**STANDARDNE PROCJENE EJAKULATA NERASTA**

Anamarija Sluganović1, Sara Strelec1, Ivona Žura Žaja1, Marko Samardžija1, Silvijo Vince1, Dražen Đuričić2, Jadranka Pejaković Hlede1, Velimir Berta3 i Suzana Milinković-Tur1

*1Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Hrvatska*

*2Veterinarska stanica Đurđevac, Hrvatska*

*3Veterinarska stanica Varaždin, Hrvatska*

**Sažetak**

Reprodukcijski se proces u svinjogojskoj industriji temelji na maksimalnoj iskoristivosti željenih obilježja svinja u kojem umjetno osjemenjivanje (UO) ima najznačajniji utjecaj. Uspjeh UO-a ovisi o identifikaciji i selekciji nerasta na temelju procjene reproduktivnog potencijala, kao što su: libido, sposobnost parenja i iznadprosječna kakvoća sjemena. U programe UO-a uključuju se nerasti s velikim brojem gibljivih, vijabilnih i morfološki normalnih spermija u ejakulatima. Analizom sperme procjenjuje se kakvoća sjemena, potencijal plodnosti mužjaka i možebitni uzroci neplodnosti. Osim toga, rutinska je procjena kakvoće sjemena nužna kako bi se osigurala vrhunska kakvoća doza sjemena za UO. Analiza se kakvoće sjemena uglavnom temelji na konvencionalnim postupcima, koji obuhvaćaju broj spermija najčešće određen na fotometru te gibljivost i morfologiju spermija, koje se procjenjuju mikroskopski, a u novije se vrijeme u centrima za UO sve češće rabi računalni sustav za analizu sjemena. Temeljitom se procjenom odabiru ejakulati s iznadprosječnim oplodnim svojstvima što je preduvjet za unaprjeđenje plodnosti te za nasljeđivanje najboljih osobitosti sjemena rasplodnjaka.

**Ključne riječi:** sperma, analiza spermija, umjetno osjemenjivanje, nerasti

**Uvod**

U posljednjih je 40-ak godina umjetno osjemnjivanje (UO) svinja imalo najznačajniji utjecaj u umjetnom odabiru (selekciji) na temelju kvantitativnih i kvalitativnih genetskih odlika što je rezultiralo brzim napretkom u svinjogojskoj industriji (Dyck i sur., 2011.), a posebice u posljednjih 10-ak godina (Riesenbeck, 2011., López Rodríguez i sur., 2013.). Uspjeh UO-a ovisi o identifikaciji i selekciji nerasta na temelju procjene njihovog reproduktivnog potencijala, kao što su: libido, sposobnost parenja i iznadprosječna kakvoća sjemena (Žura Žaja i sur., 2016.). Nerasti uključeni u programe UO-a pažljivo su odabrani kako bi imali ejakulate s velikim brojem gibljivih, vijabilnih i morfološki normalnih spermija (Barranco i sur., 2015.). Rutinska je procjena kakvoće sjemena nužna u cilju osiguranja vrhunske kakvoće doza za UO. Analiza se kakvoće sjemena uglavnom temelji na konvencionalnim postupcima, koji obuhvaćaju broj spermija najčešće određen na fotometru te gibljivost i morfologiju spermija, koje se procjenjuju mikroskopski. U novije se vrijeme u centrima za UO sve češće rabi računalni sustav za analizu sjemena (Engl. *computer aided semen analysis*, CASA). Analizom sperme procjenjuje se potencijal plodnosti mužjaka, kakvoća sjemena i možebitni uzroci neplodnosti (López Rodríguez i sur., 2013., Žura Žaja i sur., 2016.). Svojstva sperme variraju od jedinke do jedinke, a pod utjecajem su mnogih egzogenih čimbenika (hranidba, učestalost uzimanja ejakulata, smještaj, mikroklimatski uvjeti, stres, itd.) i endogenih čimbenika (genetski, neuroendokrini, itd.) (Kawęcka i sur., 2008., Smital, 2009., Kondracki i sur., 2012.). Kakvoća se sperme može mijenjati zbog utjecaja navedenih čimbenika na aktivnost spermatogeneze i spermiogeneze u testisima, ali i zbog možebitnih bolesti reproduktivnog sustava (Knox, 2015., Žura Žaja i sur., 2016.).

**Uzimanje ejakulata i priprema uzoraka za analize**

Nerasti se prije svake ejakulacije stimuliraju dovođenjem u izdvojenu prostoriju u kojoj se nalazi fantom krmače. Nakon skoka, ejakulat im se polučuje ručnom fiksacijom penisa što obavlja uvijek ista osoba na koju su nerasti naviknuti i koja poznaje navike svakog nerasta. Budući da nepovoljni izvanjski čimbenici mogu utjecati na kakvoću sjemena, provodi se nadzor na svim kritičnim točkama u postupcima sa spermom kako bi se nepoželjni učinci sveli na minumum. Zbog osjetljivosti sperme na sniženje temperature, sperma se uzimana u graduirane staklene posude (spermohvatač) omotane staničevinom. U spermohvatač se uzimaju posljednje dvije frakcije sjemena, koje se procjeđuju kroz 3 sloja sterilne gaze u svrhu odvajanja sekreta bulbouretralnih žlijezda, koji bi mogao začepiti kateter pri UO-u. Procjena ejakulata mora biti načinjena u što je moguće kraćem vremenskom razdoblju od prikupljanja. Ejakulati se analiziraju makroskopski (volumen, boja, konzistencija, miris, pH) i mikroskopski (gustoća, gibljivost, morfologija). Nakon makroskopskih provjera koje traju nekoliko sekundi procijeđeni ejakulat se stavlja u vodenu kupelj zagrijanu na 37 ˚C, gdje ostaje tijekom postupka mikroskopske ocjene ejakulata (Cergolj i Samardžija, 2006., Knox, 2015.).

**Makroskopska ocjena ejakulata - fizikalna obilježja**

***Volumen ejakulata ili količina ejakulata*** određuje se u svrhu procjene njegove prikladnosti za razrjeđivanje i konzerviranje za UO. Ocjenjuje se odmah nakon uzimanja ejakulata direktnim očitavanjem na graduiranom spermohvataču. U nerasta se volumen ejakulata razlikuje u odnosu na: životnu dob, pasminu, jedinku, godišnje doba, prehranu, zdravstveno stanje, način i vrijeme prikupljanja ejakulata, čimbenike stresa, veličinu testisa, itd. (Stančić i sur., 2003., Smital, 2009.). Mlađi nerasti (5 do 8 mjeseci) imaju manji volumen ejakulata, koji doseže maksimum sa spolnom zrelošću (18 mjeseci) te takav ostaje do andropauze (7 do 8 godina) (Knox, 2003., Frunză i sur., 2008.). Knox (2003.) navodi raspon volumena ejakulata nerasta od 150 do 500 mL, dok Wolf i Smital (2009.) navode raspon od 50 do 600 mL. U usporedbi s ostalim rasplodnim mužjacima domaćih životinja nerasti imaju najveći prosječni volumen ejakulata (250 mL), i to zbog obilnog izlučivanja sekreta akcesornih spolnih žlijezda, posebice mjehurićastih žlijezda. Bulbouretralne žlijezde izlučuju i veliku količinu sekreta koji čini želatinozni dio sperme (Cergolj i Samardžija, 2006.). Ukoliko je volumen vrlo oskudan, smatra se nezadovoljavajućim, jer između volumena ejakulata i drugih obilježja kakvoće ejakulata postoji pozitivna korelacija. Učestala ejakulacija smanjuje volumen te u slučaju uzastopnog sakupljanja dva ejakulata, drugi će zasigurno imati manji volumen. Smanjen volumen nema nužno patološko značenje, ali redovito sadržava manju gustoću spermija (Frunză i sur., 2008., Wolf i Smital, 2009.).

***Boja ejakulata*** ovisi o ***konzistenciji*** i gustoći. Stoga je u nerasta ejakulat fiziološki vodenastobijel (konzistencije mlijeka), odnosno normalna boja sperme nerasta je bijela s plavkastim odsjajem. Ukoliko se sakupljanje sjemena ponovi više puta tijekom jednog dana, sjemenska tekućina postane prozirnija zbog smanjene koncentracije spermija (Frunză i sur., 2008.). Normalna se boja sperme može pojavljivati u različitim nijansama bijele boje. Bilo kakva odstupanja u boji ili konzistenciji nisu prihvatljiva pa se ejakulati koji sadrže primjese krvi, mokraće, gnoja, dlaka, izmeta, prašine, slame, itd. odbacuju (Cergolj i Samardžija, 2006.).

***Miris ejakulata*** je svojstven svakoj životinjskoj vrsti pa i nerastima. Podsjeća na miris svježe kuhane kosti ili može podsjećati na miris ustajalog mlijeka, miris pečenog kestena. Ejakulati koji imaju miris na mokraću, trulež ili kakav drugi neugodan miris odbacuju se (Frunză i sur., 2008.).

***pH ejakulata*** je značajan pokazatelj kakvoće sjemena, a fiziološki je raspon pH ejakulata nerasta od 6,4 do 7,4. Vrijednosti pH utvrđuju se indikator papirom ili tekućinom univerzalnog indikatora. Paulenz i sur. (2000.) su ustvrdili da pH ejakulata nerasta, koji se nakon prikupljanja drži u zatvorenoj posudi iznosi 7,21, a značajno se smanjuje nakon držanja sperme 96 sati na 25 ºC odnosno 20 °C, i to na 6,69 - 7,06. Vrijednost se pH neznatno povećava na 7,25 ukoliko se sperma drži na 15 °C te na 7,29 ukoliko se pohranjuje na temperaturi od 10 ºC. Ukoliko je pH sperme u trenutku sakupljanja viši od 8 ukazuje na lošu kakvoću sperme, odnosno na prisutnost upalnog procesa u reproduktivnom sustavu i/ili akcesornim spolnim žlijezdama. Radi kiselog medija u epididimisu spermiji su u stanju anabioze i ne gibaju se sve do trenutka miješanja s alkalnim sekretom prostate. Izlučivanje veće ili manje količine sekreta akcesornih spolnih u ejakulat, odredit će alkalni ili pak više kiseli pH ejakulata. Promjene pH vrijednosti negativno utječu na preživljavanje i gibljivost spermija (Kamp i sur., 2003.).

**Mikroskopska ocjena ejakulata - kvantitativna obilježja**

***Gibljivost spermiju*** omogućava oplodnju, odnosno mogućnost prodora u jajnu stanicu te se stoga određivanje gibljivosti spermija smatra jednim od najvažnijih značajki u procjeni ejakulata rasplodnjaka. Određivanje gibljivosti spermija u procjeni ejakulata pokazatelj je kakvoće i broja oplodno sposobnih spermija (Cergolj i Samardžija, 2006.). Gibljivost i preživljavanje spermija ovise o optimalnom omjeru između tekućina koje se stvaraju u prostati i vezikularnim žlijezdama. Sekret prostate je lužnat što je od velikog značenja za metabolizam i gibljivost spermija. Normalno je gibanje spermija pravocrtno, rotiraju se oko podužne osi prema naprijed s brzim pokretima repa lijevo-desno. Osim normalnog, pravocrtnog gibanja spermija, mogu se naći i patološki oblici gibanja, primjerice, manježno ili kružno, vibriranje na mjestu, retrogradno (unazad) ili mogu biti nepomični. Spermiji koji se normalno gibaju, imaju različite brzine gibanja, ovisno o biološkoj vrijednosti sperme, temperaturi i trajanju skladištenja sperme te o vaginalnom sekretu uterusa i cerviksa, koji se u ženki stvara tijekom estrusa. Ejakulati nerasta koji se razrjeđuju za UO moraju imati najmanje 70% gibljivih spermija, a oni ejakulati koji nemaju zadovoljavajući postotak progresivno gibljivih spermija odbacuju se (Frunză i sur., 2008., Knox, 2015.). Gibljivost se spermija u nativnom ejakulatu najčešće određuje mikroskopski. Fotoelektrične, elektronske i računalne metode za analiziranje sperme, omogućuju preciznu procjenu gibanja spermija, njihove putanje, brzinu gibanja, ali i oblik promatranih gibanja (Frunză i sur., 2008., Knox, 2015.).

***Gustoća******ejakulata***, odnosno koncentracija spermija u ejakulatu (broj spermija u 1 mL ejakulata) služi kao metoda za praćenje zdravlja i reproduktivnog potencijala nerasta te kao najznačajniji pokazatelj u obradi ejakulata nerasta, odnosno za optimiziranje genetskog reprodukcijskog potencijala jedinke. Procjena je gustoće sjemena značajna kako bi se osigurao dovoljan broj živih spermija za oplodnju u svakoj dozi za UO. Ukupan broj spermija predstavlja ukupan broj spermija u ejakulatu, a broj funkcionalnih spermija predstavlja broj funkcionalnih spermija u ejakulatu. Koncentracija ejakulata u nerasta u rasponu je od 25 do 300 x 106/mL prema Cergolju i Samardžiji (2006.), dok Wolf i Smital (2009.) navode raspon od 0,05 do 0,9 x 109/mL. Koncentracija ejakulata mjeri se hemocitometrom, fotometrom, spektrofotometrom ili CASA-om. Ukoliko analizu nije moguće provesti objektivnim mjernim uređajima, procjena koncentracije sperme može se načiniti i deskriptivno (rijetka, srednje rijetka i gusta). Prikupljanjem sperme odraslih nerasta, uzastopno tijekom više dana, i to 2 puta dnevno dobiva se približno 5 milijardi spermija po ejakulatu, dok se u nerasta kojima se sperma uzima 2 puta tjedno dobiva 50 milijardi spermija po ejakulatu. Nerastima kojima se ejakulat prikuplja jednom u 2 tjedana dobiva se približno 100 milijardi spermija po ejakulatu, no ukoliko se sperma ne uzima kroz dulje vrijeme, povećava se broj patoloških i nefunkcionalnih spermija (Knox, 2003.). Sperma nerasta ima malu sposobnost skladištenja, tako da stajanjem opada broj funkcionalnih spermija (Savić, 2014.). Iako koncentracija spermija nerasta nije velika u usporedbi s drugim vrstama, ukupan je broj spermija u ejakulatu znatno veći. Mnogi autori navode da životna dob, godišnje doba, učestalost uzimanja ejakulata, pasmina i drugi okolišni čimbenici utječu na koncentraciju spermija u nerasta (Stančić i sur., 2003., Kawęcka, i sur., 2008., Kondracki i sur., 2012., Žura Žaja i sur., 2016.). Stančić i sur. (2003.) navode da se koncentracija ejakulata povećava sa starenjem nerasta.

U novijim istraživanjima Stančić i sur. (2012.) navode da su volumen i koncentracija ejakulata, progresivna gibljivost i ukupni broj spermija znatno manji u toplijem razdoblju godine, a time je i broj dobivenih doza za UO po ejakulatu gotovo dvostruko manji od onih dobivenih u hladnijem razdoblju godine. Optimalan razmak između 2 skoka za neraste u eksploataciji je 3 do 5 dana, a za mlade neraste pauza između 2 skoka treba biti veća, najmanje 7 dana (Frangeî i sur., 2005.). Koncentracija, volumen i ostali pokazatelji sperme nerasta povećavaju se sve do dobi nerasta od 3,5 godine (Savić, 2014.). Kondracki i sur. (2012.) su ustvrdili značajne razlike u koncentraciji, odnosno volumenu sjemena nerasta između različitih pasmina.

***Morfologijske značajke spermija u nativnom ejakulatu*** uključuju procjenu građe i oblika većeg broja spermija. Morfološka procjena spermija omogućuje najobjektivniju procjenu sjemena. Vrsta i broj morfološki promijenjenih spermija pokazuje stupanj nepravilnosti spermatogeneze (Kawęcka i sur., 2008.), ali razlikujemo i sekundarne patološke oblike koji nastaju tijekom skladištenja u epididimisu. Kada se pod mikroskopom uoči veći broj morfološki promijenjenih spermija, načini se preparat (razmaz) koji se fiksira i oboji, najčešće postupkom prema Bloom-u, a potom se pomoću fazno-kontrasnog mikroskopa odredi udio patoloških (morfološki promijenjenih) spermija. U ejakulatu je nerasta dopušteno manje od 30% patoloških oblika spermija te nezrelih spermija manje od 15%. Ejakulati se s veći udjelom patoloških i nezrelih oblika spermija odbacuju. Dobro opremljeni centri za UO za morfološku procjenu spermija te za utvrđivanje postotka živih i mrtvih spermija rabe CASA-u (Cergolj i Samardžija, 2006., Knox, 2015.).

Kakvoća je sjemena izuzetno važna prilikom rutinske eksploatacije rasplodnih nerasta u centrima za UO. Pri tome je vrlo važan broj doza za UO dobiven iz jednog ejakulata i oplodnja čim većeg broja ovuliranih jajnih stanica, što ovisi o kakvoći sjemena. Temeljitom se procjenom selekcioniraju ejakulati s iznadprosječnim oplodnim svojstvima koji su preduvjet za uspješno unaprjeđenje reprodukcijske učinkovitosti te za nasljeđivanje najboljih osobitosti sjemena rasplodnjaka.

**Popis literature**

1. Cergolj, M., M. Samardžija (2006): Veterinarska andrologija. Veterinarski fakultet. Zagreb.
2. Dyck, M. K., G. R. Foxcroft, S. Novak, A. Ruiz-Sanchez, J. Patterson, W. T. Dixon (2011): Biological markers of boar fertility. Reprod. Domest. Anim. 46, 55-58.
3. Frangeî, R., T. Gider, M. Kosec (2005): Frequency of boar ejaculate collection and its Influence on semen quality, pregnancy rate and litter size. Acta Vet. Brno 74, 265-273.
4. Frunză, I., H. Cernescu, G. Korodi (2008): Physical and chemical parameters of boar sperm. Lucrări Stiintifice Medicină Veterinară XLI (41), 634-640.
5. Kamp, G., G. Büsselmann, N. Jones, B. Wiesner, J. Lauterwein (2003): Energy metabolism and intracellular pH in boar spermatozoa. Reproduction 126, 517-525.
6. Kawęcka, M., A. Pietruszka, E. Jacyno, R. Czarnecki, M. Kamyczek (2008): Quality of semen of young boars of the breeds Pietrain and Duroc and their reciprocal crosses. Arch. Tierz. 51, 42-54.
7. Knox, R. V. (2003): The Anatomy & Physiology of Sperm Production in Boars. <http://www.ansci.wisc.edu/jjp1/pig_case/html/library/boara&p.pdf> (18.7.2016.).
8. Kondracki, S., M. Iwanina, A. Wysokińska, M. Huszno (2012): Comparative analysis of Duroc and Pietrain boar sperm morphology. Acta Vet. Brno 81, 195-199.
9. López Rodríguez, A., T. Rijsselaere, J. Beek, P. Vyt, A. Van Soom, D. Maes (2013): Boar seminal plasma components and their relation with semen quality. Syst. Biol. Reprod. Med. 59, 5-12.
10. Paulez, H., E. Kommisrud, P. O. Hofmo (2000): Effect of long-term storage at different temperatures on the quality of liquid boar semen. Reprod. Domest. Anim. 35, 83-89.
11. Riesenbeck, A. (2011): Review on international trade with boar semen. Reprod. Domest. Anim. 46, 1-3.
12. Savić, R. R. (2014): Fenotipska i genetska varijabilnost plodnosti nerasta. Doktorska disertacija, Univerzitet u Beogradu, Beograd, Srbija.
13. Stančić, B., A. Božić, I. Stančić, S. Dragin, I. Radović, M. Petrović (2012): Effect of worm and cold period of the year on boar semen quality parameters. Contemporary Agriculture 61, 163-168.
14. Stančić, B., M. Gagrčin, I. Radović (2003): Uticaj godišnje sezone, rase i starosti nerastova na kvalitet sperme. 1. Nativna sperma. Biotech. Anim. Husbandry 19, 17-23.
15. Wolf, J., J. Smital (2009): Quantification of factors affecting semen traits in artificial insemination boars from animal model analyses. J. Anim. Sci. 87, 1620-1627.
16. Žura Žaja, I., M. Samardžija, S. Vince, I. Majić-Balić, M. Vilić, D. Ðuričić, S. Milinković-Tur (2016): Influence of boar breeds or hybrid genetic composition onsemen quality and seminal plasma biochemical variables. Anim. Reprod. Sci. 164, 169-176.
17. Barranco, I., A. T. Varijonaviciute, C. Perez- Patiño, I. Parrilla, J. J. Ceron, E. A. Martinez, H. Rodriguez-Martinez, J. Roca (2015): High totalantioxidant capacity of the porcine seminal plasma (SP-TAC) relatesto sperm survival and fertility. Sci. Rep. 5, 18538, <http://dx.doi.org/10.1038/srep18538>.
18. Knox, R. V. (2015): PIC Boar Stud Management Manual. <http://na.picgenus.com/sites/genuspic_com/Uploads/Boar%20Manual.pdf> (20.7. 2016.)

**Conventional Semen Analyses of Boar Ejaculates**

Reproductive process in the pig industry is based on the maximal efficiency preferred characteristics of pigs in which artificial insemination (AI) has the most significant effect. The success of AI depends on identification and selection of boars based on reproductive performance assessment, such as libido, ability for mating and above average semen quality. Boars included in the AI-programs are carefully selected and safeguarded to provide ejaculates with a large number of motile, viable and morphologically normal spermatozoa. The semen quality, male fertility potential and possible causes of infertility are estimated by semen analyses. In addition, to provide high quality insemination doses, routine assessment of the semen quality of the ejaculates is necessary. Such analyses are based primarily on conventional methods, including spermatozoa counts usually determined by the photometer, and microscopically assessing sperm cell motility and morphology. Although some AI centers may implement computer aided semen analysis in their routine semen assessment. Thorough evaluation of semen is used to select ejaculates with higher fertile features which is prerequisite for the successful improvement of reproductive efficiency and for inheritance of the most desirable semen genotype traits.

**Key words**: sperm, sperm analysis, artificial insemination, boars