Metode procjene kvalitete ejakulata i rasplodnog potencijala vojnih radnih pasa

Propadalo, Tena

Master's thesis / Diplomski rad

2019

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:178:578251

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

TENA PROPADALO

Metode procjene kvalitete ejakulata i rasplodnog potencijala vojnih radnih pasa

Diplomski rad

Zagreb, 2019.

Ovaj diplomski rad izrađen je u Klinici za porodništvo i reprodukciju Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Predstojnik klinike: prof. dr. sc. Marko Samardžija

Mentorice: izv. prof. dr. sc. Iva Getz

izv. prof. dr. sc. Martina Lojkić

Članovi povjerenstva za obranu diplomskog rada:

1. prof. dr. sc. Nikica Prvanović Babić
2. izv. prof. dr. sc. Iva Getz
3. izv. prof. dr. sc. Martina Lojkić
4. izv. prof. dr. sc. Silvijo Vince (zamjena)

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentoricama, izv. prof. dr. sc. Ivi Getz i izv. prof. dr. sc. Martini Lojkić na stručnom vodstvu, savjetima, pomoći, požrtvovanosti i podršci koje su mi pružale tijekom pisanja rada, ali i samog studiranja.

Zahvaljujem izv. prof. dr. sc. Nikici Prvanović Babić na velikoj pomoći i stručnim savjetima koje je uputila za izradu ovog rada.

Zahvale upućujem izv. prof. dr. sc. Silviju Vince na ukazanoj pomoći, pristupačnosti i savjetima koje je pružao tijekom provedbe rada.

Velike zahvale upućujem zapovjedniku Pukovnije Vojne policije, brigadiru Mati Radošu, zapovjedniku Satnije za obuku vodiča i službenih pasa „Satnik Krešimir Ivošević“, bojniku Željku Barbiru, voditeljici veterinarske ambulante bojnici Jeleni Jelen-Orlić i ostalim pripadnicima Satnije na omogućavanju provedbe ovog rada.

Izuzetno sam zahvalna svojoj obitelji na potpori, pomoći i osloncu u svim životnim prilikama.

POPIS KRATICA

ABP (Androgen Binding Protein) = protein koji veže androgen

BSE (*Breeding Soundnes Examination*) = pregled rasplodne sposobnosti psa

CASA *(computer aided semen analysis)* = kompjutprska analiza sperme

CI (*confidence interval*) = interval pouzdanosti

ELFA metoda (*Enzyme Linked Fluoroscent Assay*) = enzimski imunofluorescentni test

FSH = folikulostimulirajući hormon

HOS test (*hypoosmotic swelling* test) = test hipoosmotskog bubrenja

MORH = Ministarstvo obrane Republike Hrvatske

OSRH = Oružane snage Republike Hrvatske

VP = Vojna Policija

Sadržaj

1. UVOD 1
2. HIPOTEZA 2
3. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA 2
3.1. SPECIFIČNI CILJEVI: 2
4. PREGLED LITERATURE 3
4.1. ANATOMIJA I FIZIOLOGIJA MUŠKIH SPOLNIH ORGANA 3
4.2. SPOLNOST 10
4.2.1. Pubertet i raspolodna zrelost 10
4.2.2. Libido 11
4.2.3. Spolni refleksi 11
4.3. SPERMA 11
4.3.1. Ejakulat 11
4.3.2. Spermiji 12
4.4. ANDROLOŠKI PREGLED 13
4.4.1. Reproduktivna anamneza 13
4.4.2. Androloški pregled 14
4.5. ULTRAZVUČNI PREGLED 14
4.6. POLUČIVANJE EJAKULATA 15
4.7. METODE OCJENJIVANJA KVALITETE EJAKULATA 16
4.7.1. Makroskopska ocjena 17
4.7.2. Mikroskopska ocjena 17
4.8. NAPREDNE METODE OCJENJIVANJA SJEMENA 20
5. MATERIJALI I METODE 21
5.1. DIZAJN ISTRAŽIVANJA I POSTUPAK SA ŽIVOTINJAMA 21
5.2. KLINIČKI I ANDROLOŠKI PREGLED 22
5.3. ULTRAZVUČNI PREGLED 24
5.4. UZIMANJE EJAKULATA 25
5.5. OCJENA EJAKULATA 26
5.5.1. Ocjena integriteta stanične membrane spermija 26
5.5.2. Metoda supravitalnog bojanja spermija po Bloom-u 26
5.5.3. Koncentracija i ukupan broj spermija 27
5.5.4. Preživljavanje ohlađenog sjemena 28
5.5.5. Određivanje razine testosterona 28
5.6. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA 29
6. REZULTATI 30

6.1. Rezultati ultrazvučnog pregleda testisa i prostate te određivanja razine testosterona u serumu pasa različitih dobnih kategorija 31
6.2. Rezulatati ocjene ejakulata u pasa različitih dobnih kategorija 32
7. RASPRAVA 37
8. ZAKLJUČCI 42
9. POPIS LITERATURE 43
SAŽETAK 51
ŽIVOTOPIS 53

1. UVOD

Smatra se da je pas (*Canis familiaris*) jedna od prvih domesticiranih životinja u svijetu (MOREY, 1994.), a istraživanja su pokazala da je nastao prije 14 000 godina te da je izravni potomak sivog vuka (*Canis lupus*). Psi su danas korišteni u brojne svrhe poput lovačkih pasa, pasa za čuvarsku namjenu, pastirskih pasa, vodiča slijepih i invalidnih osoba, pasa za spašavanje te policijskih i radnih vojnih pasa.

Oružane snage Republike Hrvatske službene vojne pse koriste od 1992. godine. Te godine obilježeno je i ustrojavanje Satnije za obuku vodiča i službenih pasa "Satnik Krešimir Ivošević", čiji su psi sudjelovali u izradi ovog znanstvenog rada.

Pravodobno planiranje uzgoja u skladu s potrebama Ministarstva obrane Republike Hrvatske uključuje selekciju uzgojnih i radnih pasa u korist onih reproduktivno najboljih. Zato je bitno pratiti njihov klinički status i reproduktivni potencijal u smislu selekcije pasa s najkvalitetnijim zdravstvenim i reproduktivnim karakteristikama kako bismo dobili potomke s najboljim karakteristikama vojnog radnog psa.

Uzgajivačnica Satnije registrirana je pri Hrvatskom kinološkom savezu i Ministarstvu poljoprivrede. Satnija se trenutno bavi uzgojem pasmina njemačkih, belgijskih te nizozemskih ovčara. Postoji nekoliko namjena pasa, a to su: zaštitno-tragačka, zaštitna, tragačka, čuvarska, detekcija eksploziva, detekcija droga, detekcija duhana i duhanskih proizvoda. Radni vijek obučavanih pasa je do 8 godina, nakon čega slijedi zaslužena mirovina. Odluka o prestanku radnih aktivnosti pasa donosi se u okviru procjene radne sposobnosti, nakon procjene zdravstvenog statusa od strane veterinarske struke (VLAHOVIĆ, 2017.).

Uzgajivačnica Issy Top, čije pse smo koristili u istraživanju reproduktivnog potencijala, dobila je ime po prvoj uzgojnoj ženki Satnije „Krešimir Ivošević“. Valja napomenuti da psi koje smo pregledavali sudjeluju i u brojnim međunarodnim mirovnim misijama i vježbama, najviše u Afganistanu, gdje pokazuju velike uspjehe u radu, razvoju i obuci. Stoga je vrlo bitno vršiti selekciju nad najizdržljivijim psima i psima sa sposobnostima najbrže prilagodbe raznim klimatskim uvjetima. Ekstremni napori službenih i radnih pasa, okolina u kojoj pas živi, stres, ekstremne temperature te drugi nepovoljni uvjeti mogu biti uzrok smanjene plodnosti. Iz svega navedenog možemo

ustanoviti da je nužno uključiti niz pretraga, od kliničkih do laboratorijskih, kako bi dobili potpuni uvid u reproduktivni potencijal pasa.

2. HIPOTEZA

Pretpostavka je da proizvodnja sjemena u pasa ovisi o masi funkcionalnog tkiva testisa. Ultrazvučno određivanje obujma testisa u pasa različitih dobnih kategorija te usporedba s kvalitetom polučenog ejakulata i razinom testosterona, pružiti će detaljan uvid u reproduktivni potencijal pasa te omogućiti selekciju najkvalitetnijih pasa za raspolod.

3. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA

Osnovni cilj ovog istraživanja je ustanoviti reproduktivni potencijal vojnih rasplodnih i radnih pasa Ministarstva obrane Republike Hrvatske. Reproduktivni potencijal utvrđuje se nizom pretraga koje uključuju klinički i androloški pregled, hormonalni status, ultrazvučni pregled i pregled ejakulata. Povezivanjem reproduktivnih parametara s kvalitetom ejakulata i razinom testosterona dobiti ćemo precizniji uvid u reproduktivni potencijal pasa.

3.1. SPECIFIČNI CILJEVI:

1. usporediti reproduktivne parametre pasa dobivene ultrazvučnim pregledom testisa, epididimisa i prostate pasa u dvije dobne kategorije
2. usporediti kvalitetu ejakulata pasa u dvije dobne kategorije
3. ispitati preživljavanje pohranjenih spermija u komercijalnom razrjeđivaču na 4 °C nakon 24, 48 i 72 sata;
4. odrediti razinu testosterona iz prikupljenih ostatnih uzoraka seruma
5. istražiti utjecaj dobi na reproduktivne parametre, kvalitetu ejakulata i razinu testosterona
6. istražiti povezanost reproduktivnih parametara s kvalitetom ejakulata i razinom testosterona.

4. PREGLED LITERATURE

4.1. ANATOMIJA I FIZIOLOGIJA MUŠKIH SPOLNIH ORGANA

U muške spolne organe (*organa genitalia masculina*) ubrajamo:

1. dva testisa (*testes, orchis*), smješteni u mošnji (*scrotum*)

2. sjemenovode (*ductus deferens*)

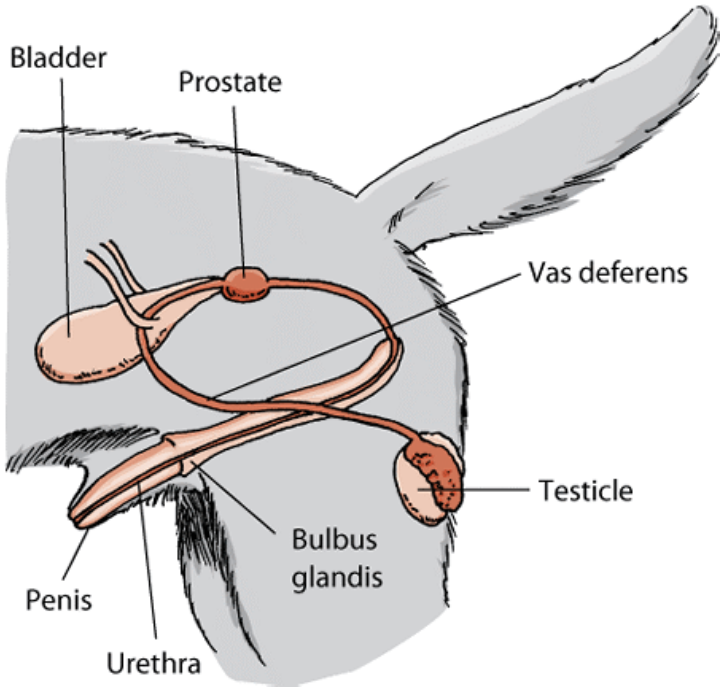
3. nuzjaja (*epididymis*)

4. uretru, mokraćnicu (*urethra masculina*)

5. prostatu (*glandula prostatica*)

6. spolni ud (*penis*)

7. prepucij ili puzdru (*praeputium*).



Slika 1. Spolni organi psa (izvor: MSD and the MSD Veterinary Manual, Merck & Co., Inc., Kenilworth, NJ, USA., preuzeto s https://www.merckvetmanual.com/dog-owners/reproductive-disorders-of-dogs/the-gonads-and-genital-tract-of-dogs (21.07.2019))

4.1.1. Testisi (*Testes*)

Testisi pasa leže u skrotumu koji je bez dlake i često pigmentiran. Smješteni su ispod repa u perinealnoj regiji. Njihova funkcija je proizvodnja spolnih stanica (spermija) i lučenje androgenih hormona, odnosno testosterona koji je odgovoran za spermatogenezu i spolno ponašanje mužjaka. Relativno su mali (veličine oraha), što ovisi i o veličini životinje, okruglog ili jajolikog oblika (ASPINALL, 2004.). Testise prekriva tanka, bijela, serozna opna *tunica vaginalis propria,* koja je visceralni list peritoneuma. Ona prekriva čitavu površinu testisa, osim područja gdje iz sjemenog traka u testis ulaze krvne žile i živci. Ispod nje nalazi se *tunica albuginea testis*, čahura od gustog bijelog fibroznog tkiva i glatkih mišićnih vlakana. Unutrašnja površina tunike albuginae sadrži mnogo vijugavih krvnih žilica. Ona leži na parenhimu testisa te zrakasto prodire u njega dijeleći ga na režnjiće (*lobuli testis*). Svaki režnjić sastoji se od 2 do 3 zavijena sjemena kanalića (*tubuli contorti seu seminiferi*) u kojima se odvija proces spermatogeneze. S obzirom da sjemeni kanalići čine približno 90% mase testisa, volumen testisa je većinom odraz spermatogeneze (LENZ i sur., 1993.). Sjemeni kanalići sastoje se od vezivne ovojnice, bazalne membrane i zametnog epitela koji čine dvije vrste stanica, Sertolijeve stanice i stanice spermatogeneze. Sertolijeve stanice su velike vretenaste stanice, manje brojne od spermatogonija. Nakon stimulacije s folikulostimulirajućim hormonom (FSH) proizvode estrogene, inhibin i *androgen binding protein* (ABP), hranjive tvari koje pomažu preživljavanje spermija tijekom putovanja kroz tubule. Inhibin negativnom povratnom spregom djeluje na lučenje FSH. Otočići intersticijskog tkiva ili Leydigove stanice razbacane su u manjim grupama između režnjića parenhima testisa, u intersticiju s krvnim žilama i živcima. One izlučuju muške spolne hormone (testosteron i ostale androgene). Zavijeni sjemeni kanalići *tubuli contorti* prelaze u *tubuli recti*, a oni ulaze u mrežicu anastomozirajućih kanala obloženih epitelnim stanicama, poznatih kao *rete testis*. Iz *rete testis* izlaze izvodni kanali (*vasa efferentia*) koji se udružuju i prelaze u epididimis, dugačku vijugavu cijev koja se pruža uz dorzolateralnu granicu testisa (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.).

Trenutno se koristi nekoliko metoda i tehnika u mjerenju i kliničkoj procjeni obujma testisa, uključujući orhidometar, ravnala, pomičnu mjerku i ultrazvuk. Precizno utvrđivanje obujma testisa od velike je važnosti pri pregledu pacijenata s raznim poremećajima koji utječu na rast i razvoj testisa (PALTIEL i sur., 2002.) Nadalje,

utvrđivanje točnog obujma testisa od velike je koristi u praćenju razvoja u pubertetu i posljedica koje na reproduktivnu funkciju imaju razne bolesti, traume, orhitisi, epididimitisi, vazektomije, skrotalne hernije te njihovo liječenje (CHIPKEVITCH i sur., 1996., PALTIEL i sur., 2002.). Iako je u većini slučajeva dovoljno definirati veličinu testisa na malu, srednju i veliku, u nekim kliničkim slučajevima je potrebna puno veća preciznost u mjerenju. Primjerice, u situacijama kada se pobliže prate promjene u pubertetu, prilikom praćenja patoloških procesa na testisima ili pri procjeni terapeutskih i hormonalnih učinaka pojedinih pripravaka na testise. U navedenim, ali i ostalim istraživanjima (ZELLI i sur., 2013.), mjerenja obujma testisa pokazala su izravnu povezanost s kvalitetom sjemena. Iako se o najpreciznijoj metodi i dalje vode rasprave, ultrazvuk se smatra najpouzdanijom metodom za procjenu obujma *in situ* (DIAMOND i sur., 2000., SAKAMOTO i sur., 2008.).

4.1.2. Mošnja (*Scrotum*)

Mošnja je dvodijelna kožna vreća koja visi izvan trbušne šupljine, a u kojoj su smješteni testisi i epididimisi te jednim dijelom sjemenovodi. Nalazi se na pola dužine između preponskog područja i anusa.

U unutrašnjosti je podijeljena središnjom pregradom na dvije skrotalne vreće, a svaka ima po jedan testis. Skrotum je kožna vreća građena od mnoštva fibroelastičnih i mišićnih vlakana, od kojih je najistaknutiji sloj *tunica dartos*. (NOAKES i sur., 2001.). Unutar stijenki skrotuma je *m. dartos*, sloj glatkog mišića. Kada se on kontrahira, povlači skrotalnu kožu, a time i testise bliže tijelu. To se događa za hladnog vremena što podiže temperaturu testikularnog tkiva. U toplo vrijeme događa se suprotno, skrotalna vreća se izdužuje, a testisi vise dalje od tijela. Na taj način održava se niža temperatura i osigurana je spermatogeneza koja bi na visokim temperaturama bila inhibirana.

Skrotum se sastoji od sljedećih slojeva:

1. vanjski sloj, koža ili *epidermis* – tanka, glatka, elastična, obrasla kratkim dlakama, opskrbljena lojnim i znojnim žlijezdama, koje održavaju temperaturu u testisima, razdijeljena s *raphe scroti*.

2. *tunica dartos* - sastoji se od fibroelastičnog tkiva i glatkih mišića, čvrsto prianja uz kožu, tijesno je povezana sa tunicom vaginalis na dnu skrotuma. *Tunica dartos* djeluje kao

termoregulator jer kontrahira testise prema abdomenu kada je hladno i relaksira kada je toplo.

3. *fascia scroti* – površna i duboka fascija te interfascijalni labavi, tanki sloj vezivnog tkiva (*stratum subdarticum*) između tunice dartos i parijetalnog sloja tunice vaginalis. Ovo tkivo omogućuje testisima pomicanje u gornjem i donjem smjeru.

4. *tunica vaginalis,* parijetalni sloj (*tunica vaginalis comunis*) – fibroserozna vreća koja se nastavlja iz parijetalnog lista peritoneuma koji okružuje unutarnji ingvinalni otvor. Proteže se kroz ingvinalni kanal do dna skrotuma. Oblaže skrotum, u gornjem dijelu je tanka, a u skrotalnom dijelu debela.

5. *tunica vaginalis,* visceralni sloj (*tunica vaginalis propria*) – prekriva testis, epididimis i sjemensko uže.

4.1.3. Sjemensko uže (*Funiculus spermaticus*)

Funiculus spermaticus proteže se od ingvinalnog prstena i povezuje se s dorzalnim krajem testisa. Sjemensko uže čine: *arteria spermatica, vena spermatica* koja tvori venozni pletež *plexus pampiniformis* oko arterije, limfne žile, simpatički živci oko krvnih žila, *ductus deferens*, *musculus cremaster internus* te *tunica vaginalis propria*. Glatki mišići sjemenskog užeta svojim kontrakcijama podižu testise bliže tijelu (prema ingvinalnom kanalu), a relaksacijom izdužuju skrotum. Zajedno s *m. cremaster* djeluje i *tunica dartos* te *m. dartos*. Ovaj proces važan je za održavanje niže temperature testisa potrebne za spermatogenezu (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.).

4.1.4. Nuzjaja (*Epididymis*)

Epididimisi su parni organi sastavljeni od zavijenih kanalića (*ductus epididymis*) koji su važni za skladištenje, sazrijevanje i transport spermija. Povezani su s testisima s fibroznim tkivom. Epididimis se sastoji od glave, tijela i repa. Proksimalni kraj epididimisa zove se glava ili *caput epididymis*, intermedijalni dio je tijelo ili *corpus epididymis*, a najduži distalni kraj zove se rep ili *cauda epididymis*. Rep epididimisa nastavlja se duž dorzomedijalne površine kao *ductus deferens*, koji ulazi u abdomen kroz ingvinalni kanal te završava u dorzalnom dijelu prostate (ŠEHIĆ i sur., 2006.) i glavno je mjesto

skladištenja ejakulata. Glava epididimisa sastoji se od 6 - 12 izvodnih kanalića (*ductuli efferentes*) koji izlaze iz *rete testis* i spajaju se u jedan glavni kanal, *ductus epididymis*. Taj kanal prelazi u sjemenovod. Glava epididimisa je čvrsto povezana s testisom pomoću njegovih odvodnih kanala, vezivnog tkiva i serozne membrane.

Epididimisi posjeduju trepetljikasti epitel koji pomaže pokretanju spermija s peristaltičkim kontrakcijama prema sjemenovodu. Prolaskom kroz epididimis spermiji dobiju lipoproteinsku ovojnicu koja štiti spermije od vanjskih utjecaja i daje im negativni električni naboj. Zbog toga se spermiji međusobno odbijaju, spriječena je aglutinacija spermija i omogućeno im je progresivno gibanje. Spermijima je potrebno do petnaestak dana za prolazak kroz epididimis, a postaju pokretljivi kada se pomiješaju sa sjemenom plazmom. Tijekom sazrijevanja spermiji gube protoplazmatsku kapljicu. Na osnovu protoplazmatske kapljice razlikujemo zrele od nezrelih spermija (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.).

Epididimis regulira izlučivanje spermija pri spolnom aktu i ne dopušta potpuno pražnjenje. Prekomjernim iskorištavanjem mladog psa značajno se smanjuje količina spermija skladištena u repu epididimisa, što smanjuje plodnost (ASPINALL, 2004.).

4.1.5. Sjemenovod (*Ductus deferens*)

Ductus deferens je jednostavni produžetak epididimisa, a smješten je od repa epididimisa do uretre u zdjelici. Sjemenovodi su parni organi, tanki mišićni kanali, malog lumena. Primarna uloga im je transport spermija od epididimisa do uretre. Protežu se dorzalno kroz *funiculus spermaticus*, zatim prolaze kroz ingvinalni kanal, pa sve do uretre (u blizini vrata mokraćnog mjehura). Sjemenovodi se sastoje od sluznice ispod koje leži glatki mišić koji provodi spermu za vrijeme ejakulacije (ASPINALL, 2004.).

4.1.6. Mokraćnica (*Urethra masculina*)

Uretra mužjaka je dugačka mišićno-sluznička cijev koja se proteže od mokraćnog mjehura do glave penisa te služi za odvod urina i sperme. Uretra počinje na vratu mokraćnog mjehura s *orificium urethrae internum* i završava na vrhu penisa s *orificium urethrae externum* (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.) Ona ide unatrag po dnu zdjelice, obilazi ishijadični luk u oštrom zavoju, pa se nastavlja naprijed kao dio penisa

okružena spužvastim tijelom uretre (SISSON, 1962.). U blizini vrata mjehura uretra je povezana sa parnim otvorima sjemenovoda i okružena je s prostatom. Dugačka pseća uretra podijeljena je u tri dijela: zdjelični dio (*pars pelvina*), *bulbus urethrae* i penisni dio uretre (*pars externa*).

4.1.7. Prostata (*Glandula prostatica*)

Prostata je akcesorna žlijezda tubuloalveolarnog tipa koja izlučuje bistar, vodenasto-serozni lužnati sekret koji u psa čini većinu treće frakcije sjemena (AROKIA i sur., 2016.). Leži na izlazu uretre iz mokraćnog mjehura gdje se nalazi veći broj izvodnih kanalića koji se ulijevaju u uretru. Prostata psa režnjaste je strukture, podijeljena medijanom pregradom i obuhvaćena kapsulom koja se sastoji od glatkog mišićja i fibroznog vezivnog tkiva. Kapsula ima pregrade koje se prostiru u parenhim prostate, stvarajući režnjeve parenhima žlijezde (ŠEHIĆ i sur., 2006.). Lužnati sekret prostate je od velikog značenja za pokretljivost spermija koji su do miješanja s ovim sekretom bili inaktivirani kiselim medijem epididimisa (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.). Veličina i položaj zdrave prostate promjenjivi su i ovise o veličini i dobi psa. Ovisna je o androgenim hormonima, pa se povećava tijekom starosti u intaktnih pasa, a atrofira u kastriranih mužjaka.

4.1.8. Udo (*Penis*)

Penis psa je muški kopulacijski organ, slične građe kao i u ostalih domaćih životinja. Međutim, značajna razlika je što penis psa ima *bulbus glandis* na anteriornom kraju penisa, koji se napuni krvlju u erekciji i omogućuje kopulacijsko vezanje tijekom parenja. Također, penis ima i kost (*os penis*) lokaliziranu na kraju penisa, koja održava rigidnost penisa u vagini tijekom parenja. Fleksibilan je i može se saviti za skoro 90° tijekom kopulacijskog vezanja. Penis se pruža kranioventralno i prolazi izvan zdjelice u prepucij.

Penis se sastoji od tri dijela:

- korijen (*radix penis*) koji ima dva kraka (*crura penis*), a koji idu od ishijadičnog luka i spajaju se u trupu penisa.

- trup ili tijelo(*corpus penis*), čini glavninu organa

- glavić (*glans penis*), prošireni slobodni kraj koji je dobro opskrbljen senzornim živcima (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.). Glavić proizlazi iz kavernoznog tijela uretre. Koža koja prekriva glavić je tanka, bez žlijezda i bogato opskrbljena živcima.

Tijekom erekcije, *bulbus* (prva četvrtina) glavića penisa bubri. Tijekom koitusa, vaginalni mišići kuje čvrsto stisnu glavić, ograničavaju protok venske krvi iz erektilnog tkiva što pomaže održavanju erekcije (JOHNSTON i sur., 2001.).

Glavić je dugačak i pruža se po čitavoj dužini kosti. Prednji dio glavića (*pars longa glandis*) je cilindričan, a iza se njega nalazi okruglo proširenje *bulbus glandis*. Iz bulbusa proizlaze dvije dorzalne vene i sjedinjuju se kod ishijadičnog luka. Sa sjedišne kvrge, obostrano, polazi mali mišić (*m. compressor venae dorsalis penis*). Ovaj mišić komprimira dorzalne vene i pomaže pri erekciji penisa i pri kopulaciji.

Penis je sastavljen uglavnom od erektilnog tkiva. Penis psa se u stražnjem dijelu sastoji od dva odvojena kavernozna tijela, a odvaja ih medijani *septum penis*. Penis je građen od dugačkog kavernoznog tijela (*corpus cavernosum penis*) koje prekriva debela vezivno-tkivna kapsula, *tunica albuginea*. Ono započinje s obje strane ishijadičnog luka kao *crus penis* koji je uložen u *m. ischiocavernosus*. Ventralno od ovoga nalazi se kavernozno tijelo uretre (*corpus cavernosum urethrae*), manja struktura koja okružuje izvanzdjeličnu uretru i nastavlja se u *glans penis*. Na korijenu penisa čini proširenje *bulbus urethrae*. Ta dva tijela su spužvaste strukture i podijeljena su u više prostora. Kavernozni prostori su venskog karaktera, pune se iz vena koje dolaze iz prepucija, ispune se krvlju za vrijeme spolnog uzbuđenja i uzrokuju erekciju (SISSON, 1962.).

Dva su bitna mišića povezana sa penisom: ishiokavernozni i erektilni mišić na korijenu penisa. *M. ischiocavernosus* je kratki, snažni, parni mišić koji polazi od sjedne kvrge i okolnih dijelova širokog zdjeličnog ligamenta, a završava na kraku i okolni je dio tijela penisa. Povlači penis prema zdjelici i održava erekciju čineći kompresiju na dorzalne vene penisa. *M. retractor penis* je glatki mišić koji se uzdiže na ventralne površine prvog i drugog repnog kralješka, dijeli se i sastaje ispod anusa. Mišić prolazi duljinom tijela penisa, pričvršćen za tunicu albugineu penisa. Nakon erekcije povlači penis natrag u prepucij (SISSON, 1962.).

4.1.9. Puzdra (*Preputium*)

Prepucij je dvostruka invaginacija kože koja potpuno prekriva slobodni dio neerigiranog penisa. Psi imaju mali prepucij na čijem je kraju otvor iz kojeg penis prolabira. Vanjski otvor zove se *ostium praeputiales*, a na njemu sluznica prelazi u kožu. Izvana se prepucij sastoji od sloja kože, a iznutra od sluznice koja prelazi na sluznicu penisa (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.).

4.2. SPOLNOST

4.2.1. Pubertet i raspolodna zrelost

Pubertetom nazivamo razdoblje u kojem jedinka postaje sposobna imati potomstvo.

Ulazak mužjaka u pubertet ovisan je o pasmini. Psi manjeg rasta sazrijevaju ranije, dok oni većeg rasta u adolescentnu dob i pubertet ulaze i sazrijevaju kasnije. Prosječna dob ulaska u pubertet je 6-8 mjeseci starosti. Spermatogeneza započinje oko 20. tjedna života, a spermiji su u epididimisu prisutni nakon 32. tjedna starosti. Većina pasa će ejakulirati spermije u dobi od 12 mjeseci, no rane ejakulacije mogu biti azospermične. Rasplodna zrelost postiže se u dobi od 18-30 mjeseci, ovisno o pasmini. Istraživanja su pokazala da se reproduktivni kapacitet pasa temelji na njihovoj starosti. Psi starosti 2- 3 godine imaju najveći volumen ejakulata te najveću koncentraciju spermija, stoga se može zaključiti da je upravo to adekvatna dob za kvalitetan rasplod (FILIPČÍK i sur., 2011.). Koncentracija testosterona raste nakon 24. tjedna života, postižući razinu odraslih pasa s otprilike 32 tjedna života (JOHNSTON i sur., 2001.).

Zdravi mužjak može pariti svakih 2-5 dana i time zadržati optimalnu koncentraciju i kvalitetu spermija. Spermatogeneza se u pasa odvija do kraja njihova života, no kako stare, plodnost im opada. Iz tog razloga psi završavaju reproduktivnu dob s 8 do 9 godina starosti.

4.2.2. Libido

Libido ili spolni nagon je ovisan o androgenim steroidnim hormonima koji utječu na agresivno ponašanje mužjaka, parenje i funkciju muškog spolnog sustava.

Spolni život pasa prirodan je i nagonski te dominira u svim fizičkim i psihičkim zbivanjima u organizmu. Spolni nagon predstavlja najjači nagon u životinjskom svijetu. Mužjak nije podložan cikličkim promjenama kao kuja, a njegov se nagon budi se na mirisni podražaj iscjetka kuje koja se tjera (JOHNSTON i sur., 2001.). Spolni nagon mužjaka posljedica je niza hormonalnih i živčanih podražaja koji prouzroče erekciju spolnog uda, opasivanje ženke, kopulaciju i ejakulaciju (SENGER, 2012.). Svrha spolnog ponašanja je produženje vrste.

4.2.3. Spolni refleksi

Spolni refleksi su reakcije organizma na vanjske podražaje koje organizam prima preko osjetilnih organa, a koji preko središnjeg živčanog sustava nadražuju spolne organe i u njima prouzroče refleksni odgovor.

Da bi uopće došlo do spolnog akta, mužjak mora imati prirođene spolne reflekse, a to su: refleks približavanja, refleks erekcije, refleks opasivanja, refleks kopulacije i refleks ejakulacije (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.).

4.3. SPERMA

Sperma (grč. σπέρμα, spérma; lat. semen) mutna je mliječnobijela do blijedožuta tekućina koja se pod određenim uvjetima izbacuje iz sjemenih puteva.

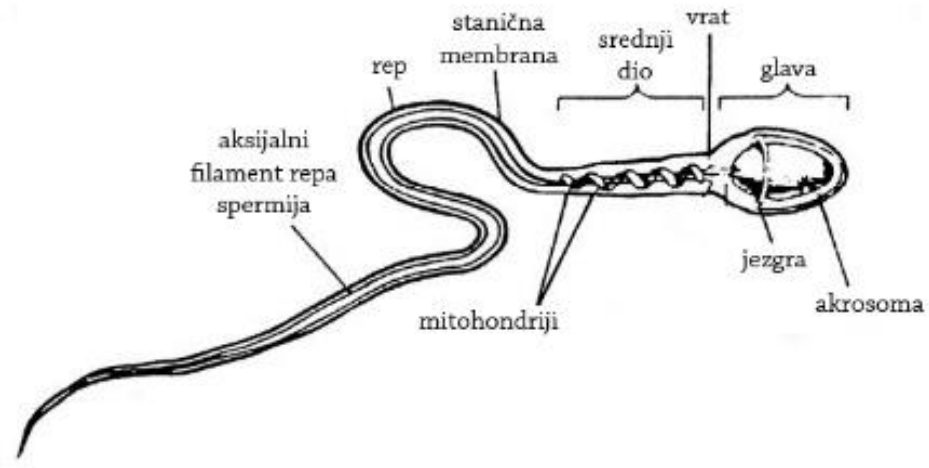
4.3.1. Ejakulat

Ejakulat se stvara od spolne zrelosti do senilnosti ejakulacijom ili polucijom. Ejakulacija nastaje djelomično pražnjenjem sadržaja testisa, epididimisa i prostate.

Ejakulat se sastoji od spermija, epitelnih stanica i sjemene plazme. Sjemena plazma je mješavina sekreta akcesornih spolnih žlijezda, nuzjaja, sjemenovoda i uretre. Sastoji se od staničnih elemenata (spermiji, epitelne stanice, eritrociti, leukociti, lipidna i amiloidna tjelešca, kristalići i granule), a uloga joj je da hrani i štiti spermu, aktivira ju i sudjeluje u transportu. Izotonična je tekućina u kojoj su Na, K, Mg, Ca, Zn, Mn, Cu, kloridi, bikarbonati, fosfati, sulfati, fruktoza, limunska kiselina, alanin, glicin, tirozin, vitamini A, D, E, C, B kompleksa, prostaglandini i razni enzimi, Fe u tragovima (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.). Razumljivo je da ejakulat nije sterilna tekućina, nego je bogata raznovrsnom florom koja je normalan sastavni dio sjemene tekućine, stoga je prije samog sakupljanja sjemena potrebno očistiti prepucij i vrh penisa fiziološkom otopinom (FELDMAN i NELSON, 1996.).

4.3.2. Spermiji

Spermiji su specifične stanice koje ne rastu i ne dijele se. Imaju specifičan oblik, a karakterizira ih mogućnost samostalnog kretanja, sposobnost preživljavanja (i oplodnje) izvan organizma u aerobnim i anaerobnim uvjetima. Imaju malu citoplazmu, što ih razlikuje od drugih stanica (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.).



Slika 2. Građa spermija (Izvor: CERGOLJ, M., M. SAMARDŽIJA (2006))

Građa spermija:

a) Glava je ovalnog oblika i spljoštena dorzoventralno. Njezin asimetričan oblik omogućuje joj pravocrtno i rotacijsko gibanje spermija. Na glavi spermija možemo razlikovati jezgru i citoplazmu. Jezgra (nucleus) ima tanak sloj protoplazme i sadrži kompletan genski materijal. Sastoji se od kromatinam DNK, RNK , bjelančevina te alkalne fosfataze. Prednji dio spermija pokriva akrosoma (nalikuje kapi) koja je bogata enzimima koji mogu razgraditi zonu pellucidu jajne stanice.
b) Srednji dio spermija sastoji se od vrata i tijela. Vrat je kratak i u njemu se nalazi bazalno tjelešce od kojeg polaze dvije aksoneme- centralna i spiralna.
c) Rep je najduži dio spermija, izgleda poput biča. Pokreće spermij brzinom od 4 mm po sekundi. Sadrži centralnu aksonemu koja je u području srednjeg dijela omotana spiralnom mitohondrijskom ovojnicom. Aksonema završava na samom repu poput kista (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.).

4.4. ANDROLOŠKI PREGLED

4.4.1. Reproduktivna anamneza

Pregled rasplodne sposobnosti pasa (engl. *Breeding Soundnes Examination,* BSE) metoda je za ocjenjivanje rasplodnog potencijala (MEMON, 2007.). Princip pregleda temelji se na utvrđivanju značajki pomoću kojih je moguće predvidjeti rasplodni potencijal, no unatoč već utemeljenom mišljenju o pozitivnim stranama te preporukama za korištenje BSE, do sada nije provedeno sveobuhvatno istraživanje koje bi ukazalo na razlike u BSE između plodnih i neplodnih pasa.

Ključne značajke BSE uključuju klinički pregled reproduktivnog sustava, provjeru libida, pregled i ocjenu kvalitete sjemena, endokrinološko testiranje te ultrazvučni pregled reproduktivnog sustava (MEMON, 2007., LOPATE, 2012.).

Prvi korak u pregledu rasplodne sposobnosti je uzimanje reproduktivne anamneze, koja obuhvaća podatke o dosadašnjoj reprodukciji jedinke, uključujući broj parenja, način oplodnje (prirodnim parenjem, umjetnim osjemenjivanjem - vaginalna, transcervikalna ili

kirurška metoda; umjetno osjemenjivanje svježim, ohlađenim ili smrznutim ejakulatom), uspješnost parenja/osjemenjivanja te veličinu legla.

Nakon toga slijedi opći klinički pregled, gdje se osobita pozornost skreće na stanje svakog pojedinog tjelesnog sustava uključujući kožu, oči, srce, pluća, abdomen i mišićno-koštani sustav. Prilikom opće kliničke pretrage rasplodnja katreba uzeti u obzir njegovu dob, spolno iskustvo, kondiciju, temperament i prikrivene bolesti. Tek nakon učinjenog kompletnog kliničkog pregleda slijedi pregled spolnog sustava (SODERBERG, 1986., KOLSTER, 2018.).

4.4.2. Androloški pregled

Androloški pregled uključuje pregled vanjskih spolnih organa, palpaciju testisa, epididimisa, kože skrotuma i sjemenskog užeta te pomičnost testisa u skrotumu. Inspekcijom skrotuma i testisa ocjenjuje se odgovaraju li veličinom dobi i pasmini rasplodnjaka, procjenjuje se simetričnosti lijeve i desne strane skrotuma i eventualno prisustvo patoloških promjena na skrotumu (ekcemi, rane, ozljede, ektoparaziti itd.). Veličina skrotuma i testisa mora odgovarati dobi i pasmini rasplodnjaka, a lijeva i desna strana trebaju biti približno simetrične, bez patoloških promjena (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.).

4.5. ULTRAZVUČNI PREGLED

Anatomska građa i smještaj testisa omogućava jednostavnost i pristupačnost ultrazvučnom pregledu. Ultrazvuk omogućuje prikaz unutrašnjih struktura u testisima i omogućava vizualizaciju eventualnih abnormalnosti.

Ultrazvučni pregled testisa omogućava točnu procjenu oblika, veličine i ehogenosti testisa i epididimisa (ENGLAND, 1991.). Dosadašnji rad utemeljen je na B-mode ultrazvučnom prikazu testisa i prostate (ENGLAND, 1991., SOUZA i sur., 2017.). Analizom digitalne slike ultrazvuka opisujemo ehogene i heterogene karakteristike testisa i prostate te ih uspoređujemo s ostalim parametrima koji sudjeluju u procjeni kvalitete sjemena (MOXON i sur., 2015.). Testis psa je ehogen s homogenom, osrednjom ehostrukturom. Parijetalna i visceralna tunika tvore tanki hiperehogeni periferni eho.

Medijastin testisa vidljiv je kao ehogena centralna linearna struktura srednjeg podužnog smjera, a u srednjem poprečnom smjeru kao centralni žarišni eho. Za izravnu usporedbu svaki se testis zasebno može oslikati u poprečnom i dorzalnom smjeru. Rep epididimisa je slabije ehogen u odnosu na parenhim testisa. Glava i tijelo epididimisa skoro su izoehogeni s testisom. Zdrava prostata u mladih i nekastriranih pasa srednje dobi ima skoro homogenu sliku, srednje do fine strukture. Različite je ehogenosti, a režnjevi se ne mogu pojedinačno razlučiti. U podužnoj slici prostata je okrugla do ovalna (ŠEHIĆ i sur., 2006.).

Ultrazvuk se nadalje koristi i kao zlatni standard u usporedbi raznih tehnika mjerenja. Ipak, pojedini autori (PALTIEL i sur., 2002.) ukazali su na razne varijabilnosti u ultrazvučnim procjenama koje ovise o kliničaru koji obavlja taj pregled i formulama koje koristi. U nedavno provedenom eksperimentalnom istraživanju na psima zaključeno je da je najpreciznija Lambertova empirijska formula za određivanje volumena testisa: dužina (L) x širina (W) x visina (H) x 0,71 (LAMBERT, 1951., HSIEH i sur., 2009.).

4.6. POLUČIVANJE EJAKULATA

Polučivanje ejakulata i njegova pretraga sastavni je dio pregleda rasplodnih pasa. S obzirom da kvaliteta ejakulata izravno utječe na reproduktivni potencijal pasa, razvile su se i brojne metode za analizu kakvoće ejakulata. Sjeme se uzima neposredno nakon ultrazvučnog pregleda tehnikom manualne fiksacije penisa, uz ili bez prisutnosti kuje (ENGLAND, 1999.). Razumljivo, odsustvo kuje može negativno utjecati na broj spermija.

Najčešće korištena metoda za uzimanje ejakulata je manualna fiksacija penisa (FARSTAD, 2010., JOHNSTON i sur., 2001., LINDE FORSBERG, 2005.). Idealni uvjeti za uzimanje ejakulata stvaraju se uz prisutnost kuje u estrusu koja uzbuđuje mužjake (MARKS i sur., 1994.). Pas se dovede sa stražnje strane kuje i omogući mu se njušenje stidnice što dovodi penis u stanje erekcije. Uzimanje sjemena u psa se provodi u stabilnom stojećem položaju, a nikako na klizavom podu ili stolu. Osoba koja uzima ejakulat treba prići mužjaku po mogućnosti s lijeve strane, ako je dešnjak, a zatim izvući penis gurajući prepucij dorzalno preko bulbusa. Ostane li bulbus u prepuciju, jaka erekcija stvara kod psa izrazitu bol. Pritiskom na penis, naročito na području neposredno iznad bulbusa pojača se erekcija i pas poslije nekoliko koitalnih pokreta počne ejakulirati (BLENDINGER, 2007.).

Nakon završenog polučivanja ejakulata, psa se može udaljiti od kuje pri čemu treba paziti da ne ozlijedi erigirani penis. Velike pasmine znatno bolje reagiraju na masažu penisa od malih pasmina. Psi ejakuliraju frakcionirano u 3 međusobno odvojene frakcije. Lučenje prve frakcije započinje vrlo brzo nakon vidnijeg bubrenja glansa i traje 30-ak sekundi. Volumena je 0,2 do 2 mL i gotovo ne sadrži spermije. Druga, spermom bogata frakcija obično se sakuplja zajedno s prvom frakcijom, izbacivanje traje 1-2 minute, sivo bijele je boje te volumena 1-3 mL. Izbacuje se kada je dosegnut vrhunac erekcije. Treća frakcija potječe iz prostate i najvećeg je volumena, 30- 40 mL, što ovisi o održavanju dovoljnog pritiska proksimalno od bulbusa penisa. Izbacivanje treće frakcije traje 5-30 minuta (GÜNZEL-APEL, 1994; JOHNSTON i sur., 2001). Treća frakcija je najbolji pokazatelj prisutnosti bolesti prostate.

Idealni razmak između uzimanja ejakulata je 2 do 5 dana, dok razmak veći od 10 dana može rezultirati povećanjem broja morfoloških abnormalnosti i smanjenjem pokretljivosti spermija (FRESHMAN, 2002., JOHNSTON i sur., 2001.).

4.7. METODE OCJENJIVANJA KVALITETE EJAKULATA

Spermij je složena stanica prilagođena transportu i njegova glavna uloga je predaja muškog genoma jajnoj stanici u ženskom reproduktivnom sustavu. Upravo zbog svoje složenosti, ne postoji jedan test koji će pružiti potpuni uvid u oplodni potencijal ejakulata, već je potrebno kombinirati više testova (IOANA i sur., 2012.).

Kod procjene kvalitete sjemena treba uzeti u obzir starost psa (HESSER i sur., 2017.) jer se u mladih, kao i u starih pasa, u ejakulatu može naći veći postotak patoloških spermija.

Odmah po uzimanju ejakulata čini se provjera čistoće ejakulata, zatim makroskopska i mikroskopska ocjena te određivanje gustoće ejakulata. Ocjena sjemena važan je dio u ocjenjivanju plodnosti mužjaka i trebala bi se obaviti rutinski prije uzgojnog ispitivanja. Sjeme je potrebno ocijeniti prije umjetnog osjemenjivanja ili pohrane. Sjeme treba pregledati odmah nakon uzimanja uzorka te pažljivo s njime rukovati tijekom svih postupaka. Brza promjena temperature može biti štetna za gibljivost i strukturu spermija te može utjecati na rezultate ocijene. Svako kašnjenje u ocjeni sjemena može smanjiti postotak pokretljivih spermija i istovremeno povećati postotak mrtvih spermija. Zato je

poželjno svu opremu za uzimanje sjemena čuvati na 37°C (CHRISTIANSEN, 1984.; FELDMAN i NELSON, 1996.; LINDE-FORSBERG, 1991.).

Ocjena sjemena uključuje određivanje izgleda i volumena ejakulata, koncentracije, pokretljivosti i postotka morfološki normalnih spermija.

4.7.1. Makroskopska ocjena

Boja. Boja ejakulata ovisi o volumenu treće frakcije, koncentraciji spermija i mogućoj prisutnosti stranih primjesa u ejakulatu. Bistri, prozirni uzorak ejakulata ne sadrži spermije, dok zamućeni ili mliječno bijeli uzorak sjemena vjerojatno sadrži. Normalna boja cjelokupnog ejakulata je sivkasto-bijela. Žuta boja ejakulata indicira prisutnost urina u uzorku kojeg proučavamo. Zeleno-siva je tipična za prisutnost gnoja u sjemenu. Crvena ili smeđa boja ukazuju na prisutnost krvi u uzorku ejakulata (JOHNSTON i sur., 2001). Najčešći uzrok pronalaska krvi u ejakulatu su bolesti prostate ili traume u području penisa (ROOT KUSTRITZ, 2007.). Bilo koja kontaminacija isključuje uzorak iz postupaka pohrane sjemena i umjetnog osjemenjivanja.

Volumen. Volumen ejakulata nije indikator kvalitete sjemena. Ipak, potrebno ga je mjeriti kako bi se mogao izračunati ukupan broj spermija u ejakulatu. Volumen je različit, a ovisi o tome koliko je sekreta prostate skupljeno, te naravno o veličini psa. Raspon volumena kreće se od < 2 do > 20 ml, ali uglavnom je oko 5 mL (BLENDINGER, 2007.). Smanjeni volumen sjemena dobije se u slučajevima benigne hiperplazije prostate, cista prostate, upalnih lezija prostate i testisa, upale epididimisa, sjemenovoda ili uretre i kod slabog libida (PAYAN-CARREIRA i sur., 2011.).

pH. Vrijednost pH utvrđuje se stavljanjem kapi sjemena na indikator papir. Normalne vrijednosti su u rasponu od 6,5 do 7,0. Promjene pH mogu upućivanti na upalu prostate (OLSON, 1984.).

4.7.2. Mikroskopska ocjena

Pokretljivost. Pokretljivost spermija je manifestacija strukturne i funkcionalne osobitosti spermija, iako postotak progresivne pokretljivosti uglavnom pozitivno korelira s integritetom plazmine membrane (KUMI- DIAKA, 1993., RODRIGUEZ- GIL i sur.,

1994.). Mužjake optimalnog reproduktivnog potencijala karakterizira proizvodnja visokog broja progresivno pokretljivih, vitalnih i morfološki normalnih spermija (AROKIA i sur., 2016.). Pokretljivost se treba ocijeniti neposredno nakon uzimanja ejakulata. Optimalna temperatura za ocjenu pokretljivosti pseće sperme je 37-39° C. Kap sjemena stavi se na zagrijanu predmetnicu i prekrije pokrovnicom te pregledava pod povećanjem od x200 i x400. Ako je spermom bogata frakcija visoko koncentrirana, sjeme treba razrijediti do koncentracije koja omogućuje pregled spermija pojedinačno. Visoko koncentrirani uzorci mogu se razrijediti sa sekretom prostate, fosfatnom puferskom soli ili 2,9% otopinom natrijeva citrata (BLENDINGER, 2007.). Ocjenjivanje pokretljivosti temelji se na procjeni prosječnog postotka progresivno pokretljivih spermija u nekoliko različitih vidnih polja. Normalno sjeme psa sadrži 7 - 90% progresivno pokretljivih spermija, iako postotak može biti manji nakon duže seksualne apstinencije (JOHNSTON i sur., 2001., IGUER- OUADA i VERSTEGEN, 2001., GÜNZEL-APEL, 1994., FELDMAN i NELSON, 1996.). Pokretljivost je u pozitivnoj korelaciji s integritetom membrane spermija i normalnom morfologijom (JOHNSTON i sur., 2001.).

Morfologija spermija. Razmazi nerazrijeđenog ejakulata mikroskopski se pregledavaju radi utvrđivanja strukturnih abnormalnosti spermija. Kapljica svježeg, nerazrijeđenog sjemena stavi se na predmetnicu te prekrije s pokrovnicom. Morfologija se najčešće ocjenjuje bojanjem sjemena i gledanjem pod povećanjem x1000. Najčešće se koristi bojanje po Giemsa-Wrightu (DiffQuick), eozin/nigrozin i Spermac® (OETTLE, 1993.). Prilikom morfološke ocjene treba ocijeniti abnormalnosti glave, srednjeg dijela i repa svakog spermija. Abnormalnosti uključuju odvojene glave, prevelike i premale glave, čvoraste akrosome, odvojene akrosome, proksimalne i distalne citoplazmatske kapljice, zavinut srednji dio, savijen rep, repove čvrsto namotane preko srednjeg dijela i proksimalno namotane repove (BLENDINGER, 2007.). Abnormalnosti se klasificiraju u primarne, nastale tijekom spermatogeneze i sekundarne, koje su nastale tijekom sazrijevanja ili pripreme uzoraka (OETTLE i SOLEY, 1988.). Prema drugim klasifikacijama, abnormalnosti spermija se mogu podijeliti u značajne nedostatke koji su u negativnoj korelaciji sa plodnošću te u manje nedostatke nepovezane s plodnosti (OETTLE, 1993.). Ukupan postotak abnormalnosti trebao bi biti < 10 - 20% (FELDMAN i NELSON, 1996., FRESHMAN, 2001., PURSWELL i sur., 1992.)

Koncentracija i ukupan broj spermija. Koncentracija spermija u sjemenu se određuje se elektronskim brojačem čiji rezultat predstavlja broj spermija u mililitru ejakulata. Uređaj je

prije svake upotrebe potrebno kalibrirati. Ejakulat se u svrhu određivanja koncentracije treba razrijediti tako da se u kiveti pomiješa 0,9%-tna otopine NaCl sa nativnim sjemenom, a kiveta se zatim stavlja na očitanje. Rezultat predstavlja broj spermija u mililitru ejakulata. Ukupan broj spermija u ejakulatu dobiva se umnoškom volumena i koncentracije ejakulata (ENGLAND, 1999.). On bi trebao biti > 200 x 10^6, odnosno veći od 400 x 10^6 u velikih pasa (BLENDINGER, 2007.).

Koncentracija spermija u sjemenu također se određuje citometričkom metodom, u hemocitometru, kao što su Thoma, Thoma-Neu, Bürker ili Neubauer komore, sa sjemenom razrijeđenim 1:200. Kako bi se odredio broj spermija po ml, broj spermija u jednom ili četiri kvadrata (ovisno o komorici) množi se sa 500 000. Broj spermija x 10^6 je koncentracija spermija/ml. (PAYAN-CARREIRA i sur., 2011.). Koncentracija spermija u ukupnom ejakulatu zdravog psa obično prelazi 80 x 10^6 spermija/ml. Smatra se da broj pokretljivih spermija potreban za uspješno umjetno osjemenjivanje treba iznositi > 150 x 10^6 (LINDE–FORSBERG, 1991.).

Velike su razlike ukupnog broja spermija po ejakulatu u različitih pasmina. Broj varira između 50 x 10^6 sve do 1575 x 10^6 spermija (LINDE–FORSBERG, 1991., OETTLE, 1993.). Male pasmine ne proizvode puno spermija kao velike jer je proizvodnja spermija ovisna o masi testikularnog tkiva. Kod njih je volumen ejakulata i ukupan broj spermija relativno nizak (< 100 x 10^6 spermija/mL). Broj spermija u ejakulatu varira i o dobi, veličini psa i seksualnoj aktivnosti (AMANN, 1986.). Ukupan broj spermija u ejakulatu može biti smanjen u mladih i starijih pasa.

Vitalnost spermija. Vitalnost spermija procjenjuje se na temelju broja onih s intaktnom plazmatskom membranom. Test hipoosmotskog bubrenja (HOS test) procjenjuje funkcionalni integritet plazmine membrane spermija čime ukazuje na oplodnu sposobnost spermija. Tijekom HOS testa spermiji su izloženi hipoosmotskoj otopini. Spermiji s intaktnom membranom bubre zbog priljeva tekućine u stanicu pa dolazi do savijanja njihova repa (SILVA i GADELLA, 2006., MOCÉ i GRAHAM, 2008., ZELLI i sur., 2013.). Osim HOS testom, integritet membrane moguće je utvrditi supravitalnim bojenjem po Bloom-u. Određivanje postotka živih i mrtvih spermija temelji se na pretpostavci da mrtvi spermiji imaju raspadnutu staničnu membranu koja propušta eozin. Prema tome, postotak eozin pozitivnih spermija obojanih s eozin/nigrozin bojom smatra se postotkom

mrtvih stanica (DOBRANIĆ i sur., 2005.). Normalno sjeme psa sadrži maksimalno 30% mrtvih spermija (PAYAN-CARREIRA i sur., 2011.).

4.8. NAPREDNE METODE OCJENJIVANJA SJEMENA

Ocjena psećeg sjemena do sada se rutinski izvodila tehnikama konvencionalnog svjetlosnog mikroskopa. Ograničenja ovih metoda su subjektivnost, promjenljivost, analiziran mali broj spermija te loša korelacija s plodnošću. U posljednjem desetljeću uvedeno je nekoliko novih *in vitro* tehnika za ocjenu psećeg ejakulata, koje omogućuju detaljniju procjenu više karakteristika spermija. Ocjena sjemena konvencionalnim svjetlosnim mikroskopom sada se zamjenjuje tehnikama fluorescentnog bojanja, kompjutorskom analizom sperme (CASA) i protočnom citometrijom.

Fluorescentno bojanje. Metoda fluorescentnog bojanja koristi se za ocjenjivanje integriteta membrane, procjenu živih i mrtvih stanica te mitohondrijski status. Kombiniranom upotrebom nekoliko fluorescentnih boja (npr. propidium jodid PI i karboksifluorescein diacetat SYBR-14) omogućava se identifikacija živih stanica. Žive stanice fluoresciraju, što se održava u intaktnoj membrani stanica. Mrtvi spermiji su obojeni crveno zbog prolaska propidij jodida kroz oštećenu membranu (RIJSSELAERE i sur., 2005., HEWITT i ENGLAND, 1998., PEŃA i sur., 1998.; SILVA i GADELLA, 2006.)

Kompjutorska analiza sperme (CASA). Za objektivnu procjenu pokretljivosti spermija koristi se računalni sustav za analizu sjemena (engl. *Computer Assisted Semen Analysis*, CASA). Mogućnosti koje pruža CASA su određivanje parametara motilnosti za spermije pojedinačno, karakterizacija motilnosti spermija prema prosječnoj brzini, putanji i amplitudi kretanja te frekvenciji križanja. No, glavni nedostaci ove metode su visoka financijska ulaganja i potreba za standardizacijom i provjerom valjanosti sistema prije svake upotrebe (IGUER-OUADA i VERSTEGEN, 2001., SMITH i ENGLAND, 2001.).

Test vezanja zone pellucide (ZBA). Za utvrđivanje potencijalne plodnosti spermija koristi se test vezanja zone pellucide (engl. *Zona Pellucida Binding Assay*). Za izvođenje testa koriste se intaktne homologne jajne stanice, ZBA (*ZP- binding assay*) ili prepolovljene hemizone, HZA (*hemizona binding assay*). Broj spermija vezan za zonu pellucidu broji se pod fazno-kontrastnim mikroskopom. Broj vezanih spermija označava se kao broj plodnih

spermija (HERMANSSON i sur., 2006., KAWAKAMI i sur., 1998., RIJSSELAERE i sur., 2005., STRÖM-HOLST i sur., 2001.)

5. MATERIJALI I METODE

Fakultetsko vijeće Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu temeljem članka 31. Statuta Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, na prijedlog Povjerenstva za etiku u veterinarstvu, na 16. redovitoj sjednici održanoj 21. veljače 2018. godine donijelo je odluku da se odobrava provođenje ovog istraživanja (klasa 640-01/18-17/04, ur. broj 251-61-44/168-18-02).

5.1. DIZAJN ISTRAŽIVANJA I POSTUPAK SA ŽIVOTINJAMA

Istraživanje je provedeno na 16 spolno zrelih vojnih rasplodnih i radnih pasa u vlasništvu Ministarstva obrane Republike Hrvatske. Psi su dio sastavnice Pukovnije Vojne policije, Satnije za obuku vodiča i službenih pasa „Satnik Krešimir Ivošević“. Prema namjeni raspodijeljeni su u dvije kategorije: zaštitno-tragačku (obuka traje šest mjeseci) i detekciju eksploziva (obuka traje sedam mjeseci). Različitih su dobnih kategorija, starosti od 1 do 9 godina, tjelesne mase u rasponu od 23,5 do 36,5 kg. Jedan je pas dokazane plodnosti, dok ostali nisu nikada bili pareni. Istraživanje je provedeno na mužjacima pasmina njemačkog (8), belgijskog (7) i nizozemskog ovčara (1). Od ukupnog broja, 12 pasa držano je u boksu vojarne, a 4 u redovitoj pratnji vodiča u obitelji.

Psi su podijeljeni u 2 dobne kategorije: psi mlađi od 2 godine i psi stariji od 2 godine. U grupi pasa mlađe dobne kategorije 4 belgijska ovčara starosti 12 mjeseci te 3 njemačka ovčara starosti 16 mjeseci, bili su iz istog legla. Prosječna dob pasa mlađe dobne kategorije (<2 godine) iznosila je 1,24 ± 0,19 godina i kretala se u rasponu od 12 do 16 mjeseci, s prosječnom tjelesnom masom od 30,12 ± 0,52 kg. U grupi zrelih pasa (>2 godine) prosječna dob je iznosila 6,26 ± 2,48 godina i kretala se u rasponu od 3,5 do 9 godina, s prosječnom tjelesnom masom 33,21 ± 0,64 kg.

Svi su psi hranjeni komercijalnom suhom hranom (Eukanuba^{TM} Premium Performance) za odrasle pse u obliku briketa. Uredno su cijepljeni protiv bjesnoće i zaraznih bolesti. Istraživanje je provedeno u razdoblju od 4 tjedna, a psi su uvijek

pregledavani u isto vrijeme (između 9.00 i 11.00 sati) da bi se izbjegao utjecaj cirkadijskog ritma na cirkulaciju.

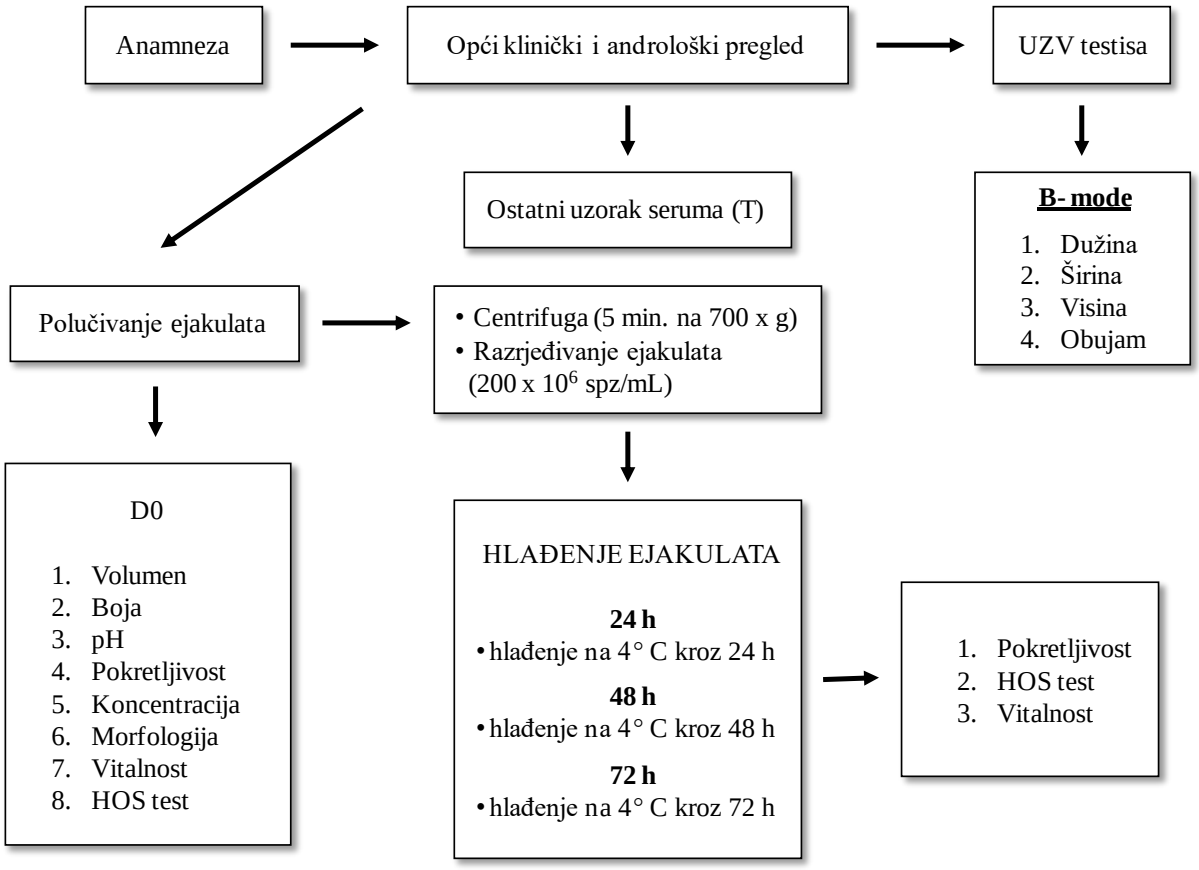
5.2. KLINIČKI I ANDROLOŠKI PREGLED

U sklopu općeg kliničkog i androloškog pregleda uzeta je opsežna anamneza o namjeni, kondiciji te temperamentu psa, kao i o načinu držanja životinja te dosadašnjem korištenju u rasplodu. U tu je svrhu korišten jednoobrazni obrazac za andrološku pretragu.

Tjelesna kondicija pasa ocijenjena je na skali od 1 do 9 inspekcijom i palpacijom rebara, lumbalnih kralježaka, zdjeličnih kostiju i korijena repa (LAFLAMME, 1997.). Tjelesna masa određena je vaganjem životinja. Opći klinički pregled obuhvaćao je uzimanje vrijednosti trijasa, sluznice konjunktiva, nosa i ustiju te palpaciju limfnih čvorova.

Androloška pretraga obuhvaćala je inspekciju i palpaciju vanjskih spolnih organa: prepucij, sluznicu prepucija i glansa penisa te pomičnost penisa u prepuciju. Prilikom palpacije skrotuma posebna se pažnja obraćala na veličinu, simetričnost, temperiranost, konzistenciju testisa i repa epididimisa te pomičnost testisa u skrotumu.

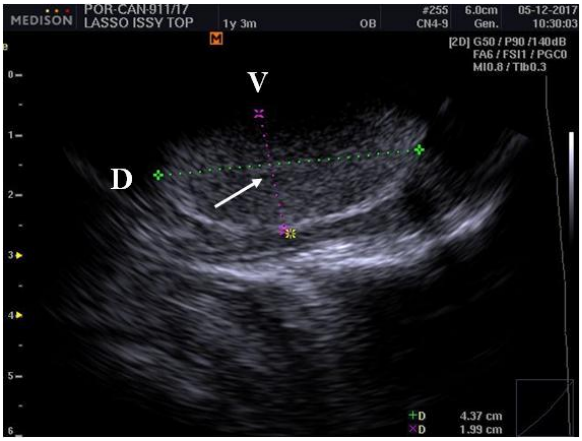
Shematski prikaz dizajna istraživanja reproduktivnog potencijala rasplodnih i radnih pasa MORH-a prikazan je na slici 1.



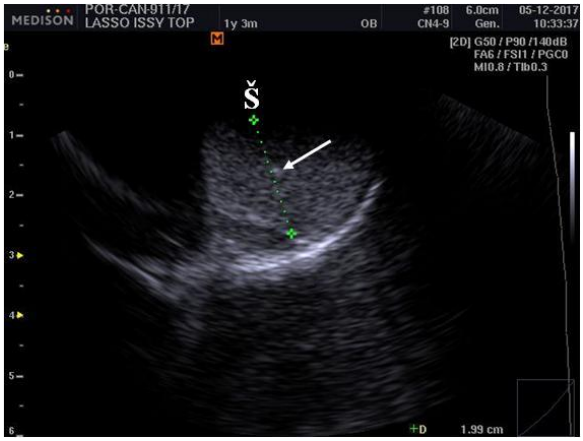
Slika 3. Shematski prikaz dizajna istraživanja rasplodne sposobnosti pasa. T: testosteron

5.3. ULTRAZVUČNI PREGLED

Ultrazvučni pregled testisa, epididimisa i prostate učinjen je s pomoću ultrazvučnog uređaja SONOVET R5 (Samsung Medison, J. Koreja) s mikrokonveksnom sondom od 4 do 9 MHz-a za B-oblik (svjetlosni oblik) u realnom vremenu te dvodimenzionalni prikaz protoka krvi (Power Doppler). Sve su preglede obavila 2 operatera. Postavke aparata ustanovljene su prilikom prvog pregleda u skladu s najboljom kvalitetom slike i ostale su nepromijenjene za sve preostale preglede koji su provedeni u razdoblju od 4 tjedna. Testisi i epididimisi pregledani su na psima u stojećem stavu, a za ultrazvučni pregled prostate psi su stavljeni u leđni položaj. Svakom testisu izmjerena je po 3 puta dužina (*D*) i visina (*V*) u sagitalnoj projekciji te širina, (*Š*) u transverzalnoj projekciji te je određena srednja vrijednost za svaku od vrijednosti. Medijastin testisa je bio referentna točka za svaku od projekcija: u transverzalnom presjeku medijastin se vidi kao centralno ehogeno žarište (slika 3), a u sagitalnom kao ehogena linearna struktura u centralnom dijelu testisa (slika 2.). Na zamrznutoj i pohranjenoj slici pomoću pomične mjerke izračunata je svaka od navedenih vrijednosti. Zabilježena je ehostruktura i homogenost te eventualne promjene u strukturi testisa. Volumen testisa određen je prema Lambertovoj empirijskoj formuli: obujam = *D* x *V* x *Š* x 0,71 (LAMBERT, 1951., HSIEH i sur., 2009.).



Slika 4. UZV mjerenje dužine (D) i visine (V) testisa u sagitalnoj projekciji. Strelicom je označen medijastin testisa



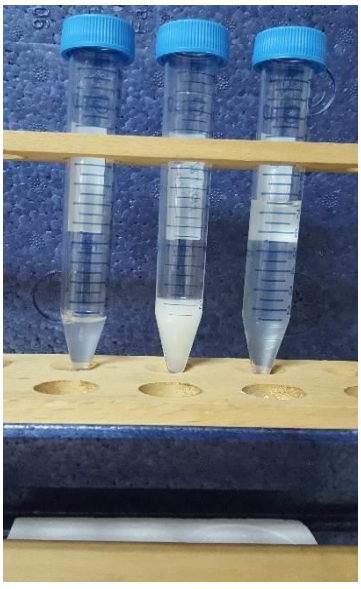
Slika 5. UZV mjerenje širine (Š) testisa u transverzalnoj projekciji. Strelicom je označen medijastin testisa

5.4. UZIMANJE EJAKULATA

Uzorci ejakulata uzeti su u tihoj i izoliranoj prostoriji Klinike za porodništvo i reprodukciju, uz prisustvo vodiča ili poznatog službenika MORH-a. Prije svakog polučivanja ejakulata, psima je omogućeno prethodno upoznavanje prostora u kojem se nalaze, uz igru s vodičem (SCHUBERT i SEAGER, 1991.). U svrhu lakšeg postizanja erekcije psi su olfaktorno stimulirani obriscima vaginalnog sekreta kuja u estrusu, radi ispoljavanja spolnog nagona. Ejakulat je polučen u stabilnom stojećem položaju psa, s lijeve strane (SEAGER, 1986., JOHNSTON i sur., 2001., FRESHMAN, 2002.). Uzimanje ejakulata započeto je nježnim masiranjem bulbusa penisa preko prepucija. Kada je seksualno uzbuđenje naraslo te posljedično došlo do erekcije penisa i bulbusa glandisa, prepucij je povučen natrag preko bulbusa, prije postizanja pune erekcije. Na taj način spriječena je pojava boli, nepotpuna ejakulacija i osigurano je da bulbus ne ostane zaglavljen u prepuciju. Čvrstim pritiskom iza bulbusa glandisa omogućen je nastavak ejakulacije. Sjeme je skupljano u frakcijama, u zasebne 15 mL epruvete (Falcon™, SAD) spojene s lijevkom (MiniTube™, Njemačka). Nakon prestanka ejakulacije i detumescencije, psima je pregledan prepucij kako bi bili sigurni da se penis adekvatno vratio u svoj položaj unutar prepucija.



Slika 6. Polučivanje ejakulata



Slika 7. Frakcije ejakulata

5.5. OCJENA EJAKULATA

Pregled druge, spermom bogate frakcije ejakulata učinjen je odmah po prikupljanju sjemena, a obuhvaćao je provjeru čistoće i volumena, zatim makroskopsku i mikroskopsku procjenu te određivanje koncentracije spermija u ejakulatu. Volumen druge frakcije ejakulata određen je pomoću graduirane epruvete. Boja, konzistencija i miris procijenjeni su organoleptički. Očitavanje pH obavljeno je pomoću indikator papira na koji je stavljena kapljica sjemena. Ukupno i progresivno gibanje spermija procijenjeno je subjektivno pomoću binokularnog fazno-kontrastnog mikroskopa (Olympus BX51, Tokyo, Japan) s grijanim postoljem (37 °C). Kapljica sjemena volumena 10 µL stavljena je na zagrijanu predmetnicu i prekrivena zagrijanom pokrovnicom. Uzorci su pregledani pod povećanjem 200 x (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.). Postupak ocjenjivanja pokretljivosti temelji se na procjeni prosječnog postotka progresivno pokretljivih spermija u nekoliko različitih vidnih polja. Pri tome su se zbrajali samo spermiji koji su se gibali progresivno. Prosudba progresivne gibljivosti spermija izražena je u postotcima (%).

5.5.1. Ocjena integriteta stanične membrane spermija

Integritet stanične membrane spermija određen je testom hipoosmostskog bubrenja (HOS 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.

5.5.2. Metoda supravitalnog bojanja spermija po Bloom-u

Radi određivanja vitalnosti i morfologije 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 mješavinom sjemena i eozina. Napravljen je tanki razmaz pomoću predmetnice s brušenim rubom. Nakon sušenja brojano je 200 spermija pod imerzijskim povećanjem mikroskopa (1000X, Olympus CX 21, Tokyo, Japan). Postotak spermija s neobojenim glavama iskazan je kao postotak živih spermija. S obzirom da ova

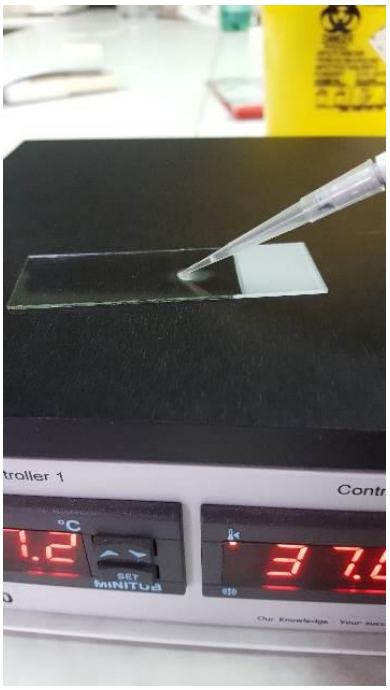
metoda omogućuje vizualizaciju glave, akrosome, središnjeg dijela i repa spermija, razlikovani su morfološki normalni od patoloških oblika, a patološki su oblici svrstani u 4 kategorije, ovisno o mjestu oštećenja (glava, srednji dio, rep te nezreli spermiji). Broj patološki promijenjenih spermija iskazan je u postotcima (%).

5.5.3. Koncentracija i ukupan broj spermija

Koncentracija spermija u drugoj frakciji (broj spermija u 1 mL ejakulata) određena je elektronskim brojačem (AccuRead, IMV Technologies, Francuska). Uređaj je prije svake upotrebe kalibriran. Ejakulat se u svrhu određivanja koncentracije razrijedio tako da se u kiveti pomiješa 3960 µL 0,9%-tne otopine NaCl i 40 µL nativnog sjemena, a kiveta se zatim stavlja na očitanje, a rezultat predstavlja broj spermija u mililitru ejakulata. Ukupan broj spermija u ejakulatu dobiven je umnoškom volumena i koncentracije ejakulata (ENGLAND, 1999.).



Slika 8. Elektronski brojač spermija



Slika 9. Grijano postolje za ocjenu progresivne pokretljivosti

5.5.4. Preživljavanje ohlađenog sjemena

Nakon inicijalne ocjene, druga frakcija sjemena centrifugirana je kroz 5 minuta na 700 x g, nakon čega je uklonjen nadtalog. U talog sjemena dodan je razrjeđivač za ohlađeno sjeme do konačne koncentracije od 200 x 10^6 spz/mL. Kao razrjeđivač korišten je CaniPlus Chill (Minitube, Tiefenbach, Njemačka) uz dodatak 20% žumanjka. Epruveta s razrijeđenim sjemenom stavljena je u staklenu čašu napunjenu vodom sobne temperature i sve je zajedno pohranjeno u hladnjak na 4° C kroz 3 dana (LOJKIĆ i sur., 2012.). Voda u staklenoj čaši osiguravala je postepeno hlađenje spermija kako bi se izbjegao temperaturni šok i eventualne varijacije u temperaturi tijekom razdoblja pohrane sjemena. Pokretljivost, vitalnost i integritet membrane ocjenjeni su nakon 24 (T24), 48 (T48) i 72 sata (T72), kao što je prethodno opisano.

5.5.5. Određivanje razine testosterona

Razina testosterona određena je iz ostatnih uzoraka seruma. Krv je uzeta u sklopu općeg kliničkog pregleda pasa, centrifugirana na 3500 okretaja/min kroz 10 min i pretočena u Eppendorpf posudice te su uzorci pohranjeni u hladnjaku na -20 °C tijekom 2 do 6 tjedana. Razina testosterona u serumu pasa izmjerena je komercijalnim kitom VIDAS® Testosterone (BioMerieux, Francuska), koji koristi ELFA metodu (Enzyme Linked Fluoroscent Assay). Princip testa je kombinacija dvostupanjskog sendvič enzimskog imunotesta s krajnjim očitavanjem fluorescencije.

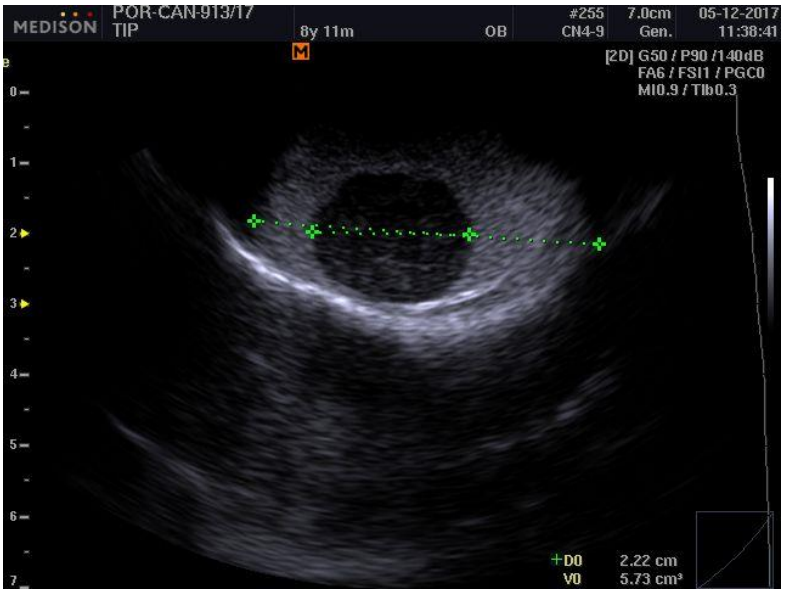
5.6. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

Statistička analiza podataka učinjena je pomoću programskog paketa SAS 9.4 (Statistical Analysis Software 2002-2012 by SAS Institute Inc., Cary, SAD). Deskriptivna statistika napravljena je pomoću modula PROC MEANS i PROC FREQ.

Dob pasa je kategorizirana u dvije skupine: skupina 1 (<2 godina), skupina 2 (>2 godine). 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 pomoću BOX-COX transformacije. Analiza varijance je upotrjebljena za kvantitativne varijable (PROC MIXED) te je u analizu uključen fiksni efekt skupine te slučajni efekt životinje. Proporcije su analizirane pomoću procedure GLIMMIX s binomialnom distribucijom i funkcijom logit link. Rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti najmanjih kvadrata (LSM - least squares means) i standardna pogreška. Za usporedbu srednjih vrijednosti korištena je Tukey-Kramer-ova metoda usporedbi na razini statističke značajnosti $p<0,05$. Podatci su nakon analize, ukoliko su bili transformirani, obrnutom transformacijom vraćeni na originalne vrijednosti i one su kao takve prikazane u tablicama. Korelacije su rađene pomoću procedure CORR (Pearson i Spearman koeficijent korelacije) te su prikazane u tablici samo one gdje je koeficijent korelacije (r) bio veći od 0,80 za parametre kvalitete nativnog ejakulata nakon polučivanja te ako je bio veći od 0,70 za parametre kvalitete ejakulata nakon pohrane na 4 °C.

6. REZULTATI

Od ukupnog broja pasa (n=16) 7 ih je bilo starijih od 2 godine (u rasponu od 3,5 do 9 godina), a 9 je pasa bilo starosti od 1 do 2 godine. Nakon obavljenog općeg kliničkog pregleda te pregleda vanjskih spolnih organa i ultrazvuka testisa, iz grupe pasa starije dobne kategorije, isključena su 2 psa: zbog pododermatitisa i promjena na sluznici usta u njemačkog ovčara starog 4,5 godine te dijagnosticiranog tumora testisa kod belgijskog ovčara starog 9 godina. Kod tog je psa inspekcijom i palpacijom testisa utvrđena asimetrija lijevog i desnog testisa, a promijenjeni je testis bio tvrđe elastične konzistencije. Rendgen prsnog koša i abdomena nije pokazao meta promjene, a svi su hematološki i biokemijski parametri bili u normalnim granicama. Taj je pas zbog ultrazvučno dijagnosticiranog tumora testisa podvrgnut kastraciji te je patohistološkom pretragom utvrđeno da se radilo o seminomu testisa (slika 8).



Slika 10. Seminom testisa u 9-godišnjeg belgijskog ovčara

Polučivanje ejakutata bilo je uspješno u svih preostalih pasa starijih od 2 godine (n=5). U pasa mlađih od 2 godine nismo uspjeli polučiti ejakulat kod 2 psa starosti 12 mjeseci zbog slabog libida i zaigranosti te je u toj dobnoj kategoriji ejakulat uspješno polučen od 7 pasa (n=7).

6.1. Rezultati ultrazvučnog pregleda testisa i prostate te određivanja razine testosterona u serumu pasa različitih dobnih kategorija

Prosječna dob pasa po kategorijama, tjelesna masa te širina, dužina, visina i obujam testisa utvrđenih ultrazvučnim pregledom u 3 mjerenja prikazani su u tablici 1. Prosječna vrijednost obujma testisa bila je statistički značajno veća u pasa starije dobne kategorije, kod kojih je i tjelesna masa bila statistički značajno veća u odnosu na mlade pse ($p<0,05$).

Tablica 1. Prikaz srednje vrijednosti i standardne pogreške tjelesne mase te obujma, širine, dužine, visine testisa u pasa mlađe (< 2 godine) i starije (> 2 godine) dobne kategorije

parametar		mean±std	testis				
		godine	masa (kg)	obujam (cm^3)	širina (cm)	dužina (cm)	visina (cm)
skupina	< 2 god	1,24±0,19	30,12±0,52*	14,90±0,72*	2,15±0,04*	4,14±0,04	2,32±0,05*
	> 2 god	6,26±2,48	33,21±0,64*	20,25±0,89*	2,55±0,05*	4,15±0,05	2,61±0,06*

*statistička značajnost između uzoraka na razini $p<0,05$

Obujam testisa iznosio je 14,90 ± 0,72 cm^3 kod pasa mlađih od 2 godine, dok je kod starijih pasa iznosio 20,25 ± 0,89 cm^3. Ove statistički značajne razlike pratili su prosječna širina i visina testisa ($p<0,05$), dok je prosječna dužina testisa bila podjednaka u mlađih i starijih pasa. Prema rezultatima, obujam testisa pozitivno korelira sa širinom ($r=0,89$, $p<0,0001$) i visinom testisa ($r=0,90$, $p<0,0001$). Tjelesna masa i dob pozitivno koreliraju s obujmom testisa i veličinom prostate.

Prosječne vrijednosti veličine prostate te razina testosterona u serumu pasa mlađe i starije dobne kategorije prikazani su u tablici 2.

Tablica 2. Prikaz srednje vrijednosti i standardne pogreške parametara prostate i testosterona u pasa mlađe (< 2 godine) i starije (> 2 godine) dobne kategorije

parametar		godine	prostata		testosteron (ng/ml)
		mean±std	širina (cm)	dužina (cm)	
skupina	< 2 god	1,24±0,19	1,86±0,08*	2,15±0,09*	4,84±1,23
	> 2 god	6,26±2,48	2,63±0,11*	2,92±0,13*	7,38±1,43

*statistička značajnost između uzoraka na razini $p<0,05$

Veličina prostate bila je značajno veća u pasa starije dobne kategorije u odnosu na mlade pse ($p<0,05$). Kod jednog psa starosti 9 godina ustanovljena je benigna hipertrofija prostate.

Razina testosterona u serumu bila je viša u pasa starije dobne kategorije (7,38 ± 1,43 ng/mL), iako bez statistički značajne razlike, zato što je postojala velika varijabilnost razine testosterona u pasa mlađe dobne kategorije koja se je kretala od 0,96 do 10,19 ng/mL (CI* 95% 2,14-7,54).

6.2. Rezulatati ocjene ejakulata u pasa različitih dobnih kategorija

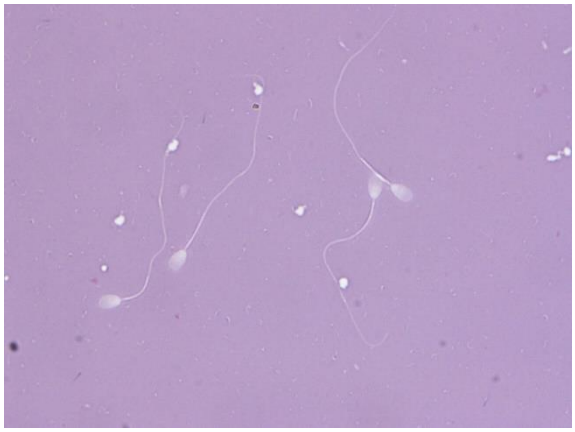
Rezultati ocjene polučenog ejakulata u pasa mlađe (<2 godine) i starije (>2 godine) dobne kategorije prikazani su u tablici 3. Ukupni volumen ejakulata iznosio je kod pasa mlađih od 2 godine 3,02 ± 1,48 mL, dok je kod starijih pasa iznosio 6,92 ± 1,55 mL ($p<0,05$). Koncentracija spermija po mL i ukupna koncentracija spermija u ejakulatu bila je značajno veća u pasa starijih od 2 godine ($p<0,05$) dok je udio živih spermija bio statistički značajno veći u pasa mlađih od 2 godine ($p<0,05$). Slika 9 i 10 prikazuju žive (neobojane) i mrtve (crveno obojane) spermije. Statistički značajne, negativne korelacije zabilježene su između dobi pasa i progresivne pokretljivosti ($r= - 0,61$, $p<0,05$), integriteta membrane (HOS test) ($r= - 0,7$, $p<0,0001$) i normalne morfologije ($r= - 0,32$, $p<0,01$).

Tablica 3. Prikaz srednje vrijednosti i standardne pogreške parametara ocjene ejakulata u pasa mlađe (< 2 godine) i starije (> 2 godine) dobne kategorije

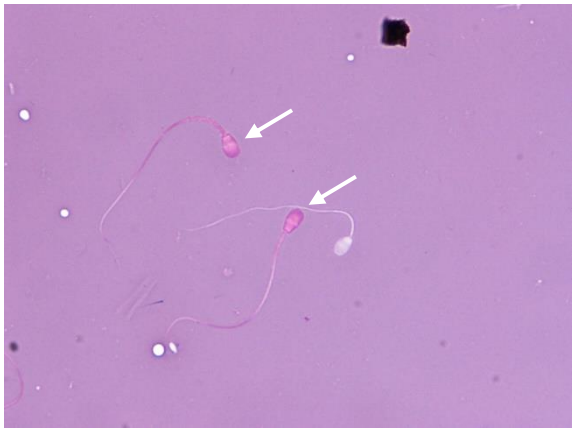
parametar	volumen (ml)	pH	koncentracija spermija (10^6/mL)	ukupna koncentracija spermija (10^6)	progresivna pokretljivost spermija (%)	udio živih spermija (%)	
						HOS	BLOOM
<2 god	3,02±1,48*	6,21±0,15	210,0±0,02*	591,9±0,08*	76,43±0,02	0,95±0,004*	0,93±0,01*
>2 god	6,92±1,55*	6,32±0,17	411,2±0,02*	976,5±0,08*	75,00±0,03	0,89±0,006*	0,86±0,02*

*statistička značajnost između uzoraka na razini $p<0,05$

*CI=confidence interval



Slika 11. Živi spermiji normalne morfologije



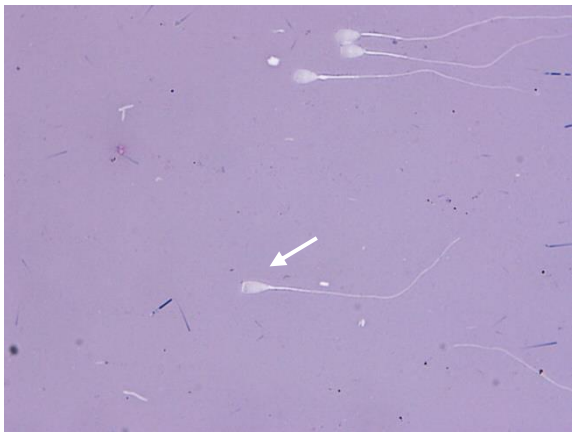
Slika 12. Mrtvi, crveno obojeni spermiji (strelica)

Morfološke karakteristike ejakulata prikazane su u tablici 4. Dob pasa utjecala je na udio morfološki normalnih spermija u ejakulatu, gdje je u pasa mlađe dobne kategorije taj udio bio značajno veći (87,29 ± 0,008%) u odnosu na pse starije dobne kategorije (82,20 ± 0,011%, $p<0,05$). Abnormalnosti glave i srednjeg dijela spermija značajno su veći u pasa starijih od 2 godine u odnosu na mlađe pse ($p<0,05$). Neke morfološke abnormalnosti spermija obojenih po Bloom-u prikazane su na slikama 11-18.

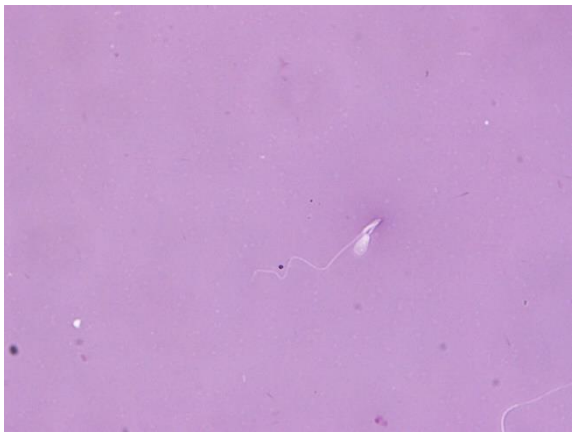
Tablica 4. Prikaz srednje vrijednosti i standardne pogreške morfoloških karakteristika ejakulata u pasa mlađe (< 2 godine) i starije (> 2 godine) dobne kategorije

parametar	udio normalnih spermija %	abnormalnost glave %	abnormalnost repa %	abnormalnost srednjeg dijela %	protoplazmatska kapljica %
<2 god	87,29±0,008*	2,29±0,002*	5,14±0,007	3,86±0,004*	6,43±0,01
>2 god	82,20±0,011*	3,60±0,003*	3,20±0,006	6,00±0,006*	5,20±0,01

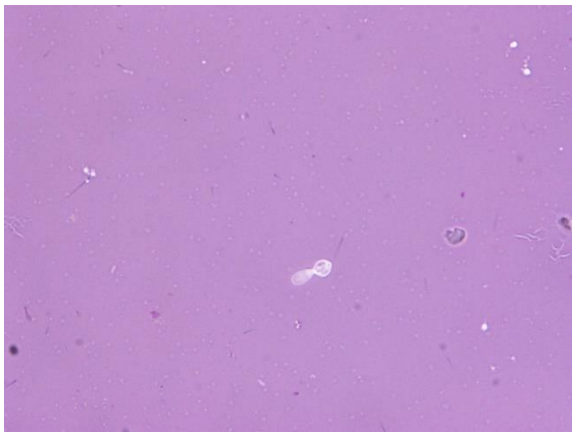
*statistička značajnost između uzoraka na razini $p<0,05$



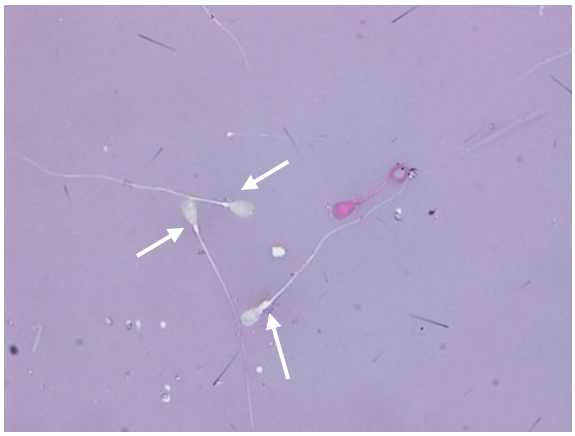
Slika 13. Sužena glava



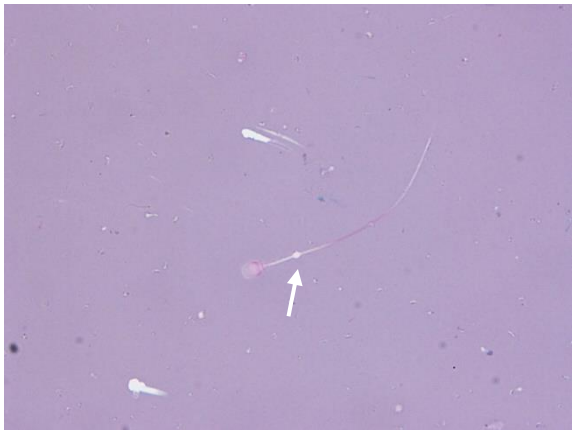
Slika 14. Prelomljen srednji dio



Slika 15. Nabiranje i zavrnuće srednjeg dijela spermija tzv. *dag defect*



Slika 16. Proksimalna protoplazmatska kapljica



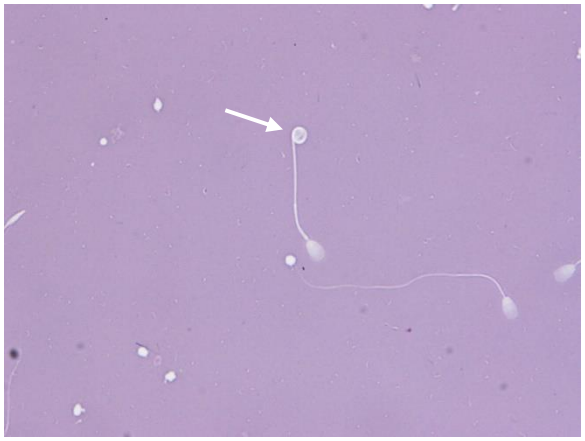
Slika 17. Distalna protoplazmatska kapljica



Slika 18. Dvostruki rep



Slika 19. Presavijen distalni dio repa



Slika 20. Zavrnuti distalni dio repa

Tablica 5 prikazuje postotak pokretljivih i vitalnih spermija nakon perioda pohrane na 4 °C kroz 24, 48 i 72 sata. Iako dob pasa nije značajno utjecala na progresivnu pokretljivost spermija, vidljivo je da je u pasa starijih od 2 godine pokretljivost značajno padala kroz period pohrane od 72 sata ($p<0,05$), dok je u pasa mlađih od 2 godine taj pad

bio neznatan. Pad vitalnosti zabilježen je u obje dobne kategorije kroz period pohrane od 72 sata ($p<0,05$).

Tablica 5. Prikaz srednje vrijednosti i standardne pogreške pokretljivosti, vitalnosti i integriteta membrane spermija ocjenjenih 24 (T24), 48 (T48) i 72 sata (T72) nakon pohrane na 4 °C

parametar		vrijeme (sati)	godine	kakvoća ejakulata		
				pokretljivost (%)	udio živih spermija (%)	
			mean±std		HOS	BLOOM
skupina	< 2 god	24	1,24±0,19	66,0±3,2	84,8±1,8[a]	82,8±2,2[a]
	> 2 god		6,26±2,48	70,0±3,1[a]	84,6±1,9[a]	85,2±2,1[a]
skupina	< 2 god	48	1,24±0,19	63,0±3,3	78,2±2,1[ab]	77,0±2,4[ab]
	> 2 god		6,26±2,48	64,0±3,3[ab]	77,0±2,2[b]	77,0±2,4[b]
skupina	< 2 god	72	1,24±0,19	60,0±3,3	72,2±2,3[b]	70,6±2,6[b]
	> 2 god		6,26±2,48	56,0±3,4[b]	68,0±2,4[c]	66,6±2,7[c]

[abc]statistička značajnost između vremena unutar iste skupine na razini $p<0,05$

Statistički značajne korelacije postoje između pokretljivosti, HOS testa i rezultata metode supravitalnog bojanja spermija po Bloom-u nakon hlađenja. Pokretljivost nakon perioda pohrane na 4 °C pozitivno korelira s progresivnom pokretljivošću nativnog sjemena ($r=0,79$, $p=0,006$), HOS testom ($r=0,79$, $p<0,0001$) i Bloom testom ($r=0,80$, $p<0,0001$). Porast jedne varijable prati rast druge varijable. Statistički značajne korelacije između širine, visine i obujma testisa, ukupne i progresivne pokretljivosti te pokretljivosti i vitalnosti spermija nakon pohrane ejakulata na 4 °C prikazane su u tablici 6.

Tablica 6. Statistički značajne korelacije između širine, visine i obujma testisa, ukupne i progresivne pokretljivosti te pokretljivosti i vitalnosti spermija nakon pohrane ejakulata na 4 °C.

Parametar	širina testisa	visina testisa	obujam testisa	ukupna pokretljivost spermija	progresivna pokretljivost	pokretljivost nakon otapanja	HOS test nakon otapanja	BLOOM test nakon otapanja
širina testisa		n.s.	r=0,89 p<0,0001	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
visina testisa	n.s.		r=0,90 p<0,0001	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
obujam testisa	r=0,89 p<0,0001	r=0,90 p<0,0001		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
ukupna pokretljivost spermija	n.s.	n.s.	n.s.		r=0,90 p<0,0001	n.s.	n.s.	n.s.
progresivna pokretljivost	n.s.	n.s.	n.s.	r=0,90 p<0,0001		r=0,79 p=0,006	n.s.	n.s.
pokretljivost nakon otapanja	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	r=0,79 p=0,006		r=0,79 p<0,0001	r=0,80 p<0,0001
HOS test nakon otapanja	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	r=0,79 p<0,0001		r=0,98 p<0,0001
BLOOM test nakon otapanja	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	r=0,80 p<0,0001	r=0,98 p<0,0001	

7. RASPRAVA

Poznato je da mnogi čimbenici utječu na kvalitetu i koncentraciju spermija u ejakulatu, uključujući vrstu i pasminu životinja, dob, hranidbu, opće zdravstveno stanje, način držanja i korištenja životinja, temperaturu okoliša, klimu i sl. Veliki je broj uzgajivačnica pasa, no da bi uzgajivačnica bila uspješna, psi moraju proizvoditi dovoljnu količinu kvalitetnog ejakulata sposobnog za oplodnju (FILIPČÍK i sur., 2011.). Pravilna morfologija i pokretljivost spermija ključni su čimbenici za oplodnju jajne stanice koje kvalitetan rasplodni pas mora zadovoljiti jer su ti su parametri izravno povezani s plodnošću pasa.

Ultrazvučna pretraga testisa omogućava točno i dosljedno određivanje veličine i obujma testisa te se može rutinski koristiti za ocjenu rasplodne sposobnosti mužjaka. Isto tako, predstavlja vrijedno dijagnostičko sredstvo za utvrđivanje različitih patoloških stanja testisa i prostate. U našem smo istraživanju kod pasa starijih od 2 godine uočili statistički značajno veći obujam testisa, uz isto tako značajno veći volumen ejakulata te koncentraciju spermija u ejakulatu. ENGLAND i sur. (2016.) nisu utvrdili povezanost između volumena testisa, heterogenosti i subjektive ehogenosti tkiva testisa s kvalitetom polučenog ejakulata. Nasuprot tome, ZELLI i sur. (2013.) te MOXON i sur. (2015.) pokazali su da mjerenje ehogenosti i heterogenosti testisa u kombinaciji s mjerenjem protoka krvi testisa mogu poslužiti za predviđanje kvalitete sjemena i ocjenu rasplodne sposobnosti pasa. SOUZA i sur. (2017.) također su ustanovili pozitivnu korelaciju između obujma testisa, tjelesne mase pasa i volumena ejakulata s ukupnom koncentracijom spermija u ejakulatu zdravih pasa.

Testosteron ima važnu ulogu u spermatogenezi i ispoljavanju spolnih refleksa u mužjaka, pa mjerenje razine testosterona u serumu omogućava indirektan uvid u funkciju testisa. Naši rezultati istraživanja prosječne razine testosterona u serumu pokazali su da je ona bila viša u pasa starije dobne kategorije (7,38 ± 1,43 ng/mL), iako bez statistički značajne razlike, zato što je postojala velika varijabilnost razine testosterona u pasa mlađe dobne kategorije. Prosječna razina testosterona kretala se unutar referentnih vrijednosti karakterističnih za pse (MARTINS i sur., 2006.). Ovi su istraživači isto tako utvrdili da je razina testosterona u tropskom području (Brazil) ovisna o godišnjem dobu te da je najviša u proljeće i u jesen, a najniža tijekom ljeta. Brojna istraživanja pokazala su da dob ne utječe na razinu testosterona u pasa (BERRY i sur., 1986., LOWSETH i sur., 1990.).

MINTER i DELIBERO (2008.) utvrdili su da je razina serumskog testosterona kod kojota u Sjedinjenim Američkim Državama bila najviša tijekom siječnja, a najniža u listopadu te da je bila u pozitivnoj korelaciji s volumenom testisa koji su najveći obujam (20,24 ± 5,4 cm^2) imali tijekom veljače, a najmanji (3,9 ± 0,7 cm^2) tijekom mjeseca srpnja. Isto tako, utvrdili su pozitivne korelacije visoke razine testosterona i većeg volumena testisa s većim volumenom i boljom kvalitetom ejakulata kojota polučenog elektrostimulacijom. Ovi se rezultati mogu objasniti činjenicom da su kojoti sezonska vrsta koja se pari krajem zime i početkom proljeća, no kuje su monoestrična poliovulatorna vrsta koja nije ovisna o sezoni. Sukladno tome, ALBRIZIO i sur. (2013.) nisu utvrdili statistički značajne razlike između razine serumskog testosterona i parametara kvalitete ejakulata tijekom godine, ali su utvrdili statistički značajnu razliku razine testosterona u sjemenoj plazmi koja je bila najviša tijekom listopada, a najniža u travnju. Nasuprot tome, progresivna pokretljivost spermija bila je u negativnoj korelaciji s razinom testosterona u sjemenoj plazmi te je bila najviša u ožujku i travnju te stoga smatraju da je pas kao vrsta na taj način zadržao reprodukcijski obrazac svojih predaka i da je to mehanizam koji omogućuje da dođe do oplodnje u vrijeme kada su okolišni uvjeti najbolji za odgoj mladunčadi.

Morfologija, pokretljivost i vitalnost spermija predstavljaju parametre koji nam pružaju uvid u kvalitetu ejakulata te pomoću kojih možemo otkriti poremećaje testisa i epididimisa. Tijekom istraživanja, na osnovi laboratorijske ocjene ejakulata, utvrdili smo da postoji statistički značajna razlika u volumenu ejakulata između pasa mlađe i starije dobne kategorije. MAJIĆ BALIĆ i sur. (2012.) su u istraživanju provedenom na bikovima simentalske pasmine mlađe i starije dobne kategorije pokazali da su stariji bikovi imali veći volumen ejakulata u odnosu na mlađe, dok se koncentracija spermija nije razlikovala između ovih dviju grupa. Prosječna vrijednost volumena ejakulata u našem istraživanju u pasa mlađih od 2 godine iznosi 3,02 ± 1,48 mL, dok prosječan volumen ejakulata pasa starijih od 2 godine iznosi 6,92 ± 1,55 mL. Obzirom da u dostupnoj literaturi postoji nekoliko studija u kojima su psi, kao i u našem modelu istraživanja, podijeljeni u dobne kategorije neophodno je dobivene rezultate ovog istraživanja usporediti s dostupnima iz literature. FILIPČIK i sur. (2011.) su proveli istraživanje među populacijom njemačkih ovčara i time potvrdili da je volumen ejakulata veći u starijih pasa te da među psima mlađe i starije dobne kategorije postoji statistički značajna razlika. U svojim rezultatima opisali su da je prosječan volumen ejakulata pasa starosti od 1,5-2 godine 6,00 ± 1,48 mL, u pasa starosti od 2-3 godine je 11,05 ± 4,31 mL, a u pasa starosti od 3-5 godina iznosi 8,00 ±

2,35 mL. Volumen ejakulata ponajprije ovisi o količini sekreta prostate koji se izluči tijekom treće frakcije ejakulacije. U pasa starije dobne kategorije prostata je bila značajno veća, što je vjerojatno utjecalo i na volumen ejakulata. Veći volumen ejakulata pasa starije dobne skupine može se povezati i s većom tjelesnom masom pasa iste dobne kategorije. U našim rezultatima može se vidjeti da dob i tjelesna masa značajno koreliraju s volumenom ejakulata, postotkom normalnih spermija, koncentracijom spermija i ukupnim brojem spermija u ejakulatu, što je u suglasju s drugim istraživanjima (AMAN, 1986., RIJSSELAERE i sur., 2007.). Ovi rezultati pokazuju da je proizvodnja sjemena u pasa ovisna o količini funkcionalnog tkiva testisa, a koje je veće u većih pasa (OLAR i sur., 1983.), kao što pokazuju i naši rezultati ultrazvučnog mjerenja testisa.

U humanoj medicini obavljen je cijeli niz istraživanja kojima se povezuje utjecaj dobi na funkciju testisa, dnevnu proizvodnju spermija (JOHNSON i sur., 1984., MATOSKA i TALERMAN, 1989.) i kvalitetu ejakulata (SCHWARZ i sur., 1983.). Nasuprot tome, u veterinarskoj medicini postoji mnogo manje studija objavljenih na tu temu. Ta istraživanja objašnjavaju da porastom dobi psa opada postotak morfološki normalnih spermija, što istodobno nema učinak na pokretljivost spermija (HENDRIKSE i ANTONISSE, 1984., RIJSSELAERE i sur., 2007., BHANMEECHAO i sur., 2018.). U pasa od 1 do 11 godina starosti PŘINOSILOVÁ i sur (2005.) su primijetili da se pokretljivost spermija kreće od 35 do 95%, uz prosječnu vrijednost od 77%. I naše istraživanje pokazalo je da nema statistički značajnih razlika u pokretljivosti spermija između dobnih kategorija. U rezultatima smo prikazali da je pokretljivost spermija pasa mlađe dobne kategorije 76,43 ± 0,02%, dok je u starijoj dobnoj kategoriji pasa taj postotak iznosio 75,00 ± 0,03%. Isto tako, u pasa mlađe dobne kategorije nađen je statistički značajno veći udio normalnih spermija (87,29 ± 0,008%), nego u pasa starije dobne kategorije (82,20 ± 0,011%). Patološki promijenjeni spermiji uočeni su u većem postotku u starijih pasa. Radi se o uočenim statistički značajnim razlikama u smislu abnormalnosti glave spermija pasa mlađih od 2 godine (2,29 ± 0,002%) i pasa starijih od 2 godine (3,60 ± 0,003%). Isto tako, primijećena je statistički značajna razlika među abnormalnostima srednjeg dijela spermija mlađe dobne kategorije (3,86 ± 0,004%) i starije dobne kategorije (6,00 ± 0,006%). ROTA i sur. (2016.) u svom istraživanju ističu da je udio normalnih spermija u mlađih pasa mnogo veći (68,6%) u odnosu na starije pse (44,0%), što je u skladu s rezultatima našeg istraživanja. Isti autori navode veći udio abnormalnosti srednjeg dijela i proksimalnih citoplazmatskih kapljica u starijih pasa. Udio proksimalnih

citoplazmatskih kapljica u našem istraživanju nije se značajno razlikovao između dvije dobne skupine, čak je u mlađih pasa bio neznatno veći, vjerojatno radi činjenice što su u mlađoj dobnoj skupini 2 psa bila starosti 12 mjeseci, što za veliku pasminu poput njemačkog ovčara znači da pas nije postigao punu rasplodnu zrelost. U istoj je skupini zabilježena i manja koncentracija testosterona, što može upućivati na još nepotpunu funkciju epididimisa. Negativan utjecaj dobi na morfološke karakteristike spermija može biti posljedica poremećene spermatogeneze (LOSWETH i sur., 1990.) ili degeneracije testisa (CAMARA i sur., 2014.), čime se objašnjava pad plodnosti pasa iza sedme godine života (JOHNSTON i sur., 2001.).

Kvaliteta sperme ocjenjivana je pomoću progresivne pokretljivosti te strukturalne i funkcionalne cjelovitosti membrane spermija. HOS test koristi se u procjeni integriteta membrane spermija u brojnih vrsta (CORREA i ZAVOS, 1994., NIE i WENZEL, 2001.), pa tako i pasa (DOBRANIĆ i sur., 2005., KRAGER i sur., 2016.). GOERICKE – PESCH i FAILING (2012.) izvijestili su da su spermiji s intaktnom membranom u pozitivnoj korelaciji s progresivnom pokretljivosti i normalnom morfologijom. ZELLI i sur. (2013.) dobili su negativne korelacije između ovih parametara i HOS pozitivnih spermija. Naše istraživanje pokazalo je značajne, vrlo jake, pozitivne korelacije između HOS testa i pokretljivosti spermija nakon pohrane na 4 °C ($r= 0,79$, $p<0,0001$), zatim između HOS testa i supravitalnog bojenja ($r= 0,98$, $p<0,0001$), te između pokretljivosti nakon pohrane i supravitalnog bojenja ($r= 0,80$, $p<0,0001$). To je očekivano jer pokretljivost spermija djelomično ovisi o funkcionalnoj cjelovitosti membrane, a djelomično i o drugim biokemijskim aktivnostima poput metabolizma spermija. Slične rezultate u svom istraživanju dobili su DOBRANIĆ i sur. (2005.) koji su utvrdili značajne, vrlo jake, pozitivne korelacije između HOS testa i progresivne pokretljivosti te supravitalnog bojenja. Dugoročno preživljavanje spermija tijekom pohrane na 4 °C omogućuje bolji uvid u kvalitetu ejakulata i mogućnost međunarodne trgovine kvalitetnim genetskim materijalom. Kada se spermiji ohlade na 4 °C, njihova oplodna sposobnost zbog usporenog metabolizma ostaje očuvana tijekom dužeg vremenskog razdoblja (AMANN i PICKETT, 1987.). Iako prema brojnim istraživanjima sperma pohranjena na 4 °C može preživjeti i do 20 dana, a kuje uspješno koncipirati 7-11 dana nakon polučivanja ejakulata (TSUTSUI, 2003., VERSTEGEN i sur., 2005.), spermiji zadržavaju optimalnu plodnost 48-96 sati nakon polučivanja (TSUTSUI, 2003.). Naše je istraživanje pokazalo da dob pasa nije značajno utjecala na progresivnu pokretljivost spermija tijekom vremena pohrane od

24, 48 i 72 sata. Unatoč očekivanom padu pokretljivosti u obje dobne skupine s porastom vremena pohrane, pokretljivost, a pogotovo vitalnost sjemena bili su visoki, što potvrđuje da je ejakulat ovih pasa visokog rasplodnog potencijala. VERSTEGEN i sur. (2005.) dokazali su da pokretljivost, odnosno nepokretljivost spermija ne predstavlja vjerodostojan kriterij u procjeni oplodne sposobnosti spermija nakon pohrane, jer nepokretni spermiji mogu povratiti pokretljivost u mediju bogatom glukozom.

Zaključno, ovo je istraživanje pokazalo da dob i tjelesna masa značajno utječu na obujam testisa, a time i volumen ejakulata te koncentraciju i morfologiju spermija. Povezivanje *in vivo* plodnosti u pasa s kvalitetom sjemena teško je radi ograničenog broja parenja, tj. umjetnog osjemenjivanja, s obzirom na specifičnosti spolnog ciklusa kuja. Upravo zato, nužno je uključiti niz pretraga, od kliničkih do laboratorijskih, kako bi dobili potpuni uvid u reproduktivni potencijal pasa te za rasplod odabrali najkvalitetnije pse. Rezultati ocjene polučenog ejakulata vojnih rasplodnih i radnih pasa MORH-a pokazali su da je ejakulat ovih pasa visokog rasplodnog potencijala i prikladan za pohranu i međunarodnu trgovinu kvalitetnim genetskim materijalom.

8. ZAKLJUČCI

Iz rezultata dobivenih ovim istraživanjem možemo zaključiti:

Dob i tjelesna masa pasa značajno utječu na obujam testisa, a time i volumen ejakulata te koncentraciju i morfologiju spermija. Volumen ejakulata ovisan je o količini sekreta prostate koji se izluči tijekom treće frakcije ejakulacije, zbog čega je u pasa starije dobne kategorije koji su imali veću prostatu i volumen ejakulata bio veći.

Dob pasa utjecala je i na udio vitalnih spermija te morfološki normalnih spermija u ejakulatu te je u pasa mlađe dobne kategorije taj udio bio značajno veći u odnosu na pse starije dobne kategorije. Abnormalnosti glave i srednjeg dijela spermija značajno su veći u pasa starijih od 2 godine u odnosu na mlađe pse.

Kvaliteta sjemena nakon pohrane kroz 72 sata bila je vrlo dobra u obje dobne skupine, što je pokazalo da su ejakulati ovih pasa visokog reproduktivnog potencijala i prikladni za pohranu i međunarodnu trgovinu genetskim materijalom.

Kako je povezivanje *in vivo* plodnosti u pasa s kvalitetom sjemena teško radi ograničenog broja parenja, tj. umjetnog osjemenjivanja, s obzirom na specifičnosti spolnog ciklusa kuja, nužno je uključiti niz pretraga, od kliničkih do laboratorijskih, kako bi dobili potpuni uvid u reproduktivni potencijal pasa te za rasplod odabrali najkvalitetnije pse.

9. POPIS LITERATURE

1. ALBRIZIO, M., M. SINISCALCHI, R. SASSO, A. QUARANTA (2013): Effects of the environment on dog semen parameters and testosterone concentration. Theriogenology 80, 800-804.
2. AMANN, R. P. (1986): Detection of alterations in testicular and epididymal function in laboratory animals. Environ Health Perspect. 70, 149-158.
3. AMANN, R. P., B. W. PICKET (1987): Principles of cryopreservation and review of cryopreservation of stallion spermatozoa. J. Equi. Vet. Sci. 7, 145-173.
4. AROKIA, R. M., G. JAYAPRAKASH, M. PAWSHE, T. TAMILMANI, M. SATHIYABARATHI (2016): Collection and evaluation od canine semen. Int. J. Sci. Environ. Tech. 5, 1586-1595.
5. ASPINALL, V. (2004): Anatomy and Physiology of the Dog and Cat II. The Male Reproductive System, pp. 200-204.
6. BERRY, S. J., D. S. COFFEY , J. D. STRANDBERG , L. L.EWING (1986): Effect of age, castration, and testosterone replacement on the development and restoration of canine benign prostatic hyperplasia. The Prostate 9, 295-302.
7. BHANMEECHAO, C., S. SRISUWATANASAGUL, N. PRAPAIWAN, S. PONGLOWHAPAN (2018): Reproductive aging in male dogs: The epididymal sperm defects and expression of androgen receptor in reproductive tissues. Theriogenology 108, 74-80.
8. BLENDINGER, K. (2007): Collection and evaluation of the semen in the dog. Proceedings of the SCIVAC Congress, Rimini, Italy, pp. 83-84.
9. CAMARA, L. B. R. M., D. R. CAMARA, F. C. MAIORINO, V. A. SILVA JUNIOR, M. M. P. GUERRA (2014): Canine testicular disorders and their influence on sperm morphology. Anim Reprod. 11, 32-36.
10. CERGOLJ, M., M. SAMARDŽIJA (2006): Veterinarska andrologija. Veterinarski fakultet, Sveučilita u Zagrebu.
11. CHIPKEVITCH, E., R. T. NISHIMURA, D. G. TU, M. GALEA-ROJAS (1996): Clinical measurement of testicular volume in adolescents: comparison of the reliability of 5 methods. J. Urol. 156, 2050-2053.

12. CHRISTIANSEN, I. J. (1984): Reproduction in the Dog & Cat. Bailliere Tindall, London, pp. 225-262.
13. CORREA, J. R., P. M. ZAVOS (1994): The hypoosmotic swelling test: Its employment as an assay to evaluate the functional integrity of the frozen-thawed bovine sperm membrane. Theriogenology 42, 351-360.
14. DIAMOND, D. A., H. J. PALTIEL, J. DICANZIO, D. ZURAKOWSKI, S. B. BAUER (2000): Comparative assessment of pediatric testicular volume: orchidometer versus ultrasound. J. Urol. 164, 1111-1114.
15. DOBRANIĆ, T., M. SAMARDŽIJA, M. CERGOLJ, N. PRVANOVIĆ (2005): Determination of membrane integrity of canine spermatozoa. Vet. arhiv 75, 23-30.
16. ENGLAND, G. C. W. (1991): Relationship between ultrasonographic appearance, tesicular size, spermatozoal output and testicular lesions in the dog. J. Small Anim. Pract. 32, 306-311.
17. ENGLAND, G. C. W. (1999): Semen quality in dogs and influence of a short interval second ejaculation. Theriogenology 52, 981-986.
18. ENGLAND, G. C. W., L. BRIGHT, B. PRITCHARD, I. M. BOWEN. M. B. de SOUZA, L. D. M. SILVA, R. MOXON (2016): Canine reproductive ultrasound examination for predicting future sperm quality. Reprod. Domest. Anim. 51 (Suppl. 3), 1-6.
19. FARSTAD W.K. (2010) Artificial insemination in dogs, In BSAVA Manual of Canine and Feline Reproduction and Neonatology, 2nd edition, England G. and von Heimendahl A. (Eds). British Small Animal Veterinary Association ISBN 978-1905319190, Gloucester, UK
20. FELDMAN, E. C., R. W. NELSON (1996): Canine and Feline Endocrinology and Reproduction. W.B. Saunders Comp., ISBN 978-0721636344, Philadelphia.
21. FILIPČÍK, R., M. VÁGENKNECHTOVÁ, M. HOŠEK, L. JARINKOVIČOVÁ (2011): The effect of the age of dogs on their ejaculate. Acta Univ. Agric. Silvic. Mendel. Brun. 3, 45-50.
22. FRESHMAN, J. L. (2002): Semen collection and evaluation. Clin. Tech. Small Anim. Pract. 17, 104-107.
23. GOERICKE-PESCH, S., K. FAILING (2012): Retrospective Analysis of Canine Semen Evaluations with Special Emphasis on the use of the Hypoosmotic Swelling (HOS) Test and Acrosomal Evaluation Using Spermac®. Reprod. Domest. Anim. 48, 213-217.

24. GÜNZEL-APEL, A. R. (1994): Fertilitätskontrolle und Samenübertragung beim Hund. Enke/Gustav Fischer Verlag, ISBN 3-334-60512-4, Jena.
25. HENDRIKSE, J., H. W. ANTONISSE (1984): Evaluation of canine semen. Tijdschr Diergeneeskd 109, 171-174.
26. HERMANSSON U., S. PONGLOWHAPAN, C. LINDE-FORSBERG, B. STRÖM-HOLST (2006): A short sperm-oocyte incubation time ZBA in the dog. Theriogenology 66, 717-725.
27. HESSER, A., C. DARR, K. GONZALES, H. POWER, T. SCANLAN, J. THOMPSON, C. LOVE, B. CHRISTENSEN, S. MEYERS (2017): Semen evaluation and fertility assessment in a purebred dog breeding facility. Theriogenology 87, 115-123.
28. HEWITT D. A., G. C. ENGLAND (1998): An investigation of capacitation and the acrosome reaction in dog spermatozoa using a dual fluorescent staining technique. Anim. Reprod. Sci. 51, 321-332.
29. HSIEH, M. L., S. T. HUANG, H. C. HUANG, Y. CHEN, Y. C. HSU (2009): The reliability of ultrasonographic measurements for testicular volume assessment: comparison of three common formulas with true testicular volume. Asian J. Androl., 261–265.
30. IGUER-OUADA, M., J.P. VERSTEGEN (2001): Evaluation of the "Hamilton Thorn computer-based automated system" for dog semen analysis. heriogenology. Theriogenology 55, 733-49.
31. IGUER-OUADA, M., J.P. VERSTEGEN (2001): Manipulation of canine fertility using in vitro culture tehniques. J. Reprod. Fertil. 57 (Suppl): 111-125.
32. IOANA, H., A. SONEA, M. MATEI., L. VINTILA, I. CAMELIA, A. BIRTOIU (2012): Semen Collection, Assessment and Processing for in vitro Fertilization in Dog – a Review. Anim. Sci. Biotech 45, 163-171.
33. JOHNSON, L., C. S. PETTY, W. B. NEAVES (1984): Influence of age on sperm production and testicular weights in men. J. Reprod. Fertil. 70, 211-218.
34. JOHNSTON, S. D., M. V. R. KUSTRITZ, P. N. S. OLSON (2001): Semen collection, evaluation, and preservation. In Canine and Feline. Theriogenology. W.B. Saunders, Philadelphia, pp. 287-306.
35. KAWAKAMI E., T. HORI, T. TSUTSUI (1998): Changes in semen quality and in vitro sperm capacitation during various frequencies of semen collection in dogs with both asthenozoospermia and teratozoospermia. J. Vet. Med. Sci., 60, 607-614.

36. KRAGER, S., B. GEISER, M. GRAU, O. BURFEIND, W. HEUWIESER, S. P. ARLT (2016): Prognostic value of a pre-freeze hypo-osmotic swelling test on the post thaw quality of semen. Anim. Reprod. Sci. 166, 141-147.
37. KOLSTER K. A. (2018): Evaluation of Canine Sperm and Management of Semen Disorders. Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice 48, 533-545.
38. KUMI-DIAKA, J. (1993): Subjecting canine semen to the hypo-osmotic test. Theriogenology 41, 1279-1289.
39. LAFLAMME, D. (1997): Development and validation of a body condition score system for dogs. Canine Pract. 22, 10–15.
40. LAMBERT, B. (1951): The frequency of mumps and of mumps orchitis and the consequences for sexuality and fertility. Acta Gen. Stat. Med. 2, 161-166.
41. LENZ, S., A. GIWERCMAN, A. ELSBORG, K. H. COHR, J. E. JELNES (1993): Ultrasonic testicular texture and size in 444 men from the general population: correlation to semen quality. Eur. Urol. 24, 231-238.
42. LINDE-FORSBERG, C. (1991): Achieving canine pregnancy by using frozen or chilled extended semen. Vet. Clin. North Am. (Small Anim. Pract.) 21, 467-485.
43. LINDE-FORSBERG, C. (2005): Artificial Insemination. U: ESAVS-EVSSAR Course Reproduction in companion, exotic and laboratory animal, Nantes 12th-17th September 2005. Dostupno na: http://www.esavs.net/course_notes/reproduction_ 05/artificial_ insemination. pdf
44. LOJKIĆ, M., N. MAČEŠIĆ, G. BAČIĆ, T. KARADJOLE, M. SAMARDŽIJA, I. GETZ, I. FOLNOŽIĆ, M. CERGOLJ, T. DOBRANIĆ, B. ŠKRLIN, Z. VRBANAC (2012): Uporaba duboko smrznute i ohlađene pseće sperme na Klinici za porodništvo i reprodukciju Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Zbornik 5. hrvatskog veterinarskog kongresa, Tuheljske Toplice, 10.-13. listopad 2012., str. 423-429.
45. LOPATE, C. (2012): The problem stud dog. Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract. 42, 469-488.
46. LOWSETH, L. A., R. F. GERLACH, N. A. GILLETT, B. A. MUGGENBURG (1990): Age-related changes in the prostate and testes of the beagle dog. Vet. Pathol. 27, 347-53.

47. MAJIĆ BALIĆ, I., S. MILINKOVIĆ-TUR, M. SAMARDŽIJA, S. VINCE (2012): Effect of age and environmental factors on semen quality, glutathione peroxidase activity and oxidative parameters in simmental bulls. Theriogenology 78, 423-431.
48. MARKS SL, J. DUPUIS , WD MICKELSEN, MA MEMON, CC JR. PLATZ (1994): Conception by use of postmortem epididymal semen extraction in a dog. J. Am. Vet. Med. Ass. 204, 1639-1640.
49. MARTINS, M. I., F. F. SOUZA, E. OBA, M. D. LOPES (2006): The effect of season on serum testosterone concentrations in dogs. Theriogenology 66,1603-1605.
50. MATOSKA, J., A. TALERMAN (1989): Mixed germ cell-sex cord stroma tumor of the testis. Cancer 64, 2146-2153.
51. MEMON, M. A. (2007): Common causes of male dog infertility. Theriogenology 68, 322-328.
52. MINTER, L. J., T. J. DELIBERO (2008): Seasonal variation in serum testosterone, testicular volume, and semen characteristics in the coyote (*Canis latrans*). Theriogenology 69, 946-952.
53. MOCÉ, E., J. K. GRAHAM (2008): *In vitro* evaluation of sperm quality. Anim. Reprod. Sci. 105, 104-118.
54. MOREY, D. (1994): The Early Evolution of the Domestic Dog. American Scientist 82, 336-347.
55. MOXON, R., L. BRIGHT, B. PRITCHARD, I. M. BOWEN, M. B. de SOUZA, L. D. M. da SILVA, G .C. W. ENGLAND (2015): Digital image analysis fo testicular and prostatic ultrasonographic echogencity and heterogeneity in dog and the relation to semen quality. Anim. Reprod. Sci. 160, 112-119.
56. NIE, G. J., J. G. WENZEL (2001): Adaptation of the hypoosmotic swelling test to assess functional integrity of stallion spermatozoal plasma membranes. Theriogenology 55, 1005-1018.
57. NOAKES, D. E., T. J. PARKINSON, G. C. W. ENGLAND, G. F. ARTHUR (2001): Veterinary reproduction & obstetrics (8^{th} ed) (Noakes, D. E., T. J. Parkinson, G. C. W. England, ur.) Saunders Ltd.
58. OETTLE, E. E. (1993): Sperm morphology and fertility in dog. J. Reprod. Fertil. 47, 257-260.
59. OETTLE, E. E., J. T SOLEY (1988): Sperm abnormalities in the dog: a light and electron microscopic study. Vet. Med. Rev. 59, 28-70.

60. OLAR, T. T., R. P. AMANN, B. W. PICKETT (1983). Relationships among testicular size, daily production and output of spermatozoa, and extragonadal spermatozoal reserves of the dog. Biol. Reprod. 29, 1114-1120.
61. OLSON, P. N. S. (1984): Disorders of the canine prostate gland. Proceedings, Society for Theriogenology, 46-60.
62. PALTIEL, H. J., D. A. DIAMOND, J. DICANZIO, D. ZURAKOWSKI, J. G. BORER (2002): Testicular volume: comparison of orchidometer and US measurements in dogs. Radiology 222, 114-119.
63. PAYAN-CARREIRA, R., S. MIRANDA, N. WOJCIECH (2011): Artificial Insemination in Dog. In: M. MANAFI: Artificial Insemination in Farm Animals.
64. PEŃA A. I., L. A. QUINTELA, P. G. HERRADÓN (1998): Viability assessment of dog spermatozoa using flow cytometry. Theriogenology 50, 1211-1220.
65. PŘINOSILOVÁ, P., Z. VĚŽNÍK, A. ZAJÍCOVÁ, D. ŠVECOVÁ (2005): Using the Sperm Quality Analyzer (SQA IIc) to evaluate dog ejaculates. Vet. Med. - Czech 50, 195-204.
66. PURSWELL B.J., G. ALTHOUSE, M.V. ROOT (1992): Guidelines for using the canine breeding soundness evaluation Form. Hastings, Nebraska, Theriogenology Handbook. Society for Theriogenology
67. RIJSSELAERE T., A. VAN SOOM, S. TANGHE, M. CORYN, D. MAES, A. DE KRUIF (2005): New techniques for the assessment of canine semen quality. Theriogenology 64, 706-719.
68. RIJSSELAERE, T., D. MAES, G. HOFLACK, A. DE KRUIF, A. VAN SOOM (2007): Effect of Body Weight, Age and Breeding History on Canine Sperm Quality Parameters Measured by the Hamilton-Thorne Analyser. Reprod. Domest. Anim. 42, 143-148.
69. RODRIGUEZ-GIL, J.E., A. MONSERRAT, A. and T. RIGAU (1994): Effects of hypoosmotic incubation on acrosome and tail structure on canine spermatozoa. Theriogenology 42, 815-829.
70. ROOT KUSTRITZ, M.V., C. KILTY, M. VOLLMER (2006): Spermatocrit as a measure of concentration of canine semen spermatozoa. Theriogenology 66: 670
71. ROTA, A., M. TESI, G. di PETTA, C. SABATINI, I. VANNOZZI (2016): A retrospective study on the relationships between semen quality, dogs' ageing and fertility. Proceedings of the 8th International Symposium on Canine and Feline Reproduction ISCFR June 22-25, 2016., Paris, France, p. 81.

72. SAKAMOTO, H., Y. OGAWA, H. YOSHIDA (2008): Relationship between testicular volume and testicular function: comparison of the Prader orchidometric and ultrasonographic measurements in patients with infertility. Asian J. Androl. 10, 319-324.
73. SCHUBERT, C. L., S. W. J. SEAGER (1991): Semen collection and evaluation for the assessment of fertility parameters in the male dalmatian. Canine Pract. 16, 17-21.
74. SCHWARZ, D., M. J. MAYAUX, A. SPIRA, M. L. MORCATO, P. JOUANNET, D. CZIGGLICK, G. DAVID (1983): Semen characteristics as a function of age in 833 fertile men. Fertil. Steril. 39, 530-535.
75. SEAGER, S. W. J. (1986): Artificial insemination in dogs. In: Burke, T. J. (ed.), Small Animal Reproduction and Infertility. Lea & Febiger, Philadelphia, pp. 207-217.
76. SENGER, P. L. (2012): Pathways to pregnancy and parturition. 3rd ed. Current Conceptions, Inc., pp. 229-230.
77. SILVA P. F., B. M. GADELLA (2006): Detection of damage in mammalian sperm cells. Theriogenology 65, 958-78.
78. SISSON, S. (1962): Anatomija domaćih životinja, 4. izdanje, Poljoprivredni Nakladni Zavod Zagreb, str. 671-688.
79. SMITH S. C., G. C. W. ENGLAND (2001): Effect of technical settings and semen handling upon motility characteristics of dog spermatozoa measured using computer-aided sperm analysis. J Reprod Fertil Suppl 57, 151-9.
80. SODERBERG, S. F. (1986): Infertility in the dog. Ultrastructure of reproduction (D. A. Morrow, ed.). W.B. Saunders Company, Philadelphia, Pennsylvania, pp. 544-548.
81. SOUZA, M. B., L. D. M. DA SILVA, R. MOXON, M. RUSSO, G. C. W. ENGLAND (2017): Ultrasonography of the prostate gland and testes in dogs. In Practice 39, 21-32.
82. STRÖM-HOLST B., B. LARSSON, H. RODRIGUEZ-MARTINEZ, A. S. LAGERSTEDT, C. LINDE-FORSBERG (2001): Zona pellucida binding assay- a method for evaluation of canine spermatozoa. J. Reprod. Fertil. Suppl 57, 137-140.
83. ŠEHIĆ, M., D. STANIN, V. BUTKOVIĆ (2006): Ultrasonografija abdomena i toraksa psa i mačke. Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 181-183.

84. TSUTSUI, T., T. TEZUKA, Y. MIKASA, H. SUGISHAWA, N. KIRIHARA, T. HORI, E. KAWAKAMI (2003): Artificial insemination with canine semen stored at low temperature. J. Vet. Med. Sci. 65, 307-312.
85. VERSTEGEN, J. P., K. ONCLIN, M. IGUER-OUADA (2005): Long-term motility and fertility conservation of chilled canine semen using egg yolk added Tris–glucose extender: *In vitro* and *in vivo* studies. Theriogenology 64, 720-733.
86. VLAHOVIĆ, D. (2017): Vodiči i službeni psi - brend Vojne policije. Hrvatski vojnik 526, 10 -13.
87. ZELLI, R., A. TROISI, A. ELAD NGONPUT, L. CARDINALI, A. POLISCA (2013): Evaluationof testicular artery blood flow by Doppler ultrasonography as a predictor of spermatogenesis in the dog. Res. Vet. Sci. 95, 632-637.

SAŽETAK

Tena Propadalo

PROCJENA REPRODUKTIVNOG POTENCIJALA RASPLODNIH I RADNIH PASA MINISTARSTVA OBRANE REPUBLIKE HRVATSKE

Svrha ovog istraživanja bila je ustanoviti reproduktivni potencijal vojnih rasplodnih i radnih pasa Ministarstva obrane Republike Hrvatske (MORH). Istraživanje je provedeno na 16 spolno zrelih vojnih rasplodnih i radnih pasa na kojima je proveden klinički pregled, ultrazvučni pregled testisa, epididimisa i prostate te je ocjenjena kvaliteta ejakulata nakon polučivanja i nakon pohrane na 4 °C tijekom 24, 48 i 72 sata. Psi su podijeljeni u dvije dobne kategorije: < 2 godine (1,24 ± 0,19 godine) i > 2 godine (6,26 ± 2,48 godina). Za opći klinički i androloški pregled korišten je jednoobrazni obrazac. Nakon polučivanja ejakulata ocijenjen je volumen, pH, progresivna pokretljivost, koncentracija i vitalnost spermija (HOS test i bojenje po Bloom-u). Razrijeđeno sjeme pohranjeno je na 4° C kroz te su pokretljivost, vitalnost i integritet membrane ocjenjeni nakon 24, 48 i 72 sata.

Prosječna vrijednost obujma testisa, veličine prostate i tjelesne mase bila je statistički značajno veća u pasa starije dobne kategorije, što je pozitivno koreliralo s volumenom ejakulata i koncentracijom spermija u ejakulatu. Značajne, negativne korelacije zabilježene su između dobi pasa i progresivne pokretljivosti, integriteta membrane i normalne morfologije spermija. U pasa < 2 godine udio spermija normalne morfologije bio značajno veći u odnosu na pse > 2 godine. Abnormalnosti glave i srednjeg dijela spermija bili su značajno veći u pasa > 2 godine u odnosu na mlađe pse. Značajne korelacije postoje između pokretljivosti, HOS testa i rezultata supravitalnog bojenja po Bloom-u nakon pohrane sjemena kroz 72 sata. Pokretljivost nakon pohrane na 4 °C pozitivno korelira s progresivnom pokretljivošću nativnog sjemena

Ovim istraživanjem pokazalo se da je nužno uključiti niz pretraga, od kliničkih do laboratorijskih, kako bi dobili potpuni uvid u rasplodni potencijal pasa te za rasplod odabrali one najkvalitetnije. Rezultati ocjene polučenog ejakulata rasplodnih i radnih pasa MORH-a pokazali su da je ejakulat ovih pasa visokog rasplodnog potencijala, a odlični rezultati preživljavanja pohranjenih spermija na 4 °C nakon 24, 48 i 72 sata omogućavaju i međunarodnu trgovinu kvalitetnim genetskim materijalom.

Ključne riječi: vojni rasplodni i radni psi, rasplodni potencijal, ocjena ejakulata

SUMMARY

Tena Propadalo

BREEDING SOUNDNESS EXAMINATION OF MILITARY BREEDING AND WORKING DOGS OWNED BY THE MINISTRY OF DEFENSE OF THE REPUBLIC OF CROATIA

The aim of this study was to evaluate the breeding soundness of military breeding and working dogs owned by the Ministry of Defense of the Republic of Croatia (MDRC). Sixteen sexually mature military dogs were subjected to a clinical examination, B-mode ultrasonography of the testes, epididymis and prostate, semen evaluation at collection and after storage at 4 ° C for 24, 48 and 72 h. Dogs were divided into two age categories < 2 years (1,24 ± 0,19 years) and > 2 years (6,26 ± 2,48 years). For clinical examination uniform database sheet was used. Semen was evaluated using the following parameters: colour, volume, pH, progressive motility, concentration and viability (HOS test and Bloom staining). Diluted semen samples were stored at 4 °C and the motility, viability and functional integrity of sperm membrane was evaluated after 24, 48 and 72 hours. Average testicular volume, prostate size and body weight were significantly higher in dogs > 2 years, which positively correlated with the semen volume and concentration of spermatozoa in the ejaculate. A negative correlations existed between the age of dogs and motility, membrane integrity (HOS test) and normal sperm morphology. In dogs < 2 years the percentage of normal spermatozoa was significantly higher compared to dogs > 2 years. Head and midpiece abnormalities were significantly higher in dogs > 2 years compared to younger dogs. Significant correlations were established between motility, HOS test results and supravital staining by Bloom after 72 hours of storage.

This research has shown that it is necessary to include variety of clinical and laboratory methods in order to get a complete insight into breeding potential of dogs and choose those with the highest quality characteristics for reproduction. Our results of semen quality evaluation at collection and after storage indicate high reproductive potential of military breeding and working dogs of MDCR and offer a possibility of international trade of high quality genetic material.

Key words: military breeding and working dogs, reproductive potential, semen quality

ŽIVOTOPIS

Rođena sam 02. 09. 1994. u Zagrebu gdje sam pohađala osnovnu školu i XI. gimnaziju. Nakon mature 2013. godine upisala sam Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.

Tijekom studija volontirala sam na Klinici za porodništvo i reprodukciju Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Od ak. god. 2014./2015. do ak. god. 2017./2018. sudjelovala sam u nastavi kao demonstrator na Zavodu za kemiju i biokemiju.

S izričitim zanimanjem za porodništvo i reprodukciju, odlučila sam pristupiti istraživanju reproduktivnog potencijala rasplodnih i radnih pasa Ministarstva obrane Republike Hrvatske. Na temelju istraživanja napisala sam rad pod naslovom „Procjena reproduktivnog potencijala rasplodnih i radnih pasa Ministarstva obrane Republike Hrvatske“, pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Ive Getz i izv. prof. dr. sc. Martine Lojkić te za isti osvojila Rektorovu nagradu za individualni znanstveni i umjetnički rad u akademskoj godini 2017./2018. godini.

Tijekom studija često sam boravila na Fakultetu i mimo nastavnih aktivnosti sudjelovanjem na stručnim seminarima i znanstvenim kongresima kao što su „Veterinarska znanost i struka“, trodnevna regionalna konferencija veterinara Istočne Europe „Eastern European Regional Veterinary Conference“, 5. Kongres veterinara male prakse Hrvatske u organizaciji Odjela veterinara male prakse (OVMPH), Kinološki stručni seminar i sl.

Znanje koje sam stekla na fakultetu nastojim kontinuirano nadograđivati te ću u listopadu 2019. godine aktivno sudjelovati na 8. međunarodnoj konferenciji „Veterinarska znanost i struka“ u vidu oralnog prezentiranja svog znanstvenog rada na engleskom jeziku.

U svibnju 2019. godine, uz predsjednika Kinološkog kluba Velika Gorica, organizirala sam Kinološki stručni seminar na kojem su održana dva stručna predavanja te predstavljeni proizvodi farmaceutske tvrtke Medical Intertrade d.o.o.

Na K9 međunarodnoj konferenciji u hotelu „I“, Zagreb, predstavljala sam proizvode koje zastupa, uvozi i distribuira tvrtka DJD ZAGREB d.o.o., za koju duže vremena radim. Bavim se promocijama i održavam edukacije o veterinarskoj hrani i dodacima prehrani na mjestima kao što su izložbe pasa, veterinarske ljekarne, Pet centar,

novootvoreni pet shopovi itd. Osim toga sam radila u veterinarskoj ljekarni i pet shopu Belugo plus.

Kao aktivni član uredništva Portala kućni ljubimci već nekoliko mjeseci iznosim aktualne teme iz životinjskog svijeta te pisanjem članaka nastojim upoznati javnost s veterinarskom problematikom.

Aktivno se služim engleskim i njemačkim jezikom.