Utjecaj egzogenog melatonina na standardne pokazatelje kakvoće sjemena jarčeva izvan rasplodne sezone

Ognjenović, Anja

Master's thesis / Diplomski rad

2016

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:178:497580

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Veterinary Medicine - Repository of PHD, master's thesis

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

VETERINARSKI FAKULTET

Anja Ognjenović

UTJECAJ EGZOGENOG MELATONINA NA STANDARDNE POKAZATELJE KAKVOĆE SJEMENA JARČEVA IZVAN RASPLODNE SEZONE

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, prosinac 2016.

Ovaj diplomski je izrađen na Klinici za porodništvo i reprodukciju i Zavodu za fiziologiju i radiobiologiju Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Klinika za porodništvo i reprodukciju
Predstojnik: izv. prof. dr. sc. Juraj Grizelj

Zavod za fiziologiju i radiobiologiju
Predstojnica: prof. dr. sc. Suzana Milinković Tur

Mentor i komentor rada:

doc. dr. sc. Silvijo Vince
dr. sc. Ivona Žura Žaja

Članovi povjerenstva za obranu diplomskog rada:

1. prof. dr. sc. Marko Samardžija
2. doc. dr. sc. Sivijo Vince
3. dr. sc. Ivona Žura Žaja
4. doc. dr. sc. Ivan Folnožić (zamjena)

Zahvaljujem se voditeljima rada doc. dr. sc. Silviju Vince i dr. sc. Ivoni Žura Žaja na uloženom trudu i vremenu te pomoći pri cjelokupnom nastanku rada.

Zahvalu dugujem i Velimiru Berta, dr. med. vet., na pomoći pri dizajnu pokusa, realizaciji i organizaciji cjelokupnog istraživanja te prikupljanju ejakulata jarčeva.

Veliko hvala također obiteljima Petric, Kovačić i Kišić koji su nam omogućili provedbu ovog istraživanja na njihovim obiteljskim gospodarstvima.

Zahvaljujem se i svojim roditeljima što su mi omogućili studij, a posebno sestrama Emini i Ines na razumijevanju i podršci.

SADRŽAJ

1. UVOD 1
2. PREGLED REZULTATA DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA 3
2.1. Muški reproduktivni sustav 3
2.2. Morfološke osobitosti ejakulata i spermija 7
2.3. Procjena kakvoće ejakulata 8
2.4. Sezonost spolnog ciklusa koza i jarčeva 9
2.5. Utjecaja egzogenog melatonina na plodnost ovnova i jarčeva 10
3. MATERIJALI I METODE 12
3.1. Držanje životinja 12
3.2. Dizajn pokusa i postupak sa životinjama 14
3.3. Polučivanje ejakulata i ocjenjivanje libida 14
3.4. Ocjena ejakulata 15
3.5. Statistička obrada rezultata 16
4. REZULTATI 17
4.1. Volumen i koncentracija ejakulata 17
4.2. Ukupni broj spermija i ukupni funkcionalni broji spermija u ejakulatu 18
4.3. Masovno gibanje i gibanje spermija 20
4.4. Udio živih i patoloških oblika spermija u ejakulatu 21
4.5. Intenzitet libida jarčeva 23
5. RASPRAVA 24
6. ZAKLJUČCI 27
7. LITERATURA 28
8. SAŽETAK 33
9. SUMMARY 34
10. ŽIVOTOPIS 35

Popis korištenih kratica

CASA: računalni sustav za analizu sjemena (engl. *computer aided semen analysis*)

eCG: konjski korionski gonadotropin (engl. *equine chorionic gonadotropin*)

FSH: folikulostimulirajući hormon

GnRH: gonadotropni otpuštajući hormoni (engl. *gonadotropin-releasing hormones*)

ISSH: intersticijskih stanica stimulirajući hormon

LH: luteinizirajući hormon

PGF2α: prostaglandin

TFSF: ukupni funkcionalni broj spermija (engl. *total functional sperm fraction*)

1. UVOD

Poznato je da rasplodna sezona malih preživača u umjerenom klimatskom pojasu traje od sredine ljeta do sredine zime, tj. u dijelu godine kada započinje i traje razdoblje kraćeg trajanja dana. Stoga su mali preživači (ovisno o pasmini) od veljače do lipnja u stanju seksualne neaktivnosti, kada se njihovo seksualno ponašanje, fiziološka aktivnost i izlučivanje feromona mijenjaju i smanjuju (SARLÓS i sur., 2013.).

Obzirom na navedeno, opskrba tržišta mlijekom i mliječnim proizvodima te jarećim i janjećim mesom je sezonska. Suvremeno kozarstvo i ovčarstvo, zbog intenzivnog uzgoja teži proizvodnji visoko kvalitetnih proizvoda animalnih podrijetla iz organskog uzgoja tijekom cijele godine. Ukoliko proizvođači žele odgovoriti zahtjevima tržišta i opskrbljivati ga svojim proizvodima tijekom cijele godine, nužan je pasminski odabir koji je pretpostavka za ostvarivanje visokih prinosa te reproduktivni management stada koji takvim zahtjevima može udovoljiti (GRIZELJ i sur., 2011.). Upravljanje reproduktivnim svojstvima stada uključuje hormonalne i nehormonalne metode. Tako su u kontroli reprodukcije malih preživača (koza i ovaca) sporo otpuštajući implantati melatonina u primjeni više od trideset godina. Naime, u malih preživača, sezonska reproduktivna aktivnost regulirana je endogenim hormonalnim ritmom, koji je sinkroniziran podražajima iz okoliša, od kojih je najvažniji fotoperiod. Stoga je spolni ciklus malih preživača uvjetovan izlučivanjem hormona melatonina iz epifize tijekom noćnih sati, a osim toga ovisan je i o genetskim te okolišnim čimbenicima (DELGADILLO i sur., 2001., GRIZELJ i sur., 2011.). Iako se proizvodnja sjemena u jarčeva zbiva tijekom cijele godine, kakvoća ejakulata je znatno lošija izvan rasplodne sezone (CHEMINEAU i sur., 1992., KAYA i sur., 2000.). Dakle, najbolja kakvoća ejakulata jarčeva je tijekom sezone parenja kada imaju višu razinu testosterona (AL-GHALBAN i sur, 2004., DELGADILLO i sur., 2004.).

Melatonin je multifunkcionalna molekula kompleksnog mehanizma djelovanja, a svojim mehanizmima antioksidativne zaštite sprječava lipidnu peroksidaciju u staničnim membranama spermija (DU PLESSIS i sur., 2010., GAVELLA i sur., 2000., CASAO i sur., 2013.) i njihovu apoptozu te štiti DNK i mitohondrije spermija od oštećenja koja mogu nastati zbog štetnog djelovanja slobodnih radikala kisika (SHANG i sur., 2004.). Prethodna istraživanja primjene melatonina izvan rasplodne sezone u ovnova i jarčeva dala su oprečne rezultate, od podataka da nije bilo nikakvog učinka melatonina, do podataka da se pozitivan učinak očitovao manjim poboljšanjem i to samo nekih karakteristika

ejakulata (KAYA i sur., 2000., RAMADAN i sur., 2009., BUFFONI i sur., 2015., FAZLI-NEZAD i sur., 2016.).

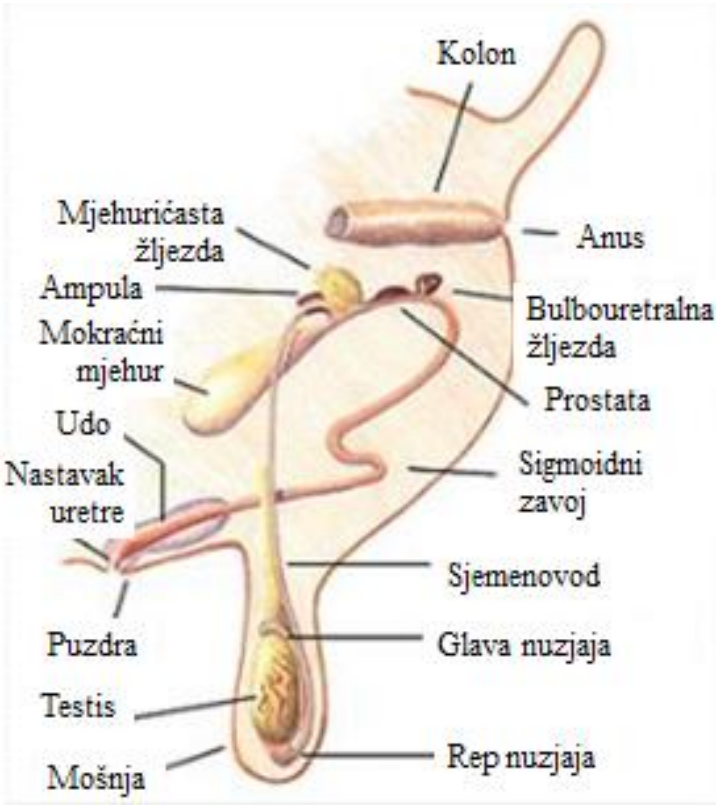
Budući da su podaci o učinku melatonina na plodnost ovnova temeljna pretpostavka normalne plodnosti (posebice izvan rasplodne sezone), često oprečni, a učinak egzogenog melatonina na spolni nagon (libido) i kakvoću sjemena jarčeva nije dostatno istražen, cilj ovoga rada bio je istražiti učinak egzogenog melatonina na libido te standardne pokazatelje kakvoće sjemena jarčeva izvan rasplodne sezone.

2. PREGLED REZULTATA DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA

2.1. Muški reproduktivni sustav

Funkcija reproduktivnoga sustava muških životinja je stvaranje velikog broja gibljivih, vijabilnih i morfološki normalnih spermija te njihovo izbacivanje u odgovarajuće mjesto ženskog reproduktivnog sustava, u odgovarajuće vrijeme spolnog ciklusa, kako bi došlo do oplodnje (CAMPBELL i sur., 2003.).

Spolni se organski sustav mužjaka domaćih životinja sastoji od organa koji se mogu vrsno razlikovati u njihovoj veličini i stupnju razvijenosti. Muški se spolni sustav sastoji od parnih testisa (muške sjemenske žlijezde, *testes*) smještenih u mošnji (*scrotum*), nuzjaja (*epididymis*), sjemenovoda (*ductus deferens*), muške mokraćnice (*urethra masculina*), akcesornih spolnih žlijezda: mjehurićaste žlijezde (*glandulae vesiculosae*), prostate (*glandula prostatica*), bulbouretralne (Cowperove) žlijezde (*glandulae bulbourethrales*), uretralne (Litreove) žlijezde (*glandulae urethrales*), uda (*penis*) i prepucija (puzdra, *praeputium*) (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.) (Slika 1.).



Slika 1. Shematski prikaz spolnog sustava jarca (Izvor: ABEBE, 2008.).

Muške sjemenske žlijezde – *testes*

Testisi su glavni parni muški spolni organi u kojima se sintetiziraju zametne stanice (spermiji). Oni nastaju i razvijaju se u abdominalnoj šupljini, te se procesom *descensus testiculorum* kroz ingvinalni kanal spuštaju u mošnju. U jarčeva period spuštanja testisa završava sredinom gravidnosti (oko 80-og dana). Nalaze se uspravno u mošnji i vise između zadnjih nogu u stidnoj regiji. Vrlo su razvijeni, dužine od 10 do 17 cm, široki 5 do 9 cm i teže između 250 do 400 g. (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.).

Pokriveni su seroznom opnom, *tunica vaginalis propria* (predstavlja visceralni list peritoneuma), ispod koje se nalazi *tunica albuginea testis.* Ona prilježe izravno na parenhim testisa te ga dijeli na režnjiće (*lobuli testi*). Svaki se režnjić sastoji od 2 do 3 izvijugana sjemena kanalića (*tubuli contorti* seu *seminifori*), u kojima se nalaze potporne Sertolijeve stanice. U njima se sa spolnom zrelošću kreće odvijati proces spermiogeneze. Oni prelaze u *tubuli recti* koji se nastavljaju u *rete testis* iz kojih kroz desetak izvodnih kanalića (*vasa efferentia*) prelaze u *ductus epididymis.*Između režnjića parenhima testisa nalaze se razbacane Leydigove stanice u manjim grupama, koje u krv izlučuju muške spolne hormone. Krv u testise dovodi *arteria spermatica*, a odvodi *vena spermatica*. To područje inerviraju živci koji oko krvnih žila tvore *plexus spermaticus* (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.).

Mošnja – *scrotum*

Mošnja je dvodijelna kožna vreća koja u jarčeva visi između zadnjih nogu, a u kojoj su smješteni testisi, nuzjaja i dijelom sjemenovodi.

Građena je od nekoliko slojeva:

- koža – razdijeljena longitudinalnom prugom, *raphe scroti*
- *tunica dartos* – prijanja uz kožu, tvori *septum scroti* koji dijeli skrotum u dvije vreće
- *fascia scroti*
- parijetalni list tunike vaginalis (*tunica vaginalis communis*)
- visceralni list tunike vaginalis (*tunica vaginalis propria*)

Tunica vaginalis predstavlja evaginaciju peritoneuma i proteže se kroz preponski kanal do dna mošnje. Sastoji se od parijetalnog i visceralnog lista. Parijetalni list oblaže skrotum, dok visceralni list sjemeno uže, testis i nuzjaje.

Kroz ingvinalne kanale u testise dolaze: *arteria spermatica, vena spermatica,* limfne žile, simpatički živci, *ductus deferens, musculus cremaster internus,* visceralni list tunike vaginalis, koji zajedno čine sjemensko uže (*funiculus spermaticus).* Mišići funikulusa, *tunica dartos*, i *vena spermatica (*tvori *plexus pampiniformis*) imaju termoregulacijsku ulogu koja je važna za normalno odvijanje spermiogeneze (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.). Skrotum može biti u cijelosti ili djelomično razdijeljen (Slika 2.).



Slika 2. Različiti oblici skrotuma (Izvor: ABEBE, 2008.).

Nuzjaja – *epididymis*

Nuzjaja su parni organi spojeni s testisima, a sastoje se od jako izvijuganog kanalića (*ductus epididymis).* Građeni su od glave (*caput epididymis),* tijela (*corpus epididymis)* i repa (*cauda epididymis).*

Akcesorne spolne žlijezde

Kod jarčeva od akcesornih spolnih žlijezda dobro su razvijene: ampula sjemenovoda, mjehurićaste ili sjemene te bulbouretralne žlijezde, dok je prostata puno manja i diseminirana oko zdjeličnog dijela uretre bez tijela. Žlijezde su smještene na ulazu u zdjelicu čiji se sekret odvodnim kanalićima prazni u uretru.

Udo – *penis*

Penis se sastoji od korijena, trupa i glavića. Korijen penisa se sastoji od dva kraka koji idu od *arcusa ischiadicusa* i spajaju se u tijelu penisa. Mjesto spajanja krakova i trupa penisa je istodobno i mjesto ulaska uretre u penis.

Anatomske specifičnosti spolnih organa jarčeva

Specifične su anatomske značajke poznate u različitih domaćih životinja. Glans penisa ima veliki raspon oblika u različitih vrsta sisavaca, pa tako u jarca, ovna i pastuha uretra strši za oko 2,5 cm iznad glansa penisa (*processus urethralis*). Kaudalno od skrotuma, prema trbušnoj stijenci, penis jarca, ovna, bika, i nerasta tvori karakterističan sigmoidni zavoj (*flexuru sigmoidae*), koji se pri erekciji ispravlja produljujući penis. U vrsta koje imaju sigmoidni zavoj postoji parni mišić *m. retractor penis* koji se hvata na repnim kralješcima i s dorzalne strane sigmoidnog zavoja. Svojom relaksacijom omogućava izduljenje penisa na račun ispravljanja sigmoidnog zavoja. Nadalje, proksimalni dijelovi sjemenovoda jarca, ovna i bika su ampulasto prošireni i tvore *ampullae* sjemenovoda. Ampule su depoi za kratkotrajno skladištenje sperme s mogućnošću brzog pražnjenja jer se u njihovoj stijenci nalaze slojevi glatke muskulature. Prethodno opisani mehanizmi objašnjavaju brzu ejakulaciju preživača. Sluznica prepucija jarca i ovna jako je naborana i ima brojne žlijezde koje izlučuju masni sekret, a miješajući se s epitelnim stanicama, bakterijama i urinom čini *smegma preputii*. Skrotum u jarca, ovna, bika i pastuha visi između zadnjih nogu, dok je u nerasta i pasa smješten kaudalno od anusa (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.).

Fiziološko je funkcioniranje reproduktivnog sustava mužjaka ovisno o hormonalnoj regulaciji. Tako adenohipofiza pod utjecajem hipotalamusa stvara gonadotropne hormone, a folikulostimulirajući hormon (FSH) stimulira Sertolijeve stanice, dok luteinizirajući hormon (LH), odnosno intersticijskih stanica stimulirajući hormon (ISSH), potiče Leydigove stanice na izlučivanje testosterona koji je nužan za rast i diobu zametnih stanica u testisu. Leydigove stanice koje se nalaze u intersticiju testisa izlučuju testosteron iz kojega se u Sertolijevim stanicama sintetiziraju estrogeni koji su također nužni za spermatogenezu. Hormon rasta kontrolira temeljne metaboličke funkcije testisa i potiče ranu diobu samih spermatogonija (GUYTON, 2006.). Prethodno opisana hormonalna regulacija poznata je kao hipotalamičko-hipofizna-testikularna os. Izuzev hormonalne

regulacije, muške spolne organe nadzire i simpatički i parasimpatički živčani sustav, pa tako parasimpatikus nadzire erektilnu sposobnost penisa, a simpatikus nadzire ejakulaciju (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006., MAJIĆ BALIĆ, 2010.).

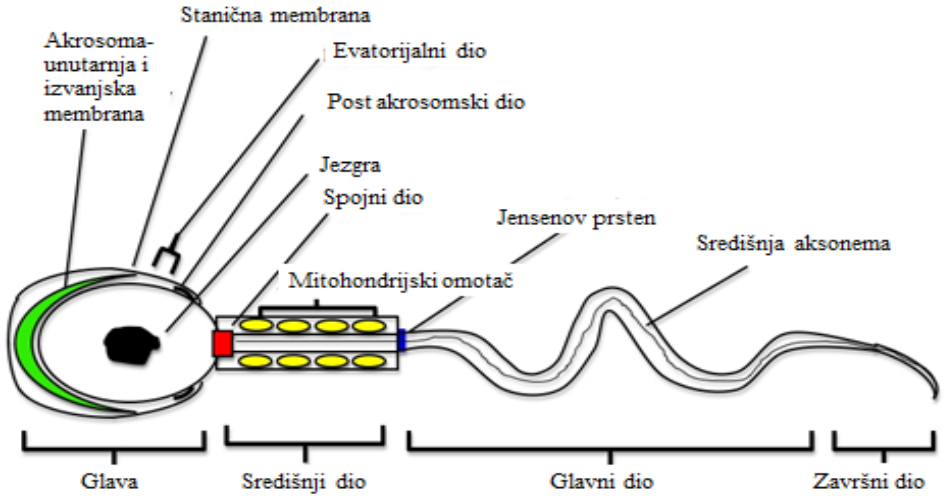
2.2. Morfološke osobitosti ejakulata i spermija

Ejakulat, sperma ili sjeme specifična je tekućina koja se sastoji od spermija i sjemene plazme. Tijekom ejakulacije kod jarca, ovna i bika koncentrirani se spermiji iz sjemenovoda pomiješaju u zdjeličnom dijelu uretre s tekućinom iz akcesornih spolnih žlijezda i tvore ejakulat. Nasuprot tome, u pastuha, nerasta i psa miješanje nije potpuno pa ejakulat sadrži odvojene frakcije siromašne i bogate spermijima. Spermiji se stvaraju spermatogenezom i spermiogenezom u testisima, dok je sjemena plazma proizvod akcesornih spolnih žlijezda. Samo je manji dio sjemene plazme proizvod testisa, sjemenovoda i epididimisa. Najznačajnije funkcije sjemene plazme jesu aktivacija, prehrana, zaštita i transport spermija. Na volumen i broj spermija u ejakulata preživača utječu: dob, prehrana, tjelesna masa, režim spolnog iskorištavanja, pasmina, uvjeti držanja, godišnje doba, način iskorištavanja rasplodnjaka, itd. Ejakulat je mliječno bijele boje sa sivo-žućkastom nijansom, konzistencije vrhnja ili kiselog mlijeka. Osobitosti ejakulata jarčeva jesu: mali volumen (0,7 - 2 mL), velika gustoća (2.000 - 5.000 milijuna spermija u mL) i blago kiselog do neutralnog pH (6,2 - 7). Ejakulat se sastoji od subpopulacija spermatozoida koji se razlikuju u zrelosti i fiziološkom stanju, obzirom na sposobnost kapacitacije, akrosomske reakcije i oplodnje (AITKEN i sur., 1992., CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.).

Spermiji su muške spolne stanice svojstvenog oblika za svaku vrstu sisavaca. Razlikuju se od svih ostalih stanica u životinjskom organizmu. Nemaju sposobnost diobe i rasta, ali imaju sposobnost samostalnog gibanja i održivosti izvan organizma u aerobnim i anaerobnim uvjetima. Iako su svojstveni za svaku životinjsku vrstu, ipak postoje neke osobine koje su zajedničke svim vrstama sisavaca.

Spermij se sastoji od glave, središnjeg dijela (vrat i tijelo) i repa. Tako jezgra i akrosoma u glavi spermija čine osnovu stanice spermija. Jezgra je spermija sastavljena od genetskog materijala, DNK, te od ribonukleinske kiseline (RNK), kromatina, bjelančevina te alkalne fosfataze, a obavijena je tankim slojem citoplazme. Akrosoma je egzocitotična

vezikula (opna) koja proizlazi iz Golgijevog aparata i sadrži važne hidrolitički enzime (hijaluronidaza i akrozin), koji su važni za postizanje penetracije kroz međustanični matriks folikularnih stanica (*zona pellucida*). Vezikulu okružuju unutarnja i izvanjska akrosomska membrana. Unutarnja se membrana nalazi bliže jezgri, a izvanjska se akrosomska membrana nalazi odmah ispod stanične membrane. Vrat je vrlo kratak, građen od devet segmenata centriola te središnje i spiralne aksoneme, koje sežu sve do repa. Tijelo povezuje glavu sa repom, a smatramo ga „motorom" koji pokreće rep. Oko središnje aksoneme smješteni su mitohondriji koji su važni izvor energije potrebne za gibanje spermija. Tijelo se spermija sastoji od bjelančevina, ugljikohidrata i masti koje sudjeluju u staničnom metabolizmu. Rep je najduži dio spermija, a time i najznačajniji organ za njegovu gibljivost. Sastoji se od središnjeg, glavnog i završnog dijela, koji završava aksonemom nalik kistu, dok u središnjem dijelu vrata sadrži središnju aksonemu, spiralno omotanu mitohondrijskim omotačem (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006., ŽURA ŽAJA, 2015.) (Slika 3.).



Slika 3. Shematski prikaz građa spermija (Izvor: http://static.fastbleep.com/assets/notes/image/9876_1.jpg).

2.3. Procjena kakvoće ejakulata

Analizom sperme procjenjuje se potencijal plodnosti mužjaka, kakvoća sjemena i možebitni uzroci neplodnosti. Analiza se kakvoće sjemena uglavnom temelji na

konvencionalnim postupcima, koji bez obzira na vrstu, obuhvaćaju određivanje volumena ejakulata, broj spermija u 1 mL (određen na fotometru) te gibljivost i morfologiju spermija, koje se procjenjuju uz pomoć mikroskopa, a u malobrojnim se centrima za umjetno osjemenjivanje rabi računalni sustav za analizu sjemena (engl. *computer aided semen analysis*, CASA). Nadalje, ukupan broja spermija u ejakulatu izračunava se umnoškom volumena ejakulata i koncentracije spermija (HERAK, 1991.). Temeljitom se procjenom selekcioniraju ejakulati/rasplodnjaci sa nadprosječnim oplodnim svojstvima. Kvalitativne metode obuhvaćaju procjenu gibljivosti spermija i njihovih morfoloških karakteristika. Kvalitativna procjena ejakulata nadopunjuje se i pretragama spermija na akrosomsku reakciju, sposobnosti spermija da prodru kroz zonu pelucidu i spoje se s jajnom stanicom te imunološkim testovima (SAMARDŽIJA i sur., 2005.). U novije vrijeme se sve više pažnje posvećuje proučavanju i određivanju aktivnosti različitih enzima normalno prisutnih u spermi, prisutstva i raspodjele glikoproteina za koje se pretpostavlja da imaju važnu ulogu u procesu oplodnje, propusnosti stanične membrane te funkciji mitohondrija (MAJIĆ BALIĆ, 2010.).

Svojstva sperme variraju od jedinke do jedinke, a pod utjecajem su mnogih egzogenih čimbenika (hranidba, učestalost uzimanja ejakulata, smještaj, mikroklimatski uvjeti, stres, itd.), ali i endogenih čimbenika (genetski, neuroendokrini, itd.) (ŽURA ŽAJA, 2015.).

2.4. Sezonost spolnog ciklusa koza i jarčeva

Koze su u umjerenom klimatskom pojasu sezonski poliestrične životinje čija sezona spolne aktivnosti počinje sredinom ljeta i traje do sredine zime. Rasplodna sezona počinje skraćivanjem trajanja dana, zbog čega ih nazivamo „short day breeders“. Zbog toga koze znakove spolnog žara iskazuju u pravilnim vremenskim razmacima samo tijekom rasplodne sezone (GRIZELJ i sur., 2011.). Ostatak godine koze se nalaze u razdoblju spolnog mirovanja ili anestrusa. Cijeli je proces uvjetovan duljim izlučivanjem melatonina iz epifize tijekom noćnih sati, dakle u tami, što uzrokuje pojačanu aktivnost hipotalamusa i pojačano lučenje gonadotropnog otpuštajućeg hormona (engl. *gonadotropin-releasing hormones*; GnRH), a osim toga ovisan je i o genetskim te okolišnim čimbenicima (DELGADILLO i sur., 2001., GRIZELJ i sur., 2011.). Naime, podražaji dnevnog svjetla dolaze do mrežnice i prenose se do epifize, gdje se pretvaraju u

hormonske podražaje (kinetičko otpuštanje melatonina) regulirano endokrinom reproduktivnom osi (GERLACH i AURICHR, 2000., ZARAZAGA i sur., 2010.). Melatonin ima središnju funkciju u prilagodbi cirkadijanog ritma (Cajochen i sur., 2003) i sezonskih promjena (MALPAUX i sur., 2001.) povećanjem njegove koncentracije tijekom noći u krvi (REITER i sur., 1991.) malih preživača (CASAO i sur., 2010a., EGERSZEGI i sur., 2014.). Duljina trajanja dana ovisi o zemljopisnoj širini pa se i rasplodna sezona razlikuje među regijama. U tropskim i suptropskim područjima u koza su vrlo mala odstupanja u spolnoj aktivnosti tijekom cijele godine „non-seasonal breeders“, jer nema godišnjih svjetlosnih varijacija. Osim svjetlosti, na rasplodnu sezonu utječe i genotip (pasmina), način držanja i socijalni čimbenici. Primjerice, fizički kontakt i/ili izražena spolna aktivnost mužjaka potiče i pojačava spolnu aktivnost ženki i obrnuto (FLORES i sur., 2000.).

Iako jarčevi mogu pariti koze tijekom cijele godine i u njih je zamijećen utjecaj rasplodne sezone na njihovu plodnost. Naime, tijekom rasplodne sezone njihova je spolna aktivnost najviše izražena, dok je najslabije izražena izvan rasplodne sezone. Tada je koncentracija testosterona puno niža pa je slabije izražen libido, a obujam i masa testisa su manji, time je i lošija kakvoća ejakulata (SAMARDŽIJA i sur., 2010.).

2.5. Utjecaja egzogenog melatonina na plodnost ovnova i jarčeva

Smatra se da je najbolja kakvoća sjemena jarčeva tijekom sezone parenja, odnosno u razdoblju kraćeg trajanja dana kada je i lučenje testosterona povećano (AL-GHALBAN i sur., 2004., DELGADILLO i sur., 2004.). No, seksualna aktivnost jarčeva izvan rasplodne sezone u suptropskom klimatskom pojasu može biti inducirana izlaganjem jarčeva umjetnom osvjetljenju i potonjom aplikacijom melatoninskih implantata (DELGADILLO i sur., 2001.; RAMADAN i sur., 2009.).

Melatonin se sintetizira u epifizi i ima važnu funkciju u mnoštvo fizioloških funkcija živčanog, imunološkog, reproduktivnog, gastrointestinalnog sustava, itd. Njegovo antioksidativno djelovanje također se opsežno istražuje (REITER i sur, 2009., HARDELAND i sur., 2011., CARPENTIERI i sur., 2012., EGERSZEGI i sur., 2014.). Takva multifunkcionalna svojstva i kompleksan mehanizam djelovanja povezana su sa molekularnim svojstvima melatonina, osobito topljivost u mastima pa stoga lako prolazi

dvosloj staničnih membrana gotovo svih stanica u organizmu (CEBRIÁN-PÉREZ i sur., 2014). Nadalje, melatonin izravno sudjeluje u „hvatanju“ i prevođenju biološki aktivnih oblika slobodnih radikala u neaktivne, te neizravno u povećanju aktivnosti antioksidacijskih enzima (DU PLESSIS i sur., 2010., CASAO i sur., 2013.). Tim mehanizmima melatonin sprečava lipidnu peroksidaciju u staničnim membranama spermija (GAVELLA i sur., 2000.) i njihovu apoptozu te štiti DNK i mitohondrije spermija od oštećenja koja mogu nastati zbog štetnog djelovanja slobodnih radikala (SHANG i sur., 2004.). Dokazano je da melatonin izravno blagotvorno djeluje na gibljivost spermija ovnova (CASAO i sur., 2010b.) kao i na ostale karakteristike spermija izvan rasplodne sezone putem smanjenja apoptotičnih promjena, modulacijom kapacitacije i povećanjem plodnosti ovnova (CASAO i sur., 2010c., EGERSZEGI i sur., 2014.). Slično tome, RAMADAN i sur. (2009.) su ustvrdili pozitivan učinak u nekim reproduktivnim pokazateljima jarčeva kao što su: povećanje razine libida, ukupnog funkcionalnog broja spermija i smanjenje udjela mrtvih spermija u ejakulatu, nakon njihova izlaganja umjetnom osvjetljenju i aplikacije melatoninskih implantata izvan rasplodne sezone. Nadalje, FATOBA i ADELOYE, (2013.) ustanovili su da egzogeni melatonin značajno povećava svekolike karakteristike spermija u rasplodnoj sezoni jarčeva.

U ovnova egzogeni melaton apliciran subkutanim melatoninskim implantatima izvan rasplodne sezone ima pozitivan učinak na kakvoću sjemena (povećanje gibljivosti spermija i razinu testosterona), dok tijekom sezone parenja nisu ustvrđeni pozitivni učinci melatonina na kakvoću njihova ejakulta (KAYA i sur., 2000.). Naprotiv, u drugim studijama nije bilo učinka melatoninskih implantata na kakvoću sjemena ovnova u različitim godišnjim dobima (ROSA i sur., 2012., BUFFONI i sur., 2015.). Rezultati istraživanja FAZLI-NEZAD i sur. (2016.) pokazuju djelomično pozitivan učinak melatonina izvan rasplodne sezone ovnova te su autori ustvrdili povećanje testisa, volumena i koncentracije ejakulata, ali ne i učinak na ostale pokazatelje kakvoće sjemena. Očito je da su dostupni podaci u literturi o učincima egzogenog melatonina na pokazatelje plodnosti u ovnova često oprečni.

3. MATERIJALI I METODE

Fakultetsko vijeće Veterinarskoga fakulteta Sveučilišta u Zagrebu temeljem članka 31. Statuta Veterinarskoga fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, na prijedlog Povjerenstva za etiku u veterinarstvu, na 23. redovitoj sjednici održanoj 20. listopada 2015. godine odobrilo je provođenje ovog istraživanja (klasa:640-01/51-17/54, ur. br.:251-61-01/139-15-2), sukladno Zakonu o zaštiti životinja (NN135/2006, 037/2013).

3.1. Držanje životinja

Istraživanje je provedeno na 12 klinički zdravih jarčeva pasmine Francuska alpina u dobi od 2 do 4 godine, tjelesne mase u rasponu od 40 do 60 kg. Jarčevi su bili smješteni na tri obiteljska gospodarstava, međusobno udaljena oko 5 km, u okolici Varaždina, na području djelovanja Veterinarske stanice d.d. Varaždin (područna ambulanta Jalžabet). Na svakoj se farmi nalazilo osamdesetak mliječnih koza te po četiri jarca. Tijekom pokusnog razdoblja jarčevi su bili smješteni u stajama otvorenog tipa zajedno sa kozama, tako da su mužjaci mogli osjetilima prepoznati koze u estrusu (Slika 4.). Jarčevi su dnevno dobivali približno 1 kg smjese (Tablica 1.) u koju je bilo umiješano 23% komercijalne krmne smjese „KzO-Do“; dopunska krmna smjesa za hranidbu koza i ovaca te 2% „Ko-vi dar“; dopunske krmne smjese s visokim udjelom vitamina i minerala za koze i ovce (Koka, Varaždin, Hrvatska). Livadnom sijenu, mineralnim blokovima (sol) i vodi imali su pristup *ad libitum*.



Slika 4. Unutrašnjost staje obiteljskog gospodarstva Kovačić (fotografirao Velimir Berta, dr. med. vet.).

Tablica 1. Sastav dnevnog obroka/smjese za jarčeve

Sastojci smjese	Udio (%)
Kukuruz	25,0
Ječam	20,0
Pšenica	15,0
Zob	15,0
Dopunska krmna smjesa „KzO-Do“[a]	23,0
Dopunska krmna smjesa „Ko-vi dar“[a]	2,0
Izračun dopunske krmne smjese „KzO-Do“, %	100
Sirove bjelančevine	30
Sirova vlakna	20,9
Sirova mast	1,7
Pepeo	10,9
Natrij	0,7
Izračun dopunske krmne smjese „Ko-vi dar“, %	100
Pepeo	11,1
Ca	29,9
P	3,0
Na	2,0
Mg	2,0

[a] Navedeni udjeli minerala i vitamina sadržani su u kilogramu krmne smjese: 8,32 mg bakra, 113 mg cinka, 1,15 mg joda, 75 mg željeza, 75 mg magnezija, 0,23 mg selena, 28 800 IJ vitamina A; 2 950 IJ vitamina D; 29 mg vitamina E; 150 mg nijacina; 800 mg metionina; 11300 mg antioksidansa

3.2. Dizajn pokusa i postupak sa životinjama

Jarčevi su bili podijeljeni u pokusnu i kontrolnu skupinu sa po šest jarčeva u svakoj i bili su držani u istim bioklimatskim uvjetima. Po dva nasumično odabrana jarca sa svake farme dobili su krajem ožujka, aplikatorom, 4 melatoninska implantanta; 74 mg melatonina (Melovine®, CEVA, Libourne, Francuska) potkožno s vanjske strane uške te su bili označeni kao pokusna skupina. Kontrolnu su skupinu činila preostala dva jarca na svakoj farmi kojima nisu umetnuti implantati melatonina. Jarčevima se polučivao ejakulat pomoću umjetne vagine, jednom tjedno ujutro, od mjeseca ožujka do lipnja (izvan sezone parenja). Za svako polučivanje ejakulata kao fantom su korištene dvije koze kojima je induciran estrus. Protokol sinkronizacije estrusa sastojao se od intavaginalne aplikacije spužvice progestagena (40 mg; Fluorogestone acetate-FGA, Chronogest®, Intervet, Francuska) u periodu od 11 dana, te intramuskularne aplikacije prostaglandina (PGF2α) (75 μg; Estrumate®, Shering-Plough, Francuska) i konjskog korionskog gonadotropina (Engl. *equine chorionic gonadotropin*, eCG), (400 IJ; Folligon®, Intervet, Nizozemska) 48 sati prije vađenja spužvice. Spolni žar se detektirao od 24 do 30 sata nakon vađenja spužvice.

3.3. Polučivanje ejakulata i ocjenjivanje libida

Jarčevima je ejakulat polučen pomoću umjetne vagine, nakon skoka na fantom, što je obavljala uvijek ista osoba/veterinar na koju su jarčevi bili naviknuti. Prilikom skoka jarčeva bodovano je seksualno ponašanje/libido svakog mužjaka, od 1 do 5 pomoću sljedećih karakteristika: 1 = jarac ne pokazuje nikakav interes za kozu u estrusu; 2 = jarac pokazuje interes za kozu tek kad dođe u njezinu neposrednu blizinu, njuška je, ali ne pokazuje aktivan refleks opasivanja (ne pokušava ju zaskočit); 3 = jarac pokazuje interes za kozu tek kad dođe u njezinu neposrednu blizinu, njuška je, pokušava je zaskočiti, ali mu za sve radnje treba puno vremena; 4 = jarac prilazi kozi, vrlo kratko je njuška, kratko se rasteže savijajući leđa i nakon toga skače na kozu; 5 = jarac već u odjeljku u kojem se nalazi pokazuje zanimanje za kozu koju samo može vidjeti, a prilikom izlaska iz odjeljka u svega par sekundi skače na kozu bez posebne pripreme.

3.4. Ocjena ejakulata

Odmah po uzimanju ejakulata načinjena je provjera čistoće i volumena ejakulata, zatim makroskopska i mikroskopska procjena ejakulata te određivanje koncentracije ejakulata. Volumen ejakulata je određen direktnim očitavanjem u graduiranom spermohvataču. Masovno gibanje i gibljivost spermija procjenjena je u nativnom ejakulatu pomoću binokularnog mikroskopa „Axiostar Plus“ (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen, Njemačka) s ugrađenim spermotermom. Kapljica sjemena od 10 μL stavljena je na zagrijanu predmetnicu pomoću pipete. Staklene su predmetnice fiksirane na spermotermu, a potom su uzorci sperme pregledani za masovno gibanje najprije pod povećanjem od 100 x, a potom pod povećanjem od 200 x za gibljivost spermija, gdje je kapljica sjemena prekrivena zagrijanom pokrovnicom. Procjena masovnog gibanja spermija izražena je ocjenom od nula do četiri plusa (0 - potpuno mirovanje; + slabo valovito gibanje; ++ valovito gibanje; +++ jako valovito gibanje; ++++ izmjenjuju se tamnije i svjetlije pruge koje se komešaju, nestaju i ponovno nastaju – vihorenje). Prosudba gibljivosti spermija izražena je u postotcima (%). Za procjenu postotka živih i mrtvih spermija u razmazima sjemena, korišten je postupak supravitalnog bojanja po Bloom-u, a za određivanje morfološki normalnih i patoloških oblika spermija korišten je postupak bojanja po Farelly-ju u kojem su spermiji obojeni gotovim komercijalnim kompletima (Minitube, Tiefenbach, Njemačka). Postupak supravitalnog bojanja po Bloom-u uključuje primjenu boja eozina i nigrozina. Pri tome se jedna manja kap sjemena, veća kap eozina i dvije kapi nigrozina nakapavaju na jednu stranu čiste, odmašćene i zagrijane predmetnice. Potom se kapljice čistim štapićem pažljivo promiješaju i načini se razmaz, koji se suši na toplom mjestu. Mrtvi spermiji sa oštećenom staničnom membranom se obojaju eozinom, dok stanične membrane živih spermija ne apsorbiraju boje te ostaju neobojani. Boja nigrozina odgovorna je za stvaranje tamne pozadine koje olakšava procjenu spermija. Postupak bojanja osušenog razmaza nativnog sjemena po Farelly-ju uključuje primjenu triju otopina: otopinu za fiksaciju razmaza (A), otopina anilinskog modrila (B) i otopina gencijan ljubičaste boje (C). Osušeni se razmaz sjemena uranja u otopinu A na 10 sekundi, zatim u otopinu B na 20 sekundi, nakon čega se razmaz dobro ispere sa vodom. Potom se razmaz uranja u otopinu C na 5 sekundi i ponovno dobro ispire vodom te ostavlja da se osuši 12 sati. Plavo-ljubičasta kontrastna boja omogućuje diferencijalnu vizualizaciju glave, akrosome, ekvatorijalnog i središnjeg dijela te repa spermija. Ovim postupkom moguće je razlikovati morfološki normalne i patološke oblike

spermija, kao i identificirati tip patološkog oblika spermija. Osušeni preparati za ocjenu supravitalnog bojanja po Bloom-u procjenjivani su mikroskopski pod povećanjem od 400 x, a pregledano je 200 spermija. Udio živih odnosno neobojanih spermija izražen je u postocima (%). Za ocjenu udjela morfološki normalnih i patoloških oblika spermija u ejakulatu po Farelly-ju pregledano je također 200 spermija po preparatu, koji su pregledani pomoću fazno-kontrasnog mikroskopa "Olympus BX50F" (Olympus, Tokyo, Japan), najprije pod srednjim povećanjem, a potom pod imerzijom pod povećanjem od 1000 x i izraženi su u postocima (%). Koncentracija spermija u ejakulatu (broj spermija u 1 mL ejakulata), utvrđena je elektronskim brojačem „Accucell photometer tip 60CI0394" (IMV technologies, Normandija, Francuska). Uređaj je prije svake upotrebe kalibriran i podešen na postavke za brojanje spermija jarčeva u 1 mL. Ejakulat se prije određivanja koncentracije spermija razrijedio, tako da se u kivetu otpipetiralo 990 µL 0,9%-tne otopine NaCl i 10 µL nativnog sjemena te potom promiješao. Ukupan broj spermija u ejakulatu dobiven je umnoškom volumena i koncentracije ejakulata, a ukupni funkcionalni broj spermija (Engl. *total functional sperm fraction*; TFSF; x 10^9) umnoškom ukupnog broja spermija u ejakulatu, gibljivih spermija i spermija normalne morfologije (RAMADAN i sur., 2009.).

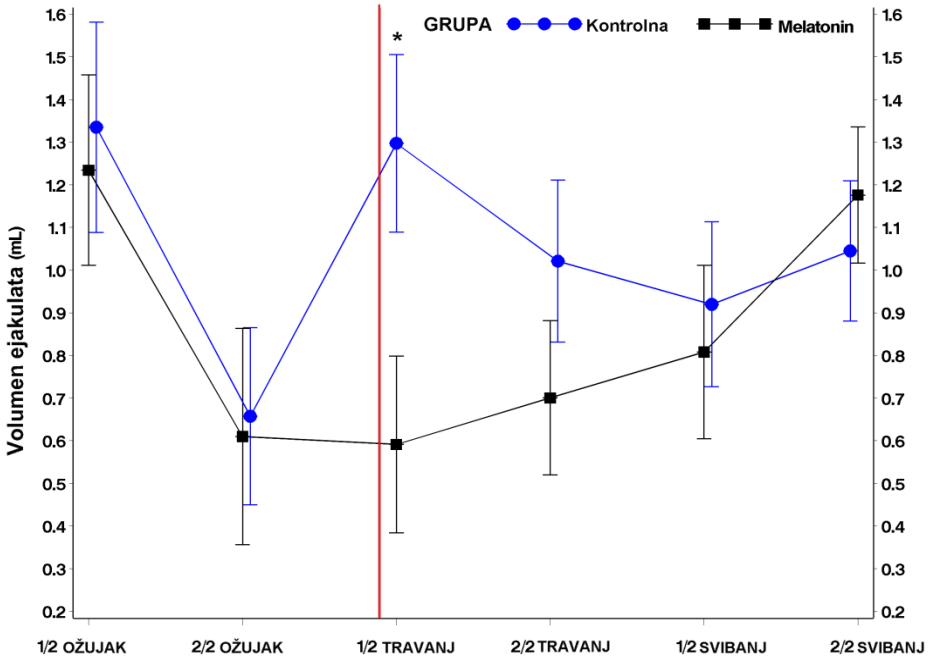
3.5. Statistička obrada rezultata

Statistička je analiza podataka načinjena pomoću programskog paketa SAS (Statistical Analysis Software) 9.4 (2002-2012 by SAS Institute Inc., Cary, SAD). Vremensko razdoblje trajanja pokusa od tri mjeseci podijeljeno je na 6 razdoblja, tako da je svaki mjesec podijeljen u prvu i drugu polovicu. Normalna raspodjela podataka testirana je pomoću modula PROC TRANSREG. Kada su pretpostavke normalne distribucije analiziranih zavisnih varijabli bile narušene te kod heterogenosti varijanci, načinjena je transformacija varijabli. Mješoviti model (PROC MIXED) je korišten za analizu ejakulata. Statistički model je uključivao fiksni efekt grupe, perioda i njihove međusobne interakcije te slučajni efekt jarca s ponavljajućim mjerenjima kroz period. Rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti najmanjih kvadrata (LSM - least squares means) i standardnom pogreškom. Za usporedbu srednjih vrijednosti korištena je Tukey-Kramer-ova metoda višestrukih usporedbi na razini statističke značajnosti $P<0,05$. Rezultati su nakon analize, ukoliko su podaci bili transformirani, obrnutom transformacijom vraćeni na originalne vrijednosti.

4. REZULTATI

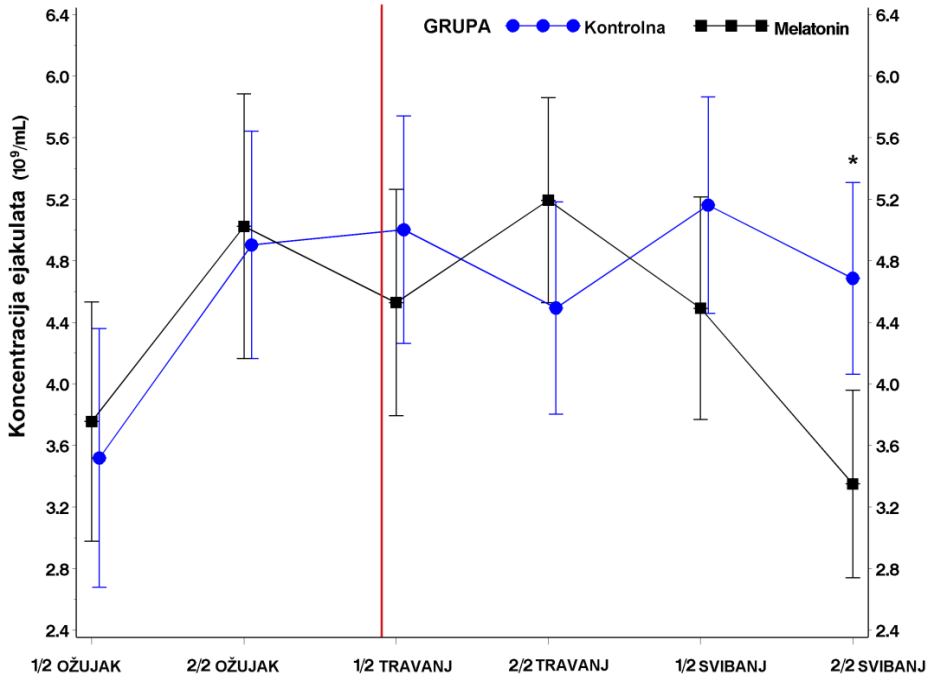
4.1. Volumen i koncentracija ejakulata

Dobiveni rezultati volumena i koncentracije ejakulata pokusne i kontrolne skupine jarčeva izvan rasplodne sezone prikazani su na Grafikonima 1. i 2. Iz rezultata prikazanih na njima uočljivo je da su se volumen i koncentracija ejakulata jarčeva značajno razlikovali (P<0,05) između pokusne i kontrolne skupine. Usporedbom srednjih vrijednosti volumena ustvrđene su značajno veće vrijednosti (P<0,05) u kontrolnoj u odnosu na pokusnu skupinu u prvoj polovici travnja, a značajno veća vrijednost koncentracije ejakulata (P<0,05) u kontrolnoj u odnosu na pokusnu skupinu u drugoj polovici svibnja.



Grafikon 1. Vrijednosti i raspon volumena ejakulata pokusne i kontrolne skupine jarčeva izvan rasplodne sezone (srednja vrijednost najmanjih kvadrata ± SD)

*Značajnost razlika između pokusne i kontrolne skupine na razini statističke značajnosti od P<0,05. Okomita crvena linija označava razdoblje prije, odnosno nakon aplikacije melatoninskih implantata.

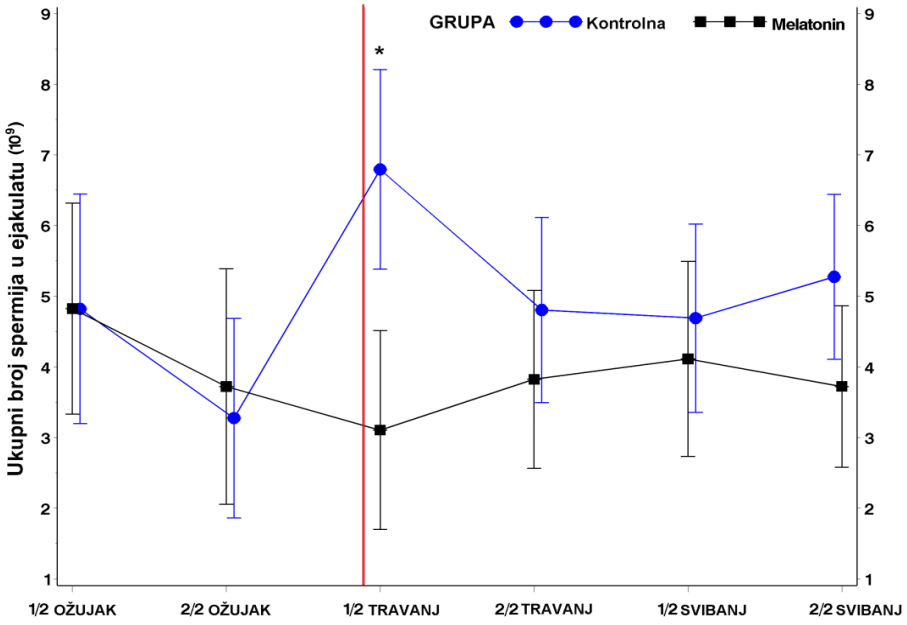


Grafikon 2. Vrijednosti i raspon koncentracije ejakulata pokusne i kontrolne skupine jarčeva izvan rasplodne sezone (srednja vrijednost najmanjih kvadrata ± SD)

*Značajnost razlika između pokusne i kontrolne skupine na razini statističke značajnosti od $P<0,05$. Okomita crvena linija označava razdoblje prije, odnosno nakon aplikacije melatoninskih implantata.

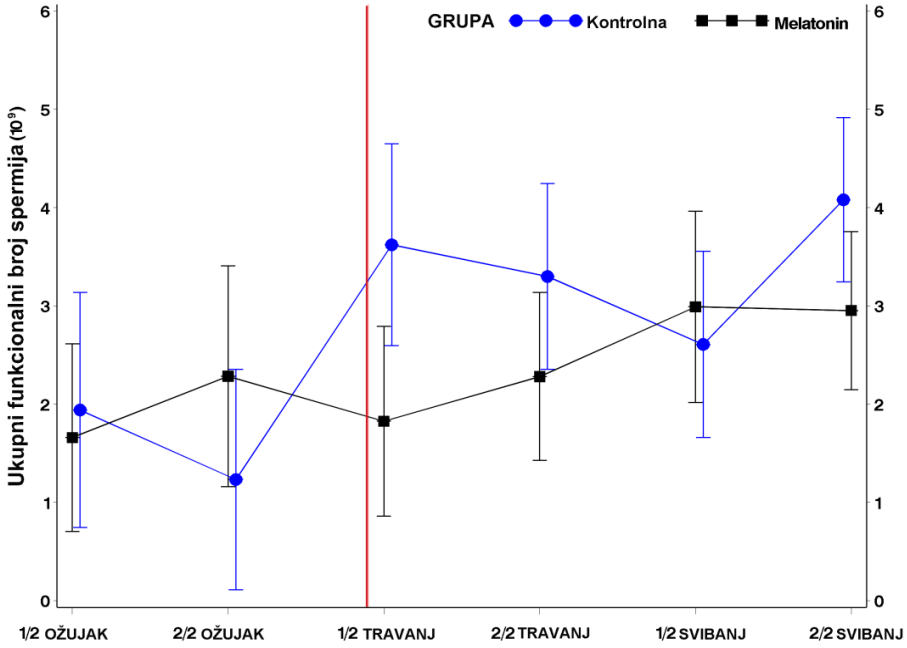
4.2. Ukupni broj spermija i ukupni funkcionalni broji spermija u ejakulatu

Rezultati istraživanja ukupnog broja spermija i ukupnog funkcionalnog broja spermija u ejakulatu pokusne i kontrolne skupine jarčeva izvan rasplodne sezone prikazani su na Grafikonima 3. i 4. Iz rezultata prikazanih na Grafikonu 3. uočljivo je da se ukupni broj spermija u ejakulatu jarčeva značajno razlikovao ($P<0,05$) između pokusne i kontrolne skupine. Usporedbom srednjih vrijednosti ukupnog broja spermija u ejakulatu ustvrđene su značajno veće vrijednosti ($P<0,05$) u kontrolnoj u odnosu na pokusnu skupinu u prvoj polovici travnja. Vrijednosti razine ukupnog funkcionalnog broja spermija između pokusne i kontrolne skupine nisu se značajnije razlikovale ($P>0,05$).



Grafikon 3. Vrijednosti ukupnog broja spermija u ejakulatu pokusne i kontrolne skupine jarčeva izvan rasplodne sezone (srednja vrijednost najmanjih kvadrata ± SD)

*Značajnost razlika između pokusne i kontrolne skupine na razini statističke značajnosti od $P<0,05$.
Okomita crvena linija označava razdoblje prije, odnosno nakon aplikacije melatoninskih implantata.

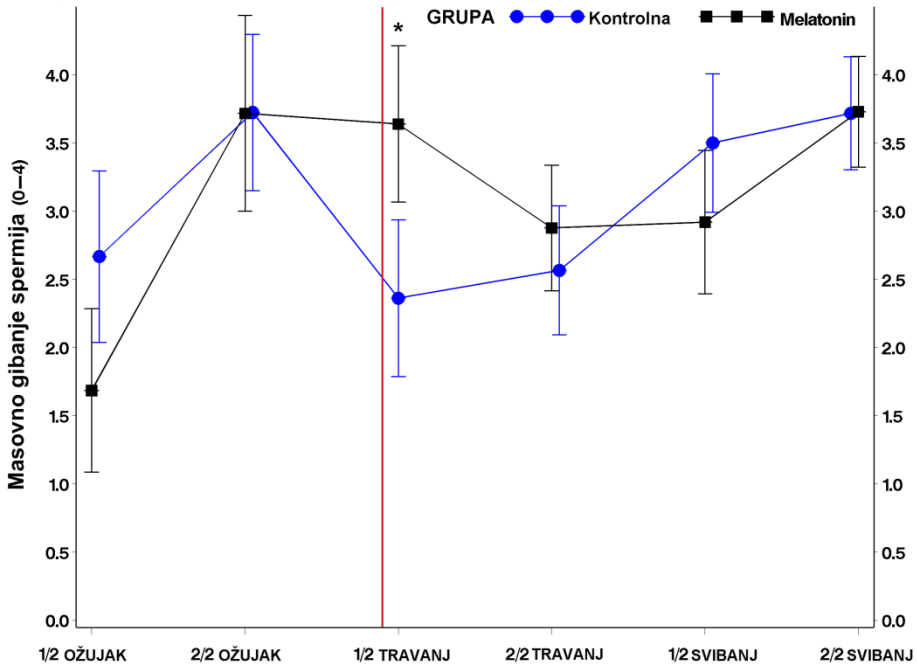


Grafikon 4. Vrijednosti ukupnog funkcionalnog broja spermija u ejakulatu pokusne i kontrolne skupine jarčeva izvan rasplodne sezone (srednja vrijednost najmanjih kvadrata ± SD)

Okomita crvena linija označava razdoblje prije, odnosno nakon aplikacije melatoninskih implantata.

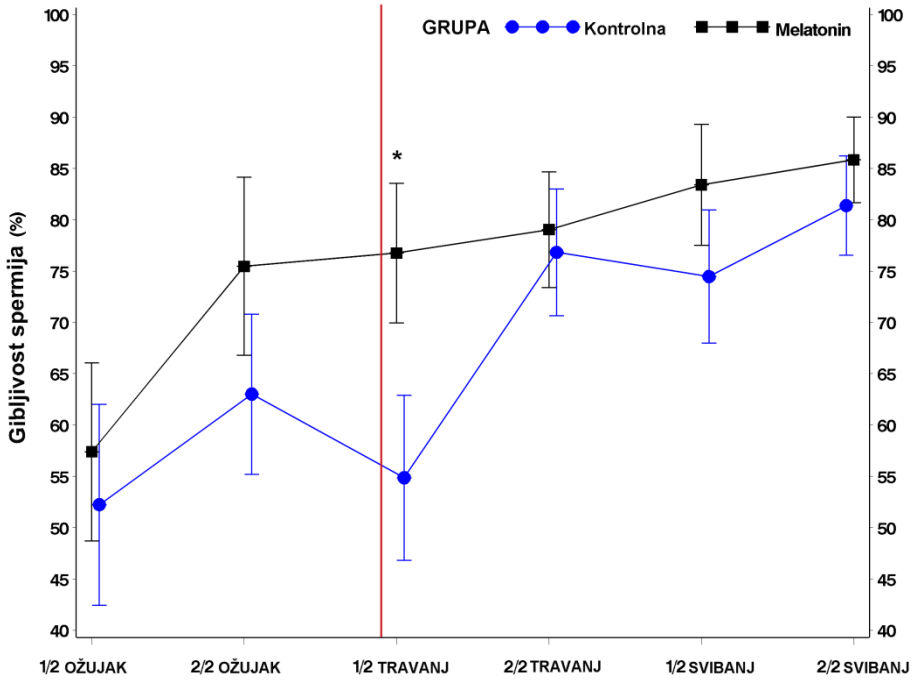
4.3. Masovno gibanje i gibanje spermija

Dobiveni rezultati masovnog gibanja i gibanja spermija pokusne i kontrolne skupine jarčeva izvan rasplodne sezone prikazani su na Grafikonima 5. i 6. Iz rezultata prikazanih na njima uočljivo je da su se masovno gibanje i gibanje spermija jarčeva značajno razlikovali (P<0,05) između pokusne i kontrolne skupine. Srednje vrijednosti navedenih pokazatelja kakvoće ejakulata bile su značajno veće (P<0,05) u pokusnoj u odnosu na kontrolnu skupinu u prvoj polovici travnja.



Grafikon 5. Vrijednosti masovnog gibanja spermija pokusne i kontrolne skupine jarčeva izvan rasplodne sezone (srednja vrijednost najmanjih kvadrata ± SD)

*Značajnost razlika između pokusne i kontrolne skupine na razini statističke značajnosti od P<0,05. Okomita crvena linija označava razdoblje prije, odnosno nakon aplikacije melatoninskih implantata.

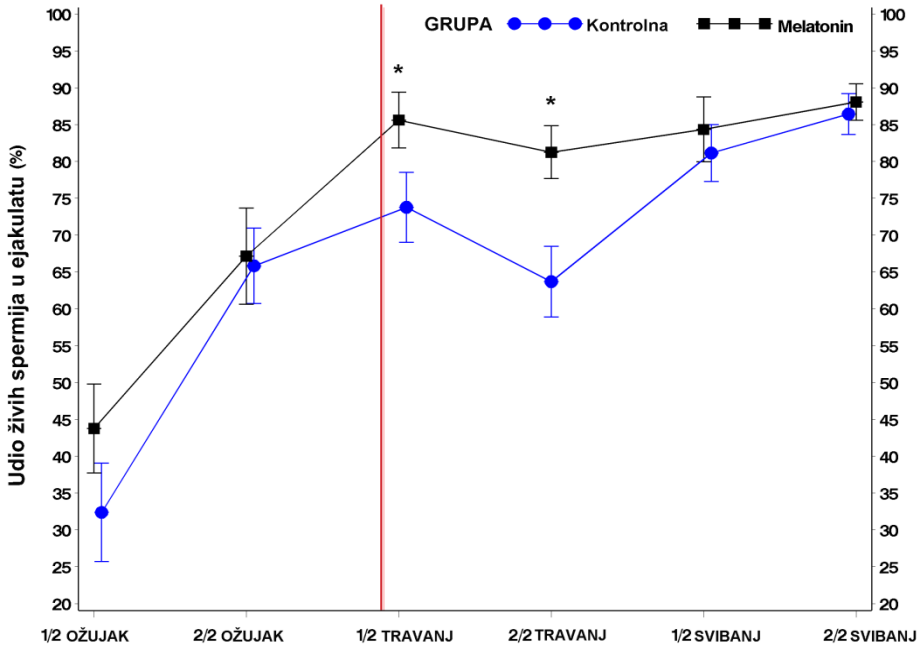


Grafikon 6. Vrijednosti i raspon gibanja spermija pokusne i kontrolne skupine jarčeva izvan rasplodne sezone (srednja vrijednost najmanjih kvadrata ± SD)

*Značajnost razlika između pokusne i kontrolne skupine na razini statističke značajnosti od $P<0,05$. Okomita crvena linija označava razdoblje prije, odnosno nakon aplikacije melatoninskih implantata.

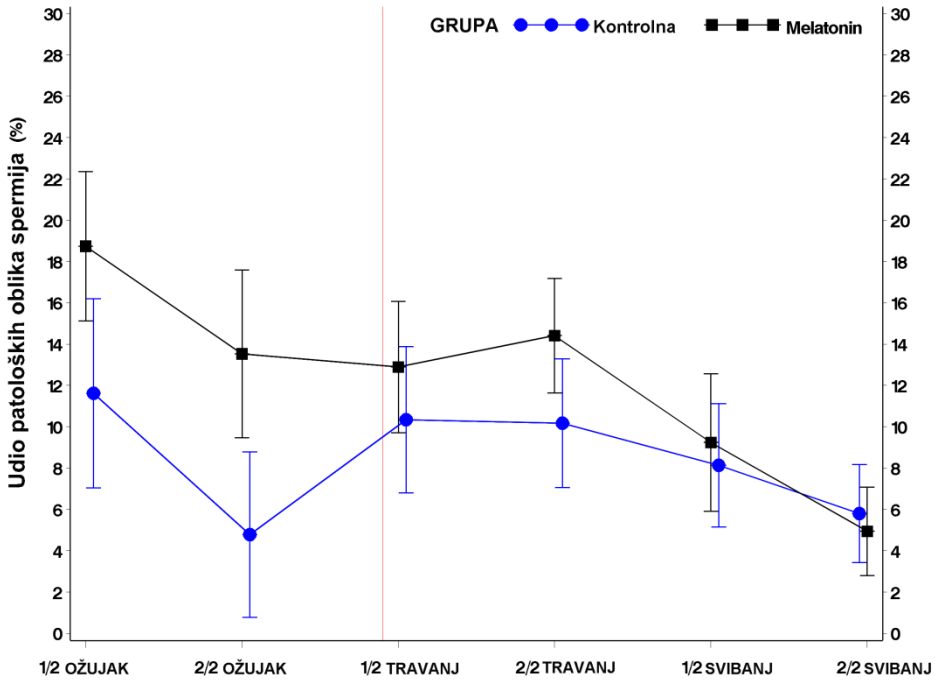
4.4. Udio živih i patoloških oblika spermija u ejakulatu

Rezultati istraživanja udjela živih i patoloških oblika spermija u ejakulatu pokusne i kontrolne skupine jarčeva izvan rasplodne sezone prikazani su na Grafikonima 7. i 8. Iz rezultata prikazanih na njima uočljivo je da se udio živih spermija u ejakulatu jarčeva značajno razlikovao ($P<0,05$) između pokusne i kontrolne skupine. Srednja vrijednost udjela živih spermija u ejakulatu bila je značajno veća ($P<0,05$) u pokusnoj u odnosu na kontrolnu skupinu u prvoj i drugoj polovici travnja. Srednje vrijednosti udjela patoloških oblika spermija između pokusne i kontrolne skupine nisu se značajno razlikovale ($P>0,05$).



Grafikon 7. Udio živih spermija u ejakulatu pokusne i kontrolne skupine jarčeva izvan rasplodne sezone (srednja vrijednost najmanjih kvadrata ± SD)

*Značajnost razlika između pokusne i kontrolne skupine na razini statističke značajnosti od $P<0,05$.
Okomita crvena linija označava razdoblje prije, odnosno nakon aplikacije melatoninskih implantata.

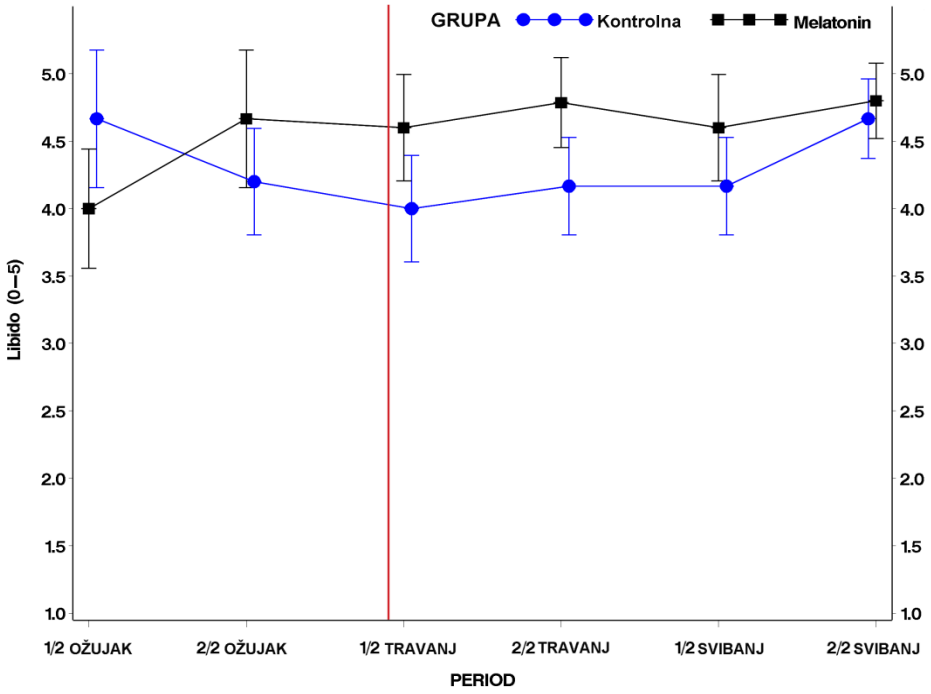


Grafikon 8. Udio patoloških oblika spermija u ejakulatu pokusne i kontrolne skupine jarčeva izvan rasplodne sezone (srednja vrijednost najmanjih kvadrata ± SD)

Okomita crvena linija označava razdoblje prije, odnosno nakon aplikacije melatoninskih implantata.

4.5. Intenzitet libida jarčeva

Dobiveni rezultati intenziteta libida pokusne i kontrolne skupine jarčeva izvan rasplodne sezone prikazani su na Grafikonu 9. Iz rezultata prikazanih na Grafikonu 9. uočljivo je da se vrijednosti razine libida između pokusne i kontrolne skupine nisu značajnije razlikovale (P>0,05).



Grafikon 9. Intenzitet libida pokusne i kontrolne skupine jarčeva izvan rasplodne sezone (srednja vrijednost najmanjih kvadrata ± SD)

Okomita crvena linija označava razdoblje prije, odnosno nakon aplikacije melatoninskih implantata.

5. RASPRAVA

U kontroli reprodukcije malih preživača sporo otpuštajući implantati melatonina u primjeni su više od trideset godina. Danas postoji sve veća potražnja za *ex situ in vitro* očuvanjem gena zamrzavanjem sjemena dobivenih izvan sezone parenja s mogućnošću njegove upotrebe u očuvanju sjemena (EGERSZEGI i sur., 2014.). Melatoninski se receptori nalaze u blizini hipotalamusa i adenohipofize, a nađeni su i u Leydigovim stanicama, što ukazuje da melatonin također može imati izravan utjecaj na testise (RAMADAN i sur., 2009.). Osim toga, učinci melatonina na kakvoću ejakulata mogli bi biti izravni, budući da se melatoninski receptori nalaze u spermijima (GONZALEZ-ARTO i sur., 2014.).

Rezultati istraživanja FATOBA i ADELOYE, (2013.) ukazuju na pozitivan učinak egzogenog melatonina na svekolike karakteristike spermija jarčeva. Autori su ustvrdili značajno povećanje masovnog gibanja i gibanja spermija, koncentracije spermija u ejakulatu, udjela živih i morfološki normalnih spermija te značajno smanjenje udjela nezrelih, patoloških oblika i mrtvih spermija u sezoni parenja. Slično istraživanje proveli su RAMADAN i sur. (2009.) i također ustvrdili pozitivan učinak na libido i svekoliku cjelokupnu kakvoću ejakulata u rasplodnoj sezoni nakon izlaganja jarčeva umjetnom osvjetljenju i aplikacije melatoninskih implantata. Međutim, učinak navedenih postupaka izvan rasplodne sezone odrazio se pozitivno samo na pojedina reproduktivna svojstva jarčeva i to na: značajno povećanje intenziteta libida i ukupnog funkcionalnog broja spermija te smanjenje udjela mrtvih spermija u ejakulatu. Slične rezultate ovim istraživanjima ustvrđena su u našem istraživanju jer se pozitivan učinak egzogenog melatonina značajno odrazio samo na pojedine pokazatelje sjemena izvan rasplodne sezone. Međutim, razina libida u ovom istraživanju između pokusne i kontrolne skupine jarčeva nije se značajnije razlikovala, što nije u suglasju sa rezultatima dobivenim u istraživanju RAMADAN-a i sur. (2009.), no ipak je pokusna skupina imala nešto veću razinu libida nakon aplikacije melatonina sve do završetka pokusnog razdoblja. Naime, skupina jarčeva kojoj je apliciran melatonin imala je značajno veće vrijednosti masovnog gibanja i gibanja spermija te udjela živih spermija tijekom nekoliko tjedana nakon aplikacije melatonina. Na ostale određivane pokazatelje kao što su: volumen i koncentracija ejakulata, ukupni broj spermija i ukupni funkcionalni broj spermija u ejakulatu, egzogeni melatonin nije imao učinka, što nije u skladu s rezultatima ZARAZAGA i sur. (2010.), koji su ustanovili povećanje navedenih pokazatelja u

mediteranskih jarčeva. Značajno je naglasiti da su se kontrolna i pokusna skupina jarčeva minimalno razlikovale u volumenu i koncentraciji ejakulata, ukupnog broja spermija i ukupnog funkcionalnog broja spermija u ejakulatu u početku pokusnog razdoblja s time da je kontrolna skupina imala nešto veće vrijednosti u gotovo svim navedenim pokazateljima. No, neposredno nakon aplikacije melatoninskih implantata u prvoj polovici travnja volumen i ukupan broj spermija u ejakulatu bili su značajno veći u kontrolnoj u odnosu na pokusnu skupinu i značajno veća vrijednost koncentracije ejakulata u drugoj polovici lipnja. Poznato je da je volumen ejakulata pod velikim utjecajem okolišnih čimbenika, ali je i nasljedna osobina, stoga nam je dobivene rezultate navedenih pokazatelja vrlo teško protumačiti, a pretpostavljamo da su posljedica individualnih varijacija jarčeva. Isto se tako, udio patoloških oblika spermija između pokusne i kontrolne skupine nije značajno razlikovao. Međutim, pozitivan učinak melatonina odrazio se u pokusnoj skupini jarčeva gdje je utvrđeno značajno manji udio patoloških oblika spermija u ejakulatu na kraju pokusnog razdoblja u odnosu na početak pokusa. Nadalje, zamijećeno je povećanje udjela živih spermija i smanjenje udjela patoloških oblika spermija tijekom pokusnog razdoblja u pokusnoj i kontrolnoj skupini, a slične su rezultate ustvrdili RAMADAN i sur. (2009.) i to tijekom sezone parenja, ali i izvan nje. Dobiveni rezultati mogu se protumačiti poznatom činjenicom da je kakvoća sjemena nakon dulje rasplodne stanke značajno lošija, a nakon postupnije i učestalije eksploatacije rasplodnjaka uslijedi poboljšanje njezine kakvoće. Tako je, veći udio živih spermija zabilježen na kraju pokusnog razdoblja u pokusnoj i kontrolnoj skupini, ali je to povećanje bilo značajno veće u pokusnoj skupini tijekom travnja. Stanične membrane spermija sadrže veliki udio nezasićenih masnih kiselina koje su vrlo osjetljive na lipidnu peroksidaciju, koja može prouzročiti oštećenja membrana, posebice u akrosomskom području i uzrokovati gubitak gibljivosti i vijabilnosti spermija (AGARWAL i sur., 2014.). Poznato je da melatonin ima antioksidativno djelovanja na spermije te da značajno smanjuje intenzitet peroksidacije lipida spermija (GAVELLA i sur., 2000.). Također je poznato da melatonin štiti mitohondrije spermija od oštećenja prouzročenog djelovanjem reaktivnih kisikovih spojeva s učinkovitim antioksidacijskim mehanizmom (CASAO i sur., 2013.). Primjerice, poznato je također da melatoninski implantati poboljšavaju sposobnost smrzavanja sjemena ovnova, zbog antioksidativnih svojstava melatonina i njegovog zaštitnog djelovanja protiv oksidativnog oštećenja (KAYA i sur., 2001.). Prethodno navedene činjenice mogu pojasniti dobivene rezultate našeg istraživanja, posebice ustvrđene značajno veće vrijednosti masovnog gibanja i

gibanja spermija u pokusnoj skupini jarčeva, koje se mogu pripisati zaštitnom učinku melatonina.

Prethodna istraživanja primjene melatonina izvan rasplodne sezone u jarčeva i ovnova dala su oprečne rezultate, od podataka da nije bilo nikakvog učinka melatonina, do podataka da se pozitivan učinak očitovao manjim poboljšanjem i to samo nekih karakteristika ejakulata (KAYA i sur., 2000., RAMADAN i sur., 2009., BUFFONI i sur., 2015., FAZLI-NEZAD i sur., 2016.). Nepodudarnosti podataka o učinku melatonina na poboljšanje kakvoće sjemena ustvrđenih u rasplodnoj sezoni i izvan rasplodne sezone mogu se protumačiti sezonskim i mjesečnim varijacijama u koncentraciji melatonina. SHEIKHELDIN i sur. (1992) su ustvrdili da su koncentracije melatonina tijekom ljeta i jeseni (sezona parenja) znatno veće nego u proljeće i zimi (izvan sezone parenja). Prema tome, aplikacija egzogenog melatonina tijekom sezone parenja, kada endogeni melatonin doseže maksimalnu koncentraciju, predstavlja dodatni učinak te se postiže iznimno poboljšanje kakvoće sjemena u odnosu na razdoblje izvan sezone parenja kada je ustvrđeno da endogeni melatonin ima najniže vrijednosti.

6. ZAKLJUČCI

Rezultati dobiveni u ovom istraživanju ukazuju da egzogeni melatonin neposredno nakon aplikacije značajno doprinosi poboljšanju kvalitativnih pokazatelja kakvoće ejakulata jarčeva, tako što prouzroči povećanje masovnog gibanja i gibanja spermija te udjela živih spermija u ejakulatu.

Taj bi se učinak mogao pripisati antioksidativnom djelovanju melatonina na spermije, što bi se trebalo detaljnije istražiti u daljnjim analizama relevantnih pokazatelja antioksidativne zaštite sjemena jarčeva tretiranih egzogenim melatoninom.

Rezultati ovog istraživanja imaju praktičnu primjenu:

- ejakulat jarčeva tretiranih melatoninom je bolje kakvoće te se kao takav može koristiti za umjetnu oplodnju koza izvan rasplodne sezone;
- aplikacija melatonina povećava dostupnost seksualno aktivnih jarčeva tijekom cijele godine;
- melatoninom tretirani jarčevi imaju bolji libido te se stoga mogu koristiti za poticanje seksualne aktivnosti koza u razdoblju anestrusa izvan rasplodne sezone.

7. LITERATURA

1. ABEBE, G. (2008): Reproduction in sheep and goats. In: Yami A., Merkel R. C. Sheep and Goat Production Handbook for Ethiopia. Ethiopia Sheep and Goat Productivity Improvement Program (ESGPIP).
2. AGARWAL, A., G. VIRK, C. ONG, S. S. DU PLESSIS (2014): Effect of Oxidative Stress on Male Reproduction. World J. Mens Health 32, 1-17.
3. AL-GHALBAN, A. M., M. J. TABBAA, R. T. KRIDLI (2004): Factors affecting semen characteristics and scrotal circumference in Damascus bucks. Small Rumin. Res. 53, 141-9.
4. AITKEN, R. J., D. BUCKINGHAM, K. WEST, F. C. WU, K. ZIKOPOULOS, D. W. RICHARDSON (1992): Differential contribution of leukocytes and spermatozoa to the generation of reactive oxygen species in the ejaculates of oligozoospermic patients and fertile donors. J. Reprod. Fertil. 94, 451 - 462.
5. BUFFONI, A., A. VOZZI, D. M. GONZALEZ, H. VIEGAS, A. LATORRACA, F. HOZBOR, A. LEDESMA, J. A. ABECIA (2015): Melatonin modifies scrotal circumference but not plasma testosterone concentrations and semen quality of rams during the seasonal anestrus at 43°S (Article). Biol. Rhythm Res. DOI: 10.1080/09291016.2015.1052649
6. CAMPBELL, J. R., M. D. KENEALYAND, K. L. CAMPBELL (2003): Anatomy and physiology of reproduction and related technologies in farm mammals. In: Animal Sciences. The Biology, Care and Production of Domestic Animals. (Campbell, J. R., M. D. Kenealyand, K. L. Campbell, Eds.), McGraw-Hill Companies Inc., New York, pp. 219 - 240.
7. CAJOCHEN, C., K. KRACCHI, A. WIRZ-JUSTICE (2003): Role of melatonin in the regulation of human circadian rhythms and sleep. J. Neuroendocrinol. 15, 432-437.
8. CARPENTIERI, A., G. DIAZDE BARBOZA, V. ARECO, M. PERALTA LÓPEZ, N. TOLOSA DETALAMONI (2012): New perspectives in melatonin uses. Pharm. Res. 65, 437-444.

9. CASAO, A., I. CEBRIÁN, M. E. ASUMPÇÃO, R. PÉREZ-PÉ, J. A. ABECIA, F. FORCADA, J. A. CEBRÁIN-PÉREZ, T. MUIÑO-BLANCO (2010a): Sesonal variations of melatonin in ram seminal plasma are correlated to those of testosterone and antioxidant enzymes. Reprod. Biol. Endocrinol. 11, 8, 59. DOI: 10.1186/1477-7827-8-59.
10. CASAO, A., S. VEGA, I. PALACIN, R. PÉREZ-PÉ, A. LAVINA, F. J. QUINTIN, E. SEVILLA, J. A. ABECIA, J. A. CEBRIÁN-PÉREZ, F. FORCADA, T. MUIÑO-BLANCO (2010b): Effects of melatonin implants during non-breeding season on sperm motility and reproductive parameters in Rasa Aragonesa rams. Reprod. Domes. Anim. 45, 425-432.
11. CASAO, A., N. MENDOZA, R. PÉREZ-PÉ, P. GRASA, J. A. ABECIA, F. FORCADA, J. A. CEBRIÁN-PÉREZ, T. MUIÑO-BLANCO (2010c): Melatonin prevents capacitation and apoptotic-like changes of ram spermatozoa and increases fertility rate. J. Pin. Res. 48, 39-46.
12. CASAO, A., R. PÉREZ-PÉ, J. A. ABECIA, F. FORCADA, T. MUIÑO-BLANCO, J. A. CEBRÁIN-PÉREZ (2013): The effect of exogenous melatonin during the non-reproductive season on the seminal plasma hormonal profile and the antioxidant defence system of Rasa Aragonesa rams. Anim. Reprod. Sci. 138, 168-174.
13. CEBRIÁN-PÉREZ, J. A., A. CASAO, M. GONZÁLEZ-ARTO, H. T. R. DOS SANTOS, R. PÉREZ-PÉ, T. MUIÑO-BLANCO (2014): Melatonin in sperm biology: breaking paradigms. Reprod. Domest. Anim. 49, 11-21.
14. CERGOLJ, M., M. SAMARDŽIJA (2006): Veterinarska andrologija. Veterinarski fakultet. Zagreb.
15. CHEMINEAU, P., B. MALPAUX, J. A. DELGADILLO, Y. GUERIN, J. P. PAVAULT, J. THIMONIER, J. PELLEITER (1992): Control of sheep and goat reproduction: use of light and melatonin. Anim. Reprod. Sci. 30, 157-184.
16. DELGADILLO, J. A., E. CARRILLO, J. MORÁN, G. DUARTE, P. CHEMINEAU, B. MALPAUX (2001): Induction of sexual activity of male Creole goats in subtropical northern Mexico using long days and melatonin. J. Anim. Sci.79, 2245-52.

17. DELGADILLO, J. A., M. E. CORTEZ, G. DUARTE, P. CHEMINEAU, B. MALPAUX (2004): Evidence that the photoperiod controls the annual changes in testosterone secretion, testicular and body weight in subtropical male goats. Reprod. Nutr. Dev.44, 183-93.
18. DU PLESSIS, S. S., K. HAGENAAR, F. LAMPIAO (2010): The in vitro effects of melatonin on human sperm function and its scavenging activities on NO and ROS. Andrologia.42, 112-6.
19. EGERSZEGI, I., P. SARLÓS, J. RÁTKY, L. SOLTI, V. FAIGL, M. KULCSÁR, S. CSEH (2014): Effect of melatonin treatment on semen parameters and endocrine function in Black Racka rams out of the breeding season. Small Rum. Res. 116, 192-198.
20. FATOBA, T. A., A. A. ADELOYE (2013). The effects of exogenous melatonin on sperm characteristics of West African Dwarf goat bucks. J. Agr. Forest Soc. Sci. 11, 1 (http://dx.doi.org/10.4314/joafss.v11i1.29)
21. FAZLI-NEZAD, J., M. MAMOEII, A. KHERADMAND, A. SOOKHTEZARY (2016): The effect of melatonin on testicular circumference and semen characteristics in non-breeding season in Lori-Bakhtiari ram. Journal of Veterinary Research 71, Pe27-Pe32 ref.20 (https://jvr.ut.ac.ir/article_57396.html)
22. FLORES, J. A., F. G. VÉLIZ, J. A. PÉREZ-VILLANUEVA, G. MARTÍNEZ DE LA ESCALERA, P. CHEMINEAU, P. POINDRON, B. MALPAUX, J. A. DELGADILLO (2000): Male reproductive condition is the limiting factor of efficiency in the male effect during seasonal anestrus in female goats. Biol. Reprod. 62, 1409-14.
23. GAVELLA, M., V. LIPOVAC (2000): Antioxidative effect of melatonin on human spermatozoa. Arch. Androl. 44, 23-7.
24. GERLACH, T., J. E. AURICHR (2000): Regulation of seasonal reproductive activity in the stallion, ram and hamster. Anim. Reprod. Sci. 58, 197-213.
25. GONZALEZ-ARTO, M., C. LUNA, R. PÉREZ-PÉ, T. MUIÑO-BLANCO, J. A. CEBRIÁN-PÉREZ, A. CASAO (2014): New evidence of melatonin receptor contribution to ram sperm functionality. Reprod. Fertil. Dev. doi: 10.1071/RD14302.

26. GRIZELJ, J., B. ŽEVRNJA, M. KARADJOLE, T. DOBRANIĆ, M. SAMARDŽIJA, S. VINCE (2011): Reproduktivni management stada u kozarstvu: kratki pregled. Naučni simpozijum "Reprodukcija domaćih životinja", Zbornik predavanja 13.-16. 10. 2011., Divčibare, Beograd, 107-115.
27. GUYTON, A. C., J. E. HALL (2006): Reprodukcijske i hormonske funkcije muškaraca; epifiza. U: Medicinska fiziologija. (Guyton, A. C., J. E. Hall, Eds.), Medicinska naklada, Zagreb, str. 996 - 1009.
28. HARDELAND, R., D. P. CARDINALI, V. SRINIVASAN, D. WARREN SPENCE, G. M. BROWN, S. R. PANDI-PERUMAL (2011): Melatonin – a pleiotropic, orchestrating regulator molecule. Prog. Neurobiol. 93, 350-384.
29. HERAK., M. (1991): Umjetno osjemenjivanje domaćih životinja; Reprodukcija domaćih životinja. U: Veterinarski priručnik, str. 181-209.
30. KAYA, A., M. AKSOY, N. BASPINAR, C. YILDRZ, M. B. ATAMAN (2001): Effect of melatonin implantation to sperm donor rams on post-thaw viability and acrosomal integrity of sperm cells in the breeding and non-breeding season. Reprod. Dom. Anim. 36, 11-15.
31. KAYA, A., N. BASPINAR, C. YILDIZ, F. KURTOGLU, M. B. ATAMAN, S. HALILOGLU (2000): Infuence of melatonin implantation on sperm quality, biochemical composition of the seminal plasma and plasma testosterone levels in rams. Rev. Med. Vet. 151, 1143-46.
32. MAJIĆ-BALIĆ, I. (2010): Utjecaj mikroklimatskih čimbenika na kakvoću i antioksidativna svojstva sjemena rasplodnih bikova. Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, Hrvatska.
33. MALPAUX, B., M. MIGAUD, H. TRICOIER, P. CHEMINEAU (2001): Biology of mammalian photoperiodic and the critical role of the pineal gland and melatonin. J. Biol. Rhythms. 16, 336-347.
34. RAMADAN, T. A., T. A. TAHA, M. A. SAMAK, A. HASSAN (2009): Effectiveness of exposure to longday followed by melatonin treatment on semen characteristics of Damascus male goats during breeding and non-breeding seasons. Theriogenology 71, 458-468.
35. REITER, R. J. (1991): Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. Endocr. Rev. 12, 151-180.

36. REITER, R. J., D.-X. TAN, L. C. MANCHESTER, S. D. PAREDES, J. C. MAYO, R. M. SAINZ (2009): Melatonin and reproduction revisited. Biol. Reprod. 81,445-456.
37. ROSA, H. J. D., C. C. SILVA, M. J. BRYANT (2012): The effect of melatonin treatment in rams on seasonal variation of testicular size and semen production parameters (Article). Small Rum. Res. 102, 197-201.
38. SAMARDŽIJA, M., M. KARADJOLE, M. CERGOLJ, A. TOMAŠKOVIĆ, T. DOBRANIĆ, I. GETZ, M. MATKOVIĆ, J. PETRIĆ J. ŠURINA, N. PRVANOVIĆ, T. KARADJOLE, D. GRAČNER, V. DOBRANIĆ (2005): Vergleich zweier Aufbereitungsmethoden des Bullenspermas zur In-vitro-Fertilisation. Tierärztliche Umschau 60, 192-199.
39. SAMARDŽIJA, M., D. ĐURIČIĆ, T. DOBRANIĆ, M. HERAK, S. VINCE (2010): Rasplođivanje ovaca i koza. U: Fiziologija rasplođivanja. Veterinarski fakultet, Sveučilište u Zagrebu (ur. Marko Samaržija, Marko Poletto). Zagreb, Hrvatska, 45-121.
40. SARLÓS, P., I. EGERSZEGI, O. BALOGH, A. MOLNÁR, S. CSEH, J. RÁTKY (2013): Seasonal changes of scrotal circumference, blood plasma testosterone concentration and semen characteristics in Racka rams. Small Rum. Res. 111, 90-95.
41. SHANG, X., Y. HUANG, Z. YE, X. YU, W. GU (2004): Protection of melatonin against damage of sperm mitochondrial function induced by reactive oxygen species. Zhonghua Nan Ke Xue. 10, 604-7.
42. SHEIKHELDIN, M. A., B. E. HOWLAND, W. M. PALMER (1992): Seasonal profiles of melatonin in adult rams. J. Pineal Res. 12, 58-63.
43. ZARAZAGA, L. A., M. C. GATICA, I. CELI, J. L. GUZMÁN, B. MALPAUX (2010): Effect of artificial long days and/or melatonin treatment on the sexual activity of Mediterranean bucks. Small Rum. Res. 93,110-118.
44. ŽURA ŽAJA, I. (2015): Pokazatelji antioksidacijskoga sustava u sjemenoj plazmi i spermijima rasplodnih nerasta različitih pasmina. Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, Hrvatska.

8. SAŽETAK

Učinak egzogenog melatonina na spolni nagon (libido) i kakvoću sjemena jarčeva nije dostatno istražen, a podaci o učinku melatonina na plodnost ovnova su poprilično oprečni. Stoga je cilj ovoga rada bio istražiti učinak egzogenog melatonina na libido te standardne pokazatelje kakvoće sjemena jarčeva izvan rasplodne sezone. Jarčevi pasmine Francuska alpina (n=12) u dobi od 2 do 4 godine podijeljeni su u pokusnu i kontrolnu skupinu. Pokusnu su skupinu činili jarčevi (n=6) kojima je krajem ožujka aplicirano 4 melatoninska implantanta (74 mg), a kontrolnu jarčevi (n=6) bez melatoninskih implantata. Uzorci ejakulata uzimani su pomoću umjetne vagine jednom tjedno od ožujka do lipnja, a istovremeno se procjenjivao libido svakog jarca. Vremensko razdoblje trajanja pokusa od tri mjeseci podijeljeno je na 6 razdoblja, tako da je svaki mjesec podijeljen u prvu i drugu polovicu. U uzorcima je određen volumen i koncentracija ejakulata, masovno gibanje i gibanje spermija, udio živih i patoloških oblika spermija te su izračunati ukupni broj spermija i ukupni funkcionalni broj spermija u ejakulatu. Pokusna skupina jarčeva imala je značajno veće vrijednosti masovnog gibanja i gibanja spermija u prvoj polovici travnja te udjela živih spermija u prvoj i drugoj polovici travnja ($P<0,05$). Razina libida bila je veća u pokusnoj u odnosu na kontrolnu skupinu jarčeva tijekom cijelog pokusnog razdoblja, no razlike nisu bile značajne ($P>0,05$). Dobiveni rezultati ukazuju da egzogeni melatonin neposredno nakon aplikacije značajno pridonosi poboljšanju kakvoće ejakulata jarčeva (povećanju masovnog gibanja i gibanja spermija te udjelu živih spermija u ejakulatu). Blagotvorni učinak bi se moglo pripisati antioksidativnom djelovanju melatonina na spermije, što bi se trebalo detaljnije istražiti u daljnjim analizama.

Ključne riječi: *kakvoća ejakulata, melatonin, libido, rasplodna sezona, jarčevi*

9. SUMMARY

Influence of exogenous melatonin on standard sperm quality parameters in bucks out of breeding season

The effect of exogenous melatonin on libido and quality of buck semen is not investigated sufficiently as yet, whereas data regarding the effect of melatonin on ram fertility were often controversial. Thus, the aim of this study was to investigate the effect of exogenous melatonin on libido and standard sperm quality parameters in bucks out of breeding season. Twelve bucks of French alpine breed aging from 2-4 years were assigned into experimental and control group comprising 6 bucks each. Total duration of the experiment of 3 months from March to June was divided into 6 periods in a way that each months was divided into the first and second half. The experimental group of bucks received 4 melatonin implants (74 mg) at the end of March, while the control group of bucks was tested without melatonin implants. Semen samples were taken from all bucks by artificial vagina once per week and simultaneously their libido was estimated. In the obtained samples volume and concentration of semen, massive motility and motility of spermatozoa, proportion of live and pathologic forms, total number of spermatozoa and total functional spermatozoa fraction were calculated. The experimental group of buck had significantly higher values of massive motility and motility of spermatozoa in the first half of April as well as the proportion of live spermatozoa in the first and second half of April ($P<0.05$). The intensity of libido was higher in the experimental than in the control group of bucks during the experimental period, but differences were not significant ($P>0.05$). The results indicated that the application of exogenous melatonin significantly improved the qualitative parameters of semen in bucks as established by increased massive motility, motility of spermatozoa and the proportion of live spermatozoa. These beneficial effects of melatonin could be ascribed to its antioxidative effects on spermatozoa. However, this finding should be studied in more details by further analyses.

Key words: *ejaculate quality, melatonin, libido, breeding season, bucks*

10. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 24. prosinca 1991. godine u Zagrebu. Pohađala sam osnovnu školu Samobor u Samoboru. 2010. godine završila sam srednju Veterinarsku školu u Zagrebu, te sam iste godine upisala Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Bila sam redovan student tijekom cjelokupnog školovanja. Upoznata sa mnogim područjima veterinarske medicine najviše me zainteresiralo područje reprodukcije, te sam iz tog razloga odlučila izraditi ovaj diplomski rad na Klinici za porodništvo i reprodukciju pod stručnim vodstvom mentora doc. dr. sc. Silvija Vince i komentorice dr. sc. Ivone Žura Žaja.