Utjecaj vremena ekvilibracije u postupku dubokog smrzavanja bičjeg sjemena

Nazansky, Igor

Master's thesis / Diplomski rad

2018

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:178:628152

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

DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

VETERINARSKI FAKULTET

Igor Nazansky

UTJECAJ VREMENA EKVILIBRACIJE U POSTUPKU DUBOKOG SMRZAVANJA BIČJEG SJEMENA

Diplomski rad

Zagreb, 2018.

Diplomski rad izrađen je u Klinici za porodništvo i reprodukciju Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i Centru za umjetno osjemenjivanje goveda d.o.o Varaždin (CUO d.o.o. Varaždin)

Predstojnik Klinike za porodništvo i reprodukciju:

prof. dr. sc. Marko Samardžija

Direktor Centra za umjetno osjemenjivanje goveda d.o.o. Varaždin

Vladimir Nazansky dr. med. vet.

Mentori:

prof. dr. sc. Marko Samardžija

izv. prof. dr. sc. Martina Lojkić

Povjerenstvo za obranu diplomskog rada:

1. izv. prof. dr. sc. Silvijo Vince
2. izv. prof. dr. sc. Martina Lojkić
3. prof. dr. sc. Marko Samardžija
4. doc. dr. sc. Ivan Folnožić (zamjena)

Zahvale

Zahvaljujem izv. prof. dr. sc. Martini Lojkić na stručnom vodstvu, velikoj pomoći, strpljenju i podršci tijekom pisanja ovog rada.

Zahvaljujem prof. dr. sc. Marku Samardžiji na pomoći i savjetima prilikom odabira teme za izradu diplomskog rada.

Zahvaljujem i izv. prof. dr. sc. Silviju Vince na stručnoj pomoći pri interpretaciji statističkih podataka za potrebe izrade diplomskog rada.

Zahvaljujem djelatnicima Centra za umjetno osjemenjivanje goveda d.o.o. Varaždin na suradnji i pomoći tijekom izrade diplomskog rada.

Zahvaljujem svojim roditeljima na iznimnoj i bezuvjetnoj podršci i pomoći tijekom svih godina studija.

Zahvaljujem svim svojim vjernim prijateljima koji su bili uz mene i pružali mi potporu, osobito Nikoli, Ozrenu, Izidoru, Tomislavu, Ines i Aniti.

Sadržaj rada

1. Uvod.....1

2. Pregled literature.....2

2.1. Umjetno osjemenjivanje.....2

2.2. Građa spermija.....2

2.3. Plazmatska membrana spermija.....2.

2.4. Uloga plazmatske membrane.....3

2.5. Motilitet spermija.....3

2.6. Oštećenja plazmatske membrane tijekom krioprezervacije.....4

2.7. Učinak krioprezervacije na bičju spermu.....4

2.8. Učinak hladnog šoka na bičje sjeme.....5

2.9. Utjecaj niske temperature na bičje sjeme.....6

2.10. Ekvilibracijski intervali razrijeđenog sjemena.....6

2.11. Sastav i značajke razrjeđivača koji se koriste za krioprezervaciju goveđeg sjemena....8

2.12. Žumanjak i razrjeđivači na bazi žumanjka.....8

2.13. Sastav žumanjka.....8

2.14. Mehanizam zaštite spermija od oštećenja uz pomoć lipoproteina niske gustoće podrijetlom iz žumanjka.....9

2.15. Procjena sjemena prije i nakon postupka krioprezervacije.....9

2.16. Inicijalna procjena sjemena.....9

2.17. Morfologija spermija.....9

2.18. Pokretljivost spermija.....10

2.19. Permeabilnost i integritet stanične membrane spermija.....10

3.Materijali i metode.....11

3.1. Smještaj životinja.....11

3.2. Hranidba životinja.....11

3.3. Pretrage na zarazne bolesti.....12

3.4. Dobivanje ejakulata....12
3.5. Ocjena ejakulata....12
3.5.1. Makroskopska ocjena ejakulata....13
3.5.2. Mikroskopska ocjena ejakulata....13
3.5.3. Ocjena integriteta stanične membrane spermija....13
3.5.4. Metoda supravitalnog bojenja po Bloom-u....14
3.5.5. Morfološka ocjena spermija....14
3.5.6. Određivanje gustoće ejakulata fotometrom....14
3.6. Konačno razrjeđivanje ejakulata....15
3.7. Duboko smrzavanje razrijeđenog ejakulata....15
4. Rezultati....16
5. Rasprava....22
6. Zaključak....25
7. Sažetak....26
8. Summary....27
9. Popis literature....28
10. Životopis....35

1. UVOD

Krioprezervacija sjemena je postala standardna tehnika u očuvanju spermija genetski superiornih bikova i nakon njihova uginuća. Naime, u goveda, sjeme se uzima od bikova koji posjeduju niz poželjnih fenotipskih karakteristika. Nakon toga se plotkinje osjemenjuju s prikupljenim sjemenom, kako bi otelile podmladak s poželjnim genetskim osobinama. Općenito gledajući, genetski superioran bik daje i do 60 000 doza sjemena godišnje. Uzimanje i smrzavanje sjemena takvih bikova koristi se kako bi se postigao brzi genetski napredak goveda diljem svijeta (SAACKE, 2000., CURRY, 2000., EHMCKE i SCHLATT, 2008.).

Protokoli za smrzavanje bičjeg sjemena najčešće uključuju sporo hlađenje do 4-5 °C, ekvilibraciju te duboko smrzavanje (LEITE i sur., 2010.). Tijekom krioprezervacije i odmrzavanja spermiji su izloženi dvjema glavnim promjenama. Prvo dolazi do smanjenja, odnosno povišenja temperature njihovog okoliša, što dovodi do hladnog i toplog šoka, a uz to dolazi do stvaranja i otapanja leda koje rezultira promjenom osmolarnosti i oštećenjima stanice zbog stvaranja kristala leda (WATSON, 1995.). Bez obzira na ekstenzivnu uporabu prethodno smrznutog sjemena prilikom umjetnog osjemenjivanja, još uvijek postoji potreba za poboljšanjem procesa krioprezervacije budući da 40-50% vitalnih spermija biva oštećeno tijekom tog procesa, kao i nakon odmrzavanja (WATSON, 2000.).

Većina ekvilibracijskih protokola za bičju spermu koristi period ekvilibracije od 4 sata, pa sjeme mora biti smrznuto isti dan kada je i uzeto (ANZAR i sur., 2010.). Međutim, opisano je da ekvilibracijski period od 18 sati rezultira povećanom plodnošću i kvalitetom sjemena u bikova (MUINO i sur., 2008.). Prolongirani period ekvilibracije prikladniji je u radnom rasporedu centara za umjetno osjemenjivanje. Kako se svakog dana uzima ejakulat od velikog broja bikova, praktičnije je smrzavati sjeme idući dan u jutarnjim satima.

Cilj našeg rada bio je utvrditi učinak kratkotrajnih (3 sata) i dugotrajnih (24 i 48 sati) ekvilibracijskih postupaka na kvalitetu smrznutog bičjeg sjemena, i to temeljem pokretljivosti, vijabiliteta, integriteta membrane i morfologije odmrznutog sjemena, a u svrhu optimiziranja proizvodnje centara za umjetno osjemenjivanje.

2. PREGLED LITERATURE

2.1. Umjetno osjemenjivanje

U mliječnih pasmina goveda, umjetno osjemenjivanje je zamijenilo prirodni pripust u većini zemalja zapadnog svijeta (GORDON, 2004.) Umjetno osjemenjivanje predstavlja zootehnološki postupak kojim se relativno brzo može mijenjati pasminski sastav i izravno utjecati na selekciju i stvaranje hibrida, koji ispoljavaju heterozis učinak na proizvodne reproduktivna svojstva (meso, mlijeko itd.). Umjetno osjemenjivanje je od velikog značaja iz više razloga. Naime, jedan bik može godišnje na prirodan način opasati 80 do 120 krava, odnosno, svakim ejakulatom samo po jednu kravu. Razrjeđivanjem jednog ejakulata može se osjemeniti nekoliko stotina krava. Osim toga, transport doze sjemena je jednostavniji i jeftiniji od transporta rasplodnjaka. Tim zahvatom onemogućuje se prijenos spolno prenosivih zaraznih bolesti (genitalna kampilobakterioza, trihomonijaza, bruceloza itd.), a uz istovremenu kontrolu rasplodnjaka i plotkinja, bolesne životinje se izlučuju iz rasploda. Nadalje, ekonomski značaj umjetnog osjemenjivanja je u tome što se povećava ukupna stočarska proizvodnja, a ujedno je i potrebno manje rasplodnjaka s manjim troškovima prehrane, držanja, liječenja i karantene (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.).

2.2. Građa spermija

Spermiji su visoko specifične stanice koje su evoluirale u smislu obavljanja jedinstvene funkcije oplodnje oocite (McDONALD i PINEDA, 1989.). Ne rastu i ne dijele se, a karakterizira ih mogućnost samostalnog kretanja, sposobnost opstanka i oplodnje u aerobnim i anaerobnim uvjetima. Spermiji se sastoje od tri dijela: glave, srednjeg dijela i repa. Glava, koja je obično spljoštena, kruškolikog oblika ustvari je jezgra stanice s haploidnim brojem kromosoma svojstvenih za vrstu koja je s prednje strane pokrivena akrosomom. Srednji dio sastoji se od kratkog vrata i tijela. Tijelo je kratko i spaja glavu s repom. Rep je najduži dio spermija (oko 50 μm). Spermiji su izvana pokriveni i zaštićeni lipoproteinskom ovojnicom koja se sastoji od lipida, proteina, ugljikohidrata i fosfolipida (McDONALD i PINEDA, 1989., CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.).

2.3. Plazmatska membrana spermija

Spermiji su u potpunosti prekriveni plazmatskom membranom, identičnoj onoj u somatskih stanica (GADELLA i sur., 2001.). Plazmatska membrana sastoji se od dvoslojne fosfolipidne ovojnice koja sadrži kolesterol, složene ugljikohidrate i proteine karakteristične za

plazmatske membrane (MEYERS, 2009.). Fosfolipidi u membrani variraju između pojedinih vrsta sisavaca, no većinom uključuju fosfatidiletanolamin (PE), fosfatidilinozitol (PI), fosfatidilserin (PS), fosfatidilkolin (PC), sfingomijelin, lizofosfatidilkolin i kardiolipin (PARKS i LYNCH, 1992., PARKS i GRAHAM, 1992., HE i sur., 2001.). U odnosu na druge vrste, bičja sperma sadrži visok omjer fosfatidilkolina u odnosu na fosfatidiletanolamin (PARKS i LYNCH, 1992.). Proteini čine otprilike 50% ukupne mase plazmatske membrane i mogu biti smješteni periferno ili intergrirani u membranu (QUINN i CHAPMAN, 1980., MEYERS, 2009.). Plazmatska membrana se opisuje kao mozaik različito lokaliziranih fluidnih područja koja se nazivaju lipidne domene (SINGER, 1972.). Domene se sastoje od određenih lipida (uglavnom fosfolipida i sterola), koji imaju određene funkcije. Lipidi i proteini su pokretni i sposobni su se kretati lateralno u odnosu na ravninu membrane. Na sobnoj temperaturi, lipidi membrane se nalaze uglavnom u tekućem stanju, no neke domene sadrže lipide i u gel stanju (BUHR i PETTITT, 1995.). Kada se nalaze u gel stanju, lipidi su više grupirani i slabije pokretni. Novija izvješća govore o tome da su proteini u membrani dominantni, i da prouzroče veću viskoznost, a time i manju lateralnu difuziju lipida (ENGELMAN, 2005.). Stupanj viskoznosti ovisi o vrsti i količini prisutnih lipida. Na primjer, dugi lanac višestruko nezasićenih masnih kiselina, kao i manja količina kolesterola smanjuju viskoznost i doprinose lakšem prolasku kroz membranu na sobnoj temperaturi (FLESCH i GADELLA, 2000., MALDJIAN i sur., 2005.).

2.4. Uloga plazmatske membrane

Plazmatska membrana ima utjecaj na oblik i volumen spermija, pokretljivost, proizvodnju energije, permeabilnost, kapacitaciju i akrosomsku reakciju te na interakciju s oocitom (HE i sur., 2001.). Ona mijenja svoj lipidni sastav i lokaciju lipidnih domena tijekom fizioloških procesa koji prethode oplodnji (BUHR i sur., 1994.).

2.5. Motilitet spermija

Motilitet spermija zahtjeva adenozin-trifosfat (ATP) kojeg proizvode mitohondriji (10%) i proces anaerobne glikolize (90%) koja se odvija u repu spermija (MARIN i sur., 2003., MUKAI i OKUNO, 2004.). Prema tome, intaktni transportni mehanizam monosaharida iz izvanstaničnog okoliša u stanicu spermija je esencijalan za flagelarnu pokretljivost. Specifični proteini plazmatske membrane omogućuju transport glukoze i fruktoze u stanicu spermija (ANGULO i sur., 1998., SCHÜRMANN i sur., 2002.). Transportni mehanizmi zahtijevaju

intaktnu plazmatsku membranu i specifični kemijski gradijent iona i drugih topivih komponenti kako bi pravilno funkcionirali.

2.6. Oštećenja plazmatske membrane tijekom krioprezervacije

Za vrijeme krioprezervacije dolazi do drastičnih promjena u plazmatskoj membrani spermija (RICKER i sur., 2006.). Postoji nekoliko predloženih mehanizama koji ukazuju na koji način dolazi do oštećenja spermija. Prvi mehanizam uključuje lateralnu reorganizaciju lipida koja destabilizira membranu (poznato kao faza tranzicije tijekom pojave hladnog šoka) (HAMMERSTEDT i sur., 1990.). Lipidne komponente (uglavnom fosfolipidi i steroli) plazmatske membrane podliježu reorganizaciji tijekom procesa hlađenja, preciznije gledano, lipidi u ovojnici počinju se nagomilavati u različitim lipidnim domenama što rezultira udruživanjem proteina i lipida u membrani pa se viskoznost plazmatske membrane smanjuje tijekom procesa krioprezervacije. To rezultira tranzicijom lipida iz čvrstog u gel stanje (BUHR i sur., 1994., DROBNIS i sur., 1993.). Sljedeći mehanizam vezan uz krioprezervaciju jest promjena u sastavu lipida membrane (MALDJIAN i sur., 2005., RICKER i sur., 2006.). Treći mehanizam koji utječe na ustrojstvo membrane jest peroksidacija lipida membrane koja se javlja kao rezultat formiranja reaktivnih kisikovih spojeva (RICKER i sur., 2006.). Posljedice promjena u viskoznosti, sastavu i oštećenju lipida dovode do destabilizacije membrane i spermiji postaju osjetljiviji na preuranjenu akrosomsku reakciju (WATSON, 1995.). Nadalje, funkcionalni proteini poput ionskih kanala također su zahvaćeni promjenama tijekom hlađenja što je povezano s povećanom propusnošću membrane spermija (WATSON, 2000.). Smanjenje pokretljivosti spermija i njihovog metabolizma nakon hlađenja može se pripisati gubitku kationa i enzima (BAILEY i sur., 2000.).

2.7. Učinak krioprezervacije na bičju spermu

Dobro je poznata činjenica da smrzavanje sperme može prouzročiti strukturna oštećenja. To je glavni razlog zašto je napredak u razvoju metoda krioprezervacije bio spor. JONES i STEWART otkrili su 1979. godine da hlađenje sperme na 5 °C prouzroči oticanje glave akrosome. Međutim, proces smrzavanja, a zatim odmrzavanja sperme prouzročio je rupturu akrosome i oštećenja srednjeg dijela velikog broja spermija. Naime, krioprezervirana sperma pokazuje znakove da je u naprednom stadiju kapacitacije nakon odmrzavanja čak iako je proces bio na samom početku prije procesa smrzavanja (MEDEIROS i sur., 2002.). Najveći problem na koji se nailazi tijekom smrzavanja bilo koje stanične strukture, jest promjena agregatnog stanja kojoj su izložene sve stanice i njihove membrane. Kako se temperatura snižava, s

vremenom tekuća faza prelazi u krutu, što prouzroči strukturne promjene. Prelaskom tekućine u krutinu, odnosno led ili kristale leda, može izazvati oštećenja stanične membrane. Kako vanjska otapala prelaze u krutu fazu, koncentracija preostalih otopina se dramatično poveća u preostaloj tekućini. Na sve te promjene stanica mora reagirati u ograničenom vremenu koje je zadano korištenim protokolom. Tijekom procesa odmrzavanja, stanica prolazi kroz obrnuti proces, u kojem se kruta faza ponovno vraća u tekuću. Sve navedene promjene naglašavaju važnost stupnja temperaturne promjene koja omogućuje vodi i krioprotektoru kretanje stanicom spermija tako da ne dođe do stvaranja unutarstaničnog leda ili bilo koje druge ireverzibilne promjene stanične membrane (HAMMERSTEDT i sur., 1990., BAILEY i sur., 2000., JANUŠKAUSKAS i ŽILINSKAS, 2002.). Dva su glavna uzroka promjena volumena stanice do kojih dolazi tijekom procesa krioprezervacije. Prvi je učinak glicerola kada se on dodaje stanicama u izotoničnom mediju. To prouzroči inicijalno brzo smanjivanje stanice nakon čega slijedi polaganiji povratak na početni volumen proporcionalno ulasku glicerola u stanicu. Drugi uzrok promjena volumena je smrzavanje izvanstanične vode, što rezultira kretanjem vode iz stanice zbog velike izvanstanične koncentracije soli prouzročene smrzavanjem. Odmrzavanjem stanice dolazi do obrnutih procesa. Također je važno znati da postoje vrsne razlike u pogledu slobode koju voda ima kada se kreće spermom, što može imati značajan učinak na krioprezervaciju sperme u različitih vrsta životinja (HAMMERSTEDT i sur., 1990., BAILEY i sur., 2000.). Cijeli proces obrade sjemena bikova u osnovi se može podijeliti na 5 koraka, od kojih svaki ima određeni učinak na stanice i metabolizam sperme. Prvi korak je razrjeđivanje sjemena i hlađenje na 5 °C, što prouzroči promjene u fizikalnim svojstvima stanične membrane zbog temperaturnih promjena. Drugi korak obuhvaća dodavanje razrjeđivača i ekvilibracijski period glicerola, kao i pakiranje sjemena, a u tom slučaju dolazi do velikih promjena u volumenu stanice na koji se ona mora prilagoditi. Slijedi smrzavanje koje prouzroči daljnje modifikacije volumena stanice spermija i stanične membrane u vrlo ograničenom vremenskom periodu. Četvrti korak obuhvaća pohranu sjemena i predstavlja mirovanje stanica. Posljednji, peti korak je odmrzavanje sjemena u kojem se stanice „oporavljaju“ od promjena i vraćaju u prvobitno stanje (DUNN i sur., 1953., HAMMERSTEDT i sur., 1990., MEDEIROS i sur., 2002.).

2.8. Učinak hladnog šoka na bičje sjeme

Pojava poznata kao „hladni šok“, može se opisati kao nepovratno oštećenje na određenim regijama svakog pojedinog spermija koje dovodi do gubitka njihove pokretljivosti. Obično nastupa kada temperatura sjemena naglo padne ispod prosječne tjelesne temperature

bika, na temperaturu smrzavanja vode (0 °C) (BLACKSHAW i SALISBURY, 1957., BAILEY i sur., 2000., MEDEIROS i sur., 2002.). Nekoliko je autora otkrilo da hladni šok može biti spriječen polaganim hlađenjem sjemena na 0 °C u periodu od nekoliko sati. Ovdje žumanjak jajeta može djelovati kao zaštitni agens ukoliko se doda sjemenu prije hlađenja (BLACKSHAW i SALISBURY, 1957.). Neka od fizikalnih oštećenja nastalih kao posljedica hladnog šoka uključuju oštećenje stanične membrane te promjene u metabolizmu stanice, a javljaju se tijekom termotropne faze tranzicije kada fosfolipidi prelaze iz tekuće-kristalnog stanja u stanje gela.

2.9. Utjecaj niske temperature na bičje sjeme

Snižavanjem temperature ispod 5 °C stvara se niz novih komplikacija. Kako se temperatura spušta na približno -10 °C, postoji veliki rizik od stvaranja kristala leda prilikom smrzavanja unutarstanične vode. Ti kristali mogu prouzročiti mehaničko oštećenje staničnih struktura i dovesti do prekida kontinuiteta njihove funkcije. Mehanički stres prouzročen formacijom leda oko stanice također može imati negativan učinak na stanicu. Kada je temperatura između -5 i -10 °C formira se led u izvanstaničnoj tekućini, dok unutarstanična tekućina ostaje ispod točke smrzavanja no bez prelaska u čvrsto stanje. Kako bi se održala ravnoteža između unutarstanične i izvanstanične tekućine, dolazi do dehidracije stanice. Tijekom tog perioda, brzina hlađenja ima kritičnu ulogu te mora biti dovoljno polagana da omogući adekvatnu staničnu dehidraciju, no i dovoljno brza da smrzne preostalu unutarstaničnu tekućinu prije nego što stanica bude izložena hiperosmotskim uvjetima kao posljedice dehidracije stanice (MEDEIROS i sur., 2002.).

2.10. Ekvilibracijski intervali razrijeđenog sjemena

Prisutnost glicerola je potencijalno toksična za svježu spermu te bi period ekvilibracije s glicerolom trebao biti uravnotežen na način da se iskoriste njegova krioprotektivna svojstva, a da pri tome ne dođe do nepotrebnog propadanja spermija prije krioprezervacije (BERNDTSON i FOOTE, 1969., FOOTE, 1975.). Ekvilibracija predstavlja ukupno vrijeme tijekom kojeg spermiji ostaju u kontaktu s glicerolom prije smrzavanja. U tom razdoblju glicerol penetrira u stanice spermija kako bi uspostavio ravnotežu između ekstracelularne i intracelularne koncentracije (LEITE i sur., 2010.). Smrzavanje i odmrzavanje koje slijedi nakon ekvilibracije uzrokuje poprilično štetu pokretnom aparatu spermija, plazmatskoj membrani i akrosomkoj kapi spermija (RASTEGARNIA i sur., 2013.). Provedena su brojna istraživanja vezana uz trajanje evilibracijskog peroda i brzinu smrzavanja, a u svrhu minimaliziranja štete

koja nastaje tijekom manipulacije spermom u procesu krioprezervacije (RASUL i sur., 2001., ANDRABI, 2009., ANZAR i sur., 2010.). Optimalno vrijeme ekvilibracije je dugo vremena bilo predmet rasprave stručnjaka u području kriobiologije.

Nekoliko studija pokazalo je da su pokretljivost spermija i plodnost poboljšane kada je sjeme ekvilibriralo kroz nekoliko sati, što sugerira da je potrebno određeno vrijeme da zaštitno djelovanje glicerola dosegne željeni učinak (BERNDTSON i FOOTE, 1969., FOOTE i KAPROTH, 2002.). BERNDTSON i FOOTE (1969.), otkrili su da period ekvilibracije glicerola od 10 sekundi rezultira značajno većom pokretljivošću spermija u usporedbi s periodom od 30 minuta ili 6 sati. To je omogućilo da se dođe do zaključka kako štetan učinak glicerola najviše dolazi do izražaja unutar prvih pola sata ekvilibracije. Dva su moguća objašnjenja zbog čega je pokretljvost spermija bolja u periodu ekvilibracije od 10 sekundi. Prvo je da premda glicerol u potpunosti uđe u spermije, nema dovoljno vremena da dođe do negativnog učinka. To objašnjenje se temelji na pretpostavci da je potrebna potpuna penetracija glicerola u stanice da bi njegova zaštitna svojstva počela djelovati. Drugo objašnjenje je da kraći period ekvilibracije omogućuje samo djelomični ulazak glicerola u stanice te da ustvari poboljšava zaštitni učinak glicerola. Prvotno vrijeme ekvilibracije za razrjeđivače na bazi žumanjka iznosilo je 15-20 sati. Neki autori preporučaju da je i vremenski period od 6 sati kao adekvatan da se postigne optimalno preživljavanje spermija (O'DELL i HURST, 1955., SULLIVAN i MIXNER, 1963.,). U istraživanju provedenom 50-tih godina prošlog stoljeća na 6 bikova pasmine holštajn, bilo je zabilježeno da su periodi ekvilibracije od 20-24 sata optimalni (GRAHAM i sur., 1956.). Istraživanje koje su 1954. proveli SAROFF i MIXNER bilo je temeljeno na periodima ekvilibracije od 2, 6, 12 i 18 sati te je potvrdilo veće preživljavanje spremija kada se radilo o dužem periodu ekvilibracije. CRAGLE i sur. (1955.) izveli su seriju eksperimenata kako bi odredili optimalan period ekvilibracije te predložili da on iznosi 14,5 sati. O'DELL i HURST (1955.) su koristeći razrjeđivač na bazi žumanjka, ustanovili da je period ekvilibracije od pola sata povoljniji u odnosu na period od 18 sati. No, suprotno tome, MARTIN i EMMENS (1961.) ustanovili su da je povoljniji period od 18 sati ukoliko se razrjeđivaču doda fruktoza (1,25%). HILL i sur. (1959.) proučavali su pokretljivost spermija nakon ekvilibracije od 30 minuta i/ili 18 sati te ustanovili da nije bilo značajne razlike. GILBERT i ALMQUIST (1978.), proučavali su učinak perioda evilibracije glicerola (0,3 i 9 sati) te ustanovili značajno manju pokretljivost spermija i gubitak akrosome. Studija koju su proveli DHAMI i SAHNI (1993.), otkrila je da je period ekvilibracije od 2 sati znatno bolji od nikakvog ekvilibracijskog perioda, kada su se nakon smrzavanja kao kriteriji uzeli pokretljivost i stopa plodnosti. SALHAB i MERILAN (1991.), proučavali su različite periode ekvilibracije

glicerola i ustanovili da period od 2 sata doprinosi boljim rezultatima u usporedbi s periodom od 4 sata. Studija koju su proveli LEITE i sur. (2010.) pokazala je da niti jedan ekvilibracijski period nije rezultirao značajno smanjenom pokretljivošću u odnosu na period od 2 ili 4 sata.

2.11. Sastav i značajke razrjeđivača koji se koriste za kriprezervaciju goveđeg sjemena

Zbog promjena koje nastaju tijekom krioprezervacije i odmrzavanja sjemena, zbog toplog i hladnog šoka te oštećenja koja nastaju zbog stvaranja kristala leda, bez vrsno specifičnih brzina smrzavanja i odmrzavanja i razrjeđivača, velika većina spermija ne bi preživjela proces krioprezervacije. Razrjeđivači za pohranu ohlađenog ili duboko smrznutog sjemena moraju se temeljiti na ionskim ili neionskim tvarima koje sprječavaju promjene u osmolarnosti, a ponašaju se i kao puferi koji sprječavaju ili kontroliraju promjene pH (VISHWANATH i SHANNON, 2000.). Osim toga, penetrirajući krioprotektori poput glicerola ili dimetil-sulfoksida (DMSO) te nepenetrirajući poput glukoze ili fruktoze, smanjuju stvaranje intracelularnih kristala leda. Šećeri istovremeno služe i kao izvor energije za spermije. Antibiotici se dodaju kako bi minimalizirali rast mikroorganizama podrijetlom iz sjemene plazme ili kontaminaciju iz okoliša. Nadalje, hladni šok mora biti spriječen, što se postiže tvarima lipoproteinske građe ili onima visoke molekularne mase poput žumanjka, mlijeka i biljnih lipida. Razrjeđivači bazirani na mlijeku pripremaju se s 10% punog ili obranog mlijeka, 7% glicerola uz dodatak antibiotika i laktoze koja poboljšava krioprotektivni učinak mlijeka (VISHWANATH i SHANNON, 2000.).

2.12. Žumanjak i razrjeđivači na bazi žumanjka

Uporaba žumanjka u razrjeđivačima datira još iz 1939. g. kada je PHILLIPS otkrio njihov zaštitni učinak na ohlađeno sjeme bikova. VAN DENMARK i sur. (1957.) i FOOTE i sur. (1960.) doprinijeli su uporabi modernih razrjeđivača kada su otkrili da je 16%-, 20%- i 24%-tni kokošji žumanjak povoljniji od cijelog žumanjaka (FOOTE, 2002.). Naime, pročišćeni žumanjak ili samo njegova nisko proteinska frakcija mogu biti uspješno korišteni za pripremanje učinkovitog razrjeđivača za sjeme (WALL i FOOTE, 1999., VISHWANATH i SHANNON, 2000.).

2.13. Sastav žumanjka

Osušeni kokošji žumanjak sastoji se od 63% lipida i 33% proteina. Svježi žumanjak se sastoji od 78% plazme i 22% krute tvari. Kruta tvar sadrži 16% lipoproteina visoke gustoće (HDL), 4% fosfitina i 2% lipoproteina niske gustoće (LDL). U žumanjčanoj plazmi glavna

komponenta su lipoproteini niske gustoće (66%), a potom su zastupljeni i livetini (10%) (ANTON, 2007.).

2.14. Mehanizam zaštite spermija od oštećenja uz pomoć lipoproteina niske gustoće podrijetlom iz žumanjka

Široko je prihvaćeno mišljenje da je zaštitni agens u žumanjku fosfolipidna frakcija LDL-a (PACE i GRAHAM, 1974., MOUSSA i sur., 2002.). Mišljenje se temelji na postojanju nekoliko mehanizama koji smanjuju oštećenja spermija. Jedna od mogućnosti je da LDL, osobito fosfolipidna frakcija, djeluje tako da se veže na staničnu membranu i tako omogućuje njezinu stabilizaciju (RICKER i sur., 2006.), dok se za drugi mehanizam navodi činjenica da su fosfolipidi degradirani tijekom krioprezervacije najvjerojatnije zamijenjeni fosfolipidima iz žumanjka (MALDJIAN i sur., 2005., BERGERON i MANJUNATH, 2006.).

2.15. Procjena sjemena prije i nakon postupka krioprezervacije

Kvaliteta sjemena je jedan od glavnih čimbenika koji utječu na plodnost *in vivo*. Laboratorijski pregled sjemena radi se u svrhu procjene zdravlja rasplodnjaka te njegove sposobnosti za rasplod (KASTELIC i THUNDATHIL, 2008.). Analiza sperme može se raditi na svježem i ohlađenom sjemenu, kao i na odmrznutim uzorcima.

2.16. Inicijalna procjena sjemena

Odmah nakon što je sjeme prikupljeno, radi se inicijalna procjena uzorka, što uključuje procjenu općeg izgleda, volumena i koncentracije spermija (MOCÉ i GRAHAM, 2008.). Uzorak sjemena bi trebao biti jednolično bijele boje, no može biti i žute zbog povišene razine riboflavina u nekih bikova (WHITE i LINCOLN, 1960.). Koncentracija sperme može se odrediti klasičnom metodom uz pomoć Neubaureovog hemocitometra, Maklerove komore ili s pomoću skuplje metodologije što je spektrofotometrija koja je znatno preciznija i pouzdanija metoda (HANSEN i sur., 2006.).

2.17. Morfologija spermija

Morfologija spermija općenito ovisi o spermatogenezi (BARTH i OKO, 1989., GRAHAM i MOCÉ, 2005.). Loše rukovanje ili problemi tijekom hlađenja i smrzavanja također mogu dovesti do oštećenja akrosome ili repa spermija (GRAHAM i MOCÉ, 2005.). Poremećaji prilikom spermatogeneze u testisima kao i oni tijekom spermiogeneze te dozrijevanja u epididimisu mogu biti klasificirani na različite načine. Učestali defekti glave koji se javljaju u

spermija bikova uključuju: udubljenu akrosomu, vakuole u jezgri te kruškoliku ili odvojenu glavu. Česti su i defekti srednjeg dijela poput savinutog ili prelomljenog srednjeg dijela, proksimalne kapljice ili teratoida (BARTH i OKO, 1989.). Druga metoda klasificira abnormalnosti spermija na temelju njihovog pretpostavljenog podrijetla pa se tako smatra da se primarni defekti javljaju tijekom procesa spermatogeneze, a sekundarni zbog abnormalne funkcije epididimisa ili zbog nepažljivog rukovanja sa sjemenom. Treća metoda klasifikacije temeljena je na pretpostavci da veliki defekti jako utječu na plodnost, dok manji nemaju takav izrazit učinak (SAACKE i sur., 2000.).

Morfološka procjena može se izvesti vizualno ili uz pomoć kompjutorski napravljenih fotografija. Vizualna procjena radi se na čistim nekontaminiranim neobojanim uzorcima uz pomoć fazno kontrastnog mikroskopa ili pak fiksiranim ili obojenim uzorcima pod uljnom imerzijom, uz dodatak boja eozina i nigrozina. Sjeme se procjenjuje na temelju postotka normalnih oblika spermija i prema prirodi gore navedenih defekata. Općenito gledajući, 70% morfološki nepromijenjenih i ne više od 20% abnormalno promijenjenih glava spermija je potrebno da se dosegne najviša moguća plodnost (GRAVANCE i sur., 1996.).

2.18. Pokretljivost spermija

Pokretljivost spermija je najčešće svojstvo koje se procjenjuje tijekom određivanja njihove kvalitete. Mikroskopska procjena radi se na čistom uzorku, a temelji se na određivanju ukupnog broja i/ili broja progresivno pokretljivih spermija (GRAHAM i MOCÉ, 2005.). To je jednostavna i brza metoda koja ne zahtjeva skupu opremu, no metoda je subjektivna što ju ipak čini ograničavajućom (GRAVANCE i sur., 1996., VERSTEGEN, 2002.).

2.19. Permeabilnost i integritet stanične membrane spermija

Spermiji sposobni za život procjenjuju se na temelju broja onih s intaktnom plazmatskom membranom. To se procjenjuje određivanjem pokretljivosti spremija ili testom osmotskog bubrenja (HOS-test) tijekom kojeg su spermiji izloženi hipoosmotskoj otopini i bubrenju zbog priljeva vode kada je membrana funkcionalno intaktna, što prouzroči savijanje repa (VAZQUEZ i sur., 1997., SILVA i GADELLA, 2006., MOCÉ i GRAHAM, 2008.).

3. MATERIJALI I METODE

Istraživanje je provedeno tijekom rutinskog iskorištavanja rasplodnih bikova u objektima Centra za umjetno osjemenjivanje goveda d.o.o. Varaždin (CUO d.o.o. Varaždin) kojima se jednom ili dva puta tjedno uzima ejakulat za pohranjivanje duboko smrznutog sjemena. Za istraživanje je nasumice odabrano 10 bikova simentalske pasmine u dobi od 3 do 5 godina neovisno o njihovim biološkim karakteristikama. Istraživanje je učinjeno na 60 ejakulata (6 ejakulata po biku). Sjeme je uzimano svim bikovima istog dana, tijekom 6 uzastopnih tjedana. U cilju istraživanja različitog perioda ekvilibracije na kvalitetu sjemena nakon otapanja, svaki eksperimentalni dan u kojem je dobiven ejakulat uključivao je različite periode ekvilibracije: 3 sati (kontrola), 24 sati ili 48 sati. Kvalitativni pokazatelji sjemena (progresivna pokretljivost, integritet membrane, postotak živih spermija i morfološke karakteristike) procjenjivani su neposredno nakon uzimanja sjemena te nakon otapanja duboko smrznutog sjemena, za sva tri ekvilibracijska vremena.

3.1. Smještaj životinja

U objektu je smješteno od 12 do 20 grla, ovisno o potrebama proizvodnje, od čega je deset odabrano za istraživanje. Životinje su smještene pojedinačno u odjeljcima s posebnim ispustom. Pod je bio prekriven suhom steljom s 15 cm slame. Odjeljci su bili čišćeni 3 puta dnevno (suho čišćenje), a jednom tjedno oprani temeljito. Bikovi su bili prani tjedno. Kada je vanjska temperatura bila viša od 8 °C pranje se odvijalo izvan objekta, a ukoliko je temperatura bila ispod 8 °C u dvorani. Na ulasku u objekt nalazi se dezinfekcijska barijera koja se čisti svakih 7 dana, a tada se ujedno mijenja dezinficijens („ECOCID S“, otopina 1%). Osim toga, redovito se provodi i dezinfekcija dvorane za dobivanje ejakulata, obično nakon uzimanja ejakulata, a dezinsekcija staje i okoliša jednom mjesečno, osim zimi, radi preventive pojave zaraznih bolesti poput, bolesti plavog jezika i bolesti kvrgave kože. Deratizacija se obavlja najmanje dva puta godišnje, a po potrebi i češće.

3.2.Hranidba životinja

Bikovi su bili hranjeni krmnom smjesom pripravljenom od različitih sirovina (kukuruz, ječam, lucerna, sojina sačma, sačma suncokreta, soja, posije, stočna sol, premiks vitamina i minerala) s ukupno 16% proteina. Veći bikovi bili su hranjeni s 3 kg smjese ujutro i 3 kg uvečer, uz dodatak od 8 do 10 kg sijena dnevno. Manji bikovi bili su hranjeni s 2,5 kg smjese ujutro i 2 kg uvečer uz istu dnevnu količinu sijena kao i za velika grla.

3.3. Pretrage na zarazne bolesti

Jednom godišnje bikovi se serološki testiraju na sljedeće zarazne bolesti: brucelozu, enzootsku leukozu goveda (ELG), zarazni rinotraheitis/infekciozni pustularni vulvovaginitis (ZRG/IPV) te virusni proljev goveda. Isto tako, jednom godišnje obavlja se i tuberkulinizacija svakog bika. Svaka dva mjeseca radi se pretraga na bolest plavog jezika. Svi bikovi se neobavezno pretražuju i na leptospirozu. Osim seroloških pretraga, obavezna je i pretraga ispirka prepucija na kampilobakteriozu i trihomonijazu. Od listopada 2016. godine, obavezno se obavlja pretraga na nazočnost genoma virusa bolesti kvrgave kože i to svakih 14 dana, dok je serološko pretraživanje na tu bolest potrebno napraviti svakih 28 dana. Uz to, jedna doza svakog proizvedenog sjemena mora biti pretražena na nazočnost genoma virusa bolesti kvrgave kože. Povremeno se rade i opće bakteriološke pretrage duboko smrznutog sjemena te pretrage na nazočnost genoma *Schmallenberg* virusa.

3.4. Dobivanje ejakulata

Prethodno se u dvoranu, u kojoj se nalazi stojnica, fiksirao jedan od bikova koji će poslužiti kao „fantom“ na kojeg naskakuju bikovi od kojih se dobiva ejakulat. Prije svakog skoka fantom treba oprati i staničevinom obrisati stražnji kraj tijela, osobito okolinu repa.

Nakon toga u dvoranu su dovedena po tri bika, jedan se vezao, a druga su dva radnici u staji vodili po dvorani na metalnom štapu, pričvršćenom za nosni prsten, sve dok u njih nije utvrđeno spolno uzbuđenje koje je znak da su spremni za skok. Prilikom skoka ejakulat se prikupljao pomoću umjetne vagine. Umjetna se vagina sastoji od vanjske tvrde (vanjska vagina) i unutarnje mekane gumene cijevi (unutarnja vagina). Dužina vanjske vagine za bika iznosi od 25-55 cm, a širina oko 6 cm. Uvlačenjem unutarnje vagine u vanjsku i fiksiranjem gumenim prstenovima između njih se dobiva međuprostor koji ispunjavamo vodom zagrijanom na 50-55 °C, ovisno o vanjskoj temperaturi. Voda zagrijava unutrašnjost umjetne vagine na 41-43 °C, a ujedno i osigurava i potrebni pritisak na glavić penisa. Umjetna vagina punjena je vodom do polovice kako bi ostalo dovoljno prostora za penis. Umjetna vagina mora biti skliska pa je zbog toga ulazni otvor premazan steriliziranim lubrikantom (vazelin). Na nepodmazanu stranu gumene cijevi pričvršćen je spermohvatač (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.).

3.5. Ocjena ejakulata

Odmah po uzimanju ejakulata načinjena je provjera čistoće ejakulata, zatim makroskopska i mikroskopska ocjena te određivanje gustoće ejakulata. Pregled nativnog sjemena obavljen je u CUO Varaždin, d.o.o., dok je pregled duboko smrznutog sjemena nakon otapanja obavljen u

laboratoriju Klinike za porodništvo i reprodukciju Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

3.5.1.Makroskopska ocjena ejakulata

Volumen ejakulata određen je izravnim očitavanjem volumena u graduiranom spermohvataču. Boja, konzistencija i miris procijenjeni su organoleptički. Ejakulati u kojima su utvrđena bilo kakva odstupanja od fiziološkog (prisustvo krvi, gnoja, mokraće, nečistoća, neugodnog mirisa i sl.) bili su izuzeti iz istraživanja.

3.5.2.Mikroskopska ocjena spermija

Mikroskopskim pregledom svježeg sjemena procijenjeno je masovno gibanje, progresivna pokretljivost i morfološke značajke spermija binokularnim mikroskopom (Carl Zeiss Axiostar, Njemačka). Masovno gibanje spermija ocijenjeno je na zagrijanoj predmetnici bez pokrovnice (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.). Kapljica sjemena od 10 µL stavljena je na zagrijanu predmetnicu pomoću pipete. Uzorci sjemena pregledani su na masovno gibanje pod povećanjem od 100 x. 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)). Radi ocjenjivanja progresivne pokretljivosti 10 µL sjemena stavljeno je na zagrijanu predmetnicu i prekriveno zagrijanom pokrovnicom. Uzorci su pregledani pod povećanjem 200 x. Prosudba progresivne pokretljivosti spermija izražena je u postotcima (%). Pri tome su se zbrajali samo spermiji koji su se gibali progresivno. Uzorci sjemena u kojima je progresivna pokretljivost bila manja od 70% bili su izuzeti iz istraživanja.

3.5.3.Ocjena integriteta stanične membrane spermija

Integritet stanične membrane spermija određen je testom hipoosmostskog bubrenja (HOS test, *Engl. Hypoosmotic swelling test*). U 1 mL hipoosmotske otopine (0,73 g Na- citrata i 1,35 g fruktoze u 100 mL destilirane vode, osmolarnost 100 mOsm/kg) zagrijane na 37 °C dodano je 50 µL sjemena. Sjeme je inkubirano 60 minuta na 37 °C, nakon čega je kapljica dobro promiješanog sjemena stavljena na predmetnicu i pokrivena pokrovnicom fiksiranom bezbojnim lakom. Brojano je 200 spermija po uzorku, a broj onih sa zavinutim repom (spermiji s intaktnom staničnom membranom) izražen je u postotcima. Za ocjenu HOS testa korišten je fazno kontrastni mikroskop (Olympus BX 51, Tokyo, Japan) i povećanje 400 x.

3.5.4.Metoda supravitalnog bojanja spermija po Bloom-u

Radi određivanja broja živih spermija korišteno je supravitalno bojanje spermija po Bloom-u. Na odmašćenu i zagrijanu predmetnicu stavljena je kap sjemena i kap eozina. Obje kapi nježno su pomiješane. Nakon toga, dodana je dvostruko veća kap nigrozina i promiješana s kapi sjemena i eozina. Napravljen je tanki razmaz pomoću predmetnice s brušenim rubom. Nakon sušenja brojano je 200 spermija pod imerzijskim povećanjem mikroskopa (1000 x, Olympus CX 21, Tokyo, Japan). Postotak spermija s neobojenim glavama iskazan je kao postotak živih spermija.

3.5.5.Morfološka ocjena spermija

Postupak bojanja osušenog razmaza nativnog i duboko smrznutog sjemena prema Farelly-ju uključuje primjenu triju otopina: otopinu za fiksaciju razmaza (A), otopinu anilinskog modrila (B) i otopinu gencijana violet boje (C). Na prethodno odmašćenu predmetnicu stavljena je kap razrijeđenog sjemena (1:1 ili 1:2 u 0,9% NaCl ili 2,9% Na- citratu, ovisno o gustoći sjemena). Nakon toga pripremljen je tanki razmaz. Osušeni razmaz uronjen je u otopinu A tijekom deset sekundi, zatim u otopinu B kroz 20 sekundi, nakon čega se razmaz ispire pod tekućom destiliranom vodom, a višak vode se odstranjuje upijajućim papirom. Potom se razmaz uranja u otopinu C tijekom 5 sekundi te ponovno ispire tekućom destiliranom vodom te ostavlja na sušenju u okomitom položaju kroz 12 sati. Plavo-ljubičasta kontrastna boja omogućuje diferencijalnu vizualizaciju glave, akrosome, ekvatorijalnog i središnjeg dijela te repa spermija. Ovim postupkom razlikovani su morfološki normalni i patološki oblici spermija te je identificiran tip patološkog oblika spermija. Za ocjenu udjela morfološki normalnih i patoloških oblika spermija u ejakulatu prema Farelly-ju pregledano je 200 spermija po preparatu koji su pregledani pomoću fazno-kontrasnog mikroskopa (Olympus BX 50, Tokyo Japan), najprije pod srednjim povećanjem, a potom pod imerzijskim povećanjem od 1000 x i izraženi su u postotcima (%)

3.5.6.Određivanje gustoće ejakulata fotometrom

U kivetu fotometra (Accucell, IMV Technologies, Francuska) dodano je 3960 µL fiziološke otopine i 40 µL ejakulata, a potom je sadržaj pomiješan. Zatim je određena masa ejakulata (na preciznoj vagi- PFB 1200-2, KERN, Njemačka) te upisana u proizvodnu listu. Ejakulat iz spremohvatača prebačen je u bočicu od smeđeg stakla koja se nalazi u vodenoj kupelji (32 °C), a u kojoj je 20 mL razrjeđivača (Optidyl®) Na bočicu je stavljena naljepnica s imenom bika i vremenom kada je potrebno bočicu izvaditi iz kupelji (32 °C). Nakon toga bočica je stavljena

u drugu kupelj na 23 °C tijekom 20 minuta računajući od trenutka dobivanja ejakulata. Kiveta, pripremljena za određivanje gustoće ejakulata stavljena je u fotometar zbog određivanja gustoće ejakulata i broja doza sjemena koji se može dobiti od razrijeđenog ejakulata uz zadani minimum broja spermija u dozi te ukupnu količinu razrjeđivača koju je potrebno dodati.

3.6.Konačno razrjeđivanje ejakulata

Nakon dodavanja preostale količine razrjeđivača, sjeme je razrijeđeno na 20 mil./mL. Bočica s konačnim razrjeđenjem vraćena je u kupelj (23 ^{0}C), kroz još 20 minuta, a potom je stavljena u hladnjak na 5 ^{0}C. Nakon 30 minuta termostat je podešen na 4 ^{0}C, a razrijeđeno sjeme je ostalo u hladnjaku još 2 sata i 30 minuta. Kroz to vrijeme tiskani su podatci na mini pajete (Easycoder, Minitube, Njemačka). Podatci na svakoj pajeti su sljedeći: oznaka pasmine, ime bika, knjiga stada (HB*, Engl. Herd book*) bika, životni broj bika, odobreni broj centra, oznaka centra i datum proizvodnje.

3.7.Duboko smrzavanje razrijeđenog ejakulata

Otisnute pajete (IMV Technologies, Francuska) stavljene su u hladnjak (Vitrine Refrigeree Quartet, IMV Technologies, Francuska), gdje su pomoću automatskog punjača pajete napunjene. Napunjene pajete slagane su na rampe i nakon završene ekvilibracije u trajanju od 3 sata (kontrola) te 24 ili 48 sati koliko je trajao istraživani ekvilibracijski period, stavljene su u zamrzivač (Digitcool 5300, IMV Technologies, Francuska). Pajete napunjene sjemenom bile su u zamrzivaču 7 minuta gdje su ohlađene na -145 °C. Nakon 7 minuta izvađene su iz zamrzivača, stavljene u plastične čaše (goblete) ispunjene tekućim dušikom, koje su potom uronjene u tekući dušik i pohranjene u spremniku do upotrebe. Pajete su otapane pojedinačno u vodenoj kupelji temperature 37 °C kroz 30 sekundi.

4. REZULTATI

Prosječni volumen ejakulata, masovno gibanje, koncentracija spermija, progresivna pokretljivost, integritet membrane, vitalnost i udio morfološki normalnih spermija svježeg sjemena prikazani su u Tablici 1. Ispitivani parametri svježeg sjemena prije perioda ekvilibracije nisu se statistički razlikovali za sve tri ekvilibracijske skupine. Isto tako, morfološke abnormalnosti spermija svježeg sjemena prije perioda ekvilibracije bile su bez statističke značajnosti u sve tri ispitivane skupine, kao što je vidljivo iz Tablice 2.

Tablica 1. Inicijalni parametri svježeg sjemena (srednja vrijednost ± standardna pogreška srednje vrijednosti)
prije perioda ekvilibracije

Vrijeme ekvilibracije	Volumen (mL)	Masovno gibanje (+)	Koncentracija ($x10^6$ spz/mL)	Progresivna pokretljivost (%)	Integritet membrane (%)	Vijabilnost spermija (%)	Morfološki normalni spermiji (%)
T3	8,77±0,58	3,58±0,11	1575,62±149	75,63±0,80	75,67±1,20	74,75±1,29	83,00±1,41
T24	9,66±0,61	3,59±0,12	1965,73±155	76,36±0,82	79,55±1,18	77,59±1,29	86,43±1,34
T48	8,94±0,64	3,20±0,12	1588,60±163	75,50±0,88	76,55±1,30	77,15±1,36	86,55±1,37

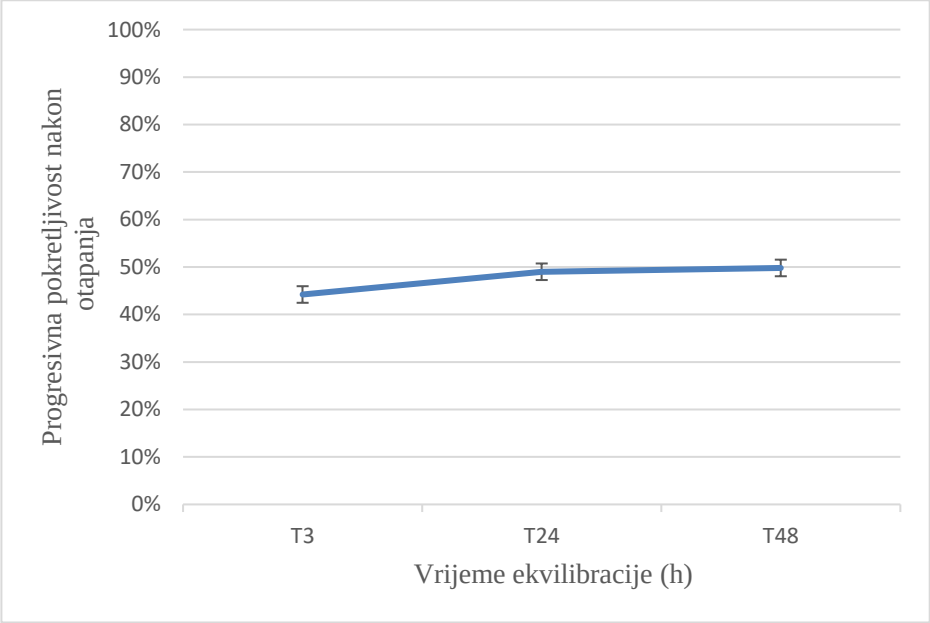
T3, T24, T48 – period ekvilibracije od 3, 24 i 48 sati

Tablica 2. Morfološke karakteristike svježeg sjemena (srednja vrijednost ± standardna pogreška srednje vrijednosti) prije perioda ekvilibracije

Vrijeme ekvilibracije	Morfološki abnormalni spermiji (%)	Abnormalnosti glave (%)	Abnormalnosti akrosome (%)	Abnormalnosti srednjeg dijela (%)	Abnormalnosti repa (%)	Protoplazmatska kapljica (%)
T3	16,99±0,82	2,82±0,43	2,34±0,47	4,56±0,83	6,69±0,92	0,56±0,12
T24	13,57±0,76	3,14±0,48	1,38±0,38	4,19±0,83	4,04±0,76	0,81±0,24
T48	13,41±0,79	2,65±0,45	1,25±0,37	3,68±0,82	5,00±0,35	0,80±0,24

T3, T24, T48 – period ekvilibracije od 3, 24 i 48 sati

Učinak ekvilibracijskog perioda (T3, T24 i T48) na progresivnu pokretljivost, viijabilnost, integritet membrane i morfološke osobitosti duboko smrznutih/odmrznutih spermija prikazan je u Tablici 3. Uzorci sjemena ekvilibrirani kroz 3 sata prije dubokog smrzavanja imali su prosječnu progresivnu pokretljivost nakon otapanja 44,21 ± 2,47%, dok je produžena ekvilibracija kroz 24 i 48 sati rezultirala višom prosječnom progresivnom pokretljivošću od 49,00 ± 2,42% i 49,80 ± 2,43% (Slika 1). Razlika u progresivnoj pokretljivosti između tri ekvilibracijska perioda nije statistički značajna. Za razliku od progresivne pokretljivosti, vijabilnost spermija i integritet membrane bili su značajno viši za ekvilibracijski period od 48 sati u odnosu na 3 sata ($p<0,05$). Nakon otapanja, udio spermija s intaktnom membranom nakon trosatne ekvilibracije iznosio je 50,26 ± 2,84%, dok je nakon 48-satne ekvilibracje taj postotak bio značajno viši (61,35 ± 2,70%, $p<0,05$). Slika 2 pokazuje utjecaj ekvilibracijskog vremena na integritet membrane duboko smrznutog sjemena nakon otapanja. Vijabilnost je isto značajno viša ($p<0,05$) nakon 48-satne ekvilibracije (61,35 ± 2,59) u odnosu na trosatnu ekvilibraciju (48,89 ± 2,78%) kao što je vidljivo iz Tablice 3 i Slike 3.

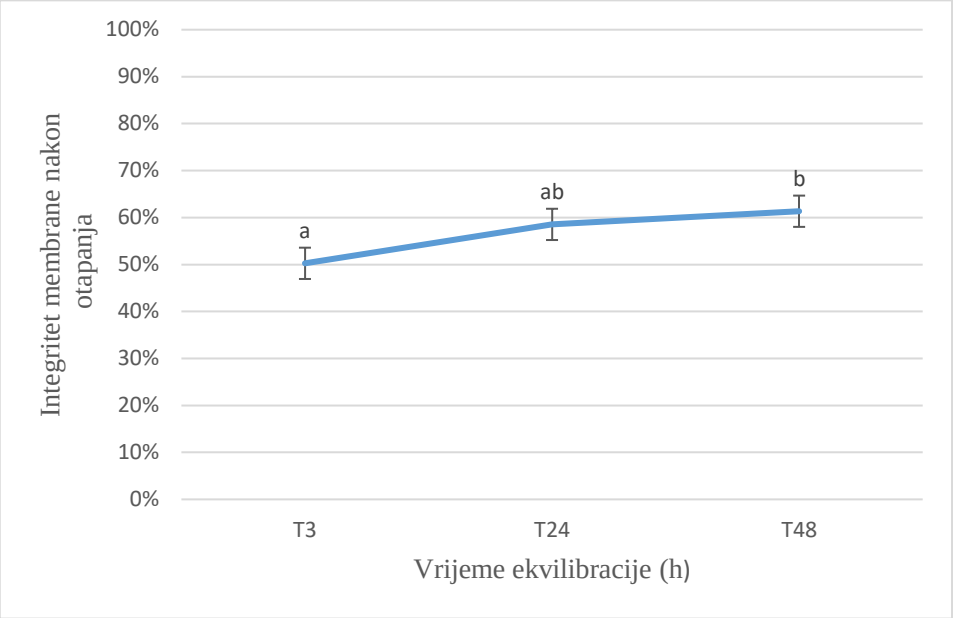


Slika 1. Učinak ekvilibracijskog perioda na progresivnu pokretljivost duboko smrznutog sjemena nakon otapanja. T3, T24, T48 – period ekvilibracije od 3, 24 i 48 sati

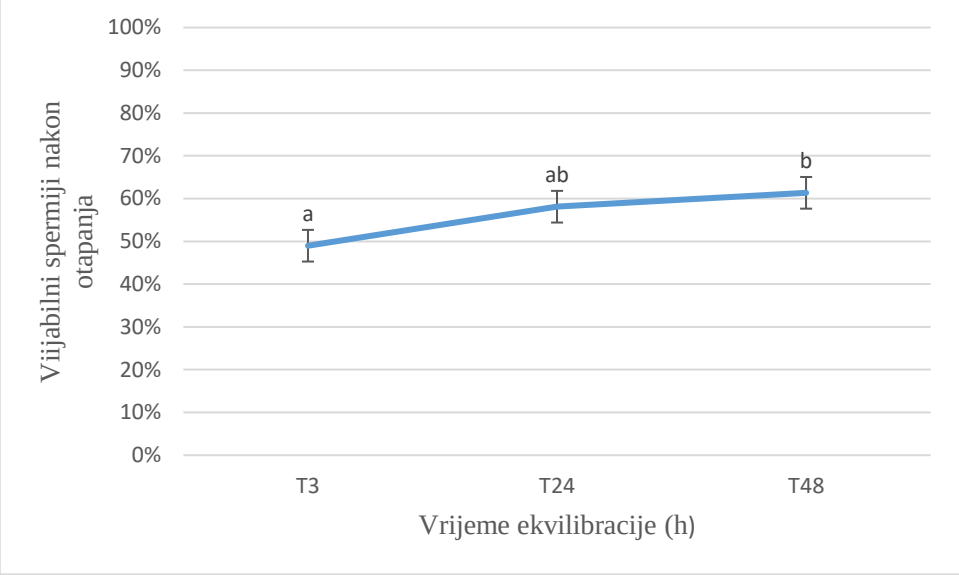
Tablica 3. Učinak ekvilibracijskog perioda na progresivnu pokretljivost, integritet membrane, vitalnost i morfologiju duboko smrznutih spermija nakon otapanja (srednja vrijednost ± standardna pogreška srednje vrijednosti)

Vrijeme ekvilibracije	Progresivna pokretljivost (%)	Integritet membrane (%)	Vijabilni spermiji (%)	Morfološki normalni spermiji (%)	Abnormalnosti glave (%)	Abnormalnosti akrosome (%)	Abnormalnosti srednjeg dijela (%)	Abnormalnosti repa (%)
T3	44,21±2,47	50,26±2,84[a]	48,89±2,78 [a]	71,32±1,62	6,94±0,82 [a]	5.77±0,61 [a]	6,78±0,67 [a]	9,31±0,82
T24	49,00±2,42	58,55±2,73[a,b]	58,10±2,60 [a,b]	73,70±1,53	7,95± 0,85 [a,b]	2,65±0,40 [b]	5,70±0,60 [a,b]	9,90±0,82
T48	49,80±2,43	61,35±2,70[b]	61,35±2,59 [b]	72,25±1,56	10,50±0,96[b]	2,85±0,41 [b]	4,45±0,53 [b]	9,25±0,80

T3, T24, T48 – period ekvilibracije od 3, 24 i 48 sati; [a,b] statistička značajnost između uzoraka na razini $p<0,05$



Slika 2. Utjecaj vremena ekvilibracije na integritet membrane duboko smrznutih spermija nakon otapanja. T3, T24, T48 – period ekvilibracije od 3, 24 i 48 sati; [a,b] statistička značajnost između uzoraka na razini $p<0,05$



Slika 3. Utjecaj vremena ekvilibracije na vijabilnost duboko smrznutih spermija nakon otapanja. T3, T24, T48 – period ekvilibracije od 3, 24 i 48 sati; [a,b] statistička značajnost između uzoraka na razini $p<0,05$

Ekvilibracijski period utjecao je i na neke morfološke osobitosti sjemena, kao što je vidljivo iz Tablice 3. Udio abnormalnosti glave bio je značajno viši nakon ekvilibracije od 48 sati u odnosu na trosatnu ekvilibraciju ($p<0,05$), dok je udio abnormalnosti akrosome ($p<0,005$)

i srednjeg dijela ($p<0,05$) bio je značajno veći kod spermija ekvilibriranih 3 sata u odnosu na duži ekvilibracijski period.

Uspjeh smrzavanja (postotak progresivne pokretljivosti nakon otapanja/postotak inicijalne progresivne pokretljivosti) iznosio je za T3 58,14 ± 3,31%, T24 64,10 ± 3,14% te T48 65,77 ± 3,10% te nije bilo statistički značajne razlike između udjela pokretljivih spermija u odnosu na inicijalnu pokretljivost između tri ispitivana vremena ekvilibracije.

Statistički značajne, pozitivne korelacije utvrđene su između masovnog gibanja spermija, koncentracije i progresivne pokretljivosti nativnog sjemena prije perioda ekvilibracije. Progresivna pokretljivost pozitivno je korelirala s integritetom membrane spermija, a morfologija nativnog sjemena s morfologijom spermija nakon dubokog smrzavanja. Statistički značajne, pozitivne korelacije utvrđene su i između HOS testa i testa supravitalnog bojenja po Bloom-u nakon dubokog smrzavanja. Statistički značajne korelacije prikazane su u Tablici 4.

Tablica 4. Korelacije između ispitivanih parametara svježeg i duboko smrznutog sjemena

Parametar	Masovno gibanje	Koncentracija spz/mL	Progresivna pokretljivost inicijalna	HOS test inicijalni	BLOOM test inicijalni	Morfologija inicijalna	Progresivna pokretljivost nakon otapanja	HOS test nakon otapanja	BLOOM test nakon otapanja	Morfologija nakon otapanja
Masovno gibanje		r=0,39 p<0,001	r=0,67 p<0,0001	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Koncentracija spz/mL	r=0,39 p<0,001		r=0,90 p<0,0001	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Progresivna pokretljivost inicijalna	r=0,67 p<0,0001	r=0,90 p<0,0001		r=0,37 p<0,002	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
HOS test inicijalni	n.s.	n.s.	r=0,37 p<0,002		r=0,61 p<0,0001	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
BLOOM test inicijalni	n.s.	n.s.	n.s.	r=0,61 p<0,0001		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Morfologija inicijalna	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.		n.s.	n.s.	n.s.	r=0,45 p<0,0003
Progresivna pokretljivost nakon otapanja	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.		r=0,76 p<0,0001	r=0,74 p<0,0001	n.s.
HOS test nakon otapanja	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	r=0,76 p<0,0001		r=0,94 p<0,0001	n.s.
BLOOM test nakon otapanja	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	=0,74 p<0,0001	r=0,94 p<0,0001		n.s.
Morfologija nakon otapanja	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	r=0,45 p<0,0003	n.s.	n.s.	n.s.	

5. RASPRAVA

U našem istraživanju utvrđeno je da produženje vremena ekvilibracije s 3 na 24 i 48 sati nije štetno utjecalo na kvalitetu duboko smrznute sperme nakon otapanja. Pokretljivost, kao jedan od najvažnijih parametara ocjene sperme povezanih s oplodnim potencijalom, bila je veća, iako ne značajno, kod ekvilibracijskog perioda od 24 i 48 sati. Ipak, utvrđena je značajna povezanost vremena ekvilibracije s integritetom membrane i vijabilnosti spermija nakon dubokog smrzavanja, pri čemu je period ekvilibracije od 48 sati bio superiorniji u pogledu postotka spermija s intaktnom plazmatskom membranom te vitalnih spermija u odnosu na period ekvilibracije od 3 sata ($p<0,05$). Tijekom vremena ekvilibracije od 48 sati ustanovili smo veći postotak spermija s abnormalnostima glave u odnosu na period od 3 sata. Ipak, u prilog vremenu ekvilibracije od 48 sati ide činjenica da su postotci spermija s abnormalnostima akrosome i spojnog dijela manji u odnosu na period ekvilibracije od 3 sata. Prema navedenim podacima možemo zaključiti da je u našem istraživanju vrijeme ekvilibracije utjecalo na vijabilnost, integritet membrane te neke morfološke osobitosti spermija, dok nije utvrđen značajniji učinak na progresivnu pokretljivost spermija nakon dubokog smrzavanja.

Krioprezervacija sjemena je od iznimne važnosti za industriju umjetnog osjemenjivanja. To je, međutim, postupak koji ne ovisi samo o prirodnim procesima, već ovisi o samoj tehnologiji proizvodnje u kojoj presudnu ulogu igra ljudski faktor. Krioprezervacija i odmrzavanje sjemena, prema dosadašnjim istraživanjima, djeluju na spermije na način da dolazi do gubitka progresivne pokretljivosti i integriteta membrane što rezultira smrću stanice. Otkriće zaštitnog djelovanja glicerola i žumanjka omogućilo je da se u tehnologiji proizvodnje duboko smrznutog sjemena (DSS) osigura preživljavanje spermija na niskim temperaturama te zadržavanje stupnja sposobnosti oplodnje jajne stanice. Napredak u tehnologiji proizvodnje DSS postignut je prije 60 godina, no unatoč brojnim istraživanjima procesa ekvilibracije znatan broj spermija još uvijek ne preživljava tehnološke procese ili gubi sposobnost oplodnje.

U opsežnom pregledu literature, već su PICKETT i BERNDTSON davne 1978. godine dokazali da su sporo hlađenje i produžena ekvilibracija spermija na 5 °C potrebni kako bi se zadržala maksimalna sposobnost oplodnje. Period ekvilibracije česta je tema istraživanja zbog potrebe da se optimizira proizvodnja u centrima za umjetno osjemenjivanje. U novijoj se literaturi spominje širok raspon perioda ekvilibracije, od 0 sati (DHAMI i SAHNI, 1993., LEITE i sur., 2010.), pola sata (KAKA i sur., 2015.), 1,5-4 sata (LEITE i sur., 2010., VAN WAGTENDONK i sur., 2000., THUN i sur., 2002., AIRES sur., 2003., RICKENBACHER i sur., 2009.), 18-28 sati (FOOTE i sur., 2002., RICKENBACHER i sur., 2009., ANZAR i sur., 2011.). U istraživanjima u kojima je period ekvilibracije bio 0 sati, rezultati su bili lošiji u

odnosu na 2 sata (DHAMI i SAHNI., 1993.) ili 4 sata ekvilibracije (LEITE i sur., 2010.), na temelju čega se može zaključiti da je izvjestan period ekvilibracije potreban kako bi se proizvelo kvalitetno sjeme nakon krioprezervacije. Većina krioprezervacijskih protokola za bičje sjeme predlaže ekvilibracijski period od 3 do 4 sata, što znači da se sjeme mora smrznuti isti dan. To je u proizvodnim uvjetima centara za proizvodnju sjemena ponekad veliki problem, s obzirom na velik broj bikova kojima se ejakulat uzima i činjenicu da je duboko smrzavanje vremenski zahtjevno. Upravo zato brojna su istraživanja produžila vrijeme ekvilibracije kako bi se optimizirala proizvodnja sjemena, odnosno kao bi se sjeme moglo smrznuti idući dan ili čak nakon vikenda. Tako je utvrđena veća stopa koncepcije nakon osjemanjivanja plotkinja sjemenom koje je bilo ekvilibrirano glicerolom kroz 12 i 18 sati u odnosu na standardna 4 sata ekvilibracije (FOOTE i KAPROTH , 2002.). ANZAR i sur. (2011.) pokazali su da je kvaliteta sjemena nakon odmrzavanja veća nakon ekvilibracije preko noći u odnosu na ekvilibraciju od 4 sata. Karakteristike vezane uz pokretljivost, integritet membrane i akrosome bile su bolje u sjemenu ekvilibriranom preko noći u odnosu na kontrolnu skupinu (4 sata). Bolju kvalitetu sjemena utvrdili su i FLEISCH i sur. (2017.) i RICKENBACHER i sur. (2009.) nakon 24-satne ekvilibracije u odnosu na ekvilibracijski period od 4 i 1,5 sati. Sukladno tome, naše istraživanje pokazalo je da je dulji period ekvilibracije rezultirao većim brojem vitalnih spermija te onih s intaktnom membranom, što je u periodu ekvilibracije od 48 sati bilo i statistički značajno u odnosu na najkraći period ekvilibracije od 3 sata. Niži postotak oštećenja plazmatske membrane pokazuje da duži period ekvilibracije djeluje učinkovitije na očuvanje plazmatske membrane, odnosno da je vrijeme ekvilibracije važno kako bi se membrana spermija prilagodila niskim temperaturama. Suprotno tome, MURPHY i sur. (2017.) utvrdili su poboljšanje progresivne pokretljivosti i vijabilnosti sjemena produženjem ekvilibracijskog perioda sa 6 na 24 sata, nakon čega je kvaliteta postepeno padala do 72 sata. RASUL i sur. (2001.) dokazali su da tijekom prolongiranog perioda ekvilibracije, osjetljiviji spermiji jače podliježu promjenama na akrosomalnoj i plazmatskoj membrani te gube sposobnost pravocrtnog gibanja što rezultira smanjenjem određenih kinetičkih parametara kao što je linearnost. Osim toga, podložniji su smrti tijekom smrzavanja i otapanja. Isti autori nisu utvrdili značajne razlike između perioda od 4, 6 i 16 sati ekvilibracije vezane uz motilitet i integritet plazmatske membrane. Slično tome, MURPHY i sur. (2017.) utvrdili su pogoršanje kinetičkih parametara produženjem ekvilibracijskog perioda sa 6 na 72 sata.

Brzina smrzavanja je, uz period ekvilibracije, jedan od najvažnijih čimbenika za uspješnu krioprezervaciju sjemena. Međutim, nema univerzalnog dogovora za optimalnu brzinu smrzavanja i period ekvilibracije. Općenito je prihvaćeno da 40-50% spermija gubi

sposobnost za život tijekom procesa smrzavanja i odmrzavanja (WATSON, 2000.). U našem se istraživanju uspjeh smrzavanja, gledajući udio motilnih spermija nakon otapanja u odnosu na inicijalnu pokretljivost, kretao od 58,14 do 65,77%, bez statističke značajnosti između ispitivanih perioda ekvilibracije.

Krioprezervacija prouzroči i promjene u morfologiji spermija, ponajprije oštećenja mitohondrija, akrosome i repa spermija pa je ukupan broj spermija intaktne membrane, repa i mitohondrijske aktivnosti manji u odnosu na svježe sjeme (HOLT, 1997.). Naše je istraživanje pokazalo značajno veći broj morfološki abnormalnih spermija nakon dubokog smrzavanja u sva tri ekvilibracijska vremena. Isto tako i udio pojedinih abnormalnosti značajno se povećao za sva tri ekvilibracijska vremena u odnosu na inicijalne morfološke parametre. Udio abnormalnosti glave bio je značajno viši nakon ekvilibracije od 48 sati u odnosu na trosatnu ekvilibraciju, dok je udio abnormalnosti akrosome i srednjeg dijela bio je značajno veći u spermija ekvilibriranih 3 sata u odnosu na duži ekvilibracijski period. Oštećenje akrosome posljedica je temperaturnog šoka, što pokazuje gubitak integriteta membrane. Poznato je da duboko smrzavanje mijenja pokretljivost spermija zbog ireverzibilnih promjena srednjeg dijela spermija i savijanja repa (WATSON, 1990.).

Rezultati ovog istraživanja pokazali su da je produženi period ekvilibracije jednako učinkovit kao i standardni trosatni period ekvilibracije, a 48 satni period ekvilibracije pokazao se čak i superiornijim u odnosu na trosatni period u pogledu vijabilnosti spermija i intaktnosti membrane nakon dubokog smrzavanja.

6. ZAKLJUČAK

Rezultati ovog istraživanja pokazali su da je produženi period ekvilibracije jednako učinkovit kao i standardni trosatni period ekvilibracije, a 48-satni period ekvilibracije pokazao se čak i superiornijim u odnosu na trosatni period u pogledu vijabilnosti spermija i intaktnosti membrane nakon dubokog smrzavanja. Primjena ekvilibracijskog perioda od 24 ili 48 sati omogućava učinkovitiju organizaciju proizvodnje sjemena, posebice u centrima s velikim brojem bikova, pa se u proizvodnji više ne trebaju izbjegavati dani prije vikenda ili praznika, jer produženo vrijeme ekvilibracije nema negativan učinak na rezultate dubokog smrzavanja bičjeg sjemena. Zaključno, produženi period ekvilibracije može se jednako uspješno primjenjivati u standardnoj proizvodnji bičjeg sjemena, a u svrhu optimiziranja proizvodnje centara za umjetno osjemenjivanje.

7. SAŽETAK

UTJECAJ VREMENA EKVILIBRACIJE U POSTUPKU DUBOKOG SMRZAVANJA BIČJEG SJEMENA

Cilj ovog istraživanja bio je istražiti utjecaj različitog vremena ekvilibracije u postupku dubokog smrzavanja bičjeg sjemena (DSS). U tu svrhu korišteni su ejakulati od 10 bikova koji se koriste u redovitoj proizvodnji duboko smrznutog bičjeg sjemena. Istraživanje je provedeno na 60 ejakulata (6 ejakulata po biku). Kako bi ustanovili učinak različitog vremena ekvilibracije na kvalitetu sjemena nakon otapanja, svaki dan prilikom kojeg je dobivan ejakulat uključivao je različite periode ekvilibracije i to: 3 sata (kontrola), 24 sata i 48 sati. Kvalitativne karakteristike sjemena procjenjivane su neposredno nakon uzimanja uzoraka te nakon otapanja duboko smrznutog sjemena (DSS), za sva 3 ekvilibracijska vremena. Utvrđeno je da prolongirani period ekvilibracije (24 sata i 48 sati) nije imao negativan učinak na kvalitetu DSS. Pokretljivost spermija, koja je ujedno i jedan od važnijih pokazatelja oplodnog potencijala bila je neznatno veća kod ekvilibracijskog perioda od 24h i 48h. Utvrđena je korelacija između vremena ekvilibracije i integriteta membrane te vijabilnosti spermija nakon dubokog smrzavanja pri čemu je 48-satni period ekvilibracije bio superiorniji u odnosu na onaj od 3 sata. U tom periodu (48 sati) ustanovljen je i veći postotak spermija s abnormalnostima glave u odnosu na period od 3 sata, ali ujedno i manji postotak abnormalnosti akrosome i spojnog dijela u odnosu na kontrolni period (3 sata). Rezultati ovog istraživanja pokazali su da je produženi period ekvilibracije jednako učinkovit kao i standardni trosatni period ekvilibracije te se može se jednako uspješno primjenjivati u standardnoj proizvodnji duboko smrznutog bičjeg sjemena, a u svrhu optimiziranja proizvodnje.

Ključne riječi: bik, ekvilibracija, duboko smrznuto sjeme, kvaliteta spermija

8. ABSTRACT

THE EFFECT OF EQUILIBRATION TIME ON CRYOPRESERVATION OF BOVINE SEMEN

The aim of this study was to assess the effect of different equilibration times on cryopreservation of bull semen. For this purpose the ejaculates from 10 bulls which are used in regular production of frozen semen were used. The experiment was conducted on 60 ejaculates (6 per bull) in order to investigate the effect of different equilibration times on the quality of frozen-thawed semen. The ejaculate thus obtained included different equilibration periods: 3 hours (control sample) and 24 hours or 48 hours. Qualitative characteristics of the semen were evaluated immediately after its collection and after thawing for all of 3 equilibration periods. Prolonged equilibration time (24 and 48 hours) did not adversely affect the quality of frozen-thawed semen. Sperm motility, which is one of the most important indicators of fertilizing potential was slightly higher than those during the equilibration times of 24 or 48 hours. The correlation between equilibration period, membrane integrity and sperm viability after freezing was established, where 48 hours equilibration period was superior to that of 3 hours. In this period (48 hours), a larger percentage of sperm with head abnormalities was determined compared to the 3- hour period of equilibration, and also a smaller percentage of acrosome and midpiece abnormalities in comparison with the control period of equilibration (3 hours). The results of this research showed that prolonged period of equilibration is equally efficient as a standard 3- hour period and can be successfully applied in the standard production of frozen bull semen in order to optimize the production.

Key words: bull, equilibration, frozen thawed semen, sperm quality

9. POPIS LITERATURE

AIRES, V. A., K. D. HINSCH, F. MUELLER-SCHLOESSER, K. BOGNER, S. MUELLER-SCHLOESSER, E. HINSCH (2003): In vitro and in vivo comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-basedextenders for cryopreservation of bovine semen. Theriogenology 60, 269–279.

ANGULO, C., M. C. RAUCH, A. DROPPELMANN, A. M. REYES, J. C. SLEBE, F. DELGADO-LÓPEZ, V. H. GUIQUIL, J. C. VERA, I. I. CONCHA (1998): Hexose transporter expression and function in mammalian spermatozoa: Cellular localization and transport of hexoses and vitamin C. J. Cell Biochem. 71, 189-203.

ANTON, M. (2007): Composition and structure of hen egg yolk. U: Huopalahti R, R. López-Fandiño, M. Anton, R. Schade, ur. Bioactive egg compounds. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp. 1-6.

ANDRABI, S. M. (2009): Factors affecting the quality of cryopreserved buffalo (*bubalus bubalis*) bull spermatozoa. Reprod. Domest. Anim. 44, 552-569.

ANZAR, M., Z. RASUL, T. A AHMED, N. AHMAD (2010): Response of buffalo spermatozoa to low temperatures during cryopreservation. Reprod. Fertil. Dev. 22, 871-880.

ANZAR, M., T. KROETSCH, L. BOSWALL (2011): Cryopreservation of bull semen shipped overnight and its effect on post-thaw sperm motility, plasma membrane integrity, mitochondrial membrane potential and normal acrosomes. Anim. Reprod. Sci. 126, 23-31.

BAILEY, J. L., J. F. BILODEAU, N. CORMIER (2000): Semen cryopreservation in domestic animals: A damaging and capacitating phenomenon. J. Androl. 21, 1-7.

BARTH, A., R. OKO (1989): Abnormal morphology of bovine spermatozoa. Ames: Iowa State University Press.

BERGERON, A., P. MANJUNATH (2006): New insights towards understanding the mechanisms of sperm protection by egg yolk and milk. Mol. Reprod. Dev. 73, 1338-1344.

BERNDTSON, W. E., R. H. FOOTE (1969): The survival of frozen bovine spermatozoa following minimum exposure to glycerol. Cryobiology 5, 398-402.

BLACKSHAW, A. W., G. W. SALISBURY (1957): Factors Influencing Metabolic Activity of Bull Spermatozoa II. Cold-Shock and its Prevention. J. Dairy Sci. 40, 1099-1106.

BUHR, M. M., E. F. CURTIS, N. S. KAKUDA (1994): Composition and behavior of head membrane lipids of fresh and cryopreserved boar sperm. Cryobiology 31, 224-238.

BUHR, M. M., M. J. PETTITT (1995): Frozen-thawed boar sperm: Isolation of membranes and fluidity measurement. Reprod. Domest. Anim. 31, 147-152.

CERGOLJ, M., M. SAMARDŽIJA (2006): Umjetno osjemenjivanje. U: Veterinarska andrologija, Veterinarski fakultet, Sveučilišta u Zagrebu, pp. 73-122.

CRAGLE, R. G., R. M. MYERS, R. K. WAUGH, J. S. HUNTER, R. L. ANDERSON (1955): The effects of various levels of sodium citrate, glycerol and equilibration time on survival of bovine spermatozoa after storage at -79°C J. Dairy Sci. 38, 508-514.

CURRY, M. R. (2000): Cryopreservation of semen from domestic livestock. Rev. Reprod. 5, 46-52.

DHAMI, A. J., K. L. SAHNI (1993): Evaluation of Different Cooling Rates, Equilibration Periods and Diluents for Effects on Deep-Freezing, Enzyme Leakage and Fertility of Taurine Bull Spermatozoa. Theriogenology 40, 1269-1280.

DROBNIS, E. Z., L. M. CROWE, T. BERGER, T. J. ANCHORDOGUY, J. W. OVERSTREET, J. H. CROWE (1993): Cold shock damage is due to lipid phase transitions in cell membranes: A demonstration using sperm as a model. J. Exp. Zool. 265, 432-437.

DUNN, H. O., G. L. LARSON, E. L. WILLET (1953): The Effects of Freezing Bovine Spermatozoa in Extenders Containing Antibacterial Agents. J. Dairy Sci. 36, 728-732.

EHMCKE, J., S. SCHLATT (2008): Animal models for fertility preservation in the male. Reprod. 136, 717-723.

ENGELMAN, D. M. (2005): Membranes are more mosaic than fluid. Nature 438, 578-580.

FLESCH, F. M., B. M. GADELLA (2000): Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. Biochim. Biophys Acta 1469, 197-235.

FLEISCH, A., E. MALAMA, U. WITSCHI, C. LEIDING, M. SIUDA, F. JANETT, H. BOLLWEIN (2017): Effects of an extension of the equilibration period up to 96 hours on the characteristics of cryopreserved bull semen. Theriogenology 89, 255-262.

FOOTE, R. H., L. C. GRAY, D. C. YOUNG, H.O. DUNN (1960): Fertility of bull semen stored up to four days at 5 °C in 20% egg yolk extenders. J. Dairy Sci. 43, 1330-1334.

FOOTE, R. H. (1975): Sperm Quality From the Bull To the Freezer: An Assessment. Theriogenology 3, 219-235.

FOOTE, R. H., M. T. KAPROTH (2002): Large batch freezing of bull semen: effect of time of freezing and fructose on fertility. J. Dairy Sci. 85, 453-456.

FOOTE, R. H. (2002): The history of artificial insemination: Selected notes and notables. J. Anim. Sci. 80, 1-10.

GADELLA, B. M., R. RATHI, J. F. H. M. BROUWERS, T. A. E. STOUT, B. COLENBRANDER (2001): Capacitation and the acrosome reaction in equine sperm. Anim. Reprod. Sci. 68, 249-265.

GILBERT, G. R., J. O. ALMQUIST (1978): Effects of processing procedures on post-thaw acrosomal retention and motility of bovine spermatozoa packaged in 0.3-ml straws at room temperature. J. Anim. Sci. 46, 225-231.

GORDON, I. (2004): Artificial insemination. In: Reproductive technologies in farm animals, CABI Publishing, Oxfordshire, pp. 49-81.

GRAHAM, J. K., E. MOCE (2005): Fertility evaluation of frozen/thawed semen. Theriogenology 64, 492-504.

GRAHAM, E. F., W. E. ERICKSON, N. D. BAYLEY (1956): Effect of Glycerol Equilibration on Frozen Bovine Spermatozoa. J. Dairy Sci. 40, 510-515.

GRAVANCE, G. G., R. VISHWANATH, C. PITT, P. J. CASEY (1996): Computer automated morphometric analysis of bull sperm heads. Theriogenology 46, 1205-1215.

HAMMERSTEDT, R. H., J. K. GRAHAM, J. P. NOLAN (1990): Cryopreservation of mammalian sperm: What we ask them to survive. J. Androl. 11, 73-88.

HANSEN, C., T. VERMEIDEN, J. P. W. VERMEIDEN, C. SIMMET, B. C. DAY, H. FEITSMA (2006): Comparison of FACSCount AF system, Improved Neubauer hemocytometer, Corning 254 photometer, SpermVision, UltiMate and NucleoCounter SP-100 for determination of sperm concentration of boar semen. Theriogenology 66, 188-194.

HE, L., J. L. BAILEY, M. M. BUHR (2001): Incorporating lipids into boar sperm decreases chilling sensitivity but not capacitation potential. Biol. Reprod. 64, 69-79.

HILL, J. R., W. C GODLEY, V. HURST (1959): Effect of Glycerol Equilibration Time, Glycerol Level, and Rate of Temperature Descent on the Freezing of Ram Spermatozoa. J. Anim. Sci. 18, 614-621.

HOLT, W. V. (1997): Alternative strategies for the long-term preservation of spermatozoa. Reprod. Fert. Dev. 9, 309-319.

JANUŠKAUSKUS, A., H. ŽILINSKAS (2002): Bull Semen Evaluation Post-Thaw and Relation of Semen Characteristics to Bull's Fertility. Vet. Ir. Zootech. 17, 39.

JONES, R. C., D. L. STEWARD (1979): The effects of cooling to 5 °C and freezing and thawing on the ultrastructure of bull spermatozoa. J. Reprod. Fertil. 56, 233-238.

KAKA, A., H. WAHID, Y. ROSNINA, N. YIMER, A. M. KHUMRAN, K. SARSAIFI et al. (2015): α-Linolenic acid supplementation in BioXcell® extender can improve the quality of post-cooling and frozen-thawed bovine sperm. Anim. Reprod. Sci. 153, 1-7.

KASTELIC, J. P., J. C. THUNDATHIL (2008): Breeding soundness evaluation and semen analysis for predicting bull fertility. Reprod. Domest. Anim. 43, Suppl 2, 368-373.

LEITE, T. G., V. R. DOVALE FILHO, R. P. DE ARRUDA, A. F. DE ANDRADE, L. L. EMERICK, F. G. ZAFFALON, et al. (2010): Effects of extender and equilibration time on post-thaw motility and membrane integrity of cryopreserved Gyr bull semen evaluated by CASA and flow cytometry. Anim. Reprod. Sci. 120, 31-38.

MALDJIAN, A., F. PIZZI, T. GLIOZZI, S. CEROLINI, P. PENNY, R. NOBLE (2005): Changes in sperm quality and lipid composition during cryopreservation of boar semen. Theriogenology 63, 411-421.

MARIN, S., K. CHIANG, S. BASSILIAN, W. N. P. LEE, L. G. BOROS, J. M. FERNANDEZ-NOVELL, et al. (2003): Metabolic strategy of boar spermatozoa revealed by a metabolomic characterization. FEBS Lett. 554, 342-346.

MARTIN, I. C. A., C. W. EMMENS (1961): Effects of Time of Equilibration and Addition of Fructose on the Survival and Fertility of Bull Spermatozoa Deep-Frozen to -79 °C. J. Reprod. Fertil. 2, 404-410.

McDONALD, L. E., M. H. PINEDA (1989): Male reproduction. U: Veterinary endocrinology and reproduction, 4th edition, Lea & Febiger, Philadelphia, London, pp. 281-282.

MEDEIROS, C. M. O., F. FORELL, A. T. D. OLIVIERA, J. L. RODRIGUEZ (2002): Current Status of Sperm Cryopreservation: Why Isn't It Better? Theriogenology 57, 327-344.

MEYERS, S. A. (2009): Sperm physiology. U: Samper, J. C., ed., Equine breeding management and artificial insemination, 2nd edition, W. B. Saunders, Saint Louis, pp. 47-55.

MOCÉ, E., J. K. GRAHAM (2008): *In vitro* evaluation of sperm quality. Anim. Reprod. Sci. 105, 104-118.

MOUSSA, M., V. MARTINET, A. TRIMECHE, D. TAINTURIER, M. ANTON (2002): Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen. Theriogenology 57, 1695-1706.

MUKAI, C., M. OKUNO (2004): Glycolysis plays a major role for adenosine triphosphate supplementation in mouse sperm flagellar movement. Biol. Reprod. 71, 540-547.

MURPHY, E. M., C. MURPHY, C. O'MEARA, G. DUNNE, B. EIVERSE, P. LONERGAN, S. FAIR (2017): A comparison of semen diluents on the in vitro and in vivo fertility of liquid bull semen. J. Dairy Sci. 100, 1541-1554.

MUINO, R., M. M. RIVERA, T. RIGAU, J. RODRIGUEZ-GIL, A. I. PENA (2008): Effect of different thawing rates on post- thaw sperm viability, kinematic parameters and motile sperm subpopulations structure of bull semen. Anim. Reprod. Sci. 109, 50-64.

O'DELL, G., V. HURST (1955): The Effect of Glycerol Equilibration Time on the Freezing of Bovine Spermatozoa in Egg Yolk-Sodium citrate and Skimmilk Semen Extenders. J. Dairy Sci. 39, 1156-1160.

PACE, M. M., E. F. GRAHAM (1974): Components in egg yolk which protect bovine spermatozoa during freezing. J. Anim. Sci. 39, 1144-1149.

PARKS, J. E., D. V. LYNCH (1992): Lipid composition and thermotropic phase behavior of boar, bull, stallion, and rooster sperm membranes. Cryobiology 29, 255-266.

PARKS, J. E., J. K. GRAHAM (1992): Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. Theriogenology 38, 209-222.

PHILLIPS, P. H. (1939): Preservation of bull semen. J. Biol. Chem.130, 415.

PICKETT, B., W. BERNDTSON (1978): Principles and techniques of freezing spermatozoa. In: Physiology of reproduction and artificial insemination of cattle. W. H. Freeman & Co, San Francisco, CA, pp. 494-554.

QUINN, P. J., D. CHAPMAN (1980): The dynamics of membrane structure. CRC Crit. Rev. Biochem. 8, 1-117.

RASTEGARNIA, A., A. SHAHVERDI, T. REZAEI TOPRAGGALEH, B. EBRAHIMI, V. SHAVIPOUR (2013): Effect of different thawing rates on post-thaw viability, kinematic parameters and chromatin structure of buffalo (*Bubalus Bubalis*) spermatozoa. Cell J. 14, 306-313.

RASUL, Z., N. AHMAD, M. ANZAR (2001): Changes in motion characteristics, plasma membrane integrity, and acrosome morphology during cryopreservation of buffalo spermatozoa. J. Androl. 22, 278-283.

RICKENBACHER, R. (2009): Influence of the dilution rate and equilibration time on the quality of frozen animals in the bull. Disertacija. Veterinarski fakultet Univerziteta u Zurichu. (Na njemačkom jeziku).

RICKER, J. V., J. J. LINFOR, W. J. DELFINO, P. KYSAR, E. L. SCHOLTZ, F. TABLIN, et al. (2006): Equine sperm membrane phase behavior: The effects of lipid-based cryoprotectants. Biol. Reprod. 74, 359-365.

SAACKE, R. G., J. C. DALTON, S. NADIR, R. L. NEBEL, J. H. BAME (2000): Relationship of seminal traits and insemination time to fertilization rate and embryo quality. Anim. Reprod. Sci. 60-61, 663-677.

SALHAB, S. A., C. P. MERILAN (1991): Some effects of collection equipment, glycerolation, and post-thaw re-equilibration times on the motility and survival of bovine spermatozoa. Anim. Reprod. Sci. 24, 53-61.

SAROFF, J., J. P. MIXNER (1954): The Relationship of Egg-yolk and Glycerol Content of Diluters and Glycerol Equilibration Time to Survival of Bull Spermatozoa after Low Temperature Freezing. J. Dairy Sci. 38, 292-297.

SCHURMANN, A., H. AXER, A. SCHEEPERS, H. DOEGE, H. G. JOOST (2002): The glucose transport facilitator glut8 is predominantly associated with the acrosomal region of mature spermatozoa. Cell Tissue Res. 307, 237-242.

SILVA, P. F. N., B. M. GADELLA (2006): Detection of damage in mammalian sperm cells. Theriogenology 65, 958-978.

SINGER, S. J. (1972): A fluid lipid-globular protein mosaic model of membrane structure. Ann. N. Y. Acad. Sci. 195, 16-23.

SULLIVAN, J. J., J. P. MIXNER (1963): Effects of Method of Egg Yolk Addition and of Glycerol Equilibration Time upon Post-Thawing Motility and Metabolic Activity of Frozen Bull Semen. J. Dairy Sci. 46, 463-467.

THUN, R., M. HURTADO, F. JANETT (2002): Comparison of Biociphos- Plus and Tris-egg yolk extender for cryopreservation of bull semen. Theriogenology 57, 1087-1094.

VANDEMARK, N. L., W. J. MILLER, W. C. KINNEY Jr., C. RODRIGUEZ, M. E. FRIEDMAN (1957): Preservation of bull semen at sub-zero temperatures. Urbana: Univ. Illinois Agric. Exp. Stn. 621, Urbana.

VAN WAGTENDONK - DE LEEUW, A. M, R. M HARING, L. M. T. E. KAAL-LANSBERGEN, J. H. G DEN DAAS (2000): Fertility results using bovine semen cryopreserved with extenders based on egg yolk and soy bean extract. Theriogenology 54, 57-67.

VAZQUEZ, J. M., E. A. MARTINEZ, P. MARTINEZ, C. GARCIA-ARTIGA, J. ROCA (1997): Hypoosmotic swelling of boar spermatozoa compared to other methods for analysing the sperm membrane. Theriogenology 47, 913-922.

VERSTEGEN, J., M. IGUER-OUADA, K. ONCLIN (2002): Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. Theriogenology 57, 149-179.

VISHWANNATH, R., P. SHANNON (2000): Storage of bovine semen in liquid and frozen state. Anim. Reprod. Sci. 62, 23-53.

WALL, R. J., R. H. FOOTE (1999): Fertility of bull sperm frozen and stored in clarified egg yolk-Tris- glycerol extender. J. Dairy Sci. 82, 817-821.

WATSON, P. F. (1990): AI and the preservation of semen. In: Lamming, G. E. (ed.) Marshall's Physiology of Reproduction, Volume 2, Male Reproduction. Churchill, Livingstone, London, str. 747-869.

WATSON, P. F. (2000): The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. Anim. Reprod. Sci. 60, 481-492.

WATSON, P. F. (1995): Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. Reprod. Fertil. Dev. 7, 871-891.

WHITE, I. G., G. J. LINCOLN (1960): The yellow pigmentation of bull semen and its content of riboflavin, niacin, thiamine and related compounds. Biochem. J. 76, 301-306.

10. ŽIVOTOPIS

Rođen sam u Varaždinu 25. svibnja 1986. Prvu osnovnu školu završio sam 2001. godine. Maturirao sam u Prvoj gimnaziji Varaždin - opći smjer 2005. godine, kada sam i upisao Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Bio sam predstavnik studenata 1. godine Fakulteta

te ujedno i član IVSA-e. Trenutno sam apsolvent Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Tijekom studija sam volontirao u Veterinarskoj stanici Varaždin gdje sam odradio obaveznu praksu u sklopu ekstramuralne nastave. Sudjelovao sam na sljedećim edukativno-stručnim skupovima: „Klinička endokrinologija u veterinarskoj medicini“ i „Traumatologija u veterinarskoj medicini“ te na kongresu „Veterinarska znanost i struka“. Govorim engleski jezik te posjedujem osnovno znanje njemačkog jezika. U slobodno vrijeme bavim se glazbom i sportom.