperm populations and its relevance for detection of changes in plasma membrane. *Reprod Fertil Dev*, 12:297–305.
- Pinart, E., Sancho, S., Briz, M., Bonet, S. (1999a): Morphologic study of the testes from spontaneous unilateral and bilateral abdominal cryptorchid boars. *J Morphol*, 239:225–243.
- Pinart, E., Sancho, S., Briz, M., Bonet, S., Garcia-Gil, N. (1999): Characterization of the semen quality of postpuberal boars with spontaneous unilateral abdominal cryptorchidism on the right side. *Anim Reprod Sci*, 55:269–278.
- Polge, C., (1956): Artificial insemination in pigs. *Vet Rec*, 68: 62-76.
- Prathalingam, N., S., Holt, W., W., Revell, S., G., Jones, S., Watson, P., F., (2006): The precision and accuracy of six different methods to determine sperm concentration. *J Androl* 27:257-262.
- Pruneda, A. (2006): *Estudi citologic i bioquimic del fluid epididimari de Sus domesticus*. Doctoral Thesis. Universitat de Girona.
- Pruneda, A., Pinart, E., Briz, M., D., Sancho, S., Garcia-Gil, N., Badia, E., Kadar, E., Bassols, J., Bussalleu, E., Yeste, M., Bonet, S. (2005): Effects of high semen-collection frequency on

the quality of sperm from ejaculates and from six epididymal regions in boars. *Theriogenology*, 63:2219–2232.

Pursel, V., G., Johnson, L., A. (1975): Freezing of boar spermatozoa: fertilizing capacity with concentrated semen and a new thawing procedure. *J Anim Sci*, 40:99–102.

Pursel, V., G., Johnson, L., A., Schulman, L., L. (1973): Effect of dilution, seminal plasma and incubation period on cold shock susceptibility of boar spermatozoa. *J Anim Sci*, 37:528–531.

Rath, D., Bathgate, R., Rodriguez-Martinez, H., Roca, J., Strzezek, J., Waberski, D. (2009): Recent advances in boar sperm cryopreservation. *Soc Reprod Fertil Suppl*, 66:51–66.

Revell, S., G., Mrode, R., A. (1994): An osmotic resistance test for bovine semen. *Anim Reprod Sci*, 36: 77–86.

Rigau, T., Rivera, M., Palomo, M., J., Fernandez-Novell, J., M., Mogas, T., Ballester, J., Pena, A., Otaegui, P., J., Guinovart, J., J., Rodriguez-Gil, J., E. (2002): Differential effects of glucose and fructose on hexose metabolism in dog spermatozoa. *Reproduction*, 123:579–591.

Rijsselaere, T., Van, Soom, A., Maes, D., de Kruif, A., (2003): Effect of technical settings on canine semen motility parameters measured by the Hamilton-Thorne analyzer. *Theriogenology*, 60:1553-1568.

Roca J., Carvajal G., Lucas X., Vazquez J.M., Martinez E.A. (2003): Fertility of weaned sows after deep intrauterine insemination with a reduced number of frozen-thawed spermatozoa. *Theriogenology*, 60: 77-87.

Roca J., Parrilla I., Rodriguez-Martinez H., Gil M.A., Cuello C., Vasquez J.M., Martinez E.A. (2011): Approaches towards efficient use of boar semen in the pig industry.

Rossato, M., Balercia, G., Lucarelli, G., Foresta, C., Mantero, F. (2002): Role of seminal osmolarity in the reduction of human sperm motility. *Int J Androl* 25:230–235.

Rothschild, M., P. (1990): The role of biology in future pig breeding programs. In: *Proceedings of the 4th world congress on genetics applied to livestock production held in Edinburg*, 415–424.

Saacke, R., G., DeJarnette, J., M., Nebel, R., L., Nadir, S. (1991): Assessing bull fertility. *Proc Soc Theriogenol*, 59–69.

Sanches, R. (1991): Control de la cadidad espermatoca. *Anaporc*, 104: 27-33.

Sanchez, R., Barbosa, J., Bellart, A., Rius, R., Garcia, P.(1998): Effect of the percentage of sperm morphological abnormalities in seminal doses on fertility and prolificity. *Proc 15th IPVS Congress, Birmingham*, 71.

Sanchez, R., Toepfer-Petersen, E., Aitken, R.,J., Schill, W., B. (1991): A new method for evaluation of the acrosome reaction in viable human spermatozoa. *Andrologia* 23(3):197–203.

Sancho, S. (2002): Efectes del fotoperiode sobre la qualitat espermatica de mascles porcins *Sus domesticus*. Doctoral Thesis.

Sancho, S., Pinart, E., Briz, M., Garcia-Gil, N., Badia, E., Bassols, J., Kadar, E., Pruneda, A., Bussalleu, E., Yeste, M., Coll, M., G., Bonet, S. (2004): Semen quality of postpubertal boars during increasing and decreasing natural photoperiods. *Theriogenology*, 62:1271–1282.

Sancho, S., Rodriguez-Gil, J., E., Pinart, E., Briz, M., Garcia-Gil, N., Badia, E., Bassols, J., Pruneda, A., Bussalleu, E., Yeste, M., Casas, I., Palomo, M., J., Ramio, L., Bonet, S. (2006): Effects of exposing boars to different artificial light regimens on semen plasma markers and “in vivo” fertilizing capacity. *Theriogenology*, 65:317–331.

Shannon, P., Curson, B. (1972): Toxic effect and action of dead sperm on diluted bovine semen. *J Dairy Sci*, 55:615–620.

Shipley, C.F. (1999): Breeding soundness examination in the boar. *Swine Health Prod*, 7 117-120.

Smital, J. (2009): Effects influencing boar semen. *Anim Reprod Sci*, 110:335–346.

Smital, J., DeSousa, L., L., Mohsen, A. (2004): Differences among breeds and manifestation of heterosis in AI boar sperm output. *Anim Reprod Sci*, 80:121–130.

Sone, M. (1990): Investigations on the control of bacteria in boar semen. *Jpn J Anim Reprod*, 36:23–29.

Sone, M., Chikyu, M., Yoshida, M., Bamba, K. and Ogasa, A. (1992): Prolonged storage of boar semen in liquid form. *Jpn J Swine Sci*, 29: 41-50.

Sone, M., Ohmura, K., Bamba, K. (1982): Effects of Various Antibiotics on the Control of Bacteria in Boar Semen. *Vet Rec*, 111: 11-14.

Stančić, B. (2006): Tehnologija veštačkog osemenjavanja svinja (monografija). Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet.

Strzezek, J., Kordan, W., Glogowski, J., Wysocki, P., Borkowski, K. (1995): Influence of semen-collection frequency on sperm quality in boars, with special reference to biochemical markers. *Reprod Dom Anim*, 30:85–94.

Sutkeviciene, N., Andersson, M., A., Zilinskas, H., Andersson, M. (2005): Assessment of boar semen quality in relation to fertility with special reference to methanol stress. *Theriogenology*, 63:739–747.

Suwimonteerabutr, J., Thuwanut, P., Singlor, J., Chatdarong, K., Tummaruk, P. (2011): Effect of Collection Extender (Dicol®) on Cold-stored Boar Sperm Viability and Bacterial Contamination.

Takahashi, K., Uchida, A., Kitao, M.(1990): Hypoosmotic swelling test of sperm. *ArchAndrol*, 25:225-242.

Teague, N., S., Boyarsky, S. and Glenn, J., F. (1971): Interference of humanspermatozoa motility by *Escherichia Coli*. *Fertil Steril* 22: 281-285.

Tomlinson, M., Turner, J., Powell, G., Sakkas, D.(2001): One-step disposable chambers for sperm concentration and motility assessment: how do they compare with the World Health Organization's recommended methods? *HumReprod*,16:121-124.

Tsakmakidis, I., A., Lymberopoulos, A., G., Khalifa, T., A.(2010): Relationship between sperm quality traits and field-fertility of porcine semen. *JVetSci*, 11: 151-154.

van Rijn, P., A., Wellenberg, G., J., Hakze-van der Honing, R., Jacobs, L., Moonen, P., L., Feitsma, H. (2004): Detection of economically important viruses in boar semen by quantitative realtime PCR technology. *J Virol Methods*, 120: 151-160.

Varner, D., D., Scanlan, C., M., Thompson, J., A., Brumbaugh, G., W., Blanchard, T., L., Carlton, C., M., Johnson, L. (1998): Bacteriology of preservedstallion semen and antibiotics in semen extenders. *Theriogenology*, 50:559-573.

Vazquez, J., M., Martinez, E., A., Martinez, P., Garcia-Artiga, C., Roca, J.(1997): Hypoosmotic swelling of boar spermatozoa compared to other methods for analysing the sperm membrane. *Theriogenology*,47:913-922.

Vyt, P.(2007): Examination and storage of liquid porcine semen, Ghent University.

Vyt, P., Maes, D., Dejonckheere, E., Castryck, F., Van Soom, A.(2004): Comparative study on five different commercial extenders for boar semen. *ReprodDom Anim*,39: 8-12.

Vyt, P., Maes, D., Rijsselaere, T., Dewulf, J., de Kruif, A., Van Soom, A.(2007a): Semen handling in porcine artificial insemination centres: the Belgian situation. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift*,76:195-200.

Waberski, D., Henning, H., Petrunkina, A., M. (2011): Assessment of storage effects in liquid preserved boar semen. *Reprod Domest Anim*, 46: 45–48.

Walker, S., Robinson, O., W., Whisnant, C., S., Cassady, J., P. (2004): Effect of divergent selection for testosterone production on testicular morphology and daily sperm production in boars. *J Anim Sci*, 82:2259–2264.

Waltz, F., A., Foley, C., W., Herschler, R., C., Tiffany, L., W., Liska, B., J. (1968):Bacteriological studies of boar semen. *J Anim Sci*, 27: 1357-1362.

- Waterhouse, K., E., De Angelis, P., M., Haugan, T., Paulenz, H., Hofmo, P., O., Farstad, W. (2004): Effects of in vitro storage time and extender on membrane quality of boar sperm assessed by flow cytometry. *Theriogenology*, 62:1638–1651.
- Watson, P., F. (2000): The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim Reprod Sci*, 60:481–492.
- Weitze, K., F. (2000): Update on the worldwide application of swine AI. *Boar Semen Preservation IV*: 141-145.
- Wolf, J. (2009): Genetic parameters for semen traits in AI boars estimated from data on individual ejaculates. *Reprod Dom Anim*, 44:338–344.
- Wolf, J. (2010): Heritabilities and genetic correlations for litter size and semen traits in czech large white and landrace pigs. *J Anim Sci*, 88:2893–2903.
- Wolf, J., Smital, J. (2009): Quantification of factors affecting semen traits in artificial insemination boars from animal model analyses. *J Anim Sci*, 87:1620–1627.
- World Health Organization, (2010): Laboratory manual for the examination of human sperm and semen-cervical mucus interaction, 5th edition. WHO Press Geneva, Switzerland.
- Xu, X., Pommier, S., Arbov, T., Hutchings, B., Sottoc, W., Foxcroft, G., R. (1998): In vitro maturation and fertilization techniques for assessment of semen quality and boar fertility. *J Anim Sci*, 76: 3079-3089.
- Yanagimachi, R. (1994): Mammalian fertilization. In: Knobil E., Neil J.D. (eds.): *The physiology of reproduction*. 2nd ed., New York, Raven Press, 1, 189–317.
- Yeste, M. (2008): New insight into boar sperm function and survival from integrated laboratory and field studies.
- Yeste, M., Barrera, X., Coll, D., Bonet, S. (2011): The effects on boar sperm quality of dietary supplementation with omega-3 polyunsaturated fatty acids differ among porcine breeds. *Theriogenology*, 76:184–196.
- Yeste, M., Briz, M., Pinart, E., Sancho, S., Bussalleu, E., Bonet, S. (2010): The osmotic tolerance of boar spermatozoa and its usefulness as sperm quality parameter. *Anim Reprod Sci*, 119:265–274.
- Yeste, M., Briz, M., Pinart, E., Sancho, S., Garcia-Gil, N., Badia, E., Bassols, J., Pruneda, A., Bussalleu, E., Casas, I., Bonet, S. (2007a): Boar spermatozoa and prostaglandin F₂ α . Quality of boar sperm after the addition of prostaglandin F₂ α the short-term extender over cooling time.
- Yeste, M., Briz, M., Pinart, E., Sancho, S., Garcia-Gil, N., Badia, E., Bassols, J., Pruneda, A., Bussalleu, E., Casas, I., Bonet, S. (2008b): Boar spermatozoa and prostaglandin F₂ α .

Quality of boar sperm after the addition of prostaglandin F₂alpha to the short-term extender over cooling time. *Anim Reprod Sci*, 108:180–195.

Yeste, M., Sancho, S., Briz, M., Pinart, E., Bussalleu, E., Bonet, S. (2010): A diet supplemented with L-carnitine improves the sperm quality of Pietrain but not of Duroc and Large White boars when photoperiod and temperature increase. *Theriogenology*, 73:577–586.

Yur'evna, I., A., Venjaminovich, V., A. (2013): Morphological Analysis of the Sperms of Breeding Boars Maintained on Nutritional Supplements. *Glob Vet*, 11: 84-87.

Zejer, P., Milewska, W. (2012): Comparison of semen traits of crossbred boars and hybrids raised at insemination station.

Tabela 8. Prosječan broj mrtvih spermatozoida u dozi

			Ogled				Kontrola			
	Raz	Dani	{1} - 1,7333	{2} - 2,9667	{3} - 6,0000	{4} - 11,800	{5} - 1,6333	{6} - 3,9667	{7} - 9,5000	{8} - 16,400
O g l e d	1	1		0,856883	0,000063	0,000032	1,000000	0,179393	0,000032	0,000032
	1	3	0,856883		0,013206	0,000032	0,799478	0,948862	0,000032	0,000032
	1	5	0,000063	0,013206		0,000032	0,000049	0,287418	0,001795	0,000032
	1	6	0,000032	0,000032	0,000032		0,000032	0,000032	0,150725	0,000036
K o n t r o l a	2	1	1,000000	0,799478	0,000049	0,000032		0,137719	0,000032	0,000032
	2	3	0,179393	0,948862	0,287418	0,000032	0,137719		0,000032	0,000032
	2	5	0,000032	0,000032	0,001795	0,150725	0,000032	0,000032		0,000032
	2	6	0,000032	0,000032	0,000032	0,000036	0,000032	0,000032	0,000032	

Tabela 9. Prosječan broj abnormalnih spermatozoida u dozi

			Ogled				Kontrola			
	Raz	Dani	{1} - 8,9333	{2} - 11,333	{3} - 18,500	{4} - 25,700	{5} - 8,9000	{6} - 12,867	{7} - 21,867	{8} - 30,067
O g l e d	1	1		0,321858	0,000032	0,000032	1,000000	0,005563	0,000032	0,000032
	1	3	0,321858		0,000032	0,000032	0,303940	0,839932	0,000032	0,000032
	1	5	0,000032	0,000032		0,000032	0,000032	0,000035	0,034289	0,000032
	1	6	0,000032	0,000032	0,000032		0,000032	0,000032	0,007859	0,001118
K o n t r o l a	2	1	1,000000	0,303940	0,000032	0,000032		0,004947	0,000032	0,000032
	2	3	0,005563	0,839932	0,000035	0,000032	0,004947		0,000032	0,000032
	2	5	0,000032	0,000032	0,034289	0,007859	0,000032	0,000032		0,000032
	2	6	0,000032	0,000032	0,000032	0,001118	0,000032	0,000032	0,000032	

Tabela 10. Prosječan broj spermatozoida sa intaktnom membranom u dozi

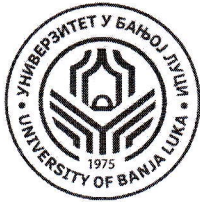
			Ogled				Kontrola			
	Raz	Dani	{1} - 2,6333	{2} - 3,6333	{3} - 6,1667	{4} - 7,9667	{5} - 4,6667	{6} - 7,1333	{7} - 12,333	{8} - 14,667
O g l e d	1	1		0,962764	0,003840	0,000032	0,364967	0,000068	0,000032	0,000032
	1	3	0,962764		0,118300	0,000120	0,955545	0,004402	0,000032	0,000032
	1	5	0,003840	0,118300		0,531253	0,746390	0,969097	0,000032	0,000032
	1	6	0,000032	0,000120	0,531253		0,009713	0,986797	0,000105	0,000032
K o n t r o l a	2	1	0,364967	0,955545	0,746390	0,009713		0,140876	0,000032	0,000032
	2	3	0,000068	0,004402	0,969097	0,986797	0,140876		0,000033	0,000032
	2	5	0,000032	0,000032	0,000032	0,000105	0,000032	0,000033		0,195412
	2	6	0,000032	0,000032	0,000032	0,000032	0,000032	0,000032	0,195412	

Tabela 11. Prosječan broj spermatozoida uginulih tokom bojenja u dozi

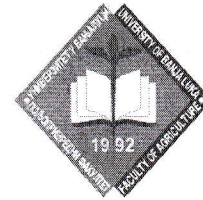
			Ogled				Kontrola			
	Raz	Dani	{1} - 7,0333	{2} - 8,9333	{3} - 12,500	{4} - 13,433	{5} - 9,4333	{6} - 12,067	{7} - 16,367	{8} - 16,100
O g l e d	1	1		0,455043	0,000032	0,000032	0,164613	0,000034	0,000032	0,000032
	1	3	0,455043		0,003248	0,000066	0,999464	0,017588	0,000032	0,000032
	1	5	0,000032	0,003248		0,974320	0,022286	0,999793	0,000883	0,002824
	1	6	0,000032	0,000066	0,974320		0,000485	0,825174	0,035103	0,080411
K o n t r o l a	2	1	0,164613	0,999464	0,022286	0,000485		0,088498	0,000032	0,000032
	2	3	0,000034	0,017588	0,999793	0,825174	0,088498		0,000132	0,000417
	2	5	0,000032	0,000032	0,000883	0,035103	0,000032	0,000132		0,999992
	2	6	0,000032	0,000032	0,002824	0,080411	0,000032	0,000417	0,999992	

BIOGRAFIJA

Siniša (Slavko) Mandić rođen je u Banjoj Luci 09.05.1989. godine, gdje i danas živi. Osnovnu školu „Stanko Rakita“ završio je u Vrbanji 2004. godine. Iste godine upisuje srednju Poljoprivrednu školu, smjer Veterinarski tehničar i redovno je završava 2008. godine. Poljoprivredni fakultet u Banjoj Luci, smjer Animalna proizvodnja, upisao je 2009. godine. Diplomirao je 19.05.2014. godine sa završnim radom pod nazivom „Projektovanje proizvodnje stajnjaka na govedarskoj farmi“ i stekao zvanje dipl. ing. poljoprivrede za animalnu proizvodnju - 180 ECTS bodova. Tokom studija ostvario je prosječnu ocjenu 7,47. Master studije, smjer Bezbjednost hrane animalnog porijekla u lancu poljoprivredne ishrane, upisao je u oktobru 2014. godine na Poljoprivrednom fakultetu u Banjoj Luci. U maju 2016. godine odlazi u SAD preko „Work and Travel“ programa i vraća se iste godine u oktobru mjesecu. Preko projekta razvoja tržišne poljoprivrede „FARMA II“ u januaru 2017. godine pohađa školu sirarstva realizovanu u Sloveniji i dobija certifikat za uspješno završenu sedmodnevnu praktičnu obuku.



УНИВЕРЗИТЕТ У БАЊОЈ ЛУЦИ
UNIVERSITY OF BANJA LUKA
ПОЉОПРИВРЕДНИ ФАКУЛТЕТ
FACULTY OF AGRICULTURE



**КОМИСИЈА ЗА ПРЕГЛЕД, ОЦЈЕНУ И ОДБРАНУ ЗАВРШНОГ - МАСТЕР РАДА
НА II ЦИКЛУСУ АКАДЕМСКИХ СТУДИЈА ПОЉОПРИВРЕДНОГ
ФАКУЛТЕТА**

Доц. др Ђорђе Савић, доцент, ужа научна област Анатомија и физиологија животиња и Зоохигијена и здравствена заштита животиња, Универзитет у Бањој Луци, Пољопривредни факултет, предсједник

Проф. др Стоја Јотановић, редовни професор, ужа научна област Репродукција и стерилитет животиња и Сточарство, Универзитет у Бањој Луци, Пољопривредни факултет, ментор

Проф. др Миленко Шарић, ванредни професор, ужа научна област Анатомија и физиологија животиња, Универзитет у Бањој Луци, Пољопривредни факултет, члан

Одлуком Наставно-научног вијећа Пољопривредног факултета студијског програма II циклуса студија Универзитета у Бањој Луци број 10/3.2 424-8-8/17 од 04.09.2017. године именовани смо у Комисију за преглед, оцјену и одбрану мастер рада студента дипл. инж. Сенише Мандиаћ под насловом: „Процјена морфолошког интегритета сперматозоида свјеже разријеђеног сјемена нераста“. Након прегледа преданог мастер рада подносимо сљедећи

ПОЉОПРИВРЕДНИ ФАКУЛТЕТ
Универзитет у Бањој Луци

Булевар војводе Петра Бојовића 1А
78000 Бања Лука
Република Српска, БиХ

FACULTY OF AGRICULTURE
University of Banja Luka

Bulevar vojvode Petra Bojovića 1A
78000 Banja Luka
The Republic of Srpska, BiH

Тел/Phone: +387 (0) 51 31 23 90
+387 (0) 51 33 09 01
Факс/Fax: +387 (0) 51 31 25 80

info@agro.unibl.org
www.agro.unibl.org

ИЗВЈЕШТАЈ

о оцјени урађеног мастер рада „Процјена морфолошког интегритета сперматозоида свјеже разријеђеног сјемена нераста“ студента дипл. инж. Сениша Мандића

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВИЈЕЋУ ПОЉОПРИВРЕДНОГ ФАКУЛТЕТА

Мастер рад студента дипл. инж. Сенише Мандића је урађен у оквиру II циклуса студија Безбједност намирница анималног поријекла у ланцу пољопривредне производње, студијског програма Анимална производња под менторством проф. др Стоје Јотановића. Рад је написан на 67 страница и садржи 11 табела и 5 графикана. Рад је укорићен у тврди повез А4 формата, принтан у боји, једнострано.

Рад садржи сљедеће цјелине: Увод, Преглед литературе, Циљ истраживања, Материјал и методе рада, Резултати истраживања, Дискусија, Закључак, Литература, те кратку биографију кандидата. Поред наведених поглавља, рад садржи и сажетак на српском и енглеском језику, УДК број и податке о комисији.

ПРИКАЗ АНАЛИЗЕ МАСТЕР РАДА ПО ЦЈЕЛИНАМА (ПОГЛАВЉИМА)

У уводу рада, кандидат даје кратак осврт на значај вјештачког осјемењавања крмача за унапређење свињарске производње, те производње квалитетних инсеминационих доза сјемена нерастова за успјешност осјемењавања и резултате фертилитета крмача. Такође, кандидат у уводу даје приказ метода за анализу квалитета сјемена, формирања инсеминационих доза, начина чувања, значају разријеђивача и употреби додатака разријеђивачима у циљу контроле бактеријске контаминације сјемена.

У поглављу преглед литературе, кандидат даје кратак преглед литературних података о грађи и физиологији полних органа нераста, начинима узимања ејакулата, саставу ејакулата, макроскопском и микроскопском прегледу ејакулата, разријеђивању сјемена и формирању инсеминационих доза, као и о њиховом складиштењу. С обзиром на бактеријску контаминацију сјемена приликом узимања и манипулације са сјеменом, кандидат посаба акценат даје на улогу разријеђивача и додатака разријеђивачима који имају за циљ да смање бактеријску контаминацију сјемена, а тиме и да омогуће дуже складиштење сјемена уз очување задвољавајућег квалитета и фертилизационе способности сперматозоида.

Сублимирајући наводе из литературе, кандидат формулише циљ рада, који гласи " ...да се испита концентрација и морфологија сперматозоида свјеже разријеђеног нерастовског сјемена са и без антибиотског додатка разријеђивачу током периода складиштења". Овако формулисан циљ рада базиран је на радној хипотези "...да ће

антибиотски додатак разрјеђивачу повољно утицати на очување морфологије сперматозоида свјеже разријеђеног сјемена нераста током периода чувања".

Кандидат детаљно описује **материјал и методологију истраживања**, наводећи при томе број инсеминационих доза обухваћених истраживањем, начин њиховог формирања (разрјеђење са комерцијалним разрјеђивачем и са комерцијалним разрјеђивачем уз антибиотски додатак) и подјеле на контролну и огледну групу, начин и дужину чувања и методологију којом је извршен преглед сјемена и детерминација морфолошког интегритета сперматозоида. Када је у питању обрада добијених података, кандидат наводи да су подаци обрађени методама дескриптивне статистике и анализе варијансе са *post hoc* Tukey тестом и приказани табеларно и графички.

У поглављу **резултати истраживања**, кандидат даје преглед добијених података о просјечном броју сперматозоида у испитаним дозама сјемена контролне и огледне групе, просјечном броју доза и просјечној запремини ејакулата од којих су потицале испитане дозе сјемена. У наставку даје табеларни и графички преглед морфолошког интегритета сперматозоида у контролној и огледној групи, кроз просјечне вриједности броја живих, мртвих, сперматозоида угинулих током бојења, сперматозоида са општећеном интактном мембраном, те абнормалних сперматозоида. Такође, кандидат даје и податке о процентуалној заступљености појединих категорија сперматозоида у укупном броју пребројаних сперматозоида у испитаним дозама сјемена.

У поглављу **дискусија** кандидат пореди добијене резултате са подацима доступним у литератури, тумачећи их у свјетлу примијењеног третмана, указујући при томе на повољније вриједности испитиваних параметара квалитета ејакулата код огледне групе. Приликом анализе добијених резултата кандидат јасно идентификује позитивне ефекте примијењеног третмана на квалитет инсеминационих доза сјемена, указујући на боље очување фертилизационог потенцијала сјемена током периода чувања, а тиме и на боље резултате у осјемењавању крмача таквим сјеменом.

У поглављу **закључак** кандидат сублимира сазнања до којих је дошао током истраживања, сугеришући ширу употребу антибиотских додатака разрјеђивачима за сјеме нераста у пракси. Кандидат у закључку указује да антибиотски додатак разријеђивачу Dicol у односу на комерцијални разријеђивач позитивно утиче на очување виталности и морфолошког интегритета сперматозоида током периода складиштења чинећи инсеминационе дозе нерастовског сјемена дуже употребљивим за вјештачко осјемењавање.

ОЦЈЕНА НАУЧНЕ ВАЛИДНОСТИ РАДА

Мастер рад кандидата дипл. инж. **Синише Мандића**, студента другог циклуса студија, под насловом "Процјена морфолошког интегритета сперматозоида свјеже разријеђеног сјемена нераста" представља оригиналан рад, који доприноси познавању проблематике употребе додатака разрјеђивачима за нерастовско сјеме у циљу смањења бактеријске контаминације и очувања виталности и морфолошког интегритета сперматозоида током периода, те је у том смислу научно валидан, а његова израда има научну и стручну оправданост.


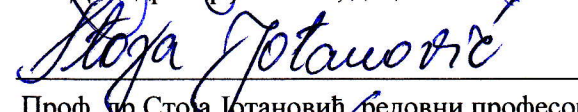
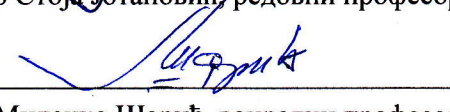
ЗАКЉУЧАК И ПРИЈЕДЛОГ

На основу оцјене мастер рада „Процјена морфолошког интегритета сперматозоида свјеже разријеђеног сјемена нераста“ студента дипл. инж. Синише Мандића Комисија закључује да дати мастер рад представља оригиналан и самосталан рад кандидата, који задовољава критеријуме за писање завршних радова на другом циклусу студија на Универзитету у Бањој Луци, прописане правилима студирања и другим релевантним прописима.

На основу свега наведеног Комисија предлаже Наставно-научном вијећу Пољопривредног факултета Универзитета у Бањој Луци да усвоји усвоји Извјештај и позитивну оцјену мастер рада студента упути на даље поступање.

У Бањој Луци, 06.06.2018. године

КОМИСИЈА

1. 
Доц. др Ђорђе Савић, доцент
2. 
Проф. др Стоја Јотановић, редовни професор
3. 
Проф. др Миленко Шарић, ванредни професор

УНИВЕРЗИТЕТУ У БАЊОЈ ЛУЦИ
ПОДАЦИ О АУТОРУ ОДБРАЊЕНОГ МАСТЕР/МАГИСТАРСКОГ РАДА

Име и презиме аутора мастер/магистарског рада: Синиша Мандић

Датум, мјесто и држава рођења аутора: 09.05.1989., Бања Лука, БиХ

Назив завршеног факултета/Академије аутора и година дипломирања: Пољопривредни факултет у Бањој Луци, 2014.

Датум одбране завршног/дипломског рада аутора: 19.05.2014.

Наслов завршног/дипломског рада аутора: „Пројектовање производње стајњака на говедарској фарми“

Академско звање коју је аутор стекао одбраном завршног/дипломског рада: Дипломирани инжењер Пољопривреде за Анималну производњу - 180 ЕЦТС

Академско звање које је аутор стекао одбраном мастер/магистарског рада: Мастер анималне производње – 300 ЕЦТС

Назив факултета/Академије на коме је мастер/магистарски рад одбрањен: Пољопривредни факултет у Бањој Луци

Наслов мастер/магистарског рада и датум одбране: „Процјена морфолошког интегритета сперматозоида свјеже разријеђеног сјемена нераста“, 04.07.2018.

Научна област мастер/магистарског рада према CERIF шифрарнику: Пољопривредне науке, CC BY-ND

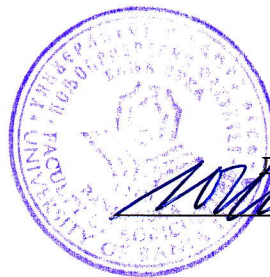
Имена ментора и чланова комисије за одбрану мастер/магистарског рада:

Др Стоја Јогановић, редовни професор, ментор,

Др Ђорђе Савић, доцент, предсједник,

Др Миленко Шарић, ванредни професор, члан.

У Бањој Луци, дана 23.07.2018.



Лекан

ИЗЈАВА О АУТОРСТВУ

**Изјављујем да је
мастер/магистарски рад**

Наслов рада: „Процјена морфолошког интегритета сперматозонда свјеже разријеђеног сјемена нераста“

Наслов рада на енглеском језику: *Assesment of the morphological integrity of spermatozoa in fresh diluted boar sperm*

- ☒ резултат сопственог истраживачког рада,
- ☒ да мастер/магистарски рад, у цјелини или у дијеловима, није био предложен за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- ☒ да су резултати коректно наведени и
- ☒ да нисам кршио ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

У Бањој Луци 23.07.2018.

Потпис кандидата

Синиша Манџић

**Изјава којом се овлашћује Пољопривредни факултет
Универзитета у Бањој Луци да мастер рад учини јавно доступним**

Овлашћујем Пољопривредни факултет Универзитета у Бањој
Луци да мој мастер, под насловом:

„Процјена морфолошког интегритета сперматозоида свјеже разријеђеног сјемена нераста“

који је моје ауторско дјело, учини јавно доступним.

Мастер рад са свим прилозима предао сам у електронском формату, погодном за трајно архивирање.

Мој мастер рад, похрањен у дигитални репозиторијум Универзитета у Бањој Луци, могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (*Creative Commons*), за коју сам се одлучио.

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

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

У Бањој Луци 23.07.2018.

Потпис кандидата

Синиша Манџић

Изјава 3

**Изјава о идентичности штампане и електронске
верзије мастер/магистарског рада**

Име и презиме аутора: Синиша Мандић

Наслов рада: „Процјена морфолошког интегритета сперматозоида свјеже разријеђеног
сјемена нераста“

Ментор: проф. др Стоја Јотановић

Изјављујем да је штампана верзија мог мастер/магистарског рада идентична
електронској верзији коју сам предао/ла за дигитални репозиторијум Универзитета у
Бањој Луци.

У Бањој Луци 23.07.2018.

Потпис кандидата

Синиша Мандић