



UNIVERZITET U NOVOM SADU
POLJOPRIVREDNI FAKULTET
Departman za veterinarsku medicinu



**UTICAJ SADRŽAJA PROTEINA U SPERMALNOJ PLAZMI
NERASTA NA PARAMETRE RAZREĐENE SPERME I
FERTILITET VEŠTAČKI OSEMENJENIH KRMAČA**

DOKTORSKA DISERTACIJA



Mentor:

Dr Slobodanka Vakanjac, DVM, vanr. prof.

Kandidat:

Jelena B. Apić, DVM.

Novi Sad, 2015.

	UNIVERZITET U NOVOM SADU POLJOPRIVREDNI FAKULTET	
Ključna dokumentacijska informacija		

Redni broj (RBR):

Identifikacioni broj (IBR):

Tip dokumentacije (TD): Monografska dokumentacija

Tip zapisa (TZ): Tekstualni štampani material

Vrsta rada (VR): Doktorska disertacija

Ime i prezime autora (AU): **Jelena B. Apić, DVM.**

Mentor (titula, ime, prezime, zvanje) (MN): **Dr Slobodanka Vakanjac, DVM, vanr. prof.**

Naslov rada (NR): **Uticaj sadržaja proteina u spermalnoj plazmi nerasta na parametre razređene sperme i fertilitet veštački osemenjenih krmača**

Jezik publikacije (JP): Srpski

Jezik izvoda (JI): Srpski / Engleski

Zemlja publikovanja (ZP): Republika Srbija

Uže geografsko područje (UGP): AP Vojvodina

Godina (GO): 2015.

Izdavač (IZ): Autorski reprint

Mesto i adresa (MA): 21000 Novi Sad, Poljoprivredni fakultet,
Departman za veterinarsku medicinu,
Trg Dositeja Obradovića 8.

Fizički opis rada (FO): 10 poglavlja / 157 stranica / 56 tabele / 22 slika
/23 grafikona /291 referenci /Prilozi /Biografija.

Naučna oblast (NO): Veterinarska medicina

Naučna disciplina (ND): Reprodukcijska i veštačko osemenjavanje svinja

Predmetna odrednica, ključne reči (PO): Sperma, kvalitet, spermalna plazma, veštačko osemenjavanje, fertilitet, nerast, krmača.

UDK 581.35:547.96:615.863:599.731.1(043.3)

Čuva se (ČU): Biblioteka poljoprivrednog fakulteta, Novi Sad.

Važna napomena (VN): Nema

Izvod (IZ):

Veštačko osemenjavanje (VO) je najznačajnija reproduktivna biotehnologija u intenzivnoj proizvodnji svinja. Efikasan izbor visoko fertilnih genetski superiornih nerastova i visok fertilitet veštački osemenjenih krmača, ima veliki ekonomski uticaj na efikasnost praktične primene ove biotehnologije. Međutim, prethodna istraživanja pokazuju da procena klasičnih parametara fertiliteta ejakulata (koncentracija, ukupan broj, pokretljivost i morfologija spermatozoida) nisu dovoljni pokazatelji fertiliteta i reproduktivne performanse nerastova. Sa druge strane, pokazalo se da je fertilitet veštački osemenjenih krmača, često, niži od onog kod prirodno osemenjenih krmača. Kao osnovni razlog nižeg fertiliteta kod VO krmača, navodi se osemenjavanje sa prekomerno razređenim dozama i/ili dozama dugotrajno čuvanim (3 do 5 dana). Rezultati prethodnih istraživanja ukazuju da komponente semene plazme imaju ključni uticaj na fertilizacioni potencijal spermatozoida *in vivo* i *in vitro*, kao i na fiziološke procese važne za uspešnu oplodnju i razvoj embriona u uterusu.

Zbog toga je glavni cilj ovog istraživanja bio da se: (a) odredi sadržaj proteina u spermalnoj plazmi nerastova koji se koriste za VO na nekoliko komercijalnih farmi svinja u Srbiji, (b) oceni uticaj sadržaja proteina u spermalnoj plazmi na pokretljivost i morfologija spermatozoida u nativnoj i razređenoj spermi, nakon 3 dana čuvanja u razređenom stanju i (c) ispita uticaj intrauterine infuzije spermalne plazme, pre aplikacije klasične VO doze, na fertilitet krmača.

Sadržaj proteina u spermalnoj plazmi se kretao između 1% i 6,5%, što je ustanovljeno kod 212 uzoraka, dobijenih iz ejakulata 106 nerastova, koji se koriste za VO na 6 farmi u AP Vojvodini. Nizak nivo proteina (1-3.5%, prosečno 2,4%) je ustanovljen kod 69%, a visok nivo proteina (3.6-6.5%, prosečno 4,2%) kod 31% ispitivanih nerastova. Nije ustanovljen značajan ($P > 0,05$) uticaj rase ili starosti nerasta, kao ni godišnje sezone, na sadržaj proteina u spermalnoj plazmi. Citomorfološka svojstva spermatozoida su testirana sistemom CASA i protočnom citometrijom. U nativnoj spermi testiranih nerastova, prosečno je bilo 71% živih, 13% spermatozoida sa oštećenim akrozomom i 32% spermatozoida sa morfološkim anomalijama. Volumen ejakulata, koncentracija, ukupan broj i pokretljivost spermatozoida bili su značajno ($P < 0,01$) veći kod nerastova sa visokim, u poređenju sa niskim sadržajem proteina u spermalnoj plazmi. Progresivna pokretljivost - PP (64%) i broj živih spermatozoida - ŽS (66%) bio je značajno veći, dok su broj spermatozoida sa oštećenom ćelijskom membranom - OM (19%), akrozomom - OA (29%) i hromozomima - OH (13%) bili značajno ($p < 0,01$) niži u uzorcima sperme sa visokim sadržajem proteina, koji su bili čuvani 72h u razređenju 1:4, od ovih vrednosti kod uzoraka sa niskim sadržajem proteina (PP = 48%, ŽS = 44%, OM = 27% OA = 45% i OH = 22%). Zamena autologne spermalne plazme iz ejakulata sa niskim sadržajem proteina od jednog nerasta, sa homologom spermalnom plazmom iz ejakulata drugog nerasta sa visokim sadržajem proteina, značajno ($p < 0,01$) povećava progresivnu pokretljivost spermatozoida, sa 52% na 65%, kod uzoraka čuvanih 72h u razređenju 1:4. Intrauterina infuzija 30 ml semene plazme, pre aplikacije klasične VO doze, značajno ($p < 0,05$) povećava vrednost prašenja (94%) i prosečan broj živo rođene prasadi po leglu (12.3) ($p < 0,01$), u poređenju sa kontrolom grupom krmača (83% i 10.5 prasadi).

Na osnovu dobijenih rezultata, može se zaključiti: (1) postoje značajne razlike u sadržaju proteina u spermalnoj plazmi između pojedinih nerastova, (2) uzorci sperme sa visokim sadržajem proteina, imaju veće vrednosti fertilizacionog potencijala spermatozoida, od uzoraka sa niskim sadržajem proteina u spermalnoj plazmi, posle 72h čuvanja u razređenju 1:4 i (3) infuzija spermalne plazme, pre aplikacije klasične VO

doze, značajno povećava fertilitet tako tretiranih krmača, u poređenju sa kontrolnim krmača. Ovi rezultati pokazuju da određivanje sadržaja proteina u spermalnoj plazmi, može biti korisno sredstvo za predviđanje stepena fertiliteta nerasta, pre njegove upotrebe za VO, kao i da se spermalna plazma može koristiti za povećanje fertiliteta veštački osemenjenih krmača. Dobijenim rezultatima su, u potpunosti, potvrđene radne hipoteze i ostvareni postavljeni ciljevi istraživanja.

Datum prihvatanja teme od strane NN 31.10.2014.
veća (DP):

Datum odbrane (DO):

Članovi komisije:
(ime i prezime / titula /
zvanje / naziv organizacije /
status)
KO



predsednik: **Dr Stoja Jotanović, vanredni profesor.**
Poljoprivredni fakultet, Banja Luka.

član,
mentor: **Dr Slobodanka Vakanjac, DVM, vanr. prof.**
Fakultet veterinarske medicine, Beograd.

član: **Dr Ivan Radović, vanr. prof.**
Poljoprivredni fakultet, Novi Sad,
Departman za stočarstvo.

član: **Dr Zdenko Kanački, DVM, docent.**
Poljoprivredni fakultet, Novi Sad,
Departman za veterinarsku medicinu.

član: **Dr Branislav Stanković, DVM, docent.**
Poljoprivredni fakultet, Beograd-Zemun,
Institut za stočarstvo.

	UNIVERSITY OF NOVI SAD FACULTY OF AGRICULTURE	
Key word documentation		

Accession number (ANO):

Identification number (INO):

Document type (DT): Monograph documentation

Type of record (TR): Textual printed material

Contents code (CC): PhD. Thesis

Author (AU): **Jelena B. Apić, DVM.**

Mentor (MN): **Dr Slobodanka Vakanjac, DVM, Associated Professor.**

Title (TI): **Effect of protein content in the boar seminal plasma on the diluted semen parameters and fertility of artificially inseminated sows**

Language of text (LT): Serbian

Language of abstract (LA): English / Serbian

Country of publication (CP): Republic of Serbia

Locality of publication (LP): AP Vojvodina

Publication year (PY): 2015.

Publisher (PU): Author's reprint

Publication place (PP): 21000 Novi Sad, Faculty of Agriculture, Department of Veterinary Medicine, Trg Dositeja Obradovića 8.

Physical description (PD): 10 chapters / 157 pages / 291 references / 56 tables / 23 graphs / 22 figures / Attachments / Biography.

Scientific field (SF): Veterinary medicine

Scientific discipline (SD): Pig Reproduction and Artificial Insemination

Subject, Key words (SKW): Semen, quality, semen plasma, artificial insemination, fertility, boar, sow.
UDC 581.35:547.96:615.863:599.731.1(043.3)
Holding data (HD): The Library of Agriculture Faculty, Novi Sad.
Note (N): None
Abstract (AB):

Artificial insemination (AI) is the most important reproductive biotechnology in the intensive pig production. Effective selection of high fertile genetically superior boars and high fertility rate in the AI sows has a great economic impact on the efficiency of using these biotechnology in practice. However, previous studies reported that the evaluation of classical seminal parameters (spermatozoa concentration, viability, motility and morphology) are not sufficient indicators of boar fertility and reproductive performance. On the other hand, it has been shown that artificial insemination often result in lower fertility rates than those obtained by natural mated sows, mainly as a result of insemination with overdiluted and/or preservation of liquid AI doses for a longer time (3 to 5 days). The results of previous studies indicate that the components of seminal plasma has a key influence on the spermatozoa fertility *in vivo* and *in vitro*, as well as on the physiological processes important for successful fertilization and embryo development in uterus. Therefore, the main objective of the present study was to: (a) determine the content of protein in seminal plasma of the AI boars at the commercial pig farm in Serbia, (b) evaluate the influence of protein content in seminal plasma on sperm motility and morphology in native and diluted semen after storage for 3 days and (c) investigate the influence of transcervical seminal plasma infusion into the uterus, prior the classical AI dose application, on the sows fertility rate.

Content of protein was ranged from 1% to 6.5%, as determined in 212 ejaculates taken from 106 AI boars. Low protein level (1-3.5%, average 2.4%) has been found in 69%, and high protein level (3.6-6.5%, average 4.2%) in 31% of tested boars. There are not significant ($P>0.05$) influence of boars breed or age, as well of season of the year on the protein content in seminal plasma. In the native semen of tested boars was found on average 71% living, 13% of spermatozoa with damaged acrosome and 32% spermatozoa with morphological anomalies. Ejaculate volume, spermatozoa concentration, total number and motility percentage was significantly greater in the boars with high, compared with low protein content boars ($p<0.01$). Citomorphological properties of spermatozoa were tested by using CASA system and flow cytometry. Progressive motility - PP (64%) and living spermatozoa - LS (66%) was greater, while spermatozoa with damaged cell membrane - DM (19%), acrosome - DA (29%) and chromosome - DH (13%) was significantly ($P<0.01$) lower in the liquid semen with high protein content, stored for 72h in 1:4 dilution rate, compared with low protein content semen sample (PP=48%, LS=44%, DM=27%, DA=45% and DH=22%). Replacement of autologous seminal plasma from one boar with a low protein content, with homologous seminal plasma from another boar with a high protein content, significantly ($p<0.01$) increase progressive motility from 52% to 65%, in the samples stored for 72h in 1:4 dilution rate. Transcervical infusion of 30 ml seminal plasma, prior to classical AI dose application, significantly ($p<0.05$) increase farrowing rate (94%) and live born piglets per litter (12.3) ($p<0.01$), compared with control (not infused) sows (83% and 10.5 piglets).

Based on the obtained results, it can be concluded: (1) there are significant variation in the content of protein in seminal plasma between the boars, (2) semen samples from ejaculates with high protein content has a greater values of spermatozoa fertilizing

potential, than samples from ejaculates with low protein content in seminal plasma, after storage for 72h at 1:4 dilution rate and (3) infusion of seminal plasma, prior to classical AI dose application, significantly increase sows fertility rate, compared with control sows. These findings indicate that protein content in seminal plasma can be useful tool for predicting boar fertility prior their using for AI, and that seminal plasma can be used for increasing fertility rate in the artificial inseminated sows. By the obtained results the working hypotheses was confirm and the investigation goals are achieved.

Accepted on Scientific Board on **31.10.2014.**
(AS):

Defended (DE):

Thesis Defend Board (DB):
Comittee member: **Stoja Jotanović, PhD,**
(President) *Associated Professor.*
Faculty of Agriculture, Banja Luka,
Republic of Serbska.

Comittee member: **Slobodanka Vakanjac, DVM, PhD,**
(Primary supervisor) *Associated Professor.*
Faculty of Veterinary Medicine, Belgrade.

Comittee member: **Ivan Radović, PhD, Associated Professor**
Faculty of Agriculture, Novi Sad,
Department of Animal Sciences.

Comittee member: **Zdenko Kanački, DVM, PhD,**
Assistant Professor.
Faculty of Agriculture, Novi Sad.
Department of Veterinary Medicine.

Comittee member: **Branislav Stanković, DVM, PhD,**
Assistant Professor.
Faculty of Agriculture, Beograd-Zemun,
Institute of Animal Sciences.

SADRŽAJ

	strana
1. UVOD	1
2. CILJ I RADNA HIPOTEZA	5
3. PREGLED LITERATURE	7
3.1. REPRODUKTIVNA PERFORMANSA NERASTOVA U INTENZIVNOJ PROIZVODNJI	7
3.2. REPRODUKTIVNA PERFORMANSA KRMAČA U INTENZIVNOJ PROIZVODNJI	11
3.3. PRODUKCIJA I OSOBINE SPERME NERASTA	14
3.4. ZNAČAJ SPERMALNE PLAZME	24
3.5. POSTCERVIKALNO OSEMENJAVANJE KRMAČA	32
4. MATERIJAL I METOD	38
4.1. REPRODUKTIVNA PERFORMANSA NERASTOVA I KRMAČA U PROIZVODNIM ZAPATIMA	39
4.2. EKSPERIMENTALNA ISTRAŽIVANJA	41
4.3. STATISTIČKA ANALIZA	57
5. REZULTATI	58
5.1. REPRODUKTIVNA EKSPLOATACIJA	58
5.2. REZULTATI EKSPERIMENTALNIH ISTRAŽIVANJA	65
5.2.1. <i>PRVI EKSPERIMENT</i>	66
5.2.2. <i>DRUGI EKSPERIMENT</i>	75
5.2.3. <i>TREĆI EKSPERIMENT</i>	98
5.2.4. <i>ČETVRTI EKSPERIMENT</i>	100
6. DISKUSIJA	109
7. ZAKLJUČCI	133
8. LITERATURA	136
9. PRILOZI	154
10. BIOGRAFIJA	157

ZAHVALNOST

Želim da se zahvalim svom mentoru, prof. dr Slobodanki Vačanjac, kao i članovima komisije, prof. dr Stoji Jotanović, prof. dr Ivanu Radoviću, docentu dr Zdenku Kanačkom i docentu dr Branislavu Stankoviću, za korisne savete, primedbe i svaku drugu pomoć tokom izrade ove disertacije.

Izuzetnu zahvalnost dugujem svim kolegama sa Departmana za Veterinarsku medicinu i Stočarstvo, Poljoprivrednog fakulteta u Novom Sadu, kao i kolegama iz Naučnog instituta za Veterinarstvo u Novom Sadu, koji su mi omogućili da deo svojih istraživanja, izvedem u njihovim laboratorijama.

Posebno se zahvaljujem i dragim kolegama na farmama svinja „Pobeda“ u Pobedi, „Voganj“ u Vognju, „Petefi“ u Temerinu, PIK „Bečej“ u Bečeju i AD IM „Neoplanta“, farma svinja u Čeneju, koje su mi obezbedile životinje, objekte, podatke reproduktivne evidencije i druge tehničko-tehnološke uslove, kao i stručnu pomoć u izvođenju oglada.

Zahvaljujem se svojoj porodici za podršku, puno ljubavi i razumevanja, što mi je bilo jako potrebno tokom izrade ove disertacije.

Takođe se zahvaljujem i svim ostalim kolegama i prijateljima, koji su mi, na bilo koji način, pomogli da završim ovu doktorsku disertaciju.

Novi Sad, septembar, 2015.

Jelena B. Apić

1. UVOD

Savremena intenzivna proizvodnja svinja, skoro da se ne može zamisliti bez primene veštačkog osemenjavanja. Ova biotehnologija je, tokom poslednjih nekoliko decenija, nesumnjivo, imala i, još uvek, ima najveći uticaj na razvoj intenzivne proizvodnje svinja u svetu (Gadea, 2003; Broekhuijse i sar., 2012). Ovo je pre svega, posledica nekoliko važnih prednosti veštačkog nad prirodnim osemenjavanjem, među kojima se ističu: (a) mogućnost dobijanja znatno većeg broja potomaka od jednog genetski superiornog nerasta, pošto se, od jednog ejakulata, može napraviti 10 do 20 inseminacionih doza, (b) mogućnost transporta inseminacionih doza na velike udaljenosti, (c) mogućnost čuvanja inseminacionih doza na duži period i (d) mogućnost kontrole širenja i eradikacije infektivnih bolesti. Zbog toga se, u mnogim razvijenim državama Evrope, veštački osemenjava i preko 90% nazimica i krmača (Almin i sar., 2006).

Sve veća globalna potreba za povećanjem proizvodnje svinjskog mesa, zahteva sve brži napredak u genetskom poboljšanju produktivnih i reproduktivnih svojstava sadašnjih i novih rasa i linija svinja. Primarni uslovi za postizanje ovog cilja su: (a) maksimalna reproduktivna eksploatacija genetski superiornih nerastova, u savremenoj tehnologiji veštačkog osemenjavanja i (b) visok stepen fertiliteta veštački osemenjenih krmača (Koketsu, 2007; Stančić i sar., 2009; Yung i sar., 2010; Stančić i sar., 2013).

Efikasno reproduktivno iskorištavanje genetski superiornih nerastova, zahteva formiranje maksimalnog broja inseminacionih doza po ejakulatu, odnosno po nerastu godišnje. Konvencionalna, intracervikalna, metoda veštačkog osemenjavanja (VO), primenjuje se u preko 90% farmi intenzivne proizvodnje svinja (Almin i sar., 2006). Za ovo se koriste inseminacione doze volumena 80 ml do 100 ml tečne razređene sperme, koje sadrže oko 3×10^9 do 6×10^9 progresivno pokretnih spermatozoida (prosečno 4×10^9 spermatozoida) (Johnson i sar., 2000; Khalifa i sar., 2014). Na taj način se, od jednog nerasta, godišnje dobija oko 1.200 do 1.500 VO doza, sa kojima se može osemeniti godišnje oko 300 krmača (Glossop, 1998; Stančić, 2000; Singleton, 2001). Ovaj broj inseminacionih doza po nerastu godišnje se, sve češće, definiše kao zootehnoški nedovoljan, jer ne obezbeđuje dovoljan broj genetski kvalitetnih potomaka, i ekonomski neisplativ (Singleton, 2001; Stančić i sar. 2009). Zbog toga se, sve češće, ističe potreba za povećanjem reproduktivne eksploatacije genetski superiornih nerastova. U našoj zemlji je broj (%) veštački osemenjenih plotkinja znatno manji od onog u razvijenim evropskim državama, ali se, i kod nas, sve više ističe potreba za povećanjem broja dobijenih inseminacionih doza godišnje, posebno od genetski superiornih nerastova (Stančić i sar., 2011; Stančić i sar., 2013).

Iz navedenih razloga, sve su češća ispitivanja faktora koji utiču na održavanje visokog stepena fertiliteta spermatozoida u ejakulatima većeg stepena razređenja i produženog čuvanja *in vitro* (Glossop, 2000; Stančić, 2000; Stančić i sar., 2008), kao i novih tehnologija VO, koje omogućavaju inseminaciju dozama znatno redukovano volumena i broja spermatozoida (Belstra, 2002; Rath, 2002; Stančić i sar., 2006; Stančić i sar., 2007).

Produkcija i kvalitet sperme nerasta zavise od brojnih faktora (mikroklimat, ishrana, frekvencija uzimanja ejakulata, genetika, starost i zdravstveno stanje) (Glossop, 2000; Stančić, 2002; Stančić i sar. 2003a; Wolf i Smital, 2009; Stančić i sar. 2012; Oliveira i sar., 2014). Pokazalo se, takođe, da sperma velikog broja nerastova ima nizak stepen tolerancije na veća razređenja i duže čuvanje *in vitro*, zbog čega nije moguće formirati maksimalan broj inseminacionih doza od ejakulata brojnih nerastova, iako numeričke vrednosti fertilizacionog kapaciteta datog ejakulata to dozvoljavaju (Waberski i sar., 1994; Kommisurd i sar., 2002; Stančić i sar. 2003b; Stančić i sar., 2011; Stančić i sar., 2012). Neka istraživanja, naime, pokazuju da povećan stepen razređenja i produžen period čuvanja tako razređene sperme, dovodi do značajne redukcije parametara fertilizacionog potencijala spermatozoida, posebno progresivne pokretljivosti i broja spermatozoida sa neoštećenim akrozomom i/ili ćelijskom membranom (Kommisurd et al., 2002; Maxwell et al., 2007; Bößenrodt et al., 2008; Gączarzewicz et al., 2010; Stančić et al., 2012; González-Cadavid et al., 2014). Ovaj negativan efekt povećanog razređenja inseminacionih doza, povezuje se sa značajnim smanjenjem koncentracije specifičnih bioaktivnih supstanci u spermalnoj plazmi razređene, u odnosu na nativnu spermu.

Brojna istraživanja su pokazala da spermalna plazma ima značajan uticaj na variranje stepena progresivne pokretljivosti spermatozoida i održavanje fertilizacionog kapaciteta razređene sperme pojedinih nerastova, tokom čuvanja *in vitro* (Weitze i sar., 1990b; Kommisurd i sar., 2002; Stančić i sar., 2002; Wolf i Smital, 2009; Stančić i sar., 2012). Istraživanja nekih autora pokazuju da bi proteini spermalne plazme mogli imati značajnu ulogu u ovim procesima (Flowers, 1998; Stančić, 2002; Stančić, 2005; Garcia i sar., 2009; Stančić i sar., 2012; Dimitrov, 2012; Stančić i sar., 2014). Osim toga, istraživanja nekih autora, takođe, pokazuju da postoji značajno variranje u sadržaju proteina u spermalnoj plazmi između pojedinih nerastova (Novak i sar., 2009), te da bi to moglo da se iskoristi za rangiranje nerastova po stepenu fertiliteta (Flowers, 2001).

Razređivanjem sperme se samanjuje sadržaj proteina (Flowers, 2001), prirodnih antioksidanata (Tvrda i sar., 2011) i drugih prirodnih bioaktivnih komponenti semene plazme (Gadea, 2005), koje su neophodne za održavanje visokog stepena progresivne pokretljivosti, kao i normalnu funkciju i integritet ćelijske membrane spermatozoida i akrozoma. Osim toga, proteini spermalne plazme, izgleda, imaju aktivnu ulogu za vreme razvoja i sazrevanja spermatozoida u muškom reproduktivnom traktu, kao i tokom boravka i preživljavanja spermatozoida u ženskom reproduktivnom traktu (Troedsson i sar., 2005; Strzezek i sar., 2005; Garcia, i sar., 2009). Pokazalo se da dodavanje razređivača u nativnu spermu, opada stepen progresivne pokretljivosti, a povećava se pojava aglutinacije spermatozoida. Zbog toga, prekomerno razređivanje nativnog ejakulata, u procesu formiranja inseminacionih doza, smanjuje fertilizacioni potencijal spermatozoida u takvim VO dozama (Rozeboom, 2000; Stančić i sar., 2012). Ovo se, sve češće, navodi kao razlog smanjenog fertiliteta veštački, u odnosu na prirodno osemenjene krmače (Spronk i sar., 1997; Stančić, 2000; Gadea, 2003; Zvekić, 2003; Alm i sar., 2006).

Problem povećanja stepena reproduktivne eksploatacije genetski superiornih nerastova, mogao bi se rešavati selekcijom nerastova sa visokim sadržajem proteina u ejakulatu, kao i primenom tehnologija veštačkog osemenjavanja dozama značajno redukovano volumena (sa sadašnjih 80ml do 100ml na 50ml) i broja spermatozoida (sa sadašnjih 4×10^9 na 2×10^9) (Belstra, 2002). Oba ova postupka bi omogućila formiranje znatno većeg broja inseminacionih doza po ejakulatu, pri čemu se stepen razređenja nebi značajno povećavao.

Upotrebu inseminacionih doza znatno redukovano volumena i broja spermatozoida, bez značajnog smanjenja fertiliteta osemenjenih krmača, omogućava nova tehnologija postcervikalne (plitke intrauterine) inseminacije (Roseboom i sar., 2004; Mezalira i sar., 2005; Stančić i sar., 2006; Stančić i sar., 2007; Radović i sar., 2007; Stančić i sar., 2010; Stančić i sar., 2013). Ovaj fenomen se bazira na fiziološkoj činjenici da se deponovanjem sperme u kranijalnije partije ženskog polnog trakta (telo materice, rogovi materice, uterotubalni spojevi ili jajovodi), volumen inseminacione doze i broj spermatozoida u dozi mogu radikalno redukovati (Hunter, 1973), pri čemu je fertilitet osemenjenih plotkinja isti ili veći u odnosu na klasično intracervikalno osemenjavanje (Krüger i Rath, 2000; Rath, 2002; Vansickle, 2002; Grafenau i sar. 2004; Mezalira i sar., 2005; Stančić i sar., 2008; Stančić i sar., 2013).

Uzimajući u obzir ove činjenice, primenom metode postcervikalne inseminacije, dozama duplo redukovano volumena (50 ml) i broja spermatozoida (2×10^9), u odnosu na doze koje se koriste kod konvencionalnog (intracervikalnog) osemenjavanja (80 ml do 100 ml, sa 4×10^9 spermatozoida) mogao bi se dobiti duplo veći broj inseminacionih doza po ejakulatu, ali pri duplo manjem stepenu razređenja. Ovo bi, verovatno, znatno povećalo potencijalni fertilizacioni kapacitet inseminacionih doza, kao i parametre fertiliteta (% prašenja i veličina legla), krmača osemenjenih ovom postcervikalnom (plitkom intrauterinom) metodom. Međutim, na osnovu analize brojne dostupne naučne literature, jasno se može konstatovati da su dosadašnji rezultati, u vezi praktične primene postcervikalne inseminacije, dosta nekonzistentni. To je, pre svega, posledica činjenice da su istraživanja vršena u različitim klimatskim i geografskim područjima, u različitim proizvodnim uslovima, kao i na farmama sa različitim vrednostima parametara efikasnosti proizvodnje svinja. Sa druge strane, nisu rešeni i neki praktični problemi primene postcervikalne inseminacije (nije moguće osemenjavati nazimice, povećana mogućnost infekcije uterusa, upotreba komplikovanije i skuplje procedure same inseminacije, veća stručnost i praktična obučenost radne snage) (Grafenau, sen. i Grafenau jr., 2004; Stančić, 2006).

Neka novija istraživanja, međutim, pokazuju da je moguće povećati parametre fertiliteta krmača (vrednost prašenja i veličina legla), primenom tzv. dvofazne inseminacije. Ova metoda podrazumeva klasičnu, intracervikalnu, inseminaciju konvencionalnim dozama (volumena 80 ml do 100 ml, sa oko 4×10^9 spermatozoida) ili postcervikalnu inseminaciju dozama duplo redukovano volumena i broja spermatozoida, uz prethodnu aplikaciju 30 ml sintetičke spermalne plazme (Martin Rillo i sar., 1996; Lyczynski, i sar, 2000; Garcia Ruvalcaba i sar., 2008; Garcia Ruvalcaba i sar., 2009; Dimitrov, 2012; Stančić i sar., 2014).

Na osnovu navedenih činjenica, jasno se može zaključiti da intenzivna proizvodnja svinja u svetu, a posebno kod nas, pokazuje nisku zootehnološku i ekonomsku efikasnost iskorištavanja genetski superiornih nerastova, kao i evidentno smanjenje fertiliteta veštački osemenjenih krmača. Ovo se, sve češće, pripisuje prekomernom razređivanju nativnog ejakulata, radi formiranja što većeg broja VO doza po ejakulatu, odnosno po nerastu godišnje. Prekomerno razređenje ejakulata ima za posledicu značajno smanjenje koncentracije

bioaktivnih supstanci u spermalnoj plazmi, odgovornih za održavanje fertilizacionog kapaciteta spermatozoida tokom *in vitro* čuvanja, i tokom njihovog boravka u reproduktivnom traktu krmače, kao i za odvijanje fizioloških procesa bitnih za normalnu oplodnju i embrionalni razvoj. Postoje brojna istraživanja ove složene problematike, ali su rezultati dosta nekonzistentni, zbog različitih uslova i metodologija istraživanja. S tim u vezi, bolje naučno razumevanje i praktično rešavanje ove aktuelne problematike, podrazumeva originalna istraživanja, u konkretnim i specifičnim uslovima intenzivne proizvodnje svinja.

Iz navedenih razloga, osnovni predmet istraživanja ove doktorske disertacije je da se, u našim uslovima intenzivne proizvodnje svinja, primenom savremenih i naučno priznatih metoda, ustanovi uticaj sadržaja proteina u spermalnoj plazmi nativnih ejakulata, na parametre fertilizacionog kapaciteta nativne i razređene sperme nerastova, kao i na parametre fertiliteta krmača veštački osemenjenih konvencionalnom intracervikalnom ili novom postcervikalnom metodom. Cilj je da se, na osnovu dobijenih rezultata, formuliše tehnologija efikasnijeg reproduktivnog iskorištavanja genetski superiornih nerastova i povećaju parametri fertiliteta veštački osemenjenih krmača na našim farmama.

2. CILJ I RADNE HIPOTEZE

Ciljevi istraživanja:

1. Prikazati sadašnje stanje reproduktivne eksploatacije nerastova i fertiliteta veštački osemenjenih krmača, u proizvodnim uslovima nekoliko vojvođanskih farmi za industrijsku (intenzivnu) proizvodnju svinja.
2. Izvršiti ispitivanje uticaja godišnje sezone, rase nerastova i sadržaja proteina u spermalnoj plazmi, na osnovne parametre fertilizacionog kapaciteta nativnih ejakulata nerastova, sa nekoliko vojvođanskih farmi intenzivne proizvodnje svinja.
3. Ispitati toleranciju sperme nerastova na stepen razređenja i čuvanje tečne razređene sperme *in vitro*, do 72h, na temperaturi 17°C, zavisno od godišnje sezone, rase nerastova i sadržaja proteina u spermalnoj plazmi.
4. Ustanoviti da li postoji značajno variranje sadržaja proteina u spermalnoj plazmi pojedinih nerastova.
5. Ustanoviti da li različit sadržaj proteina u spermalnoj plazmi utiče na variranje progresivne pokretljivosti i broja spermatozoida sa oštećenom čelijskom membranom i/ili akrozomom, u uzorcima sperme različitog stepena razređenja i trajanja čuvanja *in vitro*.
6. Ustanoviti da li mešanje spermatozoida jednog nerasta sa spermalnom plazmom drugog nerasta, koja sadrži različitu koncentraciju proteina, ima uticaja na promenu stepena progresivne pokretljivosti i broja spermatozoida sa oštećenom čelijskom membranom i/ili akrozomom, tokom čuvanja *in vitro*.
7. Ispitati uticaj konvencionalnog (intracervikalnog) i novog (postcervikalnog) veštačkog osemenjavanja dozama redukovanog volumena i broja spermatozoida, na osnovne parametre fertiliteta krmača.
8. Ispitati da li je moguće povećati parametre fertiliteta krmača osemenjenih konvencionalnom intracervikalnom metodom, primenom dvofazne inseminacije, koja podrazumeva aplikaciju određene količine native spermalne plazme, neposredno pre aplikacije inseminacione doze.

Ciljevi istraživanja su postavljeni na osnovu sledećih radnih hipoteza:

1. U industrijskim uslovima proizvodnje, parametri fertiliteta krmača osemenjenih konvencionalnom intracervikalnom metodom, sve češće su niži od onih kod prirodno

osemenjenih krmača. Kao jedan od primarnih razloga, navodi se preterano razređenje nativnih ejakulata, zbog potrebe formiranja maksimalno mogućeg broja inseminacionih (VO) doza po ejakulatu. Na ovaj način se višestruko redukuje koncentracija bioaktivnih supstanci u spermalnoj plazmi, što značajno smanjuje fertilizacioni kapacitet VO doze. što ima za rezultat smanjenu vrednost prašenja i manji broj prasadi u leglu kod prašenja.

2. Intenzivno povećanje količine i kvaliteta svinjskog mesa, zahteva maksimalnu efikasnost reproduktivnog iskorištavanja genetski superiornih nerastova. Sadašnja produkcija inseminacionih doza po ejakulatu, odnosno po nerastu godišnje, zootehnoški nije dovoljna, a ekonomski nije isplativa.
3. Rešavanje ovog problema se vidi u smanjenju volumena VO doze i broja spermatozoida u dozi. Na taj način bi se dobio isti broj VO doza po ejakulatu, uz proporcionalno smanjenje stepena razređenja ejakulata.
4. Smanjen stepen razređenja ejakulata bi imao za rezultat povećanu koncentraciju bioaktivnih supstanci u VO dozi i, posledično, povećanje parametara fertiliteta veštački osemenjenih plotkinja.
5. Sadržaj spermalne plazme u ejakulatu, kao i u VO dozama razređene sperme, sve se čašće navodi kao važan faktor povećanja potencijalnog fertilizacionog kapaciteta spermatozoida u tačnoj razređenoj spermi, čuvanoj *in vitro*, tokom nekoliko dana na 17°C.
6. Ejakulati sa većim sadržajem proteina imaju veću sposobnost održavanja visokog fertilizacionog potencijala spermatozoida u dozama razređene sperme, tokom perioda čuvanja *in vitro*.
7. Mešanjem spermalne plazme sa visokim sadržajem proteina, sa spermatozoidima nerastova čija sperma sadrži nizak sadržaj proteina, mogla bi povećati potencijalni fertilizacioni kapacitet VO doza formiranih od sperme ovih nerastova.
8. Primenom nove metode postcervikalne (tzv. plitke intrauterine) inseminacije, moguće je koristiti VO doze duplo redukovanog volumena i broja spermatozoida, bez značajnijeg smanjenja parametara fertiliteta tako osemenjenih krmača, u odnosu na krmače osemenjene konvencionalnom intracervikalnom metodom.
9. Proteini, kao i druge aktivne supstance spermalne plazme (oksitocin, prostaglandini, citokini) imaju značajnu ulogu na preživljavanje i funkciju spermatozoida u ženskom polnom traktu. Zbog toga se pretpostavlja da bi dodavanje spermalne plazme, neposredno pre aplikacije klasične VO doze, moglo povećati fertilitet osemenjenih krmača. Neki rezultati sa dodavanjem sintetičke spermalne plazme, idu u prilog ovoj pretpostavci.
10. Dobijen rezultati bi imali naučni i praktičan doprinos rešavanju veoma važnog pitanja nedovoljno efikasne eksploatacije genetski superiornih nerastova, kao i problema smanjenog fertiliteta krmača osemenjenih konvencionalnom intracervikalnom metodom, u industrijskim uslovima proizvodnje svinja.

3. PREGLED LITERATURE

Osnovni koncept istraživanja u ovoj doktorskoj disertaciji je da se, u prvom delu, prikažu osnovni parametri reproduktivne performanse nerastova i krmača na vojvođanskim farmama intenzivne proizvodnje svinja. A u drugom delu da se prikažu eksperimentalni rezultati uticaja raznih faktora na kvalitet nativne i razređene sperme nerasta, kao i uticaj dodavanja spermalne plazme na fertilitet intracervikalno i postcervikalno osemenjenih krmača. Zbog toga će i dosadašnji rezultati, do kojih su došli drugi autori, u vezi sa navedenom problematikom, biti prikazani, prateći ovaj opšti koncept istraživanja.

3.1. REPRODUKTIVNA PERFORMANSA NERASTOVA U INTENZIVNOJ PROIZVODNJI

Reproduktivna performansa nerastova, u intenzivnoj proizvodnji svinja, u užem smislu, obuhvata parametre reproduktivnog iskorištavanja nerasta, kao što su: frekvencija uzimanja sperme nedeljno, broj inseminacionih doza po ejakulatu, odnosno po nerastu godišnje, starost nerasta na početku reproduktivnog iskorištavanja i period reproduktivnog iskorištavanja. U širem smislu, reproduktivna performansa nerasta obuhvata broj osemenjenih krmača, broj oprašenih od broja osemenjenih krmača, kao i broj proizvedene živo rođene prasadi za ceo period reproduktivnog iskorištavanja (*Singleton i Flowers, 2001; Stančić, 2006*).

Sa stanovišta intenzivne proizvodnje prasadi, efikasnost reproduktivne eksploatacije nerastova je znatno važnija od reproduktivne efikasnosti krmača (*Robinson and Buhr, 2005; Smital, 2009*). Naime, čak i kod prirodnog osemenjavanja, jedan nerast može dati minimalno 52 ejakulata godišnje (jedan ejakulat, skok) nedeljno. Sa ovim brojem ejakulata, moguće je osemeniti oko 10 krmača (5 ejakulata po krmači godišnje) i dobiti oko 100 do 120 živo rođene prasadi. Sa druge strane, jedna krmača može godišnje proizvesti oko 20 do 25 živo rođene prasadi godišnje. Kod primene konvencionalnog veštačkog osemenjavanja, broj proizvedene živo rođene prasadi se višestruko povećava. Naime, sa prosečno oko 1200 inseminacionih doza po nerastu godišnje, moguće je osemeniti oko 240 krmača i dobiti 2400 do 2900 živorođene prasadi. Na ovaj način, u tehnologiji veštačkog osemenjavanja (VO), nerastovi vrlo značajno utiču na ukupan broj proizvedene parasadi na farmi, kao i na unos novih, superiornih, gena u populaciju zapata (*Gerrits i sar., 2005; Stančić i sar., 2006; Maes i sar., 2011*), bez velikog rizika za unos zaraznih bolesti (*Maes i sar., 2008*).

Tabela 1. Osnovni parametri kvaliteta ejakulata nerasta

Autori	Parametri ejakulata			
	Volumen (ml)	Koncentracija ($\times 10^6$ /ml)	Ukupan br. spermatozoida ($\times 10^9$)	Progresivna pokretljivost (%)
<i>Katanić (2004)</i>	256	204	52	77
<i>Smital (2009)</i>	280	352	98	75
<i>Stančić i sar. (2011)</i>	278	200	56	84
<i>Stančić i sar. (2012)</i>	253	254	64	78
<i>Stančić i sar. (2013)</i>	265	235	62	77
<i>Wolf i Smital (2014)</i>	260	396	103	76

3.1.1. REPRODUKTIVNA EKSPLOATACIJA

Za problematiku istraživanja u ovoj doktorskoj disertaciji, značajno je detaljnije prikazati dosadašnja saznanja u vezi parametara reproduktivnog iskorištavanja nerastova na farmama industrijske proizvodnje svinja, na kojima se primenjuje tehnologija veštačkog osemenjavanja.

Veštačko osemenjavanje (VO) je najvažnija biotehnološka metoda, koja se primenjuje u intenzivnoj stočarskoj proizvodnji, već više od 60 godina (*Foote, 2002*). Ova tehnologija je, tokom poslednjih nekoliko decenija, nesumnjivo, imala i ima najveći uticaj na razvoj intenzivne proizvodnje svinja u svetu (*Gadea, 2003; Broekhuijse i sar., 2012*). To je, pre svega, posledica većeg broja prednosti primene veštačkog nad prirodnim osemenjavanjem. Među tim prednostima se ističu: (a) dobijanje znatno većeg broja potomaka od genetski superiornih mužjaka, (b) mogućnost efikasnog sprečavanja širenja i eradikacije zaraznih bolesti, (c) mogućnost dugotrajnog čuvanja sperme mužjaka sa genetski poželjnim osobinama, (d) lak transport sperme na velike udaljenosti, (e) jednostavna tehnika primene u širokoj proizvodnoj praksi i (e) potrebna oprema ima prihvatljivu cenu. Značaj i obim primene veštačkog osemenjavanja svinja, dobro ilustruje i činjenica da se, u svetu, godišnje proizvede preko 90 miliona doza sperme nerastova (*Foote, 2002; Stančić i Veselinović, 2002; Thibier i Wagner, 2002; Stančić i Dragin, 2011*).

U mnogim razvijenim državama Evrope (Holandija, Francuska, Nemačka, Španija, Norveška, Finska, Engleska), preko 99% krmača i nazimica se veštački osemenjava konvencionalnom intracervikalnom metodom (*Almin i sar., 2006*). Ova metoda podrazumeva upotrebu doza sveže razređene sperme, volumena 80 ml do 100 ml, koje sadrže 3 do 6×10^9 (prosečno 4×10^9) progresivno pokretnih spermatozoida. Doze tečne razređene sperme se čuvaju 0 do 5 dana, na 15 do 20°C, (optimalna temperatura čuvanja je +17°C). Pri tome se oko 85% doza upotrebi istog ili sledećeg dana posle uzimanja ejakulata od nerasta, odnosno formiranja doza. Manje od 1% svih osemenjavanja se izvodi dozama čuvanim tehnologijom dubokog zamrzavanja (u tečnom azotu, na temperaturi - 196°C). Ovom tehnologijom se postižu znatno niže vrednosti osemenjenih krmača, pa se koristi samo u specijalnim programima gentskog unapređenja postojećih i formiranja novih rasa i linija svinja, u tzv. nukleus zapatima (*Johnson i sar., 2000; Khalifa i sar., 2014*), za transport sperme na veće udaljenosti ili u različitim istraživačkim programima (*Wongtawan i sar., 2006; Heise, 2012*).

Singleton (2001) je ustanovio da se sperma uzima prosečno 4.7 puta mesečno, odnosno da se od jednog nerasta dobija 100 inseminacionih doza mesečno (oko 21 doza nedeljno), odnosno oko 1200 doza po nerastu godišnje. Ovim brojem doza se, u prosečno dobrim zapahtima, može osemeniti 220 do 240 krmača godišnje (prosečno je potrebno 5 doza po krmači godišnje) (*Singelton, 2001*). Međutim, ispitivanjem 1646 nerastova, na nekoliko farmi u SAD, *Rutten i sar. (2000)* nalaze da prosečan broj upotrebljivih doza po ejakulatu iznosi 27, sa prosečno 3×10^9 fertilnih spermatozoida po dozi, te da je prosečna frekvencija uzimanja ejakulata 1.2 nedeljno.

U našoj zemlji je broj (%) veštački osemenjenih plotkinja znatno manji od onog u razvijenim evropskim državama, ali se, i kod nas, sve više ističe potreba za povećanjem broja dobijenih inseminacionih doza godišnje, posebno od genetski superiornih nerastova (*Stančić i sar., 2007; Stančić i sar., 2008; Stančić i sar., 2009*). *Stančić i sar. (2012)* su, na našim farmama u Vojvodini, ustanovili da se, po ejakulatu pravi 10 do 20 (prosečno 13) inseminacionih doza, koje sadrže oko 5×10^9 progresivno pokretnih spermatozoida. Međutim, ranija istraživanja, koja si izveli *Stančić i sar., (2009)*, pokazuju da bi se prosečan broj doza po ejakulatu, na našim farmama, mogao povećati na 15 do 22, kada bi se broj progresivno pokretnih spermatozoida po dozi smanjio na 3×10^9 ili 2×10^9 .

Tabela 2. Poželjne vrednosti parametara ejakulata, koji će biti korišteni za formiranje inseminacionih doza za VO* (*Stančić, 2006*)

Parametar	Normalne vrednosti	Granične vrednosti
Volumen ejakulata (ml)	100 - 150	min. 120
Ukupan broj spermatozoida u ejakulatu ($\times 10^9$)	20 - 100	min. 20
Progresivna pokretljivost spermatozoida (%)	70 - 95	min. 65
Aglutinacija (% pokrivenosti vidnog polja mikroskopa)	0 - 10	max. 25
Morfološki abnormalnih spermatozoida (%)	5 - 15	max. 35
Abnormalnosti akrozoma (%)	5 - 10	max. 45
Proksimalna citoplazmatska kap (%)	5 - 10	max. 40
Distalna citoplazmatska kap (%)	do 60	max. 80

*Za doze čuvane u tečnom razređenom stanju, na $+17^\circ\text{C}$, tokom maksimalno 72h.

3.1.2. POVEĆANJE REPRODUKTIVNOG ISKORIŠTAVANJA NERASTOVA

Upotrebom inseminacionih doza sa oko 5×10^9 progresivno pokretnih spermatozoida, kako se to radi u našoj proizvodnoj praksi (*Stančić i sar., 2009*), od prosečnog ejakulata se može formirati 11 doza, zavisno od rase nerastova (između 12.6 i 7.8 doza). Redukcijom broja spermatozoida u dozi na 4×10^9 , broj doza se može povećati na 14, dok se daljom redukcijom broja spermatozoida na 2×10^9 , može formirati 28 inseminacionih doza po ejakulatu.

Prosečan broj inseminacionih doza po nerastu godišnje, koji se dobija u savremenoj konvencionalnoj tehnologiji intracervikalnog osemenjavanja, nije dovoljan za zootehnoški efikasno i ekonomski isplativo iskorištavanje genetski superiornih nerastova. Naime, ovaj broj

doza ne obezbeđuje dovoljan broj genetski kvalitetnih potomaka od jednog nerasta (*Singleton, 2001; Stančić i sar. 2009; Khalifa i sar., 2014*). Osim toga, cena jedne inseminacione doze učestvuje sa preko 50% u ukupnoj ceni veštačkog osemenjavanja.

Zbog toga se, sve češće, ističe potreba za povećanjem reproduktivne eksploatacije genetski superiornih nerastova. U principu, ovo se može postići na dva osnovna načina: (a) povećanjem produkcije sperme kod nerastova i (b) povećanjem broja inseminacionih doza po ejakulatu (*Flowers, 1998; Glossop, 2000; Stančić, 2000; Stančić i sar., 2009*). Na prvi način nije moguće postići brz napredak u povećanju reproduktivne efikasnosti nerastova, jer je produkcija sperme podvrgnuta uticaju brojnih paragenetskih faktora, koje je dosta teško kontrolisati u proizvodnoj praksi, sa jedne strane, dok je stepen nasledivosti (heritabilitet, h^2) svih parametara ejakulata vrlo nisko nasledan (*See, 2002; Stančić i sar., 2009*). Drugi način, tj. povećanje broja VO doza po ejakulatu, povezan je ili sa smanjenjem broja spermatozoida u dozi, ili sa povećanjem stepena razređenja ejakulata. U oba slučaja, posebno kod povećanog stepena razređenja ejakulata, dolazi do smanjenog fertilizacionog kapaciteta inseminacione doze (*Waberski i sar., 1994; Kommisurd i sar., 2002; Stančić i sar. 2003b; Stančić i sar., 2012*), odnosno smanjenog fertiliteta tako osemenjenih krmača (*Spronk i sar., 1997; Stančić, 2000; Gadea, 2003; Zvekić, 2003; Alm i sar., 2006*). Ovo, još više, komplikuje činjenica da sperma svega 20% do 30% nerastova ima zadovoljavajuću toleranciju na visok stepen razređenja i duže *in vitro* čuvanje (*Weitze, 1990; Baltés, 1993*). Istraživanja izvedena na velikim svinjogojskim farmama u Vojvodini, pokazuju da oko 60% ispitivanih nerastova, svih važnijih rasa, podnose stepen razređenja 1:4, tokom 24 sata čuvanja na $+17^{\circ}\text{C}$, te da ovaj broj opada na svega oko 20%, posle čuvanja u trajanju od 72 sata, na istoj temperaturi i pri istom stepenu razređenja (*Stančić, 2002; Stančić i sar., 2003b*). Osim toga, pokazalo se da progresivna pokretljivost spermatozoida opada sa povećanjem dodavanja razređivača u nativnu spermu. Time se smanjuje stepen fertilizacione sposobnosti formiranih inseminacionih doza (*Rozeboom, 2000; Stančić i sar., 2011*). Ovo ukazuje na činjenicu da semena plazma ima značajan uticaj na stepen progresivne pokretljivosti spermatozoida i održavanje njihove oplodne sposobnosti *in vivo* i *in vitro* (*Waberski i sar., 1994; Stančić, 2002; Kommisrud i sar., 2002; Wolf i Smital, 2009*).

Zbog toga se povećanje stepena reproduktivne eksploatacije genetski superiornih nerastova, pokušava rešiti primenom novih tehnologija veštačkog osemenjavanja. U osnovi, ove tehnologije se zasnivaju na smanjivanju broja spermatozoida u dozi za inseminaciju, kako bi se mogao napraviti veći broj inseminacionih doza od jednog ejakulata, a da se, pri tome, ne povećava značajno stepen razređenja ejakulata (*Belstra, 2002*). Naime, od jednog prosečnog ejakulata volumena 250 ml, sa 50×10^9 progresivno pokretnih spermatozoida, može se napraviti 12 VO doza volumena 100 ml, sa 4×10^9 spermatozoida. U tom slučaju, razređen ejakulat ima 1200 ml, odnosno razređen je u odnosu 1:5. Ako bi se, međutim, volumen doze i broj spermatozoida duplo redukovali (50 ml sa 2×10^9 spermatozoida), od istog ejakulata se može napraviti duplo veći broj VO doza (24), pri čemu stepen razređenja ostaje isti (*Stančić i sar., 2009; Stančić i sar., 2011*). Pri tome se mora voditi računa da inseminacija takvim dozama, ne smanji stepena postignutog fertiliteta krmača (*Rath, 2002; Stančić, 2002; Stančić i sar., 2003; Roberts i Bilkei, 2005; Stančić i sar., 2010; Stančić i sar., 2013; Rogožarski i sar., 2013*).

Tehnologija VO se permanentno razvija, sa osnovnim ciljem da se: (a) postigne maksimalan stepen fertiliteta osemenjenih ženki, (b) maksimalno poveća broj inseminacionih doza po jednom ejakulatu, (c) da se obezbedi maksimalna higijena primene VO i (d) da se

postigne maksimalna ekonomska efikasnost tehnologije VO (*Ponsart i sar., 2004; López Rodríguez, 2012*). S tim u vezi, savremena istraživanja su naročito usmerena na iznalaženje efikasnih metoda ocene kvaliteta sperme, metode efikasnog razređivanja i dugotrajnog čuvanja inseminacionih doza sperme različitih vrsta životinja, tehnike inseminacije ženki, određivanje optimalnog momenta inseminacije, efikasnih metoda otkrivanja i sinhronizacije estrusa (*Foote, 2002*).

3.2. REPRODUKTIVNA PERFORMANS KRMAČA U INTENZIVNOJ PROIZVODNJI

Intenzivna proizvodnja svinja, odnosno svinjskog mesa, u značajnoj meri direktno zaisi od reproduktivne efikasnosti krmača (*Stančić, 2005; Varley, 2012*). Osnovni parametar reproduktivne efikasnosti krmača je broj zalučene prasadi po krmači godišnje (*Wilson i Dewey, 1994; Stančić, 1994; Koketsu, 2005; Stančić, 2005; Tanaka i Koketsu, 2007*). Ova vrednost je direktan proizvod godišnjeg indeksa prašenja (tj. broja prašenja po krmači godišnje) i broja zalučene prasadi po leglu (*Stančić, 2005*), a zavisi od brojnih faktora, među kojima su najznačajniji: (a) trajanje jednog reproduktivnog ciklusa (period između dva sukcesivna prašenja), (b) paritetna struktura zapata i trajanje perioda reproduktivnog iskorištavanja krmača (broj prašenja po krmači) i (c) prosečan broj živo rođene prasadi i stepen mortaliteta prasadi tokom laktacionog perioda (*Koketsu, 2005; Tanaka i Koketsu, 2007*).

Trajanje reproduktivnog ciklusa je određeno trajanjem perioda gestacije (suprasnosti), perioda laktacije i perioda od zalučenja do fertilnog osemenjavanja. Kako je period gestacije biološka konstanta, a trajanje laktacije se, u proizvodnim uslovima, može samo ograničeno skraćivati ili produžavati, to se, na trajanje jednog reproduktivnog ciklusa, može značajnije uticati biotehnološkim i veterinarsko medicinskim merama, koje mogu skratiti interval od zalučenja do prvog, odnosno do fertilnog estrusa (*Stančić i sar., 2000; Timotijević, 2001; Stančić, 2005; Koketsu, 2005*). Većina istraživanja jasno pokazuje da krmače sa kratkim intervalom zalučenje - estrus (do 7 dana), imaju veću vrednost (%) prašenja, tj. uspešnog osemenjavanja u prvom postlaktacijskom estrusu (80% do 90%), kao i da rađaju veći broj živo rođene prasadi po leglu (11 do 13), u odnosu na krmače kod kojih je ovaj interval prolongiran (vrednost prašenja (60% do 77%, a broj živo rođene prasadi po leglu 8,5 do 10,5) (*Le Cozler i sar., 1997; Stančić, 1997a; Stančić, 1997b; Borchart Netto, 1998; Jotanović, 2000; Stančić i sar., 2000; Timotijević i sar., 2003*). Trajanje intervala zalučenje - estrus do 7 dana se smatra normalnim za zdrave krmače, kod kojih laktacija traje 4 do 6 nedelja. Ako je ovaj interval prolongiran, to ukazuje na mogućnost pojave reproduktivnih poremećaja i nižu reproduktivnu performansu krmača u narednom reproduktivnom ciklusu. Smatra se da, u dobrim zapažanjima, preko 85% krmača treba da manifestuje znake estrusa unutar prvih 7 dana posle zalučenja (*Tubbs, 1990; Napel i sar., 1998; Stančić i sar., 2000; Stančić, 2005; Koketsu, 2007*). Trajanje intervala zalučenje - estrus zavisi od većeg broja faktora, od kojih su najuticajniji: paritet prašenja (*Timotijević i sar., 2003*), ishrana krmača, posebno tokom laktacije, trajanje laktacije (*Tubbs, 1990*), godišnja sezona (*Stančić i sar., 2010*), uslovi smeštaja krmača (*Hemsworth, 1982*), tretman egzogenim hormonima (*Stančić i sar., 2010*) i infektivne bolesti, posebno uterusa i vimena, (*Hogg i Levis, 1997; Waller i sar., 2002; Stančić i sar., 2010; Stančić i sar.,*

2011). Neka istraživanja pokazuju da postoji mogućnost genetske predispozicije krmača za trajanje intervala zalučenje – estrus (*Hoshino i Koketsu, 2008*).

Vrednost prašenja je važan parametar reproduktivne efikasnosti krmača, koja se, obično, iskazuje procentualnim odnosom broja oprашenih od broja osemenjenih krmača (*Koketsu, 2005; Stančić, 2005*). U zapaćtima visoke reproduktivne efikasnosti, ova vrednost treba da se kreće između 85% i 90% (*López i Milling, 2008; Yuong i sar., 2010*). Vrednost prašenja zavisi od: (a) faktora koji utiću na efikasno izvedenu inseminaciju (taćno otkrivanje estrusa, kvalitet upotrebljene sperme, pravilno izvedena tehnika inseminacije i pravilan postupak sa krmaćom neposredno posle inseminacije) (*Kemp i Soede, 1996; Spronk i sar., 1997; Stančić i Šahinović, 1998; Stančić i Radović, 2004*) i (b) faktora koji utiću na ukupno intrauterino (prenatalno) preživljavanje embriona i fetusa (*Gagrćin i sar., 2003; Stančić, 2005; López i Milling, 2008*), što je, najćešće, posledica agenasa infektivne etiologije (*Vanroose i sar., 2000; Stančić i sar., 2004; Stančić i sar., 2010; Stančić i sar., 2011*). Vrednost prašenja ispoljava tendenciju opadanja, u poslednjih 2 do 3 decenije. Tako se ova vrednost kretala, na vojvoćanskim farma 80-ih godina prošlog veka, između 85% i 95% (*Žaja, 1989; Šijaćić i sar., 1981; Mišković i sar., 1981*). Međutim, prema istraživanjima koje su izveli *Stančić i sar. (2011)*, na nekoliko većih vojvoćanskih farmi, prosećna vrednost prašenja je iznosila 77% (65% kod prvopraskinja, a 74% do 78% kod krmaća viših pariteta prašenja). Do sličnih rezultata je došao i *Maletić (2012)*, na većim farmama u Srbiji, BiH i Hrvatskoj, gde se vrednost prašenja kretala između 73% i 80%.

Broj živorođene prasadi u leglu je sledeći važan parametar reproduktivne efikasnosti krmaća u zapaćtima intenzivne proizvodnje svinja, a zavisi od: (a) ovulacione vrednosti u fertilnom estrusu, (b) broja oplodjenih od broja ovuliranih oocita, (c) stepena intrauterinog (prenatalnog) preživljavanje embriona i fetusa i (d) mortaliteta plodova tokom procesa prašenja (*Stančić i sar., 2004; Stančić, 2005; Trujillo-Ortega i sar., 2007*).

Kod intenzivnih belih rasa svinja, broj živo rođene prasadi u leglu, varira između 8,5 i preko 12 prasadi, zavisno od brojnih genetskih (rasa, linija, kombinacija meleženja, stepen inbreedinga) i paragenetskih faktora (paritet prašenja, ishrana, smeštaj, zdravstveni status krmaća i godišnja sezona) (*Todd, 2000; Tummaruk i sar., 2000; Stančić i sar., 2002; Gagrćin i sar., 2002; Radović i sar., 2003; Radović i sar., 2006; Kovićin i sar., 2006; Kovićin i sar., 2008; Smith i sar., 2008; Radović i sar., 2010; Stančić i sar., 2011; Radović i sar., 2011*). Prosećan broj živo rođene prasadi u razvijenim zemljama EU, je znatno veći: 12,7 (Danska), 12,5 (Francuska), 12,1 (Švedska), 11,9 (Holandija) i 11,2 (Irska) (*Pigsys, 2006*). Prema istraživanjima koje je izveo (*Maletić, 2012*), na našim farmama, prosećan broj živo rođene prasadi je nešto niži u poređenju sa evropskim razvijenim zemljama, a zavisno od farme i godine istraživanja, varira između 9,4 do 10,6 prasadi.

Broj zalučene prasadi po leglu, primarno zavisi od broja živo rođene i broja uginule prasadi tokom laktacije. Ovaj broj može znaćajno varirati, zavisno od brojnih faktora, kao što su tehnološki i higijenski uslovi smeštaja krmaća i legla tokom laktacije, ishrane krmaća u zadnjoj trećini gestacije i tokom laktacije, broja prasadi u leglu, pariteta krmaće, raznih infektivnih i alimentarnih obolenja krmaće i prasadi i trajanja laktacije (*Stančić, 2005*). Na visoko produktivnim farmama u SAD, prosećano se, po krmaći godišnje, zaluču 24 prasadi (*Koketsu, 2007*). Ovaj broj je, na našim farmama, znatno niži i, prema istraživanjima koje je izveo *Maletić (2012)*, u periodu od 2000. do 2009. godine, prosećan broj zalučene prasadi po krmaći godišnje se kretao između 17,2 i 21,8 prasadi. Pri tome je, po leglu, prosećno zalučeno između 8,1 do 9,8 prasadi, dok je ukupan broj legala po krmaći godišnje (tj. indeks prašenja) iznosio 2,10 do 2,40. Mortalitet prasadi tokom laktacije se kreće između 10% i 15% i uzrok je

vrlo značajnih ekonomskih gubitaka u intenzivnoj proizvodnji svinja, jer se događa kod preko 60% legala (*KilBride i sar., 2012*). Najveći broj prasadi uquine zbog ugnječenja, zatim zbog izgladnjivanja, diareje i drugih razloga (*Hong i sar., 2006; McManus, 2011*).

Vrednost izlučenih krmača iz zapata za godinu dana (tzv. godišnji remont krmača), takođe je važan faktor procene reproduktivne efikasnosti zapata (*Sasaki i Koketsu, 2008*). Naime, manji godišnji remont smanjuje cenu proizvodnje, jer se, smanjuje broj potrebnih suprasnih nazimica, koje treba uvesti u zapat, umesto izlučenih krmača (*Koketsu, 2007*). Poremećaji reprodukcije i različita oboljenja, su osnovni razlozi, zbog kojih se donosi odluka o izlučenju krmače (*Anil i sar., 2005; Engblom i sar., 2008; Sasaki i Koketsu, 2010*). U razvijenim zemljama sveta, krmače ostvare prosečno 4 do 5 prašenja (*Engblom i sar., 2007; Saito i sar., 2011*), dok je, na našim farmama, ova vrednost niža i iznosi 3.5 prašenja, sa godišnjim remontom krmača između 40% i 46% (*Maletić, 2012*). Konačno, uginuće krmača, zbog različitih uzroka, takođe je značajan faktor izlučenja iz reproduktivnog zapata i smanjenja ekonomičnosti proizvodnje svinja (*Tubbs i sar., 1993; Karg i Bilkei, 2002; Sasaki i Koketsu, 2008*).

Zdravstveno stanje reproduktivnog zapata (krmače, nerastovi, nazimice), značajno utiče na reproduktivnu efikasnost (*Stančić i sar., 2003; Yeske, 2007*).

Tabela 3. Vrednost osnovnih parametara reproduktivne performanse krmača (*Cit. Apić, 2014*)

P a r a m e t r i	Vrednosti parametara	
	SAD ¹	Srbija ²
Trajanje laktacije (dani)	21	28
Živo rođene prasadi po leglu (n)	11,0	10,2
Zalučene prasadi po osemenjenoj krmači godišnje (n)	24,1	18,0
Zalučeno legala po osemenjenoj krmači godišnje (n)	2,41	2,02
Zalučene prasadi po leglu (n)	10,0	8,4
Mortalitet prasadi od prašenja do zalučenja (%)	9,2	12,1
Težina legla kod zalučenja (kg)	60.7	Nije merena
Prosečno trajanje intervala zalučenje – estrus (dani)	6,5	7,2
Osemenjeno krmača unutar prvih 7 dana po zalučenju (%)	89,4	75,3
Vrednost prašenja (%)	86,2	77,6
Izlučeno krmača iz reproduktivnog zapata godišnje (%)	30-40	40-50

¹*Koketsu (2007);* ²*Prema raznim autorima (od 2005. do 2010. godine).*

Minimalne vrednosti nekih osnovnih reproduktivnih parametara, koji bitno utiču na reproduktivnu efikasnost zapata (*Hughes, 2004; Stančić, 2008*):

- ✓ Nazimica u estrusu do 200 dana starosti - 85%,
- ✓ Anestrične nazimice do 8 meseci starosti - do 5%,
- ✓ Starost nazimica kod fertilnog osemenjavanja - 210 do 240 dana,
- ✓ Telesna masa nazimica kod fertilnog osemenjavanja - minimalno 130 kg,
- ✓ Debljina leđne slanine nazimica kod fertilnog osemenjavanja - minimalno 18 mm,
- ✓ Fertilno osemenjavanje nazimica u drugom postpubertetskom estrusu,
- ✓ Živo rođene prasadi u prvom leglu - 10.2,
- ✓ Zalučene prasadi po krmači godišnje - 25.2,

- ✓ Godišnji indeks prašenja (legala po krmači godišnje) - 2.45,
- ✓ Vrednost prašenja - više od 87%,
- ✓ Živo rođene prasadi po leglu krmača - 11.3 i
- ✓ Maksimalna vrednost godišnjeg remonta krmača - 38%.

3.3. PRODUKCIJA I OSOBINE SPERME NERASTA

Ne postoji jedinstveni parametar, ili metoda kojom bi se direktno odredio fertilizacioni kapacitet sperme nerasta (*Stančić, 2006*). Međutim, pokazalo se da neke osobine, odnosno parametri ejakulata (progresivna pokretljivost, morfologija, stepen aktivnosti i koncentracija spermatozoida u ejakulatu), imaju značajnog uticaja na fertilizacioni potencijal sperme, odnosno na fertilitet osemenjenih krmača (vrednost prašenja, broj živo rođene prasadi u leglu) (*Popwell i Flowers, 2004; Gadea, 2005*). Zbog toga je, za efikasno reproduktivno iskorištavanje nerastova, potrebno znati faktore koji utiču na produkciju i vrednosti parametara ejakulata nerasta.

3.3.1. PRODUKCIJA SPERME

Produkcija sperme zavisi od brojnih paragenetskih (godišnja sezona, posebno ambijentalna temperatura i trajanje dnevnog fotoperioda (*Šernien i sar., 2002; Stančić, 2002; Stančić i sar., 2003a; Stančić i sar., 2003b; Lipenský i sar., 2010; Lapuste i sar., 2011; Stančić i sar. 2012*), ishrana (*Wilson i sar., 2004*), starost nerasta (*Wolf i Smital, 2009; Oliveira i sar., 2014; Szostak i Przykaza, 2011*), uslovi smeštaja, i zdravstveno stanje nerasta (*Glossop, 1998; Glossop, 2000*) i genetskih faktora, kao što su rasa, linija i individua (*Jankevičiūtė i Žilinskas, 2002; Katanić, 2004; See, 2002; Stančić i sar., 2003a; Smital, 2009*).

Spermatozoidi se, prvi put, javljaju u semenim kanalićima testisa, kod prepubertetskih nerastića starih oko 4 meseca. Polno sazrevanje (pubertet) započinje sa oko 5 ½ meseci starosti, kada se spermatozoidi nalaze u ejakulatu. Tokom sledećih 6 do 18 meseci, testisi intenzivno povećavaju svoju veličinu, a koncentracija spermatozoida i volumen ejakulata nastavljaju da se povećavaju. Smatra se da je nerast potpuno polno zreo sa punih 18 meseci starosti, jer se, posle ovog perioda, ne uočavaju značajne promene u parametrima ejakulata (volumen, koncentracija, ukupan broj spermatozoida, progresivna pokretljivost, broj mrtvih i patološki promenjenih spermatozoida). Dnevna produkcija spermatozoida je dosta varijabilna i kreće se između 12 i 14.5×10^9 . Nedeljna produkcija sperme po nerastu iznosi 51 do 150×10^9 , što omogućava da se, nedeljno po nerastu, dobije 20 do 40 VO doza (*Knox, 2013*). Prosečno se, od jednog nerasta, dobija oko 1.144 inseminacionih doza godišnje (22 doza po ejakulatu \times 52 nedelje, tj. uzimanje sperme jednom nedeljno), što je dovoljno za uspešno osemenjavanje svega oko 230 krmača godišnje (u dobrim zapaćima je potrebno prosečno 5 VO doza po krmači godišnje) (*Singleton, 2001; Khalifa i sar., 2014*). Istraživanja koje su izveli *Rutten i sar. (2000)* pokazuju da se prosečan broj inseminacionih doza po ejakulatu povećava sa 19, kada je interval između uzimanja ejakulata 1 dan, na 29, kada ovaj interval iznosi 10 dana. U istom istraživanju se pokazalo da se broj fettilnih spermatozoida po dozi kreće između 2.5 i

5×10^9 . Prosečan broj ejakulata je 1.2 nedeljno po nerastu. Pri tome se napravi oko 30 upotrebljivih doza po ejakulatu, sa 3×10^9 fertilnih spermatozoida.

Tabela 4. Osnovni parametri kvaliteta ejakulata nerasta (*Frunzä i sar., 2008*)*

Osobine	Vrednosti
Volumen ejakulata (ml)	250 (100 - 1200)
Koncentracija spermatozoida ($\times 10^6$ /ml)	262 (100 - 600)
Ukupan broj spermatozoida u ejakulatu ($\times 10^9$)	56 (10 - 120)
Progresivna pokretljivost spermatozoida (%)	70 (65 - 95) ¹
Morfološki abnormalni spermatozoidi (%)	10 do 60
Mrtvi spermatozoidi (%)	10 do 70
Spermatozoidi sa proksimalnom citoplazmatskom kapi (%)	20 do 40
Spermatozoidi sa distalnom citoplazmatskom kapi (%)	30 do 70

*Prema raznim autorima. ¹Kod dobrih ejakulata.

3.3.2. FAKTORI KOJI UTIČU NA PARAMETRE EJAKULATA

Iako na parametre ejakulata nerasta utiče veći broj genetskih i paragenetskih faktora, ipak se, u ovom pogledu, ističu frekvencija uzimanja sperme, starost nerasta, rasa i godišnja sezona (*Colenbrander i Kemp, 1990; Gordon, 1997; Stančić i sar., 2003a*). Kako navode *Smital i sar. (2004)*, istraživanja brojnih autora jasno pokazuju da razlike u fertilitetu nerastova više zavise od genetskih nego od paragenetskih (spoljašnjih) faktora. Otkrivanje tih razlika između pojedinih nerastova je od velike važnosti za proizvodnju svinja, jer nerastovi imaju veliki uticaj na reproduktivnu performansu zapata, naročito ako se radi o primeni veštačkog osemenjavanja (*Juonala i sar., 1998*).

Frekvencija uzimanja sperme. Za nerastove mlađe od 12 meseci, preporučuje se uzimanje sperme jednom nedeljno, a za one starije od 12 meseci 3 puta u dve nedelje. Kvalitet ejakulata dosta varira u zavisnosti od frekvencije uzimanja sperme. Optimalna frekvencija uzimanja sperme značajno varira individualno, između pojedinih nerastova (*PIC Sires, 2013*). Proizvedeni spermatozoidi se čuvaju u repu (cauda) epididimisa, koji ima kapacitet od 120 do 160×10^9 spermatozoida kod polno zrelog nerasta. Jedan ejakulat, može da sadrži 50% do 60% od ovog broja spermatozoida. U slučaju da nerast ne ejakulira 1 do 2 dana, višak spermatozoida iz epididimisa se izbacuje kroz semevode i uretru u spoljašnju sredinu (obično sa mokraćom). U slučaju dužeg perioda između dve ejakulacije (10 i više dana), prvih 3 do 4 ejakulata, uzetih svakih 24h, sadrže dramatično manju količinu spermatozoida (*Singleton i Flowers, 2001*).

Ustanovljeno je da postoji značajan uticaj intervala između uzastopnih uzimanja ejakulata na koncentraciju spermatozoida. Tako se pokazalo da je prosečna koncentracija spermatozoida u ejakulatu manja za 100×10^3 po ml, kada je ovaj interval bio 2 dana, u poređenju sa intervalom od 6 dana. Kada je interval uzimanja ejakulata 10 do 21 dan, dobija se 40×10^3 do 50×10^3 spermatozoida po 1 ml ejakulata, u odnosu na interval uzimanja od 6 dana. I volumen ejakulata se povećava sa produžavanjem intervala između sukcesivnih uzimanja sperme. Ukupan broj spermatozoida u ejakulatu, takođe, se povećava sa produžavanjem intervala između uzimanja sperme do 10 dana. Procent progresivno pokretnih spermatozoida

opada, a morfološki abnormalnih raste, sa produžavanjem intervala između dva uzimanja sperme (Wolf i Smital, 2009).

Starost nerastova ima značajnog uticaja na variranje vrednosti parametara ejakulata, kao što su volumen, dnevna produkcija spermatozoida, koncentracija, ukupan broj spermatozoida, progresivna pokretljivost (Stančić, 2008; López Rodríguez, 2012; Knox, 2013). Statistički značajan ($p < 0.05$) uticaj starosti nerastova rase Durok i Danski Landras, na volumen ejakulata, koncentraciju spermatozoida u 1 ml ejakulata i procent patološki promenjenih spermatozoida, ustanovili su Jankevičiūtė i Žilinskas (2002). Ovi autori navode da se volumen ejakulata smanjuje, a koncentracija spermatozoida povećava sa povećanjem starosti nerastova. Progresivna pokretljivost spermatozoida je bila najveća kod nerastova starih 18 do 24 meseca, a najniža kod nerastova starijih od 30 meseci. Smital (2009) nalazi da starost nerasta ima snažan uticaj na dnevnu produkciju spermatozoida. Ovaj autor navodi da se ova vrednost povećava do starosti od 3.5 godina. Prihvatljiv volumen ejakulata se dobija posle 3 dana pauze između uzimanja ejakulata, a broj spermatozoida u rezervoaru (rep epididimisa) se potpuno obnavlja za 7 do 10 dana.

Tabela 5. Uticaj starosti nerasta na parametre ejakulata* (Singleton i Flowers, 2001)

Parametri ejakulata	Starost nerasta (meseći)		
	8 - 12	13 - 15.5	16 - 18
Volumen (ml)	290	381	297
Koncentracija spermatozoida ($\times 10^6$ /ml)	117	169	202
Ukupan broj spermatozoida ($\times 10^9$)	18.8	33.5	35.4
Dnevna produkcija spermatozoida ($\times 10^9$)	8.1	14.3	15.2

*Sperma je uzimana 3 puta nedeljno.

Tabela 6. Osnovni parametri ejakulata nerastova različite starosti na farmama u AP Vojvodini (Stančić i sar., 2003a)

Parametri	Starost nerastova (meseći)				Prosečno
	≤ 12	13 - 18	19 - 24	≥ 25	
Broj nerastova	29	53	66	139	287
Volumen ejakulata (ml)	254	227	255	276	256
Koncentracija spermatozoida ($\times 10^6$ /ml)	184	188	220	200	204
Ukupan broj spermatozoida ($\times 10^9$)	40	42	54	54	50
Progresivna pokretljivost (%)	70	80	80	75	76

Jedan od osnovnih parametara koji značajno određuje fertilizacioni potencijal sperme je progresivna pokretljivost spermatozoida. Ova vrednost se značajno povećava sa starošću nerastova. Tako su Stančić i sar. (2003a) ustanovili da je broj ejakulata sa progresivnom pokretljivošću manjom od 65% bio najveći (22%) kod najmlađih nerastova (≤ 12 meseci), a najmanji kod nerastova starih 13 do 18 meseci. Slične rezultate je dobio i Zvekić (2003), koji je ispitao parametre ejakulata 1057 nerastova na vojvođanskim farmama, jer se pokazalo da se vrednosti osnovnih parametara ejakulata povećavaju sa starošću nerastova. Slične rezultate su dobili Flowers (2001) i Šerniene i sar. (2002). Statistički značajne razlike u parametrima ejakulata, između nerastova različite starosti, ustanovio je i Katanić (2004).

Nema puno rezultata istraživanja u vezi sa starošću nerasta, u kojoj počinje da opada fertilizacioni potencijal njegovih ejakulata. Istraživanja koja su izveli (*Wolf i Smital, 2009*), sugerišu da volumen ejakulata, ukupan broj spermatozoida u ejakulatu i broj progresivno pokretnih (fertilnih) spermatozoida u ejakulatu, dostižu svoj maksimum kod nerastova starih 2 godine. Koncentracija spermatozoida u 1 ml ejakulata se konstantno povećava do 11 meseci starosti, a zatim postepeno opada do 3 godine starosti nerasta. Procent morfološki abnormalnih spermatozoida postepeno raste od 8. do 48. meseca starosti. Procent progresivne pokretljivosti, međutim, pokazuje tendenciju stalnog, ali blagog opadanja (za 1%), od momenta polne zrelosti do starosti 3 ili 4 godine.

Rasa nerastova ima značajnog uticaja na osnovne parametre sperme nerasta (*Katanić, 2004*). Tako su *Jankevičiūtė i Žilinskas (2002)* ustanovili da rasa nerastova ima signifikantno značajan ($p < 0.001$) uticaj na volumen ejakulata, koncentraciju spermatozoida u 1 ml ejakulata, kao i na procent morfološki (patološki) promenjenih spermatozoida u ejakulatu. Signifikantno značajane razlike u procentu progresivne pokretljivosti spermatozoida, nisu ustanovljene između pojedinih rasa nerastova (Durok i Danski Landras). Ipak, *See (2002)* navodi da postoje razlike u stepenu nasledivosti (Heritabilitetu, h^2) između pojedinih parametara ejakulata. Tako, heritabilitet za volumen iznosi 0.41, za ukupan broj spermatozoida 0.42, za progresivnu pokretljivost 0.55, za koncentraciju spermatozoida u 1 ml sperme 0.26, za morfološke anomalije spermatozoida 0.62 i 0.42 za broj inseminacionih doza po ejakulatu. *Kennedy i Wilkins, (1984)* su ustanovili da nerastovi rase Veliki Jorkšir imaju najbolji stepen progresivne pokretljivosti spermatozoida, nerastovi rase Hempšir imaju najveći volumen ejakulata, dok nerastovi rase Durok imaju najveću koncentraciju spermatozoida u 1 ml ejakulata i najveći broj živih spermatozoida u ejakulatu. Vrednosti nekih parametara ejakulata nerastova rase Durok, Hempšir, Veliki Jorkšir i Švedski Landras, koje su dobili *Katanić (2004)* i *Stančić i sar. (2009)* u istraživanju na vojvođanskim farmama intenzivne proizvodnje svinja, prikazani su u tabelama 7 i 8.

Tabela 7. Parametri ejakulata nekih rasa nerastova (*Katanić, 2004*)

Parametri	Rasa nerastova				Prosek (n=287)
	D (n=39)	H (n=32)	VJ (n=54)	ŠL (n=44)	
Volumen (ml)	183	303	275	292	256
Ukupan broj spermatozoida ($\times 10^9$)	39	53	52	55	50
Koncentracija spermatozoida ($\times 10^6/\text{ml}$)	244	181	193	191	204
Prog. pokretljivost (%)	73	81	78	75	77
Ukupno prog. pokretnih spermatozoida ($\times 10^9$)	28.5	42.9	40.6	41.3	38.7

D-Durok; H-Hempšir; VJ-Veliki Jorkšir; SL-Švedski Landras.

Tabela 8. Parametri ejakulata nekih rasa nerastova (*Stančić i sar., 2009*)

Parametri	Rasa nerastova				Prosek (n=122)
	D (n=27)	H (n=21)	VJ (n=42)	ŠL (n=32)	
Volumen (ml)	212 ^{AB} (75-350)	308 (200-450)	289 ^A (120-500)	291 ^B (110-650)	278 (75-650)
Ukupan broj spermatozoida ($\times 10^9$)	45 ^a (21-87)	52 (38-76)	54 ^a (12-125)	59 (23-135)	53 (12-135)
Koncentracija spermatozoida ($\times 10^6/\text{ml}$)	224 ^A (109-483)	174 ^A (123-243)	190 (67-361)	211 (105-460)	200 (67-483)
Prog. pokretljivost (%)	82 (65-95)	85 (70-90)	84 (65-95)	85 (75-95)	84 (65-95)
Ukupno prog. pokretnih spermatozoida ($\times 10^9$)	37 (17-71)	44 (32-65)	46 (10-105)	50 (19-115)	44 (10-113)

D-Durok; H-Hempšir; VJ-Veliki Jorkšir; SL-Švedski Landras. Min. i max. vrednosti u zagradama. Vrednosti sa različitim superskriptima su statistički različite (^{A,B} $P < 0,01$; ^{a,b} $P < 0,05$).

I drugi autori su ustanovili da nerastovi rase Durok daju najmanje volumene ejakulata, ali najveću koncentraciju spermatozoida u 1 ml ejakulata, u odnosu na druge savremene rase nerastova. Tako su *Wolf i Smital (2009)* ustanovili da volumen ejakulata nerastova rase Durok (10.691 ispitanih ejakulata) prosečno iznosi 200 ml, a koncentracija spermatozoida u 1 mm³ iznosi 491. Kod nerastova rase Veliki Jorkšir (46.169 ispitanih ejakulata), ove vrednosti su obrnute, pa je prosečan volumen 270 ml, a prosečna koncentracija spermatozoida je $461 \times 10^3/\text{mm}^3$. Signifikantno značajne razlike u volumenu (V), koncentraciji spermatozoida (Ko), progresivnoj pokretljivosti (Pp), procentu abnormalnih spermatozoida (As), ukupnom broju spermatozoida u ejakulatu (Ub), kod nerastova rase Durok, Hempšir, Landras i Veliki Jorkšir, ustanovio je *Smital (2009)*. Maksimalne razlike između rasa su bile 95 ml za V, $109 \times 10^3/\text{mm}^3$, 9% za Pp, 1.6% za As i 24×10^9 za Ub. Maksimalni heterozis efekt je postignut 12% za V, 17% za Ko, 4% za Pp, 14% za As i 8% za Ub. Signifikantno značajne razlike ($P < 0.01$) između nerastova rase Veliki Jorkšir i Pietren, u volumenu ejakulata (266 ml prema 158 ml), koncentraciji spermatozoida ($373 \times 10^6/\text{ml}$ prema $548 \times 10^6/\text{ml}$) ukupnog broja spermatozoida u ejakulatu (95×10^9 prema 85×10^9), ustanovili su i *Ciereszko i sar. (2000)*. *Kommisurd i sar. (2002)* nalaze da prosečan volumen ejakulata nerastova rase Durok iznosi 147 ml, rase Landras 265 ml, a rase Veliki Jorkšir 245 ml. Dok *Johnson i sar. (2000)*, nalaze da prosečan ejakulat rase Durok iznosi 170 ml, rase Landras 252 ml, a rase Veliki Jorkšir 243 ml.

Rezultati prikazanih istraživanja dosta konzistentno pokazuju da postoje značajne razlike u vrednostima osnovnih parametara fertilizacionog potencijala ejakulata, između pojedinih rasa nerastova. S tim u vezi, i pored toga što je nasledivost (heritabilnost) vrednosti ovih parametara niska (*See, 2000*), rasne razlike se mogu iskoristiti u selekcijskim programima za povećanje fertiliteta sperme nerastova (*Smital i sar., 2004; Wolf i Smital, 2009*).

Godišnja sezona. Iako nerastovi domaćih rasa proizvode fertilnu spermu tokom cele godine, zapaža se značajno variranje parametara kvaliteta (fertilizacionog potencijala) sperme

u različitim godišnjim sezonama. Zbog toga je sezona vrlo značajan spoljašnji (paragenetski) faktor, koji utiče na fertilitet nerastova (*Ciereszko i sar., 2000; Smital, 2009; Lapuste i sar., 2011; Stančić i sar., 2011; Stančić i sar., 2012; Stančić i sar., 2013; Savić i sar., 2013*). Koncentracija testosterona u krvnoj plazmi varira između godišnjih sezona (*Cheon i sar., 2002*). Međutim, iako povećanje koncentracije steroidnih hormona u telesnoj cirkulaciji nije uvek prisutno, u periodu jesen - zima se, uvek, konstatuje znatno povećanje dnevne produkcije spermatozoida u testesima nerasta (*Smital i sar., 2004*). Ovaj fenomen može biti posledica nasleđa domaćih rasa od svojih divljih srodnika. Naime, poznato je da su divlji nerastovi izrazito sezonski polno aktivni, u godišnjem periodu sa znatno kraćim dnevnim fotoperiodom i nižim ambijentalnim temperaturama (*Kozdrowski i Dubiel, 2004*).

Sezonske varijacije u vrednostima parametara kvaliteta ejakulata, posledica su delovanja različitog trajanju dnevnog fotoperioda, kao različitih dnevnih ambijentalnih temperatura. Naime, fotoperiod kontroliše sintezu i sekreciju androgena (testosterona), tako što povećava osetljivost testisa na delovanje endogenog LH, tokom sezone sa kraćim trajanjem dnevnog fotoperioda. Na taj način se povećava produkcija androgena i stimuliše spermatogeneza, odnosno dnevna produkcija spermatozoida (*Kunavongkrit i sar., 2005*). Sa druge strane, vrlo je dobro poznat negativan efekt povišene ambijentalne temperature na proces spermatogeneze. Vrlo je dobro poznata fiziološka činjenica da spermatogeneza zahteva intratestikularnu temperaturu nižu za 5°C do 7°C, od normalne telesne temperature (*Setshell, 1998*). Do značajnih oštećenja spermatogenih ćelija, u procesu spermatogeneze, dolazi kada temperatura testisa dostigne 40.5°C. Zbog toga, razna obolenja, povezana sa povišenom telesnom temperaturom, mogu imati za posledicu poremećaj spermatogeneze, odnosno produkciju sperme lošeg kvaliteta, sve do infertiliteta ili steriliteta nerasta (*Cheon i sar., 2002*). Nerastovi izloženi toplotnom stresu, imaju povećanu koncentraciju specifičnih proteina (nazvanih "heat shock proteins ili HSPs") u ejakulatu, koji skraćuju sposobnost preživljavanja spermatozoida čuvanih *in vitro* u razređenom stanju na niskim temperaturama (*Knox, 2004*).

Istraživanja većeg broja autora konzistentno pokazuju da su parametri kvaliteta sperme nerasta signifikantno niži tokom toplije, u odnosu na hladniju sezonu godine (*Claus i sar., 1985; Colenbrander i Kemp, 1990; Liao i sar., 1996; Ciereszko i sar., 2000; Stančić i sar., 2002; Corcuera i sar., 2002; Stančić i sar., 2003a; Sancho i sar., 2004; Lapuste i sar., 2011; Kunowska-Słórsarz i Makowska, 2011*). Volumen ejakulata, obično, nije smanjen pod uticajem povišene temperature, ali se smanjuje broj normalnih spermatozoida, broj progresivno pokretnih spermatozoida, a povećava se broj morfološki abnormalnih i mrtvih, kao i broj spermatozoida sa nenormalnim akrozomom (*Huang i sar., 2000*). Broj fertilnih (progresivno pokretnih) spermatozoida u ejakulatu je najveći u jesen (75×10^9) i zimu (72×10^9), a značajno manji u proleće (68×10^9) i leto (70×10^9) (*Smital i sar., 2004*).

Dugotrajan (hroničan) temperaturni stres (duži od 2 nedelje, na temperaturi preko 30°C) značajno smanjuje dnevnu produkciju spermatozoida i broj progresivno pokretnih spermatozoida u ejakulatu (*Knox, 2004*). Broj (%) progresivno pokretnih spermatozoida se ne vraća na normalnu vrednost 5 nedelja posle početka izlaganja nerasta povišenoj ambijentalnoj temperaturi (*Wettemann i sar., 1979*). Procent morfološki abnormalnih spermatozoida je značajno niži u hladnoj (19%) u odnosu na toplu sezonu (25%) (*Lipensky i sar., 2010*). Broj dobrih ejakulata (progresivna pokretljivost $\geq 65\%$, volumen ejakulata ≥ 120 ml, koncentracija spermatozoida $\geq 200 \times 10^6$ /ml) znatno je veći tokom hladne (86.5%), a znatno manji tokom tople sezone (73.5%) (*Stančić i sar., 2012*).

Istraživanja naših autora (*Stančić i sar., 2002; Stančić i sar., 2003a; Katanić, 2004; Stančić i sar., 2006; Stančić i sar., 2012; Stančić i sar., 2013*), takođe, jasno pokazuju značajane razlike u osnovnim parametrima kvaliteta ejakulata (volumen, koncentracija, ukupan broj i progresivna pokretljivost spermatozoida) između tople i hladne godišnje sezone.

Tabela 9. Uticaj sezone na parametre kvaliteta ejakulata nerasta

Izvor (autori)	Topla sezona ¹				Hladna sezona ²			
	V (ml)	Ko ($\times 10^6$ /ml)	Ub ($\times 10^9$)	Pp (%)	V (ml)	Ko ($\times 10^6$ /ml)	Ub ($\times 10^9$)	Pp (%)
<i>Stančić i sar. (2003a)</i>	229	208	47.6	72	265	214	56.7	80
<i>Katanić (2004)</i>	222	202	45.0	72	271	211	57.2	79
<i>Okere i sar. (2005)</i>	261	-	-	81	408	-	-	87
<i>Kondracki i sar. (2009)</i>	274	343	93.7	72	275	89.8	323	71
<i>Stančić i sar. (2012)</i>	226	215	56.0	85	290	301	87.3	73
<i>Stančić i sar. (2013)</i>	224	210	47.0	80	269	260	70.0	72

¹Maj - Oktobar, ²Novembar - April. V- Volumen ejakulata, Ko - koncentracija, Ub - ukupan broj i Pp - progresivna pokretljivost spermatozoida u ejakulatu.

3.3.3. TEČNA RAZREĐENA SPERMA

U tehnologiji veštačkog osemenjavanja svinja, upotrebljavaju se inseminacione doze tečne razređene sperme, u preko 99% slučajeva, koje se iskoriste istog dana ili se čuvaju *in vitro* 1 do 5 dana (*Johnson i sar., 2000; Maes i sar., 2011*).

Nativna sperma (ejakulat) se razređuje iz dva osnovna razloga: (1) da se poveća volumen nativnog ejakulata, kako bi se mogao formirati određen broj inseminacionih doza od datog ejakulata i (2) da se, u nativnu spermu, dodaju neophodne supstance za održavanje vitalnosti i fertilizacione sposobnosti spermatozoida, u periodu od momenta razređenja, tj. formiranja inseminacionih doza, do momenta njihove upotrebe (*Stančić, 2006*).

Za čuvanje spermatozoida nerasta *in vitro*, posebno su važna dva faktora: (1) temperatura čuvanja i (2) sastav medijuma (razređivača) koji je upotrebljen za razređivanje nativnog ejakulata (*Johnson i sar., 2000*). Pokazalo se da optimalna temperatura čuvanja razređene sperme nerasta iznosi +17°C. Hlađenje ispod +15°C dovodi do hladnog šoka spermatozoida, zbog destabilizacije ćelijske membrane, dok temperature iznad +17°C, dovode do prebrzog metabolizma, trošenja glukoze (*Althouse i sar., 1998*), kao i do povećanog rasta i razvoja bakterija (*Althouse i Lu, 2005*).

Klasični razređivači za čuvanje tečne razređene sperme *in vitro* sadrže: glukozu (hranljiva, energetska materija), elektrolite (održavaju izoosmotski pritisak), pufere (održavaju fiziološki pH, oko 6.9 - 7.2), antibiotike i EDTA - Ethylenediamine-tetra-acetic acid, koji sprečavaju prekomeran rast i razvoj bakterija (*Johnson i sar., 2000*). Danas postoji veći broj fabrički proizvedenih razređivača za čuvanje tečne razređene sperme (BTS, Kiev, IVT, Zorlesco, Androhep). Ovi razređivači obezbeđuju uspešno čuvanje tečne razređene sperme kratkotrajno (1-3 dana) ili dugotrajno (4-14 dana) (*Stančić, 2006*).

Uspeh *in vitro* čuvanja tečne razređene sperme zavisi i od stepena razređenja nativnog ejakulata, kao i od perioda čuvanja inseminacionih doza. Povećanje stepena razređenja, kao i produžavanje čuvanja tako razređene sperme, smanjuje progresivnu pokretljivost

spermatozoida (*Stančić i sar., 2003b; Katanić, 2004; Rozeboom, 2000; Stančić i sar., 2012*). Time se smanjuje fertilizacioni kapacitet VO doza, odnosno fertilitet osemenjenih krmača (*Tummaruk i sar., 2000*). Tako su, na primer, *Stančić i sar. (2012)* ustanovili da se broj doza razređene sperme, koje su zadržale progresivnu pokretljivost $\geq 65\%$, značajno smanjuje i iznosi 60.8% posle 24h, 42.7% posle 48h i 20.3% posle 72h čuvanja *in vitro* na $+17^{\circ}\text{C}$. Prekomernim razređenjem native sperme se smanjuje koncentracija prirodnih (fizioloških) supstanci spermalne plazme, koje imaju značajan uticaj na održavanje fertilizacionog potencijala spermatozoida *in vitro*, na preživljavanje i funkciju spermatozoida u ženskom reproduktivnom traktu, kao i na funkcije ženskog reproduktivnog trakta, koje su važne za uspešnu fertilizaciju oocita i rani embrionalni razvoj (detaljnije videti u narednom poglavlju).

Iako danas postoji veći broj medijuma (razređivača) za spermu nerasta, koji mogu održati fertilizacionu sposobnost spermatozoida u razređenom stanju više dana, ipak, proces smanjivanja fertilizacione sposobnosti spermatozoida, tokom vremena čuvanja *in vitro*, nije moguće zaustaviti, bez obzira na vrstu razređivača. Povećanje broja spermatozoida u dozi, smanjenje stepena razređenja ejakulata i dodavanje spermalne plazme u doze razređene sperme, može povećati njihov fertilizacioni kapacitet (*Johnson i sar., 2000; Stančić, 2006; Novak i sar., 2010*). Ustanovljen je statistički značajan uticaj godišnje sezone na broj upotrebljivih doza po ejakulatu i broj fertilnih spermatozoida po dozi (veći su tokom hladne, a manji tokom tople godišnje sezone) (*Rutten i sar., 2000*).

3.3.4. KONTROLA KVALITETA SPERME

Fertilizacioni potencijal, kao i broj inseminacionih doza, koji se može formirati od jednog ejakulata, primarno zavise od kvaliteta spermatozoida (*Vyt i sar., 2008; Tsakmakidis i sar., 2010*). Zbog toga je ispitivanje kvaliteta svakog ejakulata, pre njegove upotrebe za veštačko osemenjavanje, apsolutno potrebno (*Roseboom, 2000; Knox, 2004; Milovanović i sar., 2012*). Naročito u situacijama kada je potrebno definisati nerastove visokog fertiliteta, koji će biti upotrebljeni za poboljšanje fertiliteta veštački osemenjenih krmača (*López Rodríguez, 2012*), jer postoji značajno variranje u parametrima kvaliteta ejakulata između pojedinih nerastova, ali i individualno variranje pojedinih ejakulata (*Maes i sar., 2011*).

Klasično ispitivanje kvaliteta ejakulata obuhvata određivanje makroskopskih i mikroskopskih vrednosti parametara (*Stančić, 2006*).

A. Makroskopski parametri ejakulata:

- ✓ Volumen,
- ✓ Gustina,
- ✓ Boja i
- ✓ Miris.

Volumen ejakulata se meri neposredno po uzimanju od nerasta, u graduisanom spermosabiraču ili menzurorom u laboratoriji za kontrolu kvaliteta sperme. Volumen ejakula se, obično, kreće između 200 ml i 300 ml. Značajno varira pod uticajem mnogih faktora, među kojima su najznačajniji rasa i starost nerasta, frekvencija uzimanja ejakulata, kao i godišnja sezona (*Stančić i sar., 2000; Smital, 2009*). Dobar ejakulat bi trebao da ima volumen 120 ml

do 150 ml (*Roseboom, 2000*). Volumen ejakulata značajno utiče na stepen razređenja, potreban da se formira ustanovljen broj mogućih VO doza od datog ejakulata (*López Rodríguez, 2012*).

Gustina ejakulata zavisi od koncentracije spermatozoida u 1 ml sperme. Kreće se od vrlo retke do vrlo guste sperme. Kod guste sperme se uočava turbulentno kretanje spermalne mase, zbog velikog broja pokretnih spermatozoida (*Stančić i sar., 2006*).

Boja ejakulata nerasta se kreće od plavkasto-bele (retka sperma) do žućkasto-bele (gusta sperma). Prosečno dobar ejakulat treba da ima mlečno-belu boju (*Roseboom, 2000*). Boja može biti i promenjena, u zavisnosti od prisustva stranih (neprirodnih) materija u ejakulatu. Tako, sivkasto-prljava ili žućkasto-prljava boja potiče od prisustva prljavštine, prašine, fecesa, urina ili gnoja. Prisustvo gnoja ukazuje na upalne procese u organima uro-genitalnog trakta. Crvenkasto-braun boja ukazuje na prisustvo razorenih eritrocita ili infekcije prostate. Crvenkasto-rozikasta boja ukazuje na prisustvo krvi, kao posledice lezija u genitalnom traktu, dok zelenkasto-plavičasta boja ukazuje na oligospermiju (*Frunzã i sar., 2008*).

Miris ejakulata treba da podseća na prirodan miris nerasta i da nije suviše intenzivan. Različiti drugi, intenzivni mirisi potiču od prisustva raznih neprirodnih materija u spermi, kao i od mirisa koji se razvijaju kod nečistih nerastova i u nečistim (prljivim i neprovetrenim) stajama za smeštaj nerastova (*Stančić i sar., 2006*).

B. Mikroskopski parametri ejakulata:

- ✓ Koncentracija spermatozoida u 1 ml i ukupan broj spermatozoida u ejakulatu,
- ✓ Morfologija i vitalnost spermatozoida,
- ✓ Pokretljivost spermatozoida i
- ✓ Integritet akrozomalne membrane.

Koncentracija spermatozoida se izražava brojem spermatozoida u 1 ml ejakulata, dok je ukupan broj spermatozoida u ejakulatu proizvod koncentracije spermatozoida i volumena ejakulata, izraženog u ml. Tako se koncentracija spermatozoida kreće od 100×10^6 do 600×10^6 spermatozoida po 1 ml ejakulata. Za veštačko osemenjavanje se uzimaju ejakulati koji imaju minimalno $\geq 120 \times 10^6$ spermatozoida u 1 ml (*Roseboom, 2000, Knox, 2004*). Ovo je važan parameter kvaliteta ejakulata, jer primarno određuje broj inseminacionih doza, koji se može napraviti od jednog ejakulata. Osim toga, permanentno praćenje ovog parametra ukazuje na efikasnost i kontinuiranost produkcije sperme kod nerasta (*Maes i sar., 2011; López Rodríguez, 2012*). Koncentracija, odnosno ukupan broj spermatozoida u ejakulatu se može odrediti primenom nekoliko metoda: (a) hemocitometrija, (b) fotometrija, (c) protočna citometrija i (d) kompjuterizovana analiza sperme (CASA - computer assisted semen analysis (*Maes i sar., 2011*)).

Hemocitometrijska metoda koristi staklenu komoricu (hemocitometar) za brojanje krvnih elemenata i melanžer za leukocite, u kome se vrši razređenje native sperme 3% vodenim rastvorom NaCl, u odnosu 1:10 ili 1:20. Postoji nekoliko vrsta hemocitometara (Neubauer, Thoma i Bürker-Türk). Ovo je klasična metoda određivanja koncentracije spermatozoida i daje dovoljno precizne rezultate za svakodnevnu primenu (*Christensen i sar., 2005*). Rezultati dobijeni ovom metodom dosta variraju (4% do 20%), zavisno od preciznosti pripreme uzorka

(tačnost odnosa native sperme i razređivača - 3% NaCl u melenžeru), ko i od preciznosti tehničara, koji vrši brojanje pod mikroskopom (*López Rodríguez, 2012*).

Fotometrijskom metodom se meri optička gustina, odnosno relativna apsorpcija i rasipanje svetlosnog snopa, koji je prošao kroz uzorak sperme. Apsorpcija i rasipanje su proporcionalni koncentraciji spermatozida u uzorku. Međutim, pored koncentracije spermatozoida, na preciznost merenja utiču i gel čestice u spermalnoj plazmi ili razređivaču, zatim eventualne nečistoće u kivetu sa uzorkom, kao i stepen, odnosno tačnost razređenja uzorka (*Knox, 2004*). I ova metoda se uobičajeno koristi u praksi, jer je brza i jednostavna za izvođenje (*Maes i sar., 2011*).

Protočna citometrija koristi fluorescentne boje, koje različito prebojavaju intaktne i oštećene spermatozoida. Protočnom citometrijom se meri distribucija različitih boja u populaciji spermatozoida u uzorku. Na taj način se meri odnos intaktnih i oštećenih spermatozoida, odnosno ukupna koncentracija spermatozoida u uzorku, odnosno ejakulatu. Ova metoda ima osnovnu prednost što može brojati veliki broj spermatozoida u vrlo kratkom vremenu (za manje od 1 minut). Glavni nedostatak ove metode je taj što nije sposobna da pravi razliku između kapljica gela i partikula debrisa u spermi, kao i nebojenih spermatozoida (*López Rodríguez, 2012*). Međutim, ova metoda je dosta skupa i zahteva kvalifikovano osoblje, pa nije pogodna za široku praktičnu upotrebu (*Christensen i sar., 2004*).

Kompjuterizovana analiza sperme (CASA - computer assisted semen analysis) koristi analizu slike u komorici za brojanja, na osnovu koje određuje broj, odnosno koncentraciju spermatozoida. Tačnost ovog sistema ne zavisi samo od optičkih svojstava i podešenosti softvera, nego i od vrste komorice za brojanje koja se koristi (*Kuster, 2005*). Ipak, ova metoda se smatra objektivnom i pouzdanom, ali relativno skupom, pa se koristi u velikim centrima za veštačko osemenjavanje, odnosno proizvodnju inseminacionih doza od genetski superiornih nerastova (*Maes i sar., 2011*).

Morfologija i vitalnost spermatozoida. Sperma sa lošom morfologijom spermatozoida daje niske rezultate veštački osemenjenih krmača (*López Rodríguez, 2012*). Mikroskopskim pregledom se može utvrditi morfologija (normalno i abnormalno građeni spermatozoidi), integritet ćelijske membrane spermatozoida i abnormalnosti akrozoma. Ovo su tri osnovna parametra koji primarno utiču na fertilizacioni potencijal spermatozoida. (*Maes i sar., 2011*). *Jovičin i sar. (2012)* navode da i određivanje broja (%) spermatozoida sa protoplazmatskom kapi ima uticaja na fertilitet ejakulata, te da i ovaj parametar treba uključiti kod selekcije nerastova za veštačko osemenjavanje. Proksimalna i distalna citoplazmatska kap se ubraja u sekundarne anomalije građe spermatozoida (*López Rodríguez, 2012*). Različitim histološkim metodama bojenja, mogu se, pod mikroskopom, ustanoviti različite anomalije morfologije spermatozoida, ćelijske membrane i akrozoma. Najčešće se koristi jednostavna metoda bojenja po Blom-u (eozin-nigrozin bojenje), na osnovu kojeg se mogu odrediti živi i mrtvi, odnosno morfološki promenjeni spermatozoidi. Ove metode nisu skupe i ne zahtevaju visoko kvalifikovanu radnu snagu, pa se redovno koriste za rutinsko određivanje kvaliteta ejakulata u VO centrima i laboratorijama. Morfološki normalnih spermatozoida, u ejakulatima koji se koriste za VO, treba da bude najmanje 70% (*Tsakmakidis i sar., 2010*). Preciznija morfološka ispitivanja je moguće izvršiti primenom CASA sistema, ali je loša strana ove metode njeno dugo trajanje. Postoji nekoliko metoda fluorescentnog bojenja, radi ispitivanja integriteta ćelijske membrane spermatozoida, a ova metoda može biti kombinovana sa protočnom citometrijom. Mogu se koristiti i metoda osmotske rezistencije i ćelijskog volumena

spermatozoida. Osmotska rezistencija spermatozoida nerasta je u korelaciji sa rezultatima fertiliteta (*Pérez-Llano i sar., 2001*).

Pokretljivost (motilitet) spermatozoida je veoma važna za uspešnu penetraciju zone pelucide oocita, u procesu oplodnje. Zbog toga je određivanje stepena (%) progresivne pokretljivosti primarni faktor procene fertilizacionog potencijala ejakulata (*Gadea, 2005*). Stepenn progresivne pokretljivosti spermatozoida se može odrediti: (a) vizuelnim posmatranjem pod svetlosnim mikroskopom (uvećanje $\times 400$ do $\times 1000$), (b) CASA sistemom, (c) opremom za analizu kvaliteta sperme (Sperm Quality analyzer - SQA). Vizuelna ocena je jednostavan i jevtin metod, ali rezultati značajno variraju, zavisno od individualne interpretacije tehničara koji vrši pregled.

Integritet akrozomalne membrane. Akrozomalna membrana pokriva 2/3 glave spermatozoida i sadrži enzime, potrebne za penetraciju oocita, tokom procesa oplodnje. Zbog toga, dobri ejakulati moraju imati više od 51% spermatozoida sa normalnim akrozomom (*Roseboom, 2000*). Anomalije građe akrozoma se mogu ispitivati primenom različitih metoda bojenja i pregledom takvih preparata fazno-kontrastnom mikroskopijom (*Maes i sar., 2011*) ili protočnom citometrijom (*de Andrade i sar., 2007*). Duboko zamrzavanje značajno povećava broj živih spermatozoida sa oštećenim akrozomom (*Jovičin, 1991*).

Aksesorni spermatozoidi u zoni pelucidi oocita su veoma važni za uspešnu oplodnju. Zbog toga je brojanje ovih spermatozoida u zoni pelucidi, dosta precizan metod ocene njihove vitalnosti i fertilizacionog kapaciteta. Obično se broj aksesornih spermatozoida kreće između 20 i 40 (*López Rodríguez, 2012*). Ovo ispitivanje se izvodi, u osnovi, tako što se ovulirani oociti, isprani iz jajovoda nazimica ili krmača, inkubiraju *in vitro* sa kapacitiranim spermatozoidima. Nakon 24h inkubacije, pod mikroskopom se vrši brojanje spermatozoida u zoni pelucidi. Samo spermatozoidi sa intaktnim akrozomom mogu da izvrše penetraciju zone pelucide oocita (*Waberski i sar., 2005*).

3.4. ZNAČAJ SPERMALNE PLAZME

Semena plazma je visoko specijalizovana telesna tečnost. Biohemijske komponente spermalne plazme su sekreti aksesornih polnih žlezda (glandulae vesiculares, glandula prostatica i glandulae bulbourethrales), rete testis-a i epididimis-a. Preko 90% volumena semene plazme potiče iz aksesornih polnih žlezda, od čega je najveći deo iz vezikularnih žlezda. Prilikom ejakulacije, sekret aksesornih polnih žlezda se meša sa spermatozoidima, na koji način nastaje sperma (*Nasrini Calogero, 2012*).

Osnovna uloga spermalne plazme je da obezbedi tečni medium za spermatozoide, kao i da spermatozoidima obezbedi energetske materije (fruktoza, aromatični alkoholi, glicerilfosforilholin), elektrolite (mineralne materije), osmotski pritisak, tj. izotoničan (fiziološki) rastvor (0.9% vodeni rastvor NaCl), puferne sisteme (za održavanje pH), specifične proteine i druge bioaktivne supstance (hormone i fermente).

Tabela 10. Neke fizičko-hemijske osobine sperme nerasta (*Frunzã i sar., 2008*)*

Osobine	Vrednosti
Voda (%)	90
pH	6.69 - 7.69 ¹
Boja	plavkasto-bela do žućkasto-bela ²
Organske materije (%)	8
Neorganske materije (%)	2
Ukupno suve materije (%)	10
Fruktoza (mg%/ml)	40
Ukupni proteini (%)	1.84 - 4.5
Sorbitol (mg%/ml)	8 - 16
Inositol (mg%/ml)	600 - 725
Limunska kiselina (mg%/ml)	110 - 260
Lipoproteini (mg%/ml)	404
Glicerilfosforilholin, GPC (mg%/ml)	110 - 240
Na (mg%/ml)	280 - 840
Ca (mg%/ml)	3 - 9
P (mg%/ml)	69 - 300
Mg (mg%/ml)	5 - 14
Hloridi (mg%/ml)	220 - 450

*Prema raznim autorima. ¹pH preko 8 ukazuje na neko bolesno stanje.

²Zavisno od gustine ejakulata; Crvenkasto-braun boja ukazuje na prisustvo razorenih eritrocita ili infekcije prostate; Crvenkasto-rozikasta boja ukazuje na prisustvo krvi, kao posledice lezija u genitalnom traktu; Zelenkasto-plavičasta boja ukazuje na oligospermiju.

Sperma nerasta sadrži još i hormone (androgene, estrogene, prostaglandin F_{2α} - PGF_{2α} i oksitocin), veći broj fermenta (katalaza, fosfataza, mucinaza, hialuronidaza, tripsin, amilaza, lipaza i holinesteraza), antioksidanse, kao i neke druge bioaktivne supstance (*Watson, 1990; Frunzã i sar., 2008*).

Generalno, spermalna plazma je kompleksna mešavina proteina, hormona, elektrolita, hranljivih supstanci, vitamina i drugih bioaktivnih supstanci (*Centurion i sar., 2003; Garcia i sar., 2010*). Svi ovi sastojci omogućavaju normalno preživljavanje i funkciju spermatozoida izvan muškog reproduktivnog trakta (u ženskom reproduktivnom traktu ili tokom boravka *in vitro*), kao i normalne fiziološke funkcije ženskog polnog trakta, važnih za uspešnu oplodnju i rani embrionalni razvoj (*Stančić, 2005; Stančić, 2006; Muiño-Blanco i sar., 2008; Rodriguez-Martinez i sar., 2011; López Rodríguez, 2012; Nasrini Calogero, 2012*).

U poslednje vreme se povećava interes za detaljnim izučavanjem sastava i funkcije spermalne plazme nerasta, jer je ustanovljeno da ona sadrži veći broj bioaktivnih supstanci, među kojima se ističu specifični proteini. Ove supstance imaju značajan uticaj na fertilitet sperme nerasta *in vitro* i *in vivo*, kao i na neke važne funkcije reproduktivnog sistema, koje utiču na fertilitet ženke (*O'Leary et al. 2002*). U spermi nerasta, preko 90% proteina pripada grupi spermadhezina, koja se sastoji od pet članova (AQN-1, AQN-3, AWN, PSP-I, and PSP-II). Svaki od ovih članova ima različitu biološku aktivnost (*Töpfer-Petersen, 1998; Centurion i sar., 2003*).

3.4.1. UTICAJ SPERMALNE PLAZME NA FERTILITET NERASTA

Spermalna plazma sadrži nekoliko biomarkera, kao što su peptidi i proteini, koji mogu biti povezani sa fertilizacionim kapacitetom sperme nerasta (*Rodriguez-Martinez i sar., 2011; Dyck i sar., 2011; López Rodríguez, 2012*). Detekcija sadržaja proteina u spermalnoj plazmi je značajan indikator fertiliteta spermatozoida nerasta (*Mogielnicka-Brzozowska i Kordan, 2011*). Naime, još je *Flowers (1998)* ustanovio visoku pozitivnu korelaciju relativne koncentracije proteina u spermalnoj plazmi, sa fertilitetom sperme nerasta *in vitro*, te da ovo može biti značajan faktor rangiranja nerastova prema stepenu njihovog fertiliteta prilikom osemenjavanja krmača. U kasnijim istraživanjima ovog autora (*Flowers, 2001*), ova pretpostavka je, i potvrđena. Naime, vrednost prašenja i prosečan broj živo rođene prasadi u leglu, bili su značajno veći kod krmača osemenjenih spermom koja sadrži veću koncentraciju specifičnih proteina.

Proteini spermalne plazme nerasta utiču na stepen progresivne pokretljivosti spermatozoida (*Strzeżek i sar., 2005*). Spermatozoidi nerasta redukuju progresivnu pokretljivost, sposobnost preživljavanja, fertilizacioni kapacitet, aktivnost mitohondrija, stabilnost ćelijske membrane ili, čak, uginjavaju, ako se nađu u sredini sa značajno redukovanom koncentracijom spermalne plazme, na primer, zbog prevelikog razređenja nativnog ejakulata (*Maxwell i sar. 2007; Caballero i sar., 2008; Stančić i sar., 2012*). U tehnologiji veštačkog osemenjavanja, formiranje inseminacionih doza zahteva veliko razređenje nativnog ejakulata. Prekomerno razređenje ejakulata, značajno smanjenje koncentraciju spermalne plazme u VO dozama, čime se samnjuje i njihov fertilizacioni potencijal (*Rozeboom, 2000; Caballero i sar., 2004; Stančić i sar., 2012*). Ovo ima za posledicu nižu vrednost fertiliteta veštački, u odnosu na prirodno osemenjene krmače (*Tummaruk i sar., 2000*). *Novak i sar. (2010)* su koristili 2 nerasta niskog fertiliteta i 2 nerasta visokog fertiliteta, za ispitivanje uloge proteina spermalne plazme. Pokazalo se da specifični proteini spermalne plazme imaju značajnu ulogu u modifikovanju stepena fertiliteta osemenjenih krmača. Istraživanja koja su izveli *Novak i sar. (2009)*, pokazuju da postoji značajno variranje sadržaja proteina u semenoj plazmi između pojedinih nerastova. Zbog toga, i ovi autori zaključuju da detekcija specifičnih proteina u spermalnoj plazmi, može biti siguran marker za procenu stepena fertiliteta nerastova, koji se koriste u tehnologiji veštačkog osemenjavanja. Ova činjenica se može iskoristiti za genetsku selekciju nerastova sa većim sadržajem proteina u semenoj plazmi, radi dobijanja nerastova većeg fertilizacionog potencijala (*Flowers, 2001*).

Dodavanje spermalne plazme u jako razređenu spermu nerasta, povećava progresivnu pokretljivost i preživljavanje spermatozoida *in vivo* i *in vitro* (*Caballero i sar., 2004*). Ovo sugerise da semena plazma ima značajan uticaj na stepen progresivne pokretljivosti i preživljavanje spermatozoida, tokom čuvanja *in vitro* u tečnom razređenom stanju (*Waberski i sar., 1994; Stančić, 2002; Kommisrud i sar., 2002; Wolf i Smital, 2009*), te da proteini spermalne plazme igraju ključnu aktivnu ulogu u ovim procesima (*Garcia i sar., 2009*).

Iz navedenih činjenica, može se zaključiti da nivo održavanja progresivne pokretljivosti i preživljavanja spermatozoida u razređenom stanju, značajno zavisi od stepena razređenja nativnog ejakulata i dužine čuvanja doza razređene sperme *in vitro*. Tako su *Stančić i sar. (2003b)* i *Katanić (2004)* ustanovili da uzorci sperme razređene u odnosu 1:4, od samo oko 20% ispitivanih nerastova (n=276), zadržava progresivnu pokretljivost $\geq 65\%$, posle 72h

čuvanja *in vitro*, na temperaturi +17°C. *Waberski i sar. (1994)* su ustanovili da postoji značajna razlika između pojedinih nerastova u stepenu tolerancije njihove sperme na stepen razređenja i period čuvanja *in vitro*. U evropskoj populaciji nerastova, koji se koriste u veštačkom osemenjavanju, ejakulati samo oko 20% nerastova tolerišu visok stepen razređenja i 72 sata čuvanja u razređenom stanju (*Weitze, 1990b*). Kod nas su *Stančić i sar. (2003b)* ispitivali ejakulate 276 nerastova, koji se koriste za VO na vojvođanskim farmama. Ustanovili su da ejakulati 19% nerastova zadržava progresivnu pokretljivost $\geq 65\%$ u razređenju 1:4, posle 72h čuvanja. Pokretljivost i integritet akrozomalne membrane, značajno opadaju sa povećanjem stepena razređenja i produžavanjem vremena čuvanja tečne razređene sperme (*Komisurd i sar., 2002*). Koncentracija spermatozoida u nativnom ejakulatu ima značajnog uticaja na održavanje određenog stepena progresivne pokretljivosti tokom 72h čuvanja u razređenom stanju (*Stančić i sar., 2012*). Ovi autori su ustanovili da 27% uzoraka razređene sperme, od ejakulata sa koncentracijom spermatozoida $\leq 150 \times 10^6/\text{ml}$ zadržava progresivnu pokretljivost $\geq 65\%$ u razređenju 1:4, posle 72h čuvanja. Ista ova vrednost iznosi svega 14.6%, kod uzoraka razređene sperme napravljenih od ejakulata kod kojih je koncentracija spermatozoida bila $\geq 303 \times 10^6/\text{ml}$. Ovo je direktna posledica smanjene količine spermalne plazme po jednom spermatozoidu, kod uzoraka načinjenih od ejakulata sa velikom koncentracijom spermatozoida (*Komisurd i sar., 2002; Boe-Hansen i sar., 2005*). Vreme čuvanja tečne razređene sperme i stepen razređenja nativnog ejakulata, su u negativnoj korelaciji sa fertilitetom inseminacionih doza, odnosno osemenjenih krmača (vrednost prašenja i broj živo rođene prasadi u leglu su manji posle osemenjavanja dozama čuvanih 56h u odnosu na doze čuvane 14h) (*Haugan i sar., 2005*).

Chutia i sar. (2014) su ispitivali progresivnu pokretljivost, broj živih spermatozoida i integritet akrozomalne membrane, u uzorcima razređene sperme, načinjenih razređivanjem nativne sperme ili razređivanjem spermatozoida koji su, pre razređenja bili isprani (odvojena je spermalna plazma). Svi navedeni parametri fertilizacionog kapaciteta su bili značajno veći u uzorcima napravljenim od nativne sperme (pokretljivost 76%, živih spermatozoida 83% i spermatozoida sa nepovređenim integritetom akrozomalne membrane 77%) u odnosu na uzorke sa ispranim spermatozoidima (pokretljivost 31%, živih spermatozoida 76% i spermatozoida sa nepovređenim integritetom akrozomalne membrane 67%). Ovi autori zaključuju da je značajna redukcija vrednosti navedenih parametara, posledica ispiranje (odvajanje) spermalne plazme od spermatozoida. Ulogu semene plazme na povećanje *in vitro* fertiliteta spermatozoida, u visoko razređenim uzorcima sperme, ustanovili su i *Maxwell i Johnson (1999)*.

Dodavanje spermalne plazme u uzorke visoko razređene sperme, povećava preživljavanje spermatozoida. Pokazalo se da, u ovom pogledu, postoji značajna razlika između spermalne plazme pojedinih nerastova. Naime, spermalna plazma nekih nerastova značajno povećava preživljavanje i motilitet spermatozoida u visoko razređenim uzorcima, čak i poništava negativan uticaj autologne sperme. Međutim, sperma nekih drugih nerastova ne ispoljava ovaj efekt, čak smanjuje stepen preživljavanja spermatozoida, u odnosu na uzorke razređene sperme, kojima je dodata sopstvena (autologna) spermalna plazma (*Caballero i sar., 2004*). Slične rezultate su dobili *Stančić i sar. (2012)*. Ovi autori su ustanovili da dodavanje spermalne plazme sa visokom koncentracijom proteina, u spermatozoide nerasta čija spermalna plazma sadrži nisku koncentraciju proteina, značajno povećava stepen (%) progresivne pokretljivosti ovih spermatozoida u razređenjima 1:2 i 1:4, čuvanih tokom 72h, na temperaturi +17°C. Obrnuto, ako se se, u spermatozoide, koji potiču iz ejakulata sa visokim sadržajem proteina, doda spermalna plazma sa niskim sadržajem proteina, dolazi do

smanjenog potencijala održavanja zadovoljavajućeg stepena progresivne pokretljivosti ($\geq 65\%$) ovih spermatozoida, u navedenim uslovima čuvanja *in vitro*.

Istraživanja koja su izveli *Centurion i sar. (2003)*, pokazuju da specifični proteini spermalne plazme (iz grupe spermadhezina, koji predstavljaju preko 90% ukupnih proteina spermalne plazme), povećavaju stepen preživljavanja, pokretljivost i aktivnost mitohondrija spermatozoida u uzorcima ekstremno razređene sperme, čuvanih 5h na fiziološkoj temperaturi. Autori zaključuju da bi dodavanje spermalne plazme bio dobar biotehnološki metod čuvanja spermatozoida u ekstremno razređenoj spermi. Slične rezultate su dobili i *Garcia i sar. (2006)*, jer su pokazali da dodavanje spermadhezina semene plazme, značajno poboljšava funkcionalne parametre spermatozoida u visoko razređenim uzorcima sperme nerasta. *Garcia i sar. (2009)* su ispitivali uticaj raznih frakcija proteina spermalne plazme na funkcionalne parametre spermatozoida *in vitro*. Pokazalo se da različite frakcije proteina spermalne plazme imaju uticaj na različite parametre fertiliteta spermatozoida. Tako, neke frakcije (1 do 3) povećavaju preživljavanje i funkciju spermatozoida, dok su neke druge frakcije (4 do 6) vrlo štetne za čuvanje spermatozoida u visoko razređenom stanju.

U poslednje vreme sve se više posvećuje pažnja istraživanjima mogućnosti povećanja fertiliteta spermatozoida čuvanih dubokim zamrzavanjem. Naime, značajno niži fertilitet krmača osemenjenih duboko zamrznutim, pa otopljenim inseminacionim dozama, posledica je (a) znatno redukovanog stepena (%) preživljavanja spermatozoida posle otapanja i (b) smanjenog perioda preživljavanja spermatozoida u ženskom reproduktivnom traktu, zbog subletalnih oštećenja spermatozoida, nastalih tokom čuvanja u duboko zamrznutom stanju (*Johnson i sar., 2000; Roca i sar., 2003*).

Pokazalo se da dodavanje spermalne plazme u medijume za otapanje duboko zamrznute sperme nerasta, predstavlja ključni faktor postizanja većeg fertiliteta krmača osemenjenih dozama zamrznute pa otopljene sperme nerastata (*Okazaki i sar., 2012*). Tako su *Cremades i sar. (2004)* pokazali da dodavanje spermalne plazme u medium za duboko zamrzavanje, povećava stepen preživljavanja spermatozoida posle otapanja inseminacionih doza. Vrednosti progresivne pokretljivosti, broja spermatozoida sa nepovređenim integritetom ćelijske i akrosomalne membrane, bili su signifikantno veće u uzorcima sa dodatkom spermalmom plazmom. Rezultati ovih autora, međutim, pokazuju da postoji razlika u ovom efektu spermalne plazme, između pojedinih nerastova. Naime, sperma nekih nerastova ima visok efekt, dok spermalna plazma nekih drugih nerastova ima nizak ili uopšte ne ispoljava ovaj stimulatívni efekt. Autori pretpostavljaju da je ovo posledica različitog odnosa sadžaja pojedinih frakcija proteina u spermalnoj plazmi pojedinih nerastova. Zamrzavanje inseminacionih doza sperme nerasta sa 10% ili 20% spermalne plazme, uspešno smanjuje oštećenja i povećava fertilizacioni kapacitet spermatozoida posle otapanja (*Vadnais i Roberts, 2007*). Otapanjem duboko zamrznutih inseminacionih doza, u medijumu sa dodatkom 50% spermalne plazme, značajno povećava preživljavanje i progresivnu pokretljivost spermatozoida. Moguće je da ovako otopljeni spermatozoidi imaju duži period preživljavanja u ženskim reproduktivnim organima i da se, na taj način, povećava fertilitet (% prašenja i broj živo rođene prasadi po leglu) krmača osemenjenih ovakvim dozama (*Garcia i sar., 2010*).

Istraživanja koje je izveo *Stanković (2012)*, u svojoj doktorskoj disertaciji, pokazuju da postoje značajne razlike između nerastova, u pogledu otpornosti spermatozoida nativne sperme, izložene uticaju različitih stresora (hipoosmotski pritisak, kontrolisano povećanje temperature, do $+41^{\circ}\text{C}$, stepen razređenja i period čuvanja razređene sperme *in vitro*). Pokazalo se da su parametri dobijeni testiranjem nativne sperme, u pozitivnoj korelaciji sa uspehom dubokog zamrzavanja. Naime, sperma sa boljim parametrima testiranja pre

zamrzavanja pokazuje i bolje parametre fertiliteta posle odmrzavanja. Tako je progresivna pokretljivost, posle odmrzavanja duboko zamrznutih uzoraka iznosila 33.3% kod nerastova sa boljim parametrima testiranja nativne sperme pre zamrzavanja, dok je ova vrednost bila značajno niža kod nerastova sa lošijim vrednostima testa pre zamrzavanja i iznosila je, svega, 19.2%. Ovi rezultati pokazuju da je, za uspešno konzerviranje sperme nerastova putem dubokog zamrzavanja, neophodna prethodna selekcija potencijalnih donora. Izbor nerastova - donora treba obaviti na osnovu rezultata ispitivanja standardnih parametara kvaliteta sperme i testova opterećenja u kojima se spermatozoidi *in vitro* kontrolisano izlažu različitim vidovima stresa.

3.4.2. UTICAJ SPERMALNE PLAZME NA FERTILITET KRMAČE

Specifični proteini spermalne plazme, povezani su sa molekularnim mehanizmima transporta spermatozoida kroz uterus krmače (*Strzeżek i sar., 2005*). Ovi proteini se absorbuju na ćelijsku membranu spermatozoida, tokom ejakulacije, gde se zadržavaju i tokom prolaska spermatozoida kroz uterus krmače, sve do kaudalnog istmusa. Tamo se ovi proteini skidaju sa ćelijske membrane (tzv. denudacija spermatozoida), kako bi započela reakcije akrosoma, u procesu kapacitacije spermatozoida, neposredno pre fertilizacije oocita u ampuli jajovoda (*Muiño-Blanco i sar., 2008*).

Proteini spermalne plazme inhibiraju imuni odgovor uterusa (stimulacijom pro-inflamatornih citokina) na antigene spermatozoida (tzv. postinseminaciona inflamacija uterusa, izazvana infiltracijom polimorfonuklearnih granulocita u lumen uterusa) (*Roseboom i sar., 2000*). Imunomodulatorno svojstvo specifičnih protein spermalne plazme, ustanovili su i (*Madej i sar., 2013*).

Uspostavljanje interakcije preimplantacionih embriona i uterusa, kao i indukcija factora rasta embriona, takođe se povezuje sa delovanjem specifičnih proteina spermalne plazme (*Robertson i Sharkey, 2001*). Tretman krmača dodavanjem spermalne plazme u uterus, stimuliše ekspresiju citokina (faktora koji stimulišu kolonizaciju uterusa makrofagnim granulocitima), što se povezuje sa povećanjem broja živih embriona (*O'Leary i sar., 2004*).

Neka istraživanja pokazuju da proteini spermalne plazme imaju uticaj na koordinaciju ovulacije i prispeća spermatozoida u utero-tubalni spoj, odnosno u kaudalni istmus (*O'Leary i sar., 2002*). Ova koordinacija obezbeđuje da se oociti i kapacitirani spermatozoidi nađu u ampuli jajovoda, u optimalno vreme za oplodnju (*Gomeida i sar., 1998*), tj. unutar 6 do 8 sati posle ovulacije (*Hunter, 1986, Radović i sar., 2006*). Tačan mehanizam ubrzanja ovulacije nije potpuno jasan, ali se smatra da proteini spermalne plazme stimulišu sekreciju prostaglandina $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) u endometriumu, koji je sposoban da prelaskom iz uteroovarijalne vene u uteroovarijalnu arteriju, dođe do ovariuma (*Claus, 1990*). Istraživanja koja su izveli *Waberski i sar. (2000)*, pokazuju da spermalna plazma ubrzava process ovulacije. Kasnije su *Waberski i sar. (2006)* ustanovili da proteini spermalne plazme indukuju povećanje koncentracije citokina u limfi uterusa, koji prelaze iz uterusne vene u ovarijalnu arteriju. Na taj način doprinose do jaja, gde ubrzavaju dozrevanje predovulatornih folikula.

Spermalna plazma nerasta sadrži oksitocin (*Frunzã i sar., 2008*), koji stimuliše kontrakcije uterusa tokom i neposredno posle osemenjavanja (*Willenburg i sar., 2004*). Ove kontrakcije su veoma važne za pravilan i brz pasivan transport spermatozoida od mesta depozicije (cerviks) do uterotubalnih spojeva i formiranje adekvatne populacije spermatozoida u kaudalnom istmusu jajovoda (*Langedijk i sar., 2002*). Prisustvo dovoljnog broja spermatozoida u kaudalnom istmusu (fiziološki rezervoar spermatozoida), unutar 24h pre

ovulacije (Hunter, 1981), je od primarne važnosti za postizanje uspešne oplodnje (Soede i sar., 1995). Neadekvatan transport spermatozoida kroz lumen uterusa, značajno smanjuje fertilitet osemenjenih krmača (Spronk i sar., 1997). Smanjen fertilitet veštački osemenjenih krmača, naročito dozama formiranim posle enormnog stepena razređenja ejakulata, ili dozama redukovano volumena (kod intrauterine inseminacije) (Roseboom i sar., 2004; Stančić i sar., 2010), povezuje se sa neadekvatnim kontrakcijama miometriuma. Ovo je direktna posledica izostanka adekvatne stimulacije ovih kontrakcija prisustvom nerasta (Kemp i sar., 2005; Stančić i sar., 2013) i/ili smanjene koncentracije oksitocina i estrogena u enormno razređenim inseminacionim dozama (Langedijak i sar., 2003; Mezalira i sar., 2005). Kontrakcije miometrijuma se mogu poboljšati dodavanjem oksitocina u inseminacione doze, injekcijom oksitocina u vulvu, neposredno pre inseminacije, i prisustvom nerasta neposredno pre, tokom i posle inseminacije (Peña i sar., 1998; Gibson i sar., 2004; Peláez, i sar., 2006; Stančić i sar., 2006; Stančić i sar., 2013).

Kada se spermalna plazma deponuje u uterus neposredno pre klasične inseminacione doze, dolazi do povećanja stepena (%) oplodjenih oocita (95.8%) i broja akcesornih spermatozoida u zoni pelucidi oocita (74.7), u odnosu na krmače osemenjene bez pre-infuzije spermalne plazme (84.7% oplodjenih oocita i 8 akcesornih spermatozoida u zoni pelucidi). Ovaj efekt se može povezati sa delovanjem sastojaka spermalne plazme na ubrzanje pasivnog transporta spermatozoida kroz uterus i direktnog uticaja spermalne plazme na povećanje fertilizacione sposobnosti samih spermatozoida (Johnson i sar., 2000).

Navedeni rezultati ukazuju na ključnu ulogu spermalne plazme u procesima povezanim sa funkcijom spermatozoida *in vivo* i *in vitro*, sa transportom, preživljavanjem i funkcijom spermatozoida u ženskom reproduktivnom traktu, kao i sa procesima fertilizacije i razvoja embriona u ženskom reproduktivnom traktu (Nasrin i Calogero, 2012). Ovo su i osnovni faktori postizanja visokog stepena fertiliteta veštački osemenjenih plotkinja. S tim u vezi, interesantna su istraživanja u vezi sa mogućnosti povećanja fertiliteta krmača, osemenjenih konvencionalnim ili dozama redukovano volumena i broja spermatozoida, uz dodatak nativne ili sintetičke spermalne plazme (tzv. dvofazna inseminacija).

Garcia i sar. (2009) su osemenjavali krmače konvencionalnim dozama (80 ml sa 3×10^9 spermatozoida) (I grupa) i istim ovim dozama, uz prethodnu aplikaciju 30 ml sintetičke spermalne plazme (Predil-MRA[®]) (II grupa). Vrednost prašenja je bila značajno niža (61.9%) kod prve (kontrolne) grupe, u odnosu drugu (tretmansku) grupu (74.1%). Prosečan broj rođene prasadi po leglu je bio značajno veći (za 1.28 prasadi) kod tretiranih, u odnosu na kontrolne krmače. Naročito su interesantni rezultati koje se, ovi autori dobili posle postcervikalne inseminacije dozama redukovano broja spermatozoida (1.5×10^9), u kombinaciji sa 30 ml sintetičke spermalne plazme. Postignuta vrednost prašenja je iznosila 92.3%, a veličina legla 13.2 praseta. Dimitrov i sar. (2012) su osemenjavali krmače postcervikalnom (plitkom intrauterinom) metodom, dozama sa 1.5×10^9 spermatozoida, uz dodatak 20 ml sintetičke spermalne plazme (Predil-MRA[®]), tretmanska grupa ili bez dodatka ovog preparata (kontrolna grupa). I ovi autori su ustanovili da dodavanje sintetičke spermalne plazme povećava fertilitet krmača (vrednost prašenja 83%, a broj živo rođene prasadi po leglu 10.75) u odnosu na kontrolne krmače (vrednost prašenja 76%, a broj živo rođene prasadi po leglu 10.07). Rezultati istraživanja koja su izveli Stančić i sar. (2014), primenom konvencionalne metode intracervikalne inseminacije, dozama volumena 100 ml sa 4×10^9 spermatozoida, sa ili bez prethodne aplikacije 30 ml sintetičke spermalne plazme (Predil-MRA[®]), pokazuju da ovo može biti korisna metoda povećanja fertiliteta krmača osemenjenih tokom toplijeg perioda

godine. Naime, ovi autori su pokazali da je vrednost prašenja, posle osemenjavanja u toploj sezoni, značajno veća (82%) kod krmača osemenjenih sa dodatkom sintetičke semene plazme, u odnosu na krmače osemenjene bez dodatka ovog preparata (72%). U hladnoj sezoni su ove vrednosti bile nešto više (88% i 84%), ali se nisu statistički značajno razlikovale. Broj živo rođene prasadi po leglu se kretao između 14.65 i 15.61, a razlike nisu bile signifikantne ni u zavisnosti od godišnje sezone, kao ni u zavisnosti od toga da li je osemenjavanje izvršeno sa ili bez aplikacije sintetičke spermalne plazme. I rezultati drugih autora (*Martin Rillo i sar., 1996, Lyczynski, i sar., 2000, Ramirez Ovalle, 2002; Garcia Ruvalcaba i sar., 2008, Garcia Ruvalcaba i sar., 2009*) pokazuju da primena tzv. dvofazne inseminacije (dodatak sintetičke spermalne plazme), klasičnom (intracervikalnom) ili novom (postcervikalnom) inseminacijom, ima stimulativan efekt na fertilitet (vrednost prašenja i veličina legla) osemenjenih krmača. Ovaj efekt se pripisuje svojstvu preparata sintetičke spermalne plazme (Predil-MRA[®]), da stimuliše kontrakcije uterusa i povećava preživljavanje i fertilizacioni kapacitet spermatozoida u uterus (*Martin Rillo i sar., 1996, Levis, 2002, Castaneda Morreno, 2002; Dimitrov i sar., 2012*). *Kasetrtut i Kaeoket (2010)* su osemenjavali krmače dozama otopljenim posle čuvanja dubokim zamrzavanjem, u koje su dodali 60 ml native spermalne plazme ili 60 ml klasičnog razređivača za sperm nerasta (ModenaTM). Vrednost uspešne koncepcije je iznosila 100% kod krmača osemenjenih dozama sa spermalnom plazmom i 60% kod krmača osemenjenih dozama sa klasičnim razređivačem za sperm nerasta. Transcervikalna infuzija 50 ml spermalne plazme, neposredno pre aplikacije inseminacione doze, ubrzava ovulaciju, povećava stepen oplodivosti ovuliranih jajnih ćelija i preživljavanje ranih embriona (*Waberski i sar., 1996*).

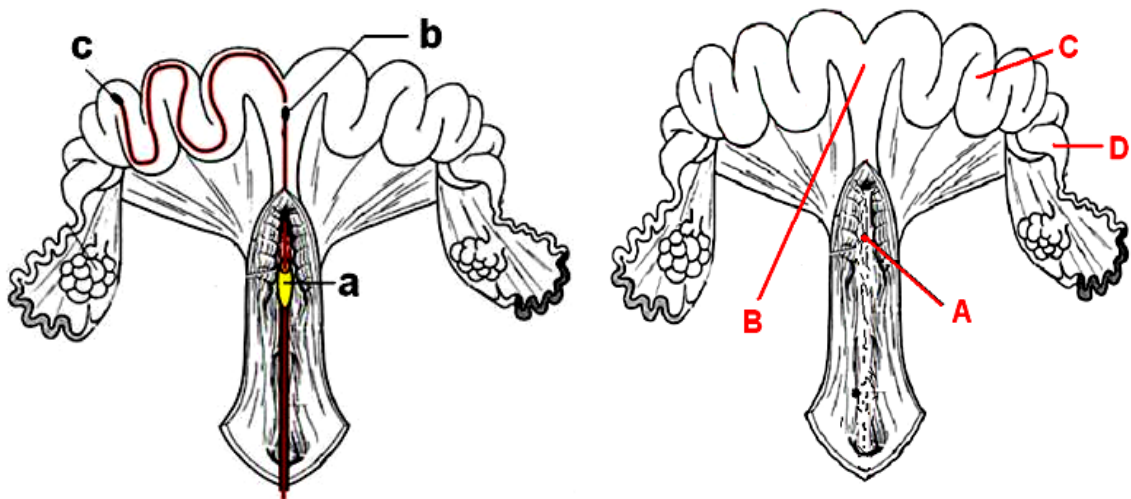
Značajno povećanje vrednosti prašenja i veličine legla, posle osemenjavanja krmača dozama odmrznutim u medijumu sa dodatkom spermalne plazme, u odnosu na osemenjavanje bez ovog dodatka, ustanovili su *Okazaki i sar. (2009b)* i *Garcia i sar. (2010)*. Dodavanje 15% native spermalne plazme u medijum za otapanje duboko zamrznutih inseminacionih doza, značajno smanjuje procent spermatozoida sa abnormalnim akrozomom i povećava progresivnu pokretljivost. Osim toga, osemenjavanje dozama otopljenih u medijumu sa dodatkom spermalne plazme, značajno je povećalo vrednost prašenja i veličinu legla, u odnosu na krmače osemenjene dozama otopljenim bez dodatka spermalne plazme (*Okazaki i sar., 2012*).

Opisane biofizičke i biohemijske karakteristike sperme mogu biti važni kriterijumi za procenu i poboljšanje parametara fertilizacionog potencijala sperme nerasta, kao i jedna od metoda dijagnostikovanja reproduktivnih poremećaja mužjaka. Određivanje sastava spermalne plazme treba da bude ustaljeno i korisno sredstvo u izboru nerastova dobrog fertiliteta za donatore sperme. I, konačno, spermalna plazma može korisno poslužiti za unapređenje fertiliteta veštački osemenjenih krmača (*Caballero i sar., 2008*). Međutim, precizni mehanizmi delovanja aktivnih sastojaka spermalne plazme, na fertilitet nerastova i krmača, ipak, ostaju predmet daljih istraživanja (*Nasrin i Calogero, 2012*).

3.5. POSTCERVIKALNO OSEMENJAVANJE KRMAČA

U poglavlju 3.1.1. (Reproduktivna eksploatacija nerastova), istaknuto je da sadašnja produkcija oko 20 inseminacionih doza po ejakulatu, nije dovoljna za efikasnu reproduktivnu eksploataciju genetski superiornih nerastova u tehnologiji klasičnog veštačkog osemenjavanja, te da ovo uzrokuje značajne ekonomske gubitke u intenzivnoj proizvodnji svinja. Takođe je istaknuto da je ovo moguće prevazići upotrebom inseminacionih doza redukovano volumena i broja spermatozoida. Naime, na taj način je moguće dobiti veći broj VO doza po ejakulatu, ali bez povećanja stepena razređenja, što značajno smanjuje fertilizacioni kapacitet spermatozoida.

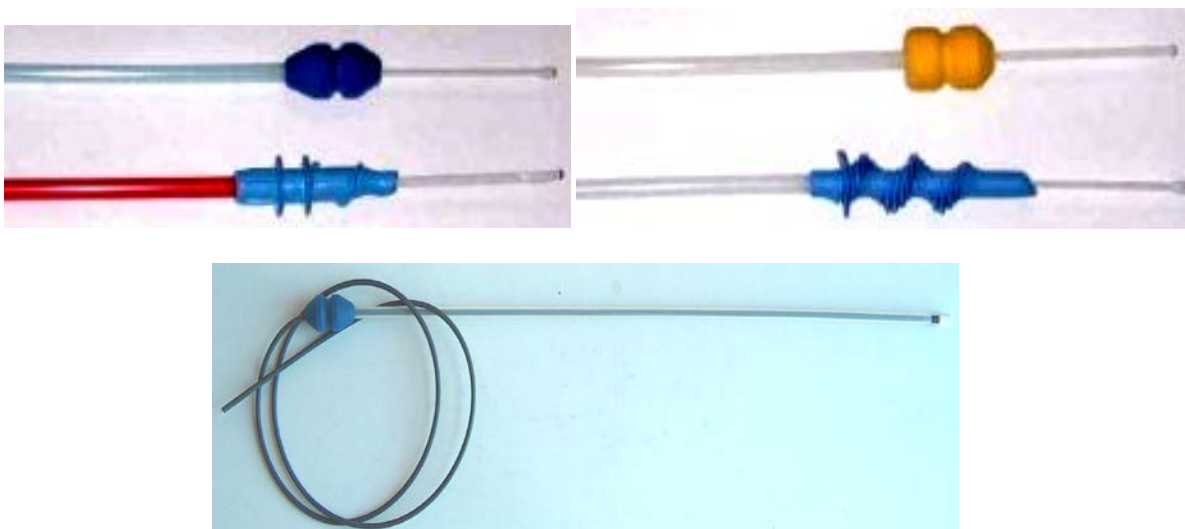
Postoje dve inseminacione procedure, koje dozvoljavaju upotrebu doza sa znatno redukovanim brojem spermatozoida, a da se, pri tome, ne redukuje vrednost fertiliteta osemenjenih krmača, u odnosu na inseminaciju klasičnim dozama (Heise, 2012; Hernández-Caravaca i sar., 2012). Radi se o novijim metodama postcervikalne (plitke intrauterine) i duboke intrauterine inseminacije. Prva metoda podrazumeva depoziciju sperme u telo materice (za razliku od klasične intracervikalne inseminacije, gde se doza deponuje u cerviks), dok druga metoda podrazumeva depoziciju inseminacione doze u proksimalnu (kranijalnu) trećinu roga materice (bliže utero-tubalnim spojevima) (Martinez i sar., 2005).



Slika 1. Mesta depozicije inseminacione doze transcervikalnom inseminacijom: **a** - intracervikalno, **b** - postcervikalno (plitko intrauterino) i **c** - duboko intrauterino (*levo*). Dubljom depozicijom sperme u ženski genitalni trakt značajno se smanjuj potreban volumen i broj spermatozoida u VO dozi (*desno*) (**A** – u cerviks: V=80 - 100ml, sa 2 do 5×10^9 spermatozoida; **B** – u telo materice: V=20 - 50ml, sa 0,5 do $2,0 \times 10^9$ spermatozoida; **C** – duboko u rog materice: V=10 - 20ml, sa 1 do 5×10^8 spermatozoida i **D** – hirurškom injekcijom u vrh roga materice: V=0,5 - 2ml, sa 1 do 5×10^6 spermatozoida). Belstra, 2002.

Primenom postcervikalne (plitke intrauterine - PIUI), sa 1 do 1.5×10^9 spermatozoida u dozi, ili posle duboke intrauterine inseminacije (DIUI), sa 6×10^8 spermatozoida u dozi, mogu se dobiti rezultati fertiliteta slični onima koji se postižu posle osemenjavanja krmača metodom konvencionalne intracervikalne inseminacije (ICI), sa 3×10^9 spermatozoida u VO dozi (Roca et al., 2003; Roca et al., 2006). Depozicijom doze sa 10×10^6 spermatozoida, u blizinu uterotubalnih spojeva, može se postići 89% vrednosti prašenja (Heise, 2012), dok se dobri rezultati sa još manjim brojem spermatozoida, postižu depozicijom doze u jajovod, laparoskopskim pristupom spermatozoa (Vazquez i sar., 2008).

Postcervikalna (plitka intrauterina) inseminacija podrazumeva deponovanje VO doze znatno nižeg volumena i broja spermatozoida (na primer, doza volumena 50 ml, sa 2×10^9 spermatozoida) u telo materice. To je oko 20 cm do 30 cm dublje (kranijalnije) od mesta (cerviks) u koje se ubacuje klasična VO doza, volumena 80 ml do 100 ml, sa prosečno 4×10^9 spermatozoida (Belstra, 2002; Stančić i sar., 2007). Za plitku intrauterinu inseminaciju, potrebni su specijalni katetri, kojima je moguće proći kroz ceo cerviks, tako da vrh katetera dospe do tela materice, tj. u blizinu razdvajanja levog i desnog roga materice (bifurcatio cornua uteri). Tako su dizajnirani kateteri slični onima koji se koriste za klasičnu intracervikalnu inseminaciju, ali je kroz njih provučen još jedan, tanji, kateter. Prilikom inseminacije, vrh osnovnog katetera se plasira u cervikalni kanal (kao kod klasične intracervikalne inseminacije), a zatim se tanji kateter gura do tela materice, gde se izvrši deponovanje VO doze (Belstra, 2004; Grafenau i sar., 2004).



Slika 2. Katetri za plitku intrauterinu inseminaciju, sa različitim osnovnim vrhom (*gore*) kateter za duboku intrauterinu inseminaciju (*dole*)

Duboka intrauterina inseminacija se može izvesti hirurškim putem, pri čemu se metodom laparotomije ili laparoskopije, pristupa do vrhova rogova uterusa, u koje se deponuju inseminacione doze razređene sperme, vrlo malog volumena (0,5 ml do 2 ml), sa svega nekoliko miliona, do nekoliko stotina miliona spermatozoida. U poslednje vreme se primenjuje nehirurška metoda duboke intrauterine inseminacije, za koju se koristi dugačak

(oko 1 m) fleksibilni, tanji, kateter za depoziciju sperme. Obe metode imaju za cilj da se inseminaciona doza deponuje što bliže vrhu roga meterice, tj. utero-tubalnom spoju (*Rath, 2002; Grafenau i sar., 2004*). Neka istraživanja pokazuju da je dovoljno uvesti fleksibilni kateter 30 cm do 40 cm u rog, kranijalno od bifurkacije uterusa, da bi se dobili dobri rezultati fertiliteta krmača, osemenjenih dozama volumena 10 ml do 20 ml, koje sadrže 1×10^8 do 5×10^8 spermatozoida (*Wolken i sar., 2002; Roca i sar., 2003; Wongtawan i sar., 2005*).

Intrauterina inseminacija ima prednosti i nedostatke u odnosu na klasičnu intracervikalnu inseminaciju (*Grafenau i sar., 2004; Stančić i sar., 2006*).

Prednosti intrauterine inseminacije:

- ✓ Moguće je koristiti inseminacione doze znatno manjeg volumena, sa znatno manjim brojem spermatozoida.
- ✓ Na ovaj način se povećava broj inseminacionih doza, koje se mogu dobiti od jednog ejakulata, odnosno moguće je osemeniti znatno veći broj plotkinja.
- ✓ Znatno se smanjuje cena koštanja jedne inseminacije.
- ✓ Tehnika samog izvođenja transcervikalne intrauterine inseminacije je relativno laka i traje približno isto koliko i klasična intracervikalna inseminacija.
- ✓ Smanjen je transvaginalni refluks sperme, posle inseminacije i bolji transport spermatozoida do utero-tubalnih spojeva (fiziološkog rezervoara spermatozoida).
- ✓ Pri tome je fertilitet osemenjenih plotkinja sličan ili veći od onog koji se postiže klasičnom intracervikalnom inseminacijom.

Nedostaci intrauterine inseminacije:

- ✓ Nije moguće osemenjavati nazimice, posebno ne u prvom ili drugom pubertetskom estrusu, zbog malih dimenzija njihovih reproduktivnih organa (posebno cerviks, telo i rogovu uterusa). Naime, depozicijom intrauterinog katetera, često dolazi do ozleda ovih organa i postinseminacionih krvavljenja.
- ✓ Nije moguće intrauterino osemenjavati ni odrasle krmače, koje su, prethodno, imale težak porođaj, sa povredama (priraslicama) na unutrašnjim polnim organima. Takve promene mogu onemogućiti prolaz katetera, ili kateter može izazvati njihovu ponovnu povredu. To može imati za posledicu postinseminaciono krvavljenje i dalje komplikacije.
- ✓ Primenom nesterilisanih katetera, vrši su unošenje infektivnih agenasa u dublje partije materice.
- ✓ Potrebna je primena skupljih katetera, posebno dizajniranih za intrauterinu inseminaciju, kao i dodatna edukacija stručnjaka.

3.5.1. FIZIOLOŠKA OSNOVA POSTCERVIKALNE INSEMINACIJE

Kod prirodnog ili konvencionalnog veštačkog osemenjavanja, spermatozoidi se deponuju u cervikalni kanal. Od ovog mesta depozicije, spermatozoidi se, antiperistaltičkim kontrakcijama miometriuma, pasivno transportuju do utero-tubalnih spojeva (*Langedijk i sar., 2002*) i, dalje, do kaudalnog istmusa jajovoda, koji predstavlja fiziološki rezervoar

spermatozoida (Hunter, 1981). Posle kapacitacije, iz kaudalnog istmusa, do ampule jajovoda (mesto fertilizacije oocita), spermatozoidi dospevaju sopstvenim hiperaktivnim kretanjem (Hoi i Suarez, 2001). U normalnim, fiziološkim, uslovima (period standing estrusa i dominacija visoke koncentracije estrogena u telesnoj cirkulaciji), adekvatna populacija spermatozoida dospeva do utero-tubalnih spojeva i rezervoara spermatozoida u kaudalnom istmusu, za 1 do 2 sata posle inseminacije. Ovo je vrlo bitno za održavanje vitalnosti, integriteta i kapacitaciju spermatozoida, tokom 24h do 42h, te njihovu završnu migraciju do ampule jajovoda, gde se vrši proces oplodnje (Hunter, 1981; Hunter, 1984; Yanagimachi, 1994; Rath, 2002).

Prilikom prirodnog osemenjavanja, u cerviks se deponuje ejakulat prosečnog volumena 250 ml, sa oko 50×10^9 spermatozoida, ili prilikom konvencionalnog VO doza volumena 80 do 100 ml, sa oko 4×10^9 spermatozoida. Tokom prolaska spermatozoida kroz uterus, ovaj broj deponovan volumen sperme i spermatozoida se radikalno smanjuje. Tako da se, unutar 1 do 2 sata posle osemenjavanja, u utero-tubalnim spojevima nalazi 100 do 200×10^6 spermatozoida, a u ampuli jajovoda (mesto oplodnje) se formira populacija od nekoliko hiljada spermatozoida (Hunter 1995). Ova redukcija se vrši antiperistaltičkim kontrakcijama uterusa unutar 30 do 45 minuta posle osemenjavanja, na koji način se, u spoljašnju sredinu, izbacuje (tzv. postinseminacioni refluks sperme) oko 75% deponovanog volumena ejakulata ili inseminacione doze, sa oko 25% do 30% deponovanih spermatozoida (Steeverink i sar., 1998). Znatno manji deo spermatozoida biva uništen *in utero*, fagocitozom polimorfonuklearnim leukocitima (Hernández-Caravaca i sar., 2012). Postinseminacioni refluks je značajan mehanizam redukcije deponovanog broja spermatozoida, prilikom osemenjavanja, kojim se obezbeđuje formiranje adekvatnog broja spermatozoida na mestu oplodnje. Ovaj refluks nema značajnog uticaja na fertilitet krmače, kada se intracervikalno osemenjavanje (prirodno ili veštačko) izvrši sa više od 1×10^9 spermatozoida, u dozi volumena većeg od 80 ml (Rath, 2002). Selektivnom propustljivošću utero-tubalnih spojeva, vrši se konačna redukcija i formiranje optimalnog broja spermatozoida u kaudalnom istmusu i ampuli jajovoda (Hunter, 1995).

Uzimajući u obzir navedene činjenice, istraživanja brojnih autora, pokazuju da se volumen inseminacione doze i broj spermatozoida u dozi, mogu radikalno smanjivati sa deponovanjem doze u kranijalnije partije uterusa (telo, rogovi, uterotubalni spojevi) ili jajovod, a da se fertilitet tako osemenjenih krmača bitno ne smanji u odnosu na onaj koji se postiže konvencionalnim intracervikalnim osemenjavanjem (Mezalira i sar., 2005; Stančić i sar., 2006; Cordova-Izquierdo i sar., 2008; Dimitrov i Żmudzki, 2009; Buranaamnuay i sar., 2010; Stančić i sar., 2010; Hernández-Caravaca i sar., 2012; Heise, 2012; Stančić i sar., 2013).

3.5.2. REZULTATI FERILITETA KRMAČA OSEMENJENIH POSTCERVIKALNOM METODOM

U širokoj praktičnoj proizvodnji, sve češće je moguće postići visoke vrednosti fertiliteta ($\geq 85\%$ prašenja i ≥ 10 živo rođene prasadi po leglu), klasičnom intracervikalnom inseminacijom, dozama sa redukovanim brojem spermatozoida (oko 2×10^9). Međutim, još uvek se široko primenjuju doze klasičnog volumena 80 ml do 100 ml i broja spermatozoida 3

do 4×10^9 . Ovo je, naime relativno jeftin način da se pokriju eventualno lošiji kvalitet upotrebene sperme, kao i greške u optimalnom vremenu i tehnici osemenjavanja (*Belstra, 2002*). Primena doza ovako velikog volumena i broja spermatozoida, smanjuje efikasnost reproduktivnog iskorištavanja genetski superiornih nerastova, jer se, od jednog nerasta može dobiti oko 1200 VO doza. Osim toga, formiranje takvih doza, često, zahteva prekomerno razređenje nativnog ejakulata, što smanjuje fertilizacioni potencijal takvih doza, odnosno fertilitet osemenjenih krmača (*Rozeboom, 2000; Tummaruk i sar., 2000; Stančić i sar., 2009; Stančić i sar., 2012*).

S tim u vezi, povećanje broja inseminacionih doza po nerastu godišnje, moguće je postići redukcijom volumena doze (na primer sa klasičnih 80 ml do 100 ml, na 50 ml) i broja spermatozoida (sa 3×10^9 do 5×10^9 na 1×10^9 do 2×10^9) (*Belstra, 2002; Stančić i sar., 2007*). reproduktivnog iskorištavanja genetski superiornih nerastova, može biti izvedeno upotrebom inseminacionih doza manjeg volumena (sa 100 ml na 50 ml), sa redukovanim brojem spermatozoida. Pri tome je važno da fertilitet osemenjenih krmača ne bude niži od onog koji se postiže tehnologijom klasičnog veštačkog osemenjavanja (*Rath, 2002; Stančić, 2002; Stančić i sar., 2003; Izco, 2004; Stančić i sar., 2009; Arujo i sar., 2009; Stančić i sar., 2010; Sbardella i sar., 2014*).

Istraživanja brojnih autora pokazuju da je primenom nove tehnologije postcervikalne (plitke intrauterine) inseminacije, dozama redukovano volumena i broja spermatozoida, moguće postići slične ili veće vrednosti fertiliteta krmača, u odnosu na klasičnu intracervikalnu inseminaciju (*Vansickle, 2002; Watson i Behan, 2002; Belstra, 2004; Roseboom i sar., 2004; Mezalira i sar., 2005; Stančić i sar., 2006; Stančić i sar., 2007; Radović i sar., 2006; Radović i sar., 2007; Stančić i sar., 2010; Stančić i sar., 2013; Rogožarski i sar., 2013*). Tako, na primer, ako se plitka intrauterina inseminacija izvede dozama koje sadrže $0,5 \times 10^9$ do $1,0 \times 10^9$ spermatozoida, rezultati fertiliteta krmača su vrlo slični onima koji se dobijaju kod klasične intracervikalne inseminacije (*Watson i sar., 2002; Belstra, 2004; Mezalira i sar., 2005*). Neka istraživanja (*Stančić i sar., 2009*) pokazuju da duplo redukovani broj spermatozoida u inseminacionoj dozi (2×10^9), u odnosu na uobičajeni broj u dozi (4×10^9), nema značajnog uticaja na vrednost prašenja i veličinu legla. Međutim, duplo manji volumen doze (50ml, u odnosu na 100 ml), bez obzira na broj spermatozoida u njoj, ima uticaja na smanjenje vrednosti prašenja, ali ne i na značajnije razlike u prosečnom broju živorođene prasadi po leglu (*Stančić i sar., 2009*). Tako je vrednost prašenja, posle osemenjavanja sa 4×10^9 i 2×10^9 spermatozoida u dozi od 100 ml, iznosila 83.3% i 80.0% (nije značajno različita), dok su ove vrednosti, posle osemenjavanja istim brojem spermatozoida, ali u dozama duplo redukovano volumena (50 ml) bile značajno niže (73.3% i 70.0%), iako se nisu međusobno značajno razlikovale. Prosečan broj živo rođene prasadi u leglu nije bio značajno različiti, ni u zavisnosti od volumena doze, ni u zavisnosti od broja spermatozoida u dozi i iznosio je 10.16, 10.21, 10.27 i 9.85. Rezultati fertiliteta postcervikalno osemenjenih krmača, prikazani su u tabeli 11.

Rezultati prikazani u tabeli 11, jasno pokazuju da se primenom plitke intrauterine inseminacije (postcervikalne), dozama znatno redukovano volumena i broja spermatozoida, postiže fertilitet (vrednost, % prašenja i veličina legla) krmača vrlo sličan onom, koji se postiže posle konvencionalnog intracervikalnog osemenjavanja.

Tabela 11. Fertilitet krmača posle postcervikalne (plitke intrauterine) inseminacije

Autor	Inseminaciona doza		Fertilitet krmača	
	Volumen (ml)	Broj sptz. u dozi	% prašenja	Živorodne prasadi u leglu (n)
<i>Vansickle (2002)</i>	100	$3,0 \times 10^9$	96,7	12,23
	50	$1,5 \times 10^9$	92,8	11,61
	30	$1,0 \times 10^9$	94,1	10,44
<i>Rozeboom i sar. (2004)</i>	85	$0,5 \times 10^9$	78,0	8,6
	85	$1,0 \times 10^9$	87,0	9,3
	85	$4,0 \times 10^9$	94,4	10,5
<i>Izco (2004)</i>	30	$1,5 \times 10^9$	79,1	10,9
<i>Serret i sar. (2005)</i>	50	2×10^9	80,7	10,3
	50	1×10^9	83,1	11,0
	50	$0,5 \times 10^9$	74,7	10,4
<i>Mezalira i sar. (2005)</i>	20	$0,25 \times 10^9$	78,6 ²	11,8 ²
	20	$0,5 \times 10^9$	85,7	13,0
	20	1×10^9	88,9	12,8
<i>Stančić i sar. (2006)</i>	100	5×10^9	88,0	10,77
	50	5×10^9	86,6	10,50
	100	$2,5 \times 10^9$	93,3	10,42
	50	$2,5 \times 10^9$	88,0	11,86
<i>Stančić i sar. (2009)</i>	100 ¹	4×10^9	83,3	10,16
	50 ¹	4×10^9	73,3	10,27
	100 ¹	2×10^9	80,0	10,21
	50 ¹	2×10^9	70,0	9,85
<i>Araújo i sar. (2009)</i>	50	1×10^9	95,5	11,6
<i>Dimitrov i Žmudski (2009)</i>	50	$1,5 \times 10^9$	92,5	10,05
<i>Stančić i sar. (2010)</i>	50	4×10^9	83,3	10,27
	50	2×10^9	76,7	9,85
	50	1×10^9	66,7	9,67
<i>Sbardella i sar. (2014)</i>	45	$1,5 \times 10^9$	91,5	12,5 ³

¹Klasična intracervikalna inseminacija; ²Vrednost koncepcije i broj živih embriona, ustanovljeno žrtvovanjem krmača, 34 do 41 dan posle inseminacije. ³Ukupno rođene prasadi u leglu.

Pored kvaliteta upotrebljenih doza, za postizanje visoke vrednosti fertiliteta krmača osemenjenih intrauterinom metodom, naročito je važno precizno ustanoviti optimalno vreme osemenjavanja, u odnosu na početak manifestacije standing estrusa (*Spronk i sar., 1997; Kaeoket i sar., 2005; Radović i sar., 2006; Stančić i sar., 2007; Stančić i sar., 2007; Stančić i sar., 2008; Stančić i sar., 2009; Stančić i sar., 2010*). Osim toga, neka istraživanja (*Fülöp i sar., 1992; Nebesni i sar., 1998; Grafenau i sar., 2005; Kragić, 2014*) pokazuju da i dizajn inseminacionog katetera, posebno njegov oblik i tvrdoća, mogu značajno uticati na fertilitet postcervikalno osemenjenih krmača.

4. MATERIJAL I METOD RADA

Celokupno istraživanje je podeljeno u dva osnovna dela.

U prvom delu je izvršen prikaz reproduktivne performanse nerastova i krmača u proizvodnim uslovima, na osnovu reproduktivne evidencije tri klasične farme za intenzivnu proizvodnju svinja u AP Vojvodini, kao i na osnovu podataka Glavne odgajivačke organizacije AP Vojvodine, za sve registrovane farme u AP Vojvodini. Cilj je bio da se, prvenstveno, prikažu osnovni parametri efikasnosti reproduktivnog iskorištavanja nerastova u tehnologiji konvencionalnog intracervikalnog osemenjavanja, kao i da se prikažu osnovni paramteri reproduktivne efikasnosti krmača u našim proizvodnim uslovima.

U drugom delu, su izvršena sledeća eksperimentalna istraživanja:

1. Kvalitet native i razređene sperme, u laboratorijskim uslovima, zavisno od uticaja godišnje sezone, rase ispitivanih nerastova i sadržaja proteina u nativej spermalnoj plazmi
2. Variranje progresivne pokretljivosti (pp) u svim ispitivanim uzorcima, kao i u dobrim uzorcima (pp $\geq 65\%$) sperme čuvane *in vitro* do 72h, u razređenju 1:2 i 1:4, zavisno od godišnje sezone, rase nerastova i sadržaja proteina u spermalnoj plazmi.
3. Uticaj mešanja autologne ili homologne spermalne plazme na progresivnu pokretljivost spermatozoida u razređenoj spermi.
4. Uticaj primene inseminacionih doza različitog volumena i broja spermatozoida, na parametre fertiliteta intracervikalno i postcervikalno (plitko intrauterino) osemenjenih krmača.
5. Uticaj dodavanja native spermalne plazme neposredno pre intracervikalne aplikacije konvencionalne VO doze, na fertilitet osemenjenih krmača (% prašenja i veličina legla).

4.1. REPRODUKTIVNA PERFORMANSA NERASTOVA I KRMAČA U PROIZVODNIM ZAPATIMA

4.1.1. REPRODUKTIVNA PERFORMANSA NERASTOVA

Podaci o reproduktivnoj eksploataciji i produktivnosti nerastova, prikupljeni su iz sledećih izvora:

- a) Baze podatka reproduktivne evidencije tri ispitivane farme i
- b) Godišnji izveštaji za 2013. i 2014. godinu iz baza podataka Glavne odgajivačke organizacije za AP Vojvodinu, sa sedištem na Poljoprivrednom fakultetu u Novom Sadu, Departmana za stočarstvo.

Efiksnost reproduktivne eksploatacije nerastova, prikazana je na osnovu podataka prikupljenih iz reproduktivne evidencije tri klasične farme intenzivne proizvodnje svinja, svaka sa više od 1.000 krmača u priplodnom zapatu. To su farme: (1) "Pobeda" Pobeda, Gunaroš, (2) PIK "Bečej" u Bečeju i (3) AD IM "Neoplanta", farma svinja u Čeneju. Radi zaštite proizvodnih podataka, ove farme će, u daljem tekstu, biti označene kao: farma A, farma B i farma C, ali ne redosledom kako su navedene u gornjem tekstu. Na svakoj farmi su uzeti podaci za 9 do 10 nerastova, koji su bili korišteni tokom cele godine (2013. ili 2014. godine), odnosno od kojih je uzimana sperma za veštačko osemenjavanje (VO), prosečno jednom nedeljno u toku svakog mesca u godini.

Prikazani su sledeći parametri ocene reproduktivne eksploatacije nerastova:

1. broj uzetih ejakulata po nerastu godišnje,
2. frekvencija uzimanja uzastopnih ejakulata,
3. volumen ejakulata,
4. progresivna pokretljivost,
5. broj formiranih inseminacionih (VO) doza po ejakulatu,
6. stepen razređenja ejakulata,
7. broj VO doza po nerastu godišnje,
8. broj (%) živih i spermatozoida sa oštećenim akrozomom,
9. broj (%) spermatozoida sa morfološkim anomalijama glave i/ili repa i
10. broj (%) inseminacionih doza "van klase", tj, koje nisu za upotrebu u VO.

Parametri od rednog broja 1 do 7 su određivani na farmi i preuzeti su iz farmske reproduktivne evidencije. Parametri od rednog broja 8 do 10 su određeni u VO dozama razređene sperme, koje su, sa farmi, donete u laboratoriju za reprodukciju, Naučnog instituta za veterinarstvo u Novom Sadu. Broj živih i spermatozoida sa oštećenim i

intaktnim akrozomom, određen je CASA metodom (computer-assisted semen analysis), dok je broj spermatozoida sa morfološkim anomalijama glave i repa, određen metodom protočne citometrije. Inseminacione doze su klasifikovane kao: "prva klasa", "druga klasa", "treća klasa" i "van klase", tj. nisu za upotrebu u VO. Klasifikacija je izvršena na osnovu cito-morfoloških nalaza, po internoj metodi Instituta, kao i po internacionalnoj klasifikaciji, na osnovu broja (%) progresivno pokretnih spermatozoida u VO dozi razređene sperme. Doze u kategoriji "van klase", imaju: manje od 50% živih spermatozoida, više od 30% spermatozoida sa oštećenim akrozomom, više od 60% spermatozoida sa morfološkim anomalijama i manje od 65% progresivno pokretnih spermatozoida (*Milovanović et al., 2013*).



Slika 3. Oprema za citomorfološki pregled sperme
CASA (levo) i protočna citometrija (desno)

Naučni institut za veterinarstvo u Novom Sadu, Odeljenje za reprodukciju

Rezultati zvanične kontrole produktivnosti nerastova i krmača, sa ukupno 51 umatičene (registrovane) farme u AP Vojvodini, prikazni su na osnovu *Izveštaja o produktivnosti umatičenih nerastova i krmača (za 2014. godinu)*, koji je uradila *Glavna odgajivačka organizacija za AP Vojvodinu*, sa sedištem na Poljoprivrednom fakultetu u Novom Sadu (Departman za stočarstvo). Ukupno je kontrolisano 34001 umatičenih krmača i 461 umatičenih nerastova.

4.1.2. REPRODUKTIVNA PERFORMANSA KRMAČA U PROIZVODNIM ZAPATIMA

Podaci su prikupljeni od ukupno 34.001 kontrolisanih krmača, sa 51 registrovane industrijske farme u AP Vojvodini, za 2014. godinu. Posebno su prikazani podaci o prosečnom broju živo, mrtvo i ukupno rođene prasadi, kao i o broju zalučene prasadi po leglu, za ukupno 14.428 krmača, sa 10 odbranih (po proizvodnji boljih) farmi, koje imaju

preko 600 krmača u reproduktivnom zapatu. Te farme su: (1) „Carnex“, Vrbas, (2) PIK „Bečej“, Bečej, (3) AD IM „Neoplanta“, farma svinja Čenej, (4) „Dinamika“, Kamendin, Širig, (5) „Stari Tamiš“, Pančevo, (6) „Delta vet-med“, doo farma Stara Pazova, (7) „Essentico“, farma Mokrin, (8) „Pobeda“, Pobeda, (9) „Doža Djerdj“, Bačka Topola i (10) „Delta vet-med“, doo farma „Kozara“, Banatsko Veliko Selo. Prikazani su i podaci za prosečan broj živo rođene i zalučene prasadi po leglu, za 11.377 krmača nerastovskih majki, u periodu od 2005. do 2013. godine.

Prikazani su sledeći osnovni parametri reproduktivne performanse krmača:

1. prosečan broj prašenja po krmači,
2. prosečan indeks prašenja (broj prašenja po krmači godišnje),
3. vrednost prašenja (postotak oprašenih od broja osemenjenih krmača godišnje),
4. prosečan broj prasadi u leglu kod rođenja (živih, mrtvih, ukupno)
5. prosečan broj zalučene prasadi po leglu

4.2. EKSPERIMENTALNA ISTRAŽIVANJA

Istraživanja su obavljena u četiri odvojena eksperimenta.

Prvi eksperiment je obuhvatio ispitivanje uticaja godišnje sezone, rase nerastova i sadržaja proteina u spermalnoj plazmi, na osnovne parametre fertilizacionog potencijala ejakulata (nativne sperme) nerastova.

Drugi eksperiment je obuhvatio ispitivanje uticaja godišnje sezone, rase nerastova i sadržaja proteina u spermalnoj plazmi, na progresivnu pokretljivost spermatozoida u spermi različitog stepen razređenja i perioda čuvanja *in vitro*. Izvršeno je i ispitivanje uticaja sadržaja spermalne plazme u ejaklatu, na status akrozoma, hromozoma i ćelijske membrane spermatozoida.

Treći eksperiment. Izvršeno je istraživanje uticaja mešanja spermatozoida nerastova sa visokim sadržajem proteina u spermalnoj plazmi, sa spermalnom plazmom nerastova sa niskim sadržajem proteina i obrnuto, na stepen progresivne pokretljivosti spermatozoida u razređenoj spermi. Cilj je bio da se ustanovi da li postoji uticaj sadržaja proteina u spermalnoj plazmi na održavanje minimalno potrebnog procenta progresivne pokretljivosti spermatozoida u spermi različitog stepena razređenja i perioda čuvanja *in vitro*.

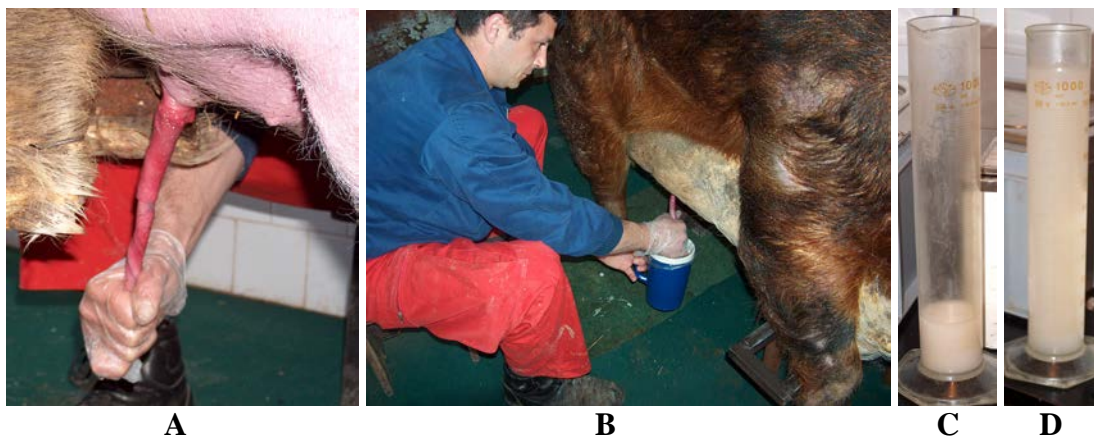
Četvrti eksperiment je imao za cilj da se ustanovi uticaj dodavanja nativne spermalne plazme, neposredno pre aplikacije klasične inseminacione doze (tzv. *dvofazna inseminacija*), na prametere fertiliteta krmača osemenjenih konvencionalnom intracervikalnom metodom.

Eksperimentalna istraživanja su izvedena u:

- a) Laboratoriji za reprodukciju domaćih životinja, Poljoprivredni fakultet u Novom Sadu (*Departman za stočarstvo i Departman za veterinarsku medicinu*),
- b) Laboratoriji za reprodukciju domaćih životinja, Naučni institut za veterinarstvo u Novom Sadu,
- c) Laboratoriji za hemijske analize stočne hrane i materijala animalnog porekla, Poljoprivredni fakultet u Novom Sadu (*Departman za stočarstvi*),
- d) Laboratoriji odeljenja za ispitivanje kvaliteta namirnica i hrane za životinje, Naučni institut za veterinarstvo u Novom Sadu i
- e) Na tri velike farme za industrijsku proizvodnju svinja u AP Vojvodini.

4.2.1. PRVI EKSPERIMENT

Dobijanje uzoraka ejakulata za analizu. Ejakulati pojedinih nerastova su uzimani na pojedinim farmama, uobičajenom metodom manuelne fiksacije penisa i skokom nerasta na fantom. Uziman je ejakulat bez gel-frakcije. Sva oprema, korištena prilikom uzimanja sperme (rukavice, polietilenski spermosabirač, filter-gaza), bila je sterilna i za jednokratnu upotrebu. Na farmi je izmeren volumen dobijenog ejakulata, a uzorak ejakulata, oko 60 ml do 70 ml je stavljen u sterilnu polietilensku flašicu za spermu. Ovako pripremljen uzorak ili uzorci, stavljen je u termo-box na temperaturu od $+17^{\circ}\text{C}$ i transportovan od farme do određene laboratorije na Poljoprivrednom fakultetu ili Naučnom institutu za veterinarstvo u Novom Sadu. Od uzimanja ejakulata, do pristizanja uzoraka u laboratoriju, prolazilo je 2 do 4 sata. Svaki uzorak ejakulata je, na flašici, obeležen tetovir brojem nerasta od koga je uzeta sperma. Osim toga, u prapratnoj dokumentaciji je navedena farma sa koje uzorci dolaze, datum uzimanja sperme, volumen ejakulata od koga je uzet uzorak, kao i rasa i starost nerasta.



Slika 4. Uzimanje sperme metodom manuelne fiksacije penisa (A i B); menzure sa nativnom i razređenom spermom (C i D) (*originalne fotografije*)

Postupak sa uzorkom nativne sperme u laboratoriji. Sve flašice sa uzorcima prispele sperme, stavljene su u vodeno kupatilo. Tokom oko 60 minuta, uzorci su, postepeno, zagrevani na $+37^{\circ}\text{C}$. Na ovoj temperaturi su uzorci držani tokom perioda kontrole kvaliteta.

Kontrola kvaliteta nativne sperme. Izvršena je makroskopska i mikroskopska kontrola i određivanje osnovnih parametara fertilizacionog potencijala svakog uzorka.

Makroskopska ocena je obuhvatila, pored volumena, koji je određen na farmi, još i izgled, boju, gustinu, prisustvo stranih materija (nečistoća, krv i gnoj).

Mikroskopska ocena nativne sperme je obuhvatila: određivanje progresivne pokretljivosti (%), ukupan broj spermatozoida u ejakulatu, broj živih, mrtvih i morfološki abnormalnih spermatozoida.

Progresivna pokretljivost spermatozoida, svakog uzorka, određivana je vizuelnom mikroskopskom metodom (faznokontrastni mikroskop, uveličanje $100\times$). Mikroskopski sto, predmetna pločica i pokrovna ljušpica zagrejani su na 35°C . Ocenu progresivne pokretljivosti su vršila dva iskusna istraživača, istovremeno ali nezavisno, u 3 različita vidna polja mikroskopa, u dve različite kapi sperme (kako su opisali *Komisurd i sar.*, 2002). Tako je dobijeno ukupno 6 vrednosti progresivne pokretljivosti za svaki uzorak. Njihova srednja vrednost je uzeta za dalju analizu. Vrednost progresivne pokretljivosti je izražene u % od ukupno procenjenog broja spermatozoida u vidnom polju.

Koncentracija spermatozoida ($\times 10^6$ u jednom ml ejakulata) i **ukupan broj spermatozoida u ejakulatu** ($\times 10^9$), određeni su fotometrijskom metodom, primenom digitalnog fotometra SDM-5 (Minitüb, Tifenbach, Germany). Aparat je, ujedno, odredio broj mogućih inseminacionih doza, koji se može napraviti od ejakulata čiji se uzorak ispituje, kao i potrebnu količinu razređivača, koja se mora dodati u nativni ejakulat, kako bi se mogao formirati određen broj doza. Time je, praktično, definisan stepen razređenja nativnog ejakulata.

Broj živih, mrtvih i morfološki promenjenih spermatozoida, određen je metodom bojenja po Blom-u i brojanjem pod svetlosnim mikroskopom (uveličanje $\times 1.000$).



Slika 5. Fotometar SDM-5 za fotometrijsko brojanje spermatozoida (*levo*).
Laboratorija za reprodukciju i VO domaćih životinja, Poljoprivredni fakultet, Novi Sad (desno)

Dobri ejakulati. Za dobre ejakulate su smatrani ejakulati volumena ≥ 120 ml; koncentracija spermatozoida $\geq 200 \times 10^6$ /ml ejakulata i progresivne pokretljivosti $\geq 65\%$ (Stančić, 2005; López Rodríguez, 2012).

Svi dobijeni rezultati su uredno evidentirani za svaki uzorak native sperme, za svakog nerasta i za svaku farmu.

Uticaj godišnje sezone na kvalitet ejakulata. Ispitano je ukupno 270 uzoraka ejakulata od 10 nerastova. Od svakog nerasta je kontrolisano 14 ejakulata u hladnoj (ukupno 140 ejakulata) i 13 ejakulata u toploj godišnjoj sezoni (ukupno 130 ejakulata).

Hladna sezona je obuhvatila mesece Novembar-Decembar-Januar-Februar-Mart-April, a *topla sezona* mesece Maj-Jun-Jul-Avgust-Septembar-Oktobar. Broj ispitanih ejakulata u pojedinim mesecima, tokom hladne i tople godišnje sezone, kao i ukupan broj ispitanih ejakulata, prikazani su u tabeli 12.

Tabela 12. Broj ispitanih ejakulata po mesecima u hladnoj i toploj sezoni godine

Hladna sezona		Topla sezona	
Mesec	Broj ejakulata	Mesec	Broj ejakulata
Novembar	35	Maj	20
Decembar	21	Jun	22
Januar	19	Jul	20
Februar	21	Avgust	20
Mart	26	Septembar	20
April	18	Oktobar	28
Ukupno	140	Ukupno	130
Ukupno za celu godinu: 270 ejakulata			

Uticaj rase nerastova na kvalitet ejakulata. Izvršeno je ispitivanje kvaliteta ukupno 168 ejakulata od 24 nerasta. Za ispitivanje su uzete tri rase nerastova, koje se najčešće koriste u industrijskoj proizvodnji svinja na vojvođanskom farmama: Švedski Landras, Veliki Jorkšir i Durok.

Broj ispitanih nerastova, broj ejakulata po nerastu i starost ispitivanih nerastova, prikazani su u tabeli 13.

Tabela 13. Broj ispitanih ejakulata i starost nerastova po rasama

	Rasa nerasta			Ukupno
	Švedski Landras	Veliki Jorkšir	Durok	
Ukupno nerastova (n)	8	8	8	24
Ukupno ejakulata (n)	40	72	56	168
Ejakulata po nerastu (n)	5	9	7	7
Starost nerastova (meseći)	21 (9-57)	23 (7-75)	24 (11-48)	23 (7-75)

Uticaj sadržaja proteina u spermalnoj plazmi na kvalitet ejakulata. Ispitano je ukupno 12 nerastova sa niskim sadržajem proteina u spermalnoj plazmi (2.30%) i 12 nerastova sa visokim sadržajem proteina u spermalnoj plazmi (4.22%). Od svakog nerasta je ispitano po 8 ejakulata. Nerastovi su klasifikovani u grupu sa niskim ili sa visokim sadržajem proteina, na osnovu analize prva dva ejakulata uzeta od svakog nerasta. (Tabela 14).

Tabela 14. Sadržaj proteina u semennoj plazmi i broj ispitanih ejakulata

	Sadržaj proteina u spermalnoj plazmi	
	Visok	Nizak
Broj ispitanih nerastova	12	12
Broj ejakulata po nerastu	8	8
Ukupan broj ejakulata	96	96
Ukupno ispitanih ejakulata	192	
Broj ejakulata u kojima je utvrđen sadržaj proteina u spermalnoj plazmi	24	24
Prosečan sadržaj proteina u spermalnoj plazmi (%)	4.22 (3.81 – 4.81)	2.30 (1.31 – 3.01)

Dobijanje uzoraka nativnih ejakulata, postupak sa uzorcima po prispeću u laboratoriju, kao i metode određivanja parametara kvaliteta native sperme, urađeni su kako je opisano na početku ovog podpoglavlja (4.2.1.).

Distribucija nerastova prema sadržaju proteina u spermalnoj plazmi

Ovo ispitivanje je izvršeno kod ukupno 106 nerastova, sa 7 velikih vojvodanskih farmi za industrijsku proizvodnju svinja. Od ovih nerastova je ispitano ukupno 212 ejakulata (po 2 ejakulata od svakog nerasta) (Tabela 15).

Tabela 15. Broj farmi i nerastova od kojih su uzimani ejakulati za određivanje sadržaja proteina u spermalnoj plazmi

Broj farmi sa kojih su uzimani ejakulati nerastova	7	
Ukupan broj nerastova od kojih su uzeti ejakulati	106	
Ukupan broj ispitanih ejakulata	212	
Broj ispitanih nerastova pojedinih rasa	Landras	38
	Veliki Jorkšir	44
	Durok	24
Prosečna starost nerastova (meseći)	23.8	
Prosečne vrednosti osnovnih parametara ejakulata ispitivanih nerastova	Volumen (ml)	234
	Progresivna pokretljivost (%)	77
	Koncentracija spermatozoida ($\times 10^6$ /ml)	322
	Ukupan broj spermatozoida ($\times 10^9$)	73

Određivanje sadržaja proteina u uzorcima spermalne plazme.

Dobijanje uzoraka native sperme, kao i postupak sa ovim uzorcima do momenta formiranja uzoraka spermalne plazme, opisani su u prvom eksperimentu (podpoglavlje 4.2.1.).

Dobijanje uzoraka spermalne plazme. Uzorak od 20 ml svakog svežeg ejakulata je centrifugiran na 1000 obrtaja (o) u minuti (min), i na temperaturi 4°C, tokom 15 minuta, da se izvrši razdvajanje spermatozoida i spermalne plazme. Zatim je dobijeni supernatant (spermalna plazma) pažljivo odliven u novu, čistu, epruvetu i ponovo centrifugiran na 3000 o/min i 4°C, da se spermalna plazma prečisti od eventualno zaostalih spermatozoida ili drugih organskih partikula. Tako dobijeni uzorci spermalne plazme su čuvani maksimalno 24h u frižideru na 4°C, do momenta početka hemijske analize.



Slika 6. Centrifuga sa hlađenjem ili grejanjem
Naučni institut za veterinarstvo u Novom Sadu, Odeljenje za reprodukciju

Hemijska analiza sadržaja proteina u uzorcima spermalne plazme, izvršena je u Laboratoriji za kontrolu kvaliteta hrane za životinje i animalnih proizvoda, Departman za stočarstvo, Poljoprivredni fakultet u Novom Sadu. Sadržaj proteina u spermalnoj plazmi je utvrđen hemijskom metodom AOAC (Official Method 2001.11). Dobijene vrednosti su iskazane u procentima sadržaja ukupnih protein u spermalnoj plazmi.

4.2.2. DRUGI EKSPERIMENT

Dobijanje uzoraka nativnih ejakulata, postupak sa uzorcima po prispeću u laboratoriju, kao i metode određivanja parametara kvaliteta nativne sperme, urađeni su kako je opisano na početku ovog podpoglavlja (4.2.1.).

Priprema uzoraka razređene sperme je izvršena u laboratoriji za Reprodukciju životinja, Poljoprivrednog fakulteta u Novom Sadu, posle kontrole kvaliteta uzoraka nativne sperme, koji su dopremljeni sa ispitivanih farmi.

Uzorci razređene sperme od svakog ejakulata, pripremljeni su tako što je, u dve sterilne staklene epruvete, zapremine 20 ml, usuto 10 puta manji volumen (ml) nativne sperme, od punog volumena ejakulata od koga se pravi uzorak. Na primer, ako je volumen ejakulata bio 200 ml, u svaku epruvetu je usuto po 2 ml nativne sperme tog ejakulata. Zatim je, u jednu epruvetu usuto dva puta veći volumen razređivača (4 ml), a u drugu epruvetu je usuto 4 puta veći volume (8 ml) razređivača. Tako je, prvi uzorak razređen u odnosu 1:2, a drugi uzorak u odnosu 1:4. Zatim je svaki od ovih uzoraka podeljen u tri epruvete, u jednakoj zapremini. Svaki od njih je služio za kontrolu posle čuvanja 24h, 48h ili 72h u razređenom stanju. Korišten je razređivač BTS-1, za kratkotrajno *in vitro* čuvanje razređene sperme nerasta (Minitüb, Tifenbach, Germany). Fabrički razređivač, u praškastom obliku, rastvoren je u 1 litru redestilovane vode i držan u vodenom kupatilu, na +35°C, minimalno 60 minuta pre upotrebe.

Ovako pripremljeni uzorci razređene sperme, odmah su stavljeni u termo-box (Minitüb, Tifenbach, Germany), u kome su čuvani 72 sata, na konstantnoj temperaturi od +17°C. Svaka epruveta sa uzorkom je promešana svakih oko 12h.

Kontrola progresivne pokretljivosti (%), vršena je neposredno pre razređivanja, 24h, 48h i 72h po razređenju. Svaki uzorak razređene sperme je, neposredno pre kontrole, reaktiviran u dva koraka: prvo je izvršena redisperzija spermatozoida, blagim ručnim mućkanjem uzorka, a zatim je takav uzorak zagrejan u vodenom kupatilu na +35°C, tokm 30 minuta. Ocena progresivne pokretljivosti je izvršena vizuelnom metodom, na istovetan način kako je već opisano u prvom eksperimentu (podpoglavlje 4.2.1.).

Dobri uzorci razređene sperme. Za dobre uzorke, smatrani su oni, koji su, posle određenog perioda čuvanja u razređenju 1:2 ili 1:4, zadržali $\geq 65\%$ progresivne pokretljivosti. Smatra se, naime, da je ovo minimalna vrednost progresivne pokretljivosti razređene sperme, koja se može koristiti za veštačko osemenjavanje svinja (Stančić, 2005; López Rodríguez, 2012).

Uticaj godišnje sezone na progresivnu pokretljivost razređene sperme. Uzorci sperme razređene 1:2 i 1:4, načinjeni su od istih nativnih ejakulata, nerastova korištenih za ispitivanje uticaja godišnje sezone na parametre nativnih ejakulata, u eksperimentu 1 (4.2.1). Ukupan broj ispitanih uzoraka razređene sperme, po mesecima i za celu godinu, prikazan je u tabeli 16.

Tabela 16. Broj ispitanih uzoraka razređene sperme po mesecima, u hladnoj i toploj sezoni godine

Hladna sezona			Topla sezona		
Mesec	Stepen razređenja		Mesec	Stepen razređenja	
	1:2	1:4		1:2	1:4
Novembar	35	35	Maj	20	20
Decembar	21	21	Jun	22	22
Januar	19	19	Jul	20	20
Februar	21	21	Avgust	20	20
Mart	26	26	Septembar	20	20
April	18	18	Oktobar	28	28
Ukupno	140	140	Ukupno	130	130
Ukupno za celu godinu: $(140+140) + (130+130) = 540$ uzoraka razr. sperme					

Uticaj rase nerastova na progresivnu pokretljivost razređene sperme. Uzorci razređene sperme su načinjeni od ejakulata po 5 nerastova rase Švedski Landras, Veliki Jorkšir i Durok. Od svakog nerasta je uzeto po 4 ejakulata (1 ejakulat nedeljno), u mesecima: April, Avgust i Oktobar. Tako je, od jedne rase, dobijeno ukupno 60 ejakulata, od kojih je napravljeno i ispitano 60 uzoraka sperme razređene u odnosu 1:2 i 60 uzoraka sperme razređene u odnosu 1:4 (ukupno 120 uzoraka).

Za sve tri rase, ispitano je 180 uzoraka sperme razređene u odnosu 1:2 i 180 uzoraka sperme razređene u odnosu 1:4 (ukupno za sve tri rase, ispitano je 360 uzoraka razređene sperme). Broj uzetih ejakulata i napravljenih uzoraka razređene sperme, po mesecima i ukupno za nerastove tri ispitivane rase, prikazani su u tabeli 17.

Tabela 17. Broj ispitanih uzoraka razređene sperme po rasama nerastova,

Mesec ispitivanja	Broj uzoraka	Stepen razređenja	Rase nerastova			Ukupno (n=15)
			Švedski Landras (n=5)	Veliki Jorkšir (n=5)	Durok (n=5)	
April	Nativnih ejakulata		4×5=20	4×5=20	4×5=20	4×15=60
	Razređene sperme	1 : 2	20	20	20	60
		1 : 4	20	20	20	60
		ukupno	40	40	40	120
Avgust	Nativnih ejakulata		4×5=20	4×5=20	4×5=20	4×15=60
	Razređene sperme	1 : 2	20	20	20	60
		1 : 4	20	20	20	60
		ukupno	40	40	40	120
Oktobar	Nativnih ejakulata		4×5=20	4×5=20	4×5=20	4×15=60
	Razređene sperme	1 : 2	20	20	20	60
		1 : 4	20	20	20	60
		ukupno	40	40	40	120
Ukupno	Nativnih ejakulata		60	60	60	3×60=180
	Razređene sperme	1 : 2	60	60	60	3×60=180
		1 : 4	60	60	60	3×60=180
		ukupno	120	120	120	3×120= 360

Utjecaj sadržaja proteina u nativnoj spermi na progresivnu pokretljivost razređene sperme. Za pripremanje uzoraka razređene sperme, korišteno je 4 nerasta sa visokim i 4 nerasta sa niskim sadržajem proteina u semenoj plazmi (n=12). Kod prva tri ejakulata, uzetih od svakog nerasta, utvrđen je sadržaj proteina u spermalnoj plazmi. Od svakog nerasta je ispitano po 8 ejakulata, a od svakog ejakulata je napravljeno po 3 uzorka razređene sperme za ispitivanje.

Ukupan broj ispitanih uzoraka sperme iznosio je 192 (po 96 uzoraka od nerastova sa visokim i po 96 uzoraka od nerastova sa niskim sadržajem proteina u spermalnoj plazmi. Svi nerastovi su poticali sa iste farme, a bili su rase Veliki Jorkšir (n=4), Švedski Landras (n=2) i Durok (n=2). Od svakog uzorka native sperme, načinjeno je po tri uzorka sperme razređene u odnosu 1:2 i po tri uzorka sperme razređene u odnosu 1:4. (Tabela 18).

Tabela 18. Broj ispitivanih uzoraka native i razređene sperme nerastova sa visokim i niskim sadržajem proteina u spermalnoj plazmi

		Sadržaj proteina u spermalnoj plazmi	
		Visok	Nizak
Prosečan sadržaj proteina u semenoj plazmi (%)		4.08 (3.70 do 4.31)	2.19 (1.52 do 2.60)
Broj ispitanih nerastova		4	4
Broj ispitanih ejakulata po nerastu		8	8
Broj ispitanih uzoraka po ejakulatu		3	3
Ukupno uzoraka native sperme		96	96
		192	
Ukupno uzoraka razređene sperme (n)	1:2	96×3=288	96×3=288
	1:4	96×3=288	96×3=288
	Ukupno	2×288=576	2×288=576
U k u p n o		2 × 576 = 1,152	

Uticaoj sadržaja proteina u spermalnoj plazmi i dužine čuvanja razređene sperme, na status akrozoma, hromozoma i ćelijske membrane spermatozoida, ispitano je metodom protočne citometrije.

Priprema uzoraka sperme na farmi. Na jednoj farmi, u okolini Novog Sada (udaljena oko 15 km od laboratorije Naučnog instituta za veterinarstvo u Novom Sadu, gde je vršeno ispitivanje sperme), izabrano je 4 nerasta sa niskim (prosečno 4.1%, variranje 3.5% do 4.7%) i 4 nerasta (2 rase Jorkšir i 2 rase Landras) sa visokim sadržajem proteina u spermalnoj plazmi (prosečno 2.2%, variranje 1.5% do 2.6%). Sadržaj proteina se značajno ($P < 0.01$) razlikovala između grupe nerastova sa visokim i niskim sadržajem proteina. Neposredno posle uzimanja sperme, na farmi su određeni osnovni parametri svakog ejakulata, čije se vrednosti nisu značajno ($P > 0.05$) razlikovale između ejakulata sa visokim (V) i niskim (N) sadržajem proteina u spermalnoj plazmi i iznosile su: volumen ejakulata = 249 ml (V) i 234 ml (N), koncentracija = 277×10^6 /ml (V) i 269×10^6 /ml (N), ukupan broj = 68×10^9 (V) i 62×10^9 (N), progresivna pokreljivost spermatozoida = 81% (V) i 76% (N). Tako je postignuta vrlo slična proporcija broja spermatozoida i količine proteina u jedinici volumena spermalne plazme svakog uzorka. Ovo je važno za dobijanje tačnih rezultata uticaja sadržaja proteina u spermalnoj plazmi na ispitivane parametre fertilizacionog potencijala spermatozoida.

Od svakog ejakulata su napravljena dva uzorka. Jedan uzorak je bio nativna (nerazređena) sperma, dok je drugi uzorak bio sperma razređena u odnosu 1:4, upotrebom razređivača BTS (Minitüb, Germany) za kratkotrajno čuvanje tečne razređene sperme nerasta. Po 10ml od svakog uzorka, odliveno je u sterilnu plastičnu epruvetu sa poklopcem. Uzorci su stavljeni u termo-boks na $+17^\circ\text{C}$ i, u roku od 3h do 4h po uzimanju

ejakulata od nerastova, transportovani su do laboratorije za reprodukciju domaćih životinja, u Naučnom institutu za veterinarstvo, Novi Sad.

Postupak sa uzorcima u laboratoriji. Neposredno po prispeću u laboratoriju, uzorci su reaktivirani na +35°C, tokom 30 minuta u vodenom kupatilu. U svakom uzorku nativne sperme, primenom metode CASA, određeni su: koncentracija, ukupan broj i progresivna pokretljivost spermatozoida.

Primenom metode protočne citometrije, u svakom uzorku sperme razređene u odnosu 1:4, određen je procent spermatozoida sa oštećenim akrozomom, ćelijskom membranom ili hromozomima, neposredno posle razređenja (0h čuvanja) i nakon 72h čuvanja na +17°C.

4.2.3. TREĆI EKSPERIMENT

Dobijanje uzoraka nativnih ejakulata, postupak sa uzorcima po prispeću u laboratoriju, kao i metode određivanja parametara kvaliteta nativne sperme, urađeni su kako je opisano na početku ovog podpoglavlja (4.2.1.).

Izvršeno je mešanje spermatozoida iz uzoraka ejakulata nerastova sa niskim sadržajem proteina u spermalnoj plazmi, sa spermalnom plazmom iz ejakulata nerastova sa visokim sadržajem proteina u spermalnoj plazmi i obrnuto. Ukupno je ispitano po 8 ejakulata od 4 nerasta (ukupno 32) sa visokim i po 8 ejakulata od 4 nerasta (ukupno 32) sa niskim sadržajem proteina u spermalnoj plazmi. Od svakog uzorka nativne sperme, napravljena su po dva uzorka, po jedan sa autolognom i po jedan sa homolognom spermalnom plazmom.

Postupak pripreme homologne spermalne plazme:

1. U dve plastične epruvete sa poklopcem, zapremine 50ml, stavljeno je po 45ml svežeg ejakulata, od nerasta sa visokim ili niskim sadržajem proteina u spermalnoj plazmi.
2. Ovi uzorci ejakulata su centrifugirani i recentrifugirani, na isti način kako je opisano u prvom eksperimentu (podpoglavlje 4.2.1.).
3. Ukupno dobijena količina spermalne plazme od 4 nerasta sa visokim i od 4 nerasta sa niskim sadržajem protein, je pomešana. Tako je prikupljeno oko 400 ml spermalne plazme sa visokim i oko 400 ml spermalne plazme sa niskim sadržajem proteina. Ova količina je podeljena u plastične epruvete sa kapom, po 15ml u svakoj. Ovako dobijene doze spermalne plazme su čuvane u zamrzivču na - 20°C do upotrebe.
4. Oko 24h pre upotrebe, potreban broj doza sa niskim ili visokim sadržajem proteina, postepeno je odmrznut i zagrejan u vodenom kupatilu na +35°. Ove doze su služile kao homologna spermalna plazma, za mešanje sa spermatozoidima iz ejakulata sa visokim ili niskim sadržajem proteina.

Postupak pripreme uzoraka razređene mešane sperme:

1. U dve epruvete za centrifugiranje, odmereno je op 10ml nativnog ejakulata od svakog nerasta.
2. Izvršeno je centrifugiranje i recentrifugiranja ovih uzoraka, kako je već opisano.
3. *Formiranje autolognih uzoraka razređene sperme.* Blagim ručnim mešanjem, izvršena je redisperzija spermatozoida u sopstvenoj (autolognoj) spermalnoj plazmi.
4. *Formiranje homolognih uzoraka razređene sperme.* Izdvojena spermalna plazma je odlivena iz uzorka posle recentrifugiranja. Zatim je, u epruvetu sa sedimentiranim spermatozoidima, dodata homologna spermalna plazma. I to tako što je, u spermatozoide iz ejakulata sa visokim sadržajem proteina dodata homologna spermalna plazma sa niskim sadržajem proteina i obrnuto.
5. Od ovako dobijenog uzorka pomešanih spermatozoida i spermalne plazme, pripremljen je uzorak sperme razređene u odnosu 1:4, kako je opisano u drugom eksperimentu (podpoglavlje 4.2.2.).

Čuvanje uzoraka razređene sperme. Neposredno posle razređivanja, uzorci razređene mešane sperme su stavljeni u termo-boks, gde su čuvani tokom 72h, na temperaturi +17°C. Svakih 24h, uzorci razređene sperme su blago promešani, kako bi spermatozoidi stalno bili ravnomerno raspršeni u spermalnoj plazmi.

Kontrola progresivne pokretljivosti je vršena vizuelnom mikroskopskom metodom, 72h posle razređivanja, na već opisan način.

Broj ispitanih uzoraka mešane razređene sperme, prikazan je u tabeli 19.

Tabela 19. Broj ispitanih uzoraka mešane razređene sperme

Nivo proteina u ejakulatu iz koga potiču spermatozoidi ili spermalna plazma		Broj uzoraka
Spermatozoidi	Spermalna plazma	
Visok ¹	Visok ¹	32
Nizak ¹	Nizak ¹	32
Visok ²	Nizak ²	32
Nizak ²	Visok ²	32
Ukupno uzoraka mešane razređene sperme		128
Sadržaj proteina u semenoj plazmi ispitivanih nerastova		
		Nivo proteina
		visok nizak
Broj ispitanih nerastova	4	4
Broj ispitanih ejakulata	8	8
Prosečan sadržaj proteina u spermalnoj plazmi (%)	4.03 (3.44 - 4.43)	1.97 (1.32 - 2.60)

¹Autologna i ²Homologna razređena sperma.

4.2.4. ČETVRTI EKSPERIMENT

Ovaj eksperiment je izveden u dva odvojena dela, na farmama intenzivne proizvodnje svinja u AP Vojvodini.

Za eksperiment u prvom i drugom delu, korištene su krmače drugog do šestog pariteta prašenja, koje su manifestovale znake estrusa 5. ili 6. dana posle zalučnja, odnosno laktacije, koja je prosečno trajala 28 dana.

Ogledne krmače su bile smeštene u posebnim boksevima na farmi. Ishrana, napajanje, nega i zdravstvena zaštita su bili isti kao i za ostale krmače na farmi.

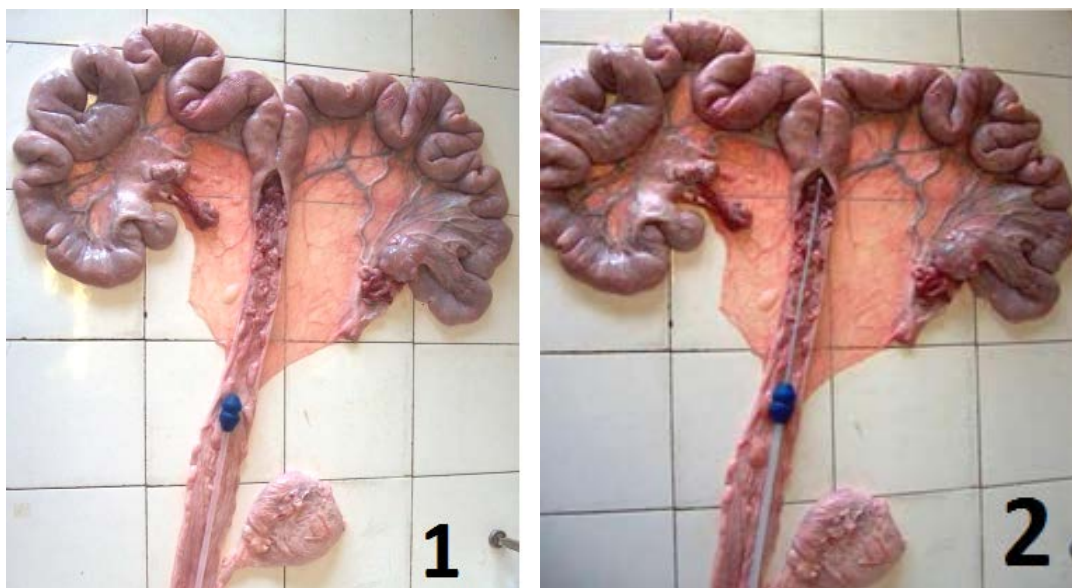
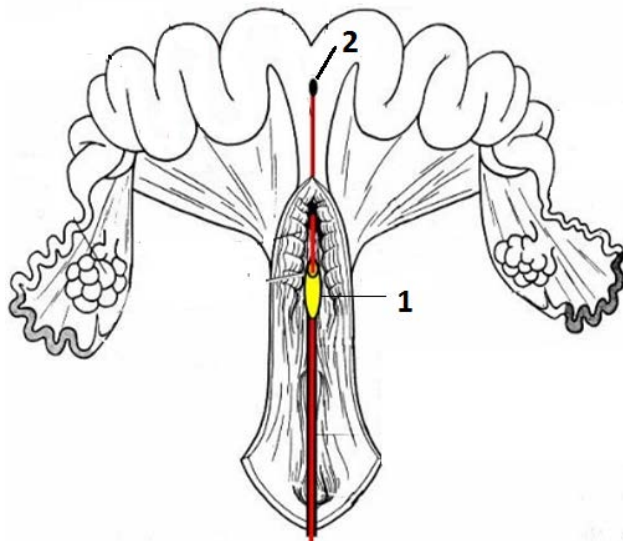
Otkrivanje estrusa i veštačko osemenjavanje. Estrus je otkrivan dva puta dnevno, direktnim kontaktom krmača sa polno zrelim nerastom probaćem, počevši od sledećeg dana posle zalučnja legla. Sve ogledne krmače su dvokratno veštački osemenjene (VO). Prvo VO je izvršeno nekoliko sati posle otkrivanja estrusa (refleksa stajanja), a drugo oko 24 sata posle prvog.

Sperma je uzimana od nerastova proverenog fertiliteta. Za osemenjavanje su korišteni ejakulati volumena 250ml do 300ml, sa 40×10^9 do 50×10^9 progresivno pokretnih spermatozoida (parametri prosečnih ejakulata nerastova na vojvođanskim farmama).

Progresivna pokretljivost je određena svetlosnim mikroskopom, pod srednjim uveličanjem, a brojanje spermatozoida, stepen razređenja nativnog ejakulata i broj inseminacionih doza su određeni fotometrom SDM5 (*Minitüb, Tifenbach, Germany*).

Razređivanje native sperme je vršeno razređivačem BTS1, za kratkotrajno čuvanje razređene sperme nerasta (*Minitüb, Tifenbach, Germany*). Fabrička doza praškastog razređivača je razređena u jednom litru redestilovane vode, oko jedan sat pre upotrebe za razređivanje sperme. Za to vreme, pripremljen razređivač je čuvan u vodenom kupatilu na $+37^{\circ}\text{C}$.

Inseminacione doze su bile čuvane u termo-boksu (*Minitüb, Tifenbach, Germany*) na temperaturi $+17^{\circ}\text{C}$, ne duže od nekoliko sati od momenta formiranja, do momenta osemenjavanja.



Slika 7. Mesta depozicije inseminacione doze: 1- Intracervikalno (klasično VO),
2 - Postcervikalno (plitko intrauterino). *Originalne fotografije.*



Slika 8. Foamtipe safe blue kateter za klasično intracervikalno osemenjavanje (*gore*) i Foamtipe safe blue "Verona" za postcervikalno osemenjavanje (*dole*)
Originalne fotografije

Intracervikalna inseminacija je izvedena sterilnim kateterima Foamtipe safe blue, za jednokratnu upotrebu (*Minitüb, Tifenbach, Germany*), dok je postcervikalna (plitka intrauterina) inseminacija izvedena specijalnim sterilnim kateterima Foamtipe „Verona“, takođe za jednokratnu upotrebu (*Minitüb, Tifenbach, Germany*) (slika 8).

Prvi deo. Izvršeno je ispitivanje uticaja volumena inseminacione doze i broja spermatozoida u dozi, na fertilitet (vrednost, % prašenja i veličina legla) krmača osemenjenih konvencionalnom intracervikalnom ili novom postcervikalnom (plitkom intrauterinom) metodom.

Tabela 20. Plan prvog dela israživanja u četvrtom eksperimentu

Parametri inseminacione doze		Broj krmača u grupi		
Volumen	Prog. pokr. sptz. po dozi (n)	Intracervikalna inseminacija	Postcervikalna inseminacija	Ukupno
50 ml	2×10^9	30	30	60
	4×10^9	30	30	60
100 ml	2×10^9	30	30	60
	4×10^9	30	30	60
U k u p n o		120	120	240

U ovom delu eksperimenta, korištene su konvencionalne inseminacione doze sveže razređene sperme, volumena 100ml, sa oko 4×10^9 progresivno pokretnih spermatozoida ili doze duplo redukovano volumena i broja spermatozoida (50ml sa 2×10^9 spermatozoida), kako za intracervikalno, tako i za postcervikalno osemenjavanje.

Drugi deo ispitivanja je imao za cilj da se ustanovi da li aplikacija doze native spermalne plazme, neposredno pre aplikacije inseminacionih doza (tzv. *dvofazna inseminacija*), može povećati parametre fertiliteta (% prašenja i veličina legla) krmača osemenjenih konvencionalnom intracervikalnom metodom.

Izvedena je konvencionalna intracervikalna inseminacija VO dozama zapremine 80ml razređene sperme, sa oko 4×10^9 progresivno pokretnih spermatozoida. Pri tome je po jedna grupa krmača (kontrolna) osemenjena samo VO dozama, dok je druga (ogledna) grupa osemenjena tzv. dvofaznom metodom. Naime, neposredno pre aplikacije inseminacione doze, kroz postavljen intracervikalni kateter za klasično VO, svakoj krmači je izvršena transcervikalna intrauterina aplikacija 30ml native spermalne plazme.

U ogledu su korištene krmače 2. do 6. pariteta prašenja, koje su estrus manifestovale unutar prvih 7 dana posle zalučenja legla, odnosno posle laktacije koja je, prosečno, trajala 30 dana. Ogled je izveden na 3 vojvođanske farme intenzivne proizvodnje svinja. Broj osemenjenih oglednih i kontrolnih krmača, prikazan je u tabeli 21.

Tabela 21. Plan drugog dela istraživanja u četvrtom eksperimentu

Grupa	Volumen VO doze/broj spermatozoida u dozi	Osemenjeno krmača		Prosečan paritet prašenja	Prosečan interval zalučenje estrus (dani)
		Farma	(n)		
Kontrolna	80 ml / 4×10^9	A	31	4.2	4.3
		B	40	3.0	5.0
		C	43	3.6	4.3
		Ukupno	114	3.6	4.6
Ogledna	30 ml spermalne plazme* + 80 ml/ 4×10^9	A	31	4.5	4.7
		B	40	3.3	4.7
		C	43	3.5	4.6
		Ukupno	114	3.7	4.7
U k u p n o			228	3.6	4.7

*Spermalna plazma je aplikovana neposredno pre aplikacije inseminacione doze.

Pripremanje spermalne plazme. Na farmi je odabrano 4 nerasta, u čijim ejakulatima, odnosno spermalnoj plazmi, je ustanovljen visok sadržaj proteina (oko 4%). Izvršena je uobičajena kontrola kvaliteta ejakulata. Zatim je celokupan ejakulat centrifugiran na 3000 o/min, tokom 15 minuta, radi odvajanja spermalne plazme. Ova spermalna plazma je,

pažljivo, odvojena i razlivena u posebne sterilne polietilenske flašice (po 30ml u svakoj) i čuvana u frižideru na +4°C, do upotrebe. Ovako pripremljene doze spermalne plazme, upotrebljene su maksimalno 48h od momenta pripreme.

Oko 14 dana posle osemenjavanja, ogledne krmače su testirane na pojavu estrusa (povađanje). U ogledu su ostajale samo krmače koje su uspešno koncipirale i oprasile se iz osemenjavanja u prvom postlaktacijskom estrusu.

Evidentiran je broj oprasenih od broja osemenjenih krmača u svakoj tretmanskoj grupi (vrednost prašenja), kao i broj živo, mrtvo i ukupno oprasene prasadi u svakom leglu.

4.3. STATISTIČKA ANALIZA

Za prvi, drugi i treći eksperiment: Ocena fenotipskih parametara dobijenih rezultata istraživanja, urađena je u programu „Statistika 12“ (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA). Određene su srednje vrednosti, standardna devijacija, minimalne i maksimalne vrednosti ispitivanih osobina.

Za testiranje značajnosti razlika između aritmetičkih sredina ispitivanih osobina korišćen je T-test.

Za četvrti eksperiment: Vrednost (%) prašenja, iskazana kao broj oprasenih od broja osemenjenih krmača, analizirana je kao efekt volumena doze i broja spermatozoida u dozi, kao i infuzije spermalne plazme kod klasične veštačke inseminacije, primenom Fischer-ovog egzaktnog testa.

Ocena efekta volumena doze, broja spermatozoida u dozi i metoda inseminacije, kao i infuzije spermalne plazme kod klasične veštačke inseminacije, na prosečan broj živo, mrtvo i ukupno rođene prasadi po leglu, izvršena je analizom varijanse, primenom programa „Statistika 12“.

5. REZULTATI ISTRAŽIVANJA

Rezultati celokupnih istraživanja su prikazani u dva osnovna dela. U prvom delu su prikazani osnovni parametri reproduktivne performanse nerastova i krmača, na nekoliko većih industrijskih farmi svinja u AP Vojvodini. U drugom delu su prikazani rezultati eksperimenatlnih istraživanja, koja su podeljena u četiri odvojena eksperimenta.

5.1. REPRODUKTIVNA EKSPLOATACIJA

Osnovni parametri repoduktivne eksploatacije nerastova, koji se koriste za veštačko osemenjavanje (VO), na tri velike vojvođanske farme svinja, prikazani su u tabelama 22, 23, 24 i 25.

Na farmi A je, tokom 2013. godine, bilo ukupno 10 nerastova, od kojih je sperma uzimana kontinuirano, prosečno svakih 7 dana. Prosečan volumen ejakulata je iznosio 277 ml (od 120 ml do 420 ml), sa prosečnom progresivnom pokretljivošću 77%. Od svakog ejakulata je formirano prosečno oko 12 inseminacionih (VO) doza, tako da je, po nerastu godišnje, dobijeno prosečno 559 VO doza (između 446 i 672 VO doze). Prosečan stepen razređenja ejakulata je iznosio 1:3.3, sa variranjem od 1:2 do 1:7 (Tabela 22).

Na farmi B, tokom 2014. godine, sperma je kontinuirano uzimana, prosečno svakih 7 dana, od ukupno 9 nerastova. Volumen ejakulata je prosečno iznosio 280 ml (od 200 ml do 450 ml), a prosečna progresivna pokretljivost je bila 80% (od 65% do 95%). Po ejakulatu je prosečno formirano nešto više od 9 VO doza, (od 6 do 18 VO doza), što iznosi prosečno 483 VO doze po nerastu godišnje (između 447 i 520 VO doza). Prosečan stepen razređenja ejakulata je iznosio 1:2, sa variranjem od 1:1.5 do 1:4 (Tabela 23).

Na farmi C, tokom 2014. godine, interval između uzimanja pojedinih ejakulata, od 9 nerastova, iznosio je prosečno 7.8 dana, a od svakog nerasta je, za godinu dana, dobijeno

52 ejakulatu. Prosečan volumen ejakulata je bio nešto veći od onog na prethodne dve farme i iznosio je 306 ml, ali je i dijapazon variranja pojedinih volumena bio najveći (od 116 ml do 629 ml). Prosečna progresivna pokretljivost je bila niža u poređenju sa prethodne dve farme i iznosila je 74% (od 60% do 90%). Po ejakulatu je prosečno formirano 15 VO doza, sa vrlo širokim variranjem od 4 do 32 VO doze. Tako je, po nerastu godišnje, dobijeno prosečno 791 VO doze, (između 712 i 1019 VO doza). Prosečan stepen razređenja ejakulata je iznosio 1:4, sa variranjem od 1:1 do 1:9 (Tabela 24).

Tabela 22. Parametri reproduktivne eksploatacije nerastova na farmi A

Tet. broj nerasta	Ejak. po nerastu god. (n)	Frekv. uzim. ejak. (dani)	Vol. ejak. (ml)	Prog. pokret. (%)	Broj VO doza		Stepen razređ. ejak.
					po ejakulatu	po nerastu godišnje	
2750	48	7 (5-14)	162 (125-280)	78 (65-90)	9 (6-14)	446	1:4 (1:3-1:5)
2749	48	7.5 (5-14)	268 (209-321)	73 (65-85)	14 (9-19)	672	1:4 (1:3-1:5)
52225	48	7 (5-14)	278 (200-350)	81 (70-90)	14 (11-20)	672	1:4 (1:3-1:5)
2653	51	5 (2-17)	270 (120-380)	80 (65-90)	12 (7-18)	612	1:4 (1:2-1:7)
2971	48	7 (5-13)	299 (200-360)	81 (65-90)	12 (6-16)	576	1:3.5 (1:2-1:6)
2991	49	5 (1-16)	269 (170-360)	76 (65-80)	10 (4-16)	490	1:3.25 (1:2-1:6)
1501	44	6 (1-28)	295 (250-400)	76 (65-80)	13 (8-18)	554	1:3 (1:1.5-1:4)
2766	43	8 (5-22)	273 (200-370)	80 (65-90)	12 (8-16)	516	1:3 (1:2-1:5)
4313	49	5 (1-16)	285 (170-420)	77 (65-90)	12 (8-16)	588	1:3 (1:2-1:4.5)
81426	47	5 (1-16)	278 (190-350)	76 (65-90)	11 (6-16)	517	1:3 (1:2-1:5)
Prosek	47	7 (1-28)	277 (120-420)	77 (65-90)	12 (4-20)	559	1:3.5 (1:2-1:7)

Izvor: Reproductivna evidencija farme A (2013. godina).

Tabela 23. Parametri reproduktivne eksploatacije nerastova na farmi B

Tet. broj	Ejak. po nerastu god. (n)	Frekv. uzim. ejak. (dani)	Vol. ejakul. (ml)	Prog. pokret. (%)	Broj VO doza		Stepen razređenja ejakulata
					po ejakulatu	po nerastu godišnje	
5124	52	7 (3-12)	283 (200-350)	80 (75-85)	8 (6-12)	447	1:2 (1:1.5-1:2)
9231	52	7 (1-12)	263 (200-380)	83 (75-95)	9 (8-11)	468	1:2 (1:1.6-1:4)
5108	52	7 (3-15)	274 (200-320)	85 (75-95)	9 (8-12)	468	1:2 (1:1.5-1:4)
1494	52	7 (3-14)	284 (200-380)	84 (65-90)	9 (7-12)	468	1:2 (1:2-1:4)
4656	52	7 (3-9)	276 (200-380)	78 (65-95)	9 (6-15)	494	1:2.5 (1:2-1:4)
4716	52	7 (4-10)	269 (200-360)	77 (65-85)	10 (8-18)	520	1:2 (1:2-1:4)
5797	52	7 (4-10)	291 (200-400)	79 (65-95)	10 (8-18)	520	1:2 (1:2-1:4)
5322	52	7 (4-10)	289 (200-380)	80 (65-95)	9.6 (8-11)	499	1:2 (1:2-1:4)
5220	52	7 (4-15)	292 (200-400)	79 (65-90)	10 (6-16)	468	1:2 (1:2-1:4)
Prosek	52	7 (1-15)	280 (200-450)	80 (65-95)	9.4 (6-18)	483	1:2 (1:1.5-1:4)

Izvor: Reproductivna evidencija farme B (2014.god.).

Tabela 24. Parametri reproduktivne eksploatacije nerastova na farmi C

Tet. broj	Ejak. po nerastu god. (n)	Frekv. uzim. ejak. (dani)	Vol. ejakul. (ml)	Progr. pokret. (%)	Broj VO doza		Stepen razređenja ejakulata
					po ejakulatu	po nerastu godišnje	
75193	52	7.5 (1-4)	304 (161-471)	71 (65-85)	14 (8-24)	723	1:3.4 (1:1.3-1:6)
27717	52	8 (2-16)	269 (142-399)	73 (65-85)	14 (4-26)	712	1:3.8 (1:1-1:7.5)
1196	52	7 (1-20)	277 (137-471)	75 (70-85)	14 (6-32)	723	1:3.8 (1:1.7-1:8)
17128	52	8 (2-16)	312 (139-526)	76 (65-90)	14 (6-26)	749	1:3.6 (1:2.3-1:5)
16425	52	7 (1-16)	312 (117-496)	72 (65-85)	14 (6-28)	749	1:3.5 (1:2-1:7)
17284	52	9 (3-15)	295 (122-442)	74 (65-85)	15 (8-30)	785	1:4.2 (1:3-1:6.5)
26559	52	9 (3-17)	273 (116-477)	76 (65-85)	15 (8-28)	806	1:4.7 (1:2.5-1:9)
14203	52	7 (2-13)	348 (126-629)	72 (60-85)	16 (6-32)	853	1:3.8 (1:2-1:8.5)
103	52	8 (1-14)	363 (186-570)	73 (60-85)	19 (8-30)	1019	1:4.4 (1:2.5-1:8.5)
Prosek	52	8 (1-20)	306 (116-629)	74 (60-90)	15 (4-32)	791	1:4 (1:1-1:9)

Izvor: Reproductivna evidencija farme C (2014.god.).

U tabeli 25 su prikazani sumarne vrednosti parametara efikasnosti reproduktivne efikasnosti nerastova na tri ispitivane farme. Ukupno je ispitano 28 nerastova, od kojih je sperma uzimana kontinuirano, prosečno jednom nedeljno (tj. prosečno svakih 7.2 dana). Tako je dobijeno prosečno 50.3 ejakulata po nerastu godišnje. Prosečan volumen ejakulata je iznosio 287 ml (sa variranjem do 116 ml do 629 ml). Prosečna progresivna

pokretljivost je iznosila je 77%, a kretala se između 60% i 90%. Po ejakulatu je prosečno formirano 12 VO doza, sa variranjem od 4 do 32 VO doze. Prosečno je, po nerastu godišnje, dobijeno 611 VO doze, sa variranjem između 416 i 1019 VO doza. Prosečan stepen razređenja ejakulata je iznosio 1:3.5, sa variranjem od 1:1 do 1:9.

Tabela 25. Parametri reproduktivne eksploatacije nerastova za sve tri ispitivane farme

Parametri		F a r m a ¹			Ukupno (A+B+C)
		A	B	C	
Broj nerastova		10	9	9	28
Ejakulata/nerast/godišnje (n)		47	52	52	50.3
Ukupno ispitano ejakulata (n)		475	468	468	1411
Frekvencija uzimanja ejakulata (dani)		6.7 (1-28)	7 (1-15)	7.8 (1-20)	7.2 (1-28)
Volumen ejakulata (ml)		277 (120-420)	280 (200-450)	306 (116-629)	287 (116-629)
Progresivna pokretljivost (%)		77 (65-90)	80 (65-95)	74 (60-90)	77 (60-95)
Broj VO doza	po ejakulatu	11.9 (4-20)	9.4 (6-18)	15 (4-32)	12.1 (4-32)
	po nerastu godišnje	559	483	791	611 (416-1019)
Stepen razređenja ejakulata		1:3.5 (1:2-1:7)	1:2 (1:1.5-1:4)	1:4 (1:1-1:9)	1:3.5 (1:1-1:9)
Ejakulata razređenih u odnosu \geq 1:4	n	216/475	29/468	255/468	500/1411
	%	45.5	6.2	56.5	35.4

Rezultati citološkog pregleda razređene sperme u VO dozama²

Subpopulacije spermatozoida u uzorcima sperme	Prosek (%)	Min. - max.
Ukupno živih	71.4	35.6 - 91.9
Živih sa intaktnim akrozomom	58.7	17.3 - 87.7
Živih sa oštećenim akrozomom	12.7	0.2 - 53.7
Sa morfološkim anomalijama glave i/ili prednjeg dela repa	20.7	1 - 64
Sa morfološkim anomalijama srednjeg i/ili zadnjeg dela repa	11.5	0 - 68
Ukupno sa morfološkim anomalijam	32.2	2 - 85
Klasa kvaliteta VO doza	Prva	19%
	Druga	16%
	Treća	16%
	Van klase	49%
Ukupno ispitano uzoraka / nerastova (n)		111

¹Izvor: Reproductivna evidencija farme.

²Izvor: Laboratorija za reprodukciju, Naučni institut za veterinarstvo, Novi Sda (2014. i 2015. godina).

³Nije za upotrebu u VO.

Tokom 2014. i 2015. godine, izvršen je citološki pregled VO doza od ejakulata 111 nerastova, sa frami u AP Vojvodini. Broj živih i mrtvih spermatozoida, kao i integritet akrosomalne membrane, određen je CASA metodom (computer-assisted semen analysis), dok forme spermatozoida sa morfološkim anomalijama, određene metodom protočne citometrije. Na osnovu dobijenih vrednosti ovih parametara, ustanovljeno je da 49% ispitivanih doza nije za upotrebu u veštačkom osemenjavanju, jer imaju manje od 50% živih spermatozoida, više od 30% spermatozoida sa oštećenim akrozomom, više od 60% spermatozoida sa morfološkim anomalijama i manje od 65% progresivno pokretnih spermatozoida.

Rezultati zvanične kontrole produktivnosti umatičenih krmača i nerastova, koja je obuhvatila ukupno 51 umatičenu farmu, registrovanu za proizvodnju priplodnih grla u AP Vojvodini, za 2013. godinu, prikazani su u tabeli 25. Ova kontrola je obuhvatila i tri farme na kojima su vršena pojedina istraživanja u ovoj doktorskoj disertaciji. Te farme su posebno istaknute u tabeli 26.

Tabela 26. Zvanična kontrola produktivnosti umatičenih krmača i nerastova

Kontrolisane farme	Broj krmača	Broj nerastova	Broj oprasene prasadi po leglu		Broj zalučene prasadi po leglu
			Živo	Mrtvo	
“Pobeda” Pobeda, Gunaroš*	1150	18	9.59	0.40	9.70
PIK “Bečej” Bečej*	5084	58	10.67	0.55	8.76
AD IM “Neoplanta”, farma Čenej*	1935	24	11.33	0.78	10.55
Ukupno za 51 umatičenu farmu	34.001	461	10.83	0.85	9.33

Izvor: Izveštaj glavne odgajivačke organizacije za AP Vojvodinu, Poljop. fak., Novi Sad (2014. god.).

* Farme na kojima su vršena istraživanja u ovoj disertaciji.

Iz tabele 26 se vidi da je ova kontrola produktivnosti obuhvatila ukupno 34.001 krmača i 461 nerastova, evidentirani parametri produktivnosti su bili prosečan broj živo i mrtvo rođene prasadi u leglu, kao i prosečan broj zalučene prasadi po leglu. Prosečan broj živo rođene prasadi po leglu je iznosio 10.83, a mrtvo rođene 0.85 prasadi. Prosečno je, po leglu, zalučeno 9.33 prasadi.

Biloškim testom na 18 umatičenih farmi u AP Vojvodini, obuhvaćeno je ukupno 97 nerastova, koji su, u 2013. godini, ostvarili ukupno 8726 legala, sa ukupno 101530 rođene prasadi (Tabela 27).

Ovaj test je pokazao da je u legima 26 nerastova (26.8% od ukupno 97 testiranih nerastova), bilo prasadi sa različitim anomalijama. Odnosno, u 4314 legala, bilo je prasadi sa različitim anomalijama, što čini 4.25% od ukupnog broja testirane prasadi. Najveći broj rođene prasadi je bilo avitalno (66.6%), zatim laka prasad (23.2%), raskrećena (*displasio tuber coxae*) prasad (5.6%), dok je 4.6% prasadi bilo sa ostalim različitim anomalijama kod rođenja (Tabela 27).

Tabela 27. Rezultati biološkog testa nerastova, na 18 umatičenih farmi u AP Vojvodini

Broj testiranih nerastova		97	
Broj testiranih legala		8726	
Broj testirane prasadi		101530	
Prasad sa anomalijama	Laka ¹	n	1002
		%	23.23
	Avitalna	n	2872
		%	66.57
	Raskrečena	n	241
		%	5.59
	Ostalo	n	199
		%	4.61
Ukupno	n	4314	
	%	4.25	
Nerastovi u čijim je leglima bilo prasadi sa anomalijama	n		26
	%		26.80

¹ ≤ 800 grama kod prašenja.

Izvor: Izveštaj glavne odgajivačke organizacije za AP Vojvodinu, Poljop. fak., Novi Sad (2013. god.).

Osnovni parametri reproduktivne performanse, ukupno 14428 krmača, na 10 (deset) najvećih farmi intenzivne proizvodnje svinja u AP Vojvodini, prema podacima iz baze podataka Glavne odgajivačke organizacije za AP Vojvodinu, sa sedištem na Poljoprivrednom fakultetu u Novom Sadu (Departman za stočarstvo), prikazani su u tabelama 28 i 29.

Tabela 28. Reproductivna performansa krmača u 2014. godini

P a r a m e t a r		V r e d n o s t
Broj ispitivanih farmi		10*
Broj ispitivanih krmača		14428
Prosečan broj prašenja po krmači		3.6 (3.1 – 4.4)
Prosečan indeks prašenja		2.12 (1.8 – 2.3)
Vrednost prašenja (%)		78.9 (72,3 – 82.2)
Prosečan broj prasadi u leglu kod rođenja	živih	11.95 (9.59 – 14.86)
	mrtvih	0.84 (0.54 – 1.25)
	ukupno	12.79 (9.99 – 15.85)
Prosečan broj zalučene prasadi po leglu		9.74 (8.76 – 11.68)
<i>Za sve kontrolisane farme (ukupno 51 farma i 34001 krmača)</i>		
Prosečan broj prasadi u leglu kod rođenja	živih	10.83 (7.82 – 14.86)
	mrtvih	0,85 (0.33 – 3.35)
	ukupno	11.68 (8.15 – 15.85)
Prosečan broj zalučene prasadi po leglu		9.33

Izvor: Izveštaj glavne odgajivačke organizacije za AP Vojvodinu (za 2014. godinu).

*Velike farme intenzivne proizvodnje svinja u AP Vojvodini.

Svaka od ispitivanih krmača se prasila 3.6 puta (od 3.1 do 4.4), u toku perioda reproduktivnog iskorištavanja, a prosečan broj prašenja po krmači godišnje (indeks prašenje), iznosio je 2.12 (od 1.8 do 2.3). Prosečna vrednost prašenja (broj oprашenih od broja osemenjenih krmača), kretala se između 72% i 82% (prosečno 78.9%). Prosečan broj živo rođene prasadi po leglu je iznosio 11.95 (od 9.59 do 14.86), mrtvo rođene prasadi je prosečno bilo 0.84 (od 0.54 do 1.25), a ukupan broj prasadi u leglu kod rođenja se kretao između 9.99 i 15.85 (prosečno 12.79). Prosečno je, po leglu, zalučeno 9.74 prasadi (od 8.76 do 11.68). Za svih 34001 kontrolisanih krmača (51 umatičena farma) prosečan broj živo rođene prasadi je bio nešto niži i iznosio je 10.83, dok je prosečno, po leglu, zalučeno 9.33 prasadi (Tabela 28).

Tabela 29. Kontrola produktivnosti nerastovskih majki, od 2005. do 2013 godine

Godina	Broj krmača u kontroli	Živo rođeno po leglu	Zalučeno po leglu
2005	2393	11.05	9.56
2006	2474	10.74	9.33
2007	2324	10.99	9.49
2008	1492	11.41	9.60
2009	1996	11.59	9.90
2010	1251	11.75	9.91
2011	1028	11.75	9.91
2012	323	10.45	9.64
2013	326	11.22	9.63
Ukupno	13607	11.21	9.67

Izvor: Izveštaj glavne odgajivačke organizacije za AP Vojvodinu.

Kontrola produktivnosti ukupno 13607 nerastovskih majki, za period od 2005. do 2013. godine (Tabela 29), pokazuje da je prosečan broj živo rođene prasadi po leglu iznosio 11.21, a dok je, po leglu, prosečno zalučeno 9.63 prasadi.

5.2. REZULTATI EKSPERIMENTALNIH ISTRAŽIVANJA

Istraživanja su obuhvatila četiri odvojena eksperimenta. U prvom eksperimentu je ispitivan: (a) sadržaj proteina u spermalnoj plazmi nerastova i (b) uticaj godišnje sezone, rase nerasta i sadržaja proteina u spermalnoj plazmi, na osnovne parametre ejakulata nerastova. U drugom je ispitivan uticaj navedenih faktora na održavanje progresivne pokretljivosti spermatozoida u razređenoj spermi, čuvanoj *in vitro* tokom 72h. U trećem eksperimentu je ispitivan uticaj mešanja spermatozoida iz sperme sa niskim sadržajem

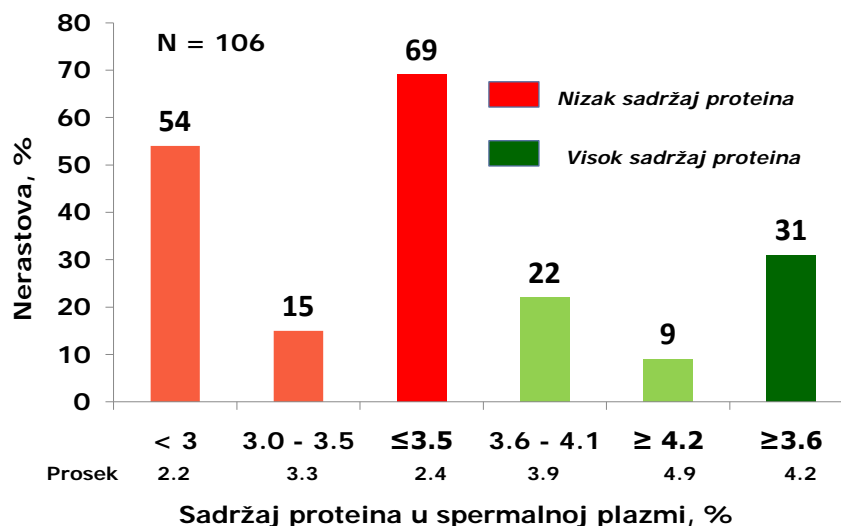
proteina, sa spermalnom plazmom visokog sadržaja proteina i obrnuto, na progresivnu pokretljivost uzoraka razređene sperme. U četvrtom eksperimentu je ispitivan uticaj intracervikalne i postcervikalne (plitke intrauterine) metode VO, klasičnim i dozama duplo redukovanog volumena i broja spermatozoida, bez i sa dodatkom semene plazme pre aplikacije doze, na fertilitet krmača.

5.2.1. PRVI EKSPERIMENT

A. Sadržaj proteina u spermalnoj plazmi

Distribucija sadržaja proteina u spermalnoj plazmi, utvrđena u 212 uzoraka sperme, načinjenih od ejakulata 106, nerastova rase Landras (n=38), Veliki Jorkšir (n=44) i Durok (n=24), sa 7 vojvođanskih farmi industrijske proizvodnje svinja, prikazana je u tabeli 30.

Nizak sadržaj proteina u spermalnoj plazmi ($\leq 3.5\%$), ustanovljen je kod 69% nerastova, a visok ($\geq 3.6\%$) kod 31% ispitivanih nerastova. Manje od 3% proteina u spermalnoj plazmi ima najveći broj (54%), a vrlo visok sadržaj proteina u spermalnoj plazmi ($\geq 4.2\%$), ustanovljen je kod, svega, 9% nerast (Grafikin 1).



Grafikon 1. Distribucija nerastova prema sadržaju proteina u spermalnoj plazmi

U grupi sa niskim sadržajem proteina, prosečna vrednost je iznosila 2.44%, a u grupi sa visokim sadržajem proteina ova vrednost je, prosečno, bila skoro duplo veća i iznosila je 4.18% proteina. Za sve ispitivane nerastove, prosečan sadržaj proteina u spermalnoj plazmi je iznosio 2.97%. Najniži prosečan sadržaj proteina u spermalnoj plazmi je iznosio 2.19% (kod 54% nerastova), dok je najveći prosečan sadržaj proteina u spermalnoj plazmi iznosio 4.87% (kod 9% nerastova) (Tabela 30).

Tabela 30. Sadržaj proteina u spermalnoj plazmi

		Nivo proteina u spermalnoj plazmi, %			
		Nizak, ≤ 3.5	Visok, ≥ 3.6	Ukupno	
Ispitano nerastova	n	73	33	106	
	%	68.87	31.13	100.0	
Prosečan sadržaj proteina ¹ , %		2.44 (1.00 - 3.54)	4.18 (3.62 - 6.50)	2.97 (1.00 - 6.50)	
Distribucija sadržaja proteina u spermalnoj plazmi (%)					
Grupa (rang), %		Prosečno		Ukupno	
				Prosečno	Nerastova (n)
< 3 (n=57)		2.19 (1.0-3.0)	-	2.44 (1.0-3.5)	73
3.0 - 3.5 (n=16)		3.35 (3.0-3.5)	-		
3.6 -4.1 (n=23)		-	3.88 (3.6-4.2)	4.18 (3.6-6.5)	33
≥ 4.2 (n=10)		-	4.87 (4.2-6.5)		
U k u p n o		2.44 (1.0-3.5)	4.18 (3.6-6.5)	2.97 (1.0-6.5)	106
Sadržaj proteina u spermalnoj plazmi pojedinih rasa ispitivanih nerastova					
Rasa nerastova	Nerastova		Sadržaj proteina (%)		
	n	%	Prosek \pm SD	min. – max.	
Landras	38	35.8	2.98 \pm 1.250 ^a	1.00 – 6.50	
Veliki Jorkšir	44	41.5	2.92 \pm 1.005 ^a	1.23 – 5.34	
Durok	24	22.7	3.01 \pm 0.869 ^a	1.35 – 4.45	
U k u p n o	106	100.0	2.97	1.00 – 6.50	
Sadržaj proteina u spermalnoj plazmi ispitivanih nerastova različite starosti					
Starost nerastova (meseći)	Nerastova		Sadržaj proteina (%)		
	n	%	Prosek \pm SD	min. – max.	
≤ 16	33	31.1	3.04 \pm 1.017 ^a	1.00 - 5.17	
17 do 20	25	23.6	3.14 \pm 1.139 ^a	1.53 - 6.5	
21 do 24	20	18.9	3.03 \pm 1.031 ^a	1.34 - 5.34	
≥ 25	28	26.4	2.74 \pm 0.984 ^a	1.23 - 5.05	
U k u p n o	106	100.0	2.97	1.00 - 6.5	

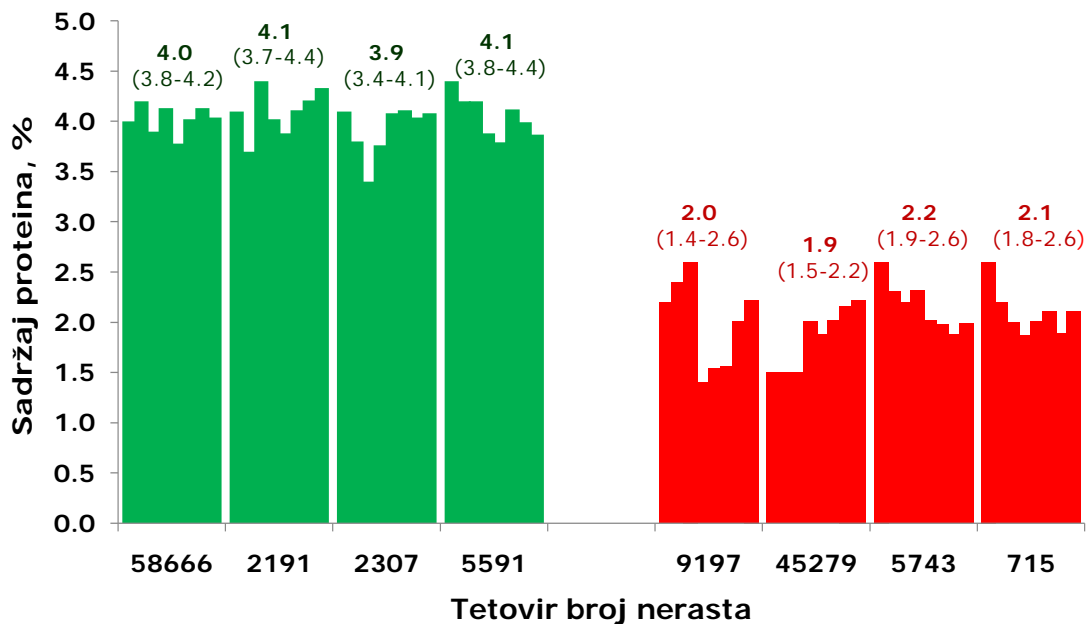
¹U zagradama su minimalne i maksimalne vrednosti.

Vrednosti sa različitim superskriptima su statistički značajno različite (^{A,B}P<0.01; ^{a,b}P<0.05).

Nisu ustanovljene statistički značajne (P>0.05) razlike u prosečom sadržaju proteina u spermalnoj plazmi, između pojedinih ispitivanih rasa nerastova. Ova vrednost je iznosila 2.98% kod rase Landras, 2.92% kod rase Veliki Jorkšir i 3.01% kod rase Durok. Prosečna vrednost sadržaja proteina u spermalnoj plazmi nije značajno (P>0.05) varirala ni u zavisnosti od starosti ispitivanih nerastova. Tako je ova vrednost iznosila 3.04% kod nerastova starih ≤ 16 meseci, 3.14% kod nerastova starih 17 do 20 meseci, 3.03% kod

nerastova starih 21 do 24 meseca, dok je najniži sadržaj proteina (2.74%) ustanovljen u spermalnoj plazmi nerastova starih ≥ 25 meseci.

Međutim, postoje velike varijacije sadržaja proteina u spermalnoj plazmi, između pojedinih nerastova. Tako se ova vrednost kretala između 1% i 6.5% (Tabela 30). Sa druge strane, sadržaj proteina u spermalnoj plazmi jednog istog nerasta ne pokazuje veliko variranje (Grafikon 2, Tabela 75 i Tabela 76 u prilogu).



Grafikon 2. Variranje sadržaja proteina u spermalnoj plazmi, kod pojedinih nerastova
(Od svakog nerasta je ispitano po 8 ejakulata; Iznad su prosečne vrednosti i variranje, u zagradama, sadržaj proteina u spermalnoj plazmi)

Najveća razlika između maksimalne i minimalne vrednosti sadržaja proteina u spermalnoj plazmi, kod jednog nerasta, iznosi 1.2% (nerast TB 9197), a minimalna razlika ovih vrednosti iznosi 0.4% (nerast TB 58666). I prosečne vrednosti sadržaja proteina su veoma ujednačene. Tako, se ove vrednosti kreću između 3.9% i 4.1%, kod nerastova sa visokim sadržajem proteina, odnosno između 1.9% i 2.2%, kod nerastova sa niskim sadržajem proteina u spermalnoj plazmi (Grafikon 2).

B. Uticaj godišnje sezone na parametre ejakulata

Parametri nativnih ejakulata, u hladnoj i toploj godišnjoj sezoni, prikazani su u tabeli 31.

Tabela 31. Parametri kvaliteta nativnih ejakulata nerastova po sezonama* ($\bar{x} \pm SD$)

Parametar	Godišnja sezona		Ukupno
	Hladna ¹	Topla ²	
Ukupno nerastova (n)	10	10	20
Ukupno ejakulata (n)	140	130	270
Ejakulata po nerastu (n)	14	13	13.5
Volumen ejakulata (ml)	274±88.93 ^A (85-650)	218±70.89 ^B (95-370)	247 (85-650)
Koncentracija spermatozoida (×10 ⁶ /ml)	229±69.81 ^A (103-483)	208±39.27 ^B (112-320)	219 (103-483)
Ukupan broj spermatozoida u ejakulatu (×10 ⁹)	60±23.76 ^A (15-135)	45±17.18 ^B (17-90)	53 (15-135)
Progresivna pokretljivost (%)	79±12.02 ^a (40-95)	69±11.11 ^b (20-90)	74 (20-95)
Broj progresivno pokretnih spermatozoida u ejakulatu (×10 ⁹) ³	47 (12-10)	30 (11-61)	39 (11-100)
Dobrih ejakulata ⁴ (%)	96±25.03 ^A (134/140)	78±20.88 ^B (102/130)	87 (236/270)

¹Izvor: Evidencije laboratorije za reprodukciju i VO, Poljoprivredni fakultet, Novi Sad.

¹Novembar-Decembar-Januar-Februar-Mart-April; ²Maj-Jun-Jul-Avgust-Septembar-Oktobar.

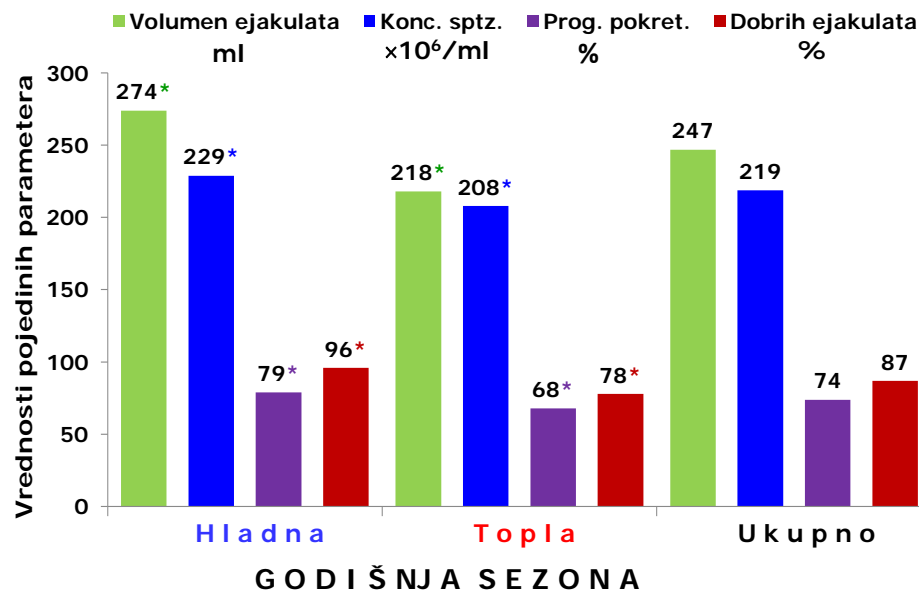
³Izračunata vrednost na osnovu ukupnog broja spermatozoida u ejakulatu i % prog. pokretljivosti.

⁴Volumen ≥120 ml; Koncentracija spermatozoida ≥200×10⁶/ml ejakulata; Prog. pokret. ≥65%.

Vrednosti sa različitim superskriptima, unutar istog reda, značajno se razlikuju (^{A,B}P<0.01; ^{a,b}P<0.05). Detaljnija statistička analiza je prikazana u prilogu (tabela 62).

Svi osnovni parametri fertilizacionog potencijala ispitivanih ejakulata, bili su visoko statistički značajno veći (P<0.01), izuzev progresivne pokretljivosti (P<0.05), tokom hladne sezone, u poređenju sa istim vrednostima ustanovljenim tokom toplije godišnje sezone. Tako je volumen ejakulata iznosio 274 ml i 218 ml, koncentracija spermatozoida je bila 229×10⁶/ml i 208×10⁶/ml, ukupan broj spermatozoida u ejakulatu je iznosio 60×10⁹ i 45×10⁹, dok je progresivna pokretljivost bila 79% i 68% u hladnoj, odnosno toploj godišnjoj sezoni.

Broj dobrih ejakulata je, takođe, bio značajno veći 96% u hladnoj od onog u toploj (78%) godišnjoj sezoni (Tabela 31 i Grafikon 3).



Grafikon 3. Poređenje parametara ejakula između tople i hladne sezone

*Vrednosti se statistički značajno razlikuju ($P < 0.01$ ili $P < 0.05$)

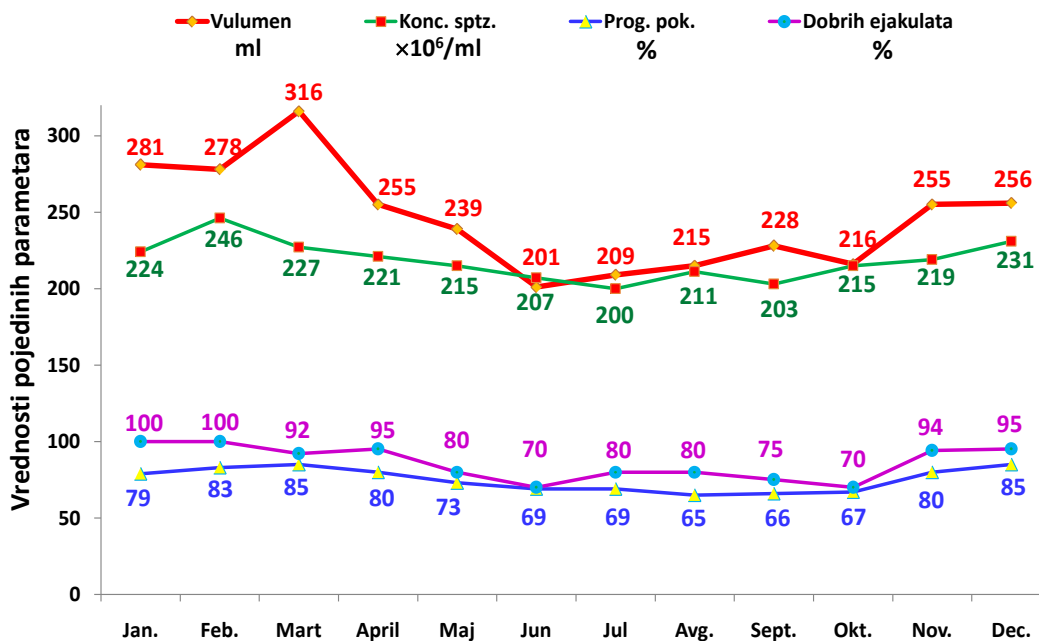
Variranje parametara fertilizacionog potencijala ispitivanih ejakulata, tokom pojedinih meseci u godini, prikazano je u tabeli 32 i grafikonu 4.

Najveće variranje se zapaža u vrednosti volumena ejakulata. Tako je volume ejakulata najniži period od maja do oktobra. U ovom period, najniža vrednost je ustanovljena u junu (201 ml), julu (209 ml) i avgustu (215 ml). Značajnije povećanje volumena ejakulata započinje od novembra (255 ml) do marta, kada je zabeležen i najveći volume ejakulata (216 ml). Vrednosti ostalih parametara, kao što su koncentracija spermatozoida u 1 ml ejakulata, progresivna pokretljivost i broj dobrih ejakulata, pokazuju znatno manji stepan variranja, tokom pojedinih meseci. Ipak, i kod ovih parametara se zapaža tendencija smanjenja vrednosti tokom toplijih meseci godine. Tako se koncentracija spermatozoida povećava od oktobra ($215 \times 10^6/\text{ml}$) do februara, kada dostiže maksimalnu vrednost od 246×10^6 po 1 ml ejakulata. Broj dobrih ejakulata je najveći u periodu od novembra (94%) do aprila (95%). I vrednost progresivne pokretljivosti raste od oktobra do aprila, pri čemu su najveće vrednosti ustanovljene u decembru (85%), februaru (83%) i martu (85%).

Tabela 32. Parametri kvaliteta nativnih ejakulata nerastova po mesecima u godini

Meseci	Parametri nativnih ejakulata				
	Volumen (ml)	Koncentrac. sptz. ($\times 10^6/\text{ml}$)	Ukupan br. sptz. ($\times 10^9$)	Prog. pokret. (%)	Dobrih ejakulata ¹ (%)
Januar (n=19)	281	224	62	79	100.0
Februar (n=21)	278	246	61	83	100.0
Mart (n=26)	316	227	70	85	92.0
April (n=18)	255	221	55	80	95.0
Maj (n=20)	239	215	51	73	80.0
Jun (n=22)	201	207	42	69	70.3
Jul (n=20)	209	200	42	69	80.0
Avgust (n=20)	215	211	44	65	80.0
Septembar (n=20)	228	203	45	66	75.0
Oktoabar (n=28)	216	215	46	67	70.0
Novembar (n=35)	255	219	58	80	94.0
Decembar (n=21)	256	231	58	85	95.0
Ukupno (n=270)	247	219	53	74	87.0

Sptz. – Spermatozoidi.

¹Volumen ≥ 120 ml; Koncentracija spermatozoida $\geq 200 \times 10^6/\text{ml}$ ejakulata; Prog. pokret. $\geq 65\%$.

Grafikon 4. Variranje vrednosti parametara nativnih ejakulata, tokom meseci

C. Uticaj rase nerastova na parametre ejakulata

Vrednosti osnovnih parametara fertilizacionog potencijala ejakulata ispitivanih rasa nerastova, prikazane su u tabeli 33 i grafikonu 5.

Nerastovi rase Durok su imali najmanji prosečan volumen ejakulata (228 ml). Ovaj volume je bio statistički visoko značano ($P < 0.01$) manji od prosečnog volumena nerastova rase Švedski Landras (301 ml) i statistički značajno ($P < 0.01$) manji od volumena nerastova Veliki Jorkšir (267 ml). Nije ustanovljena statistički značajna razlika ($P > 0.05$) između volumena ejakulata rase Švedski Landras i Veliki Jorkšir, mada nerastovi rase Veliki Jorkšir imaju manji volume ejakulata od nerastova rase Švedski Landras. Koncentracija spermatozoida u 1 ml ejakulata je najveća kod nerastova rase Durok (289×10^6), a najmanja kod nerastova rase Švedski Landras (244×10^6) ($P < 0.01$). Nerstovi rase Veliki Jorkšir su imali prosečnu koncentraciju spermatozoida $264 \times 10^6/\text{ml}$, i ona je bila statistički značajno manja ($P < 0.05$) od ove vrednosti kod nerastova rase Durok, ali nije bila statistički značajno ($P > 0.05$) manja od volumena ejakulata nerastova rase Švedski Landras.

Tabela 33. Parametri kvaliteta nativnih ejakulata nerastova po rasama* ($\bar{x} \pm \text{SD}$)

Parametri	Rasa nerasta			Ukupno
	Švedski Landras	Veliki Jorkšir	Durok	
Ukupno nerastova (n)	8	8	8	24
Ukupno ejakulata (n)	40	72	56	168
Volumen ejakulata (ml)	301±112.19 ^A (110-500)	267±90.36 ^a (120-610)	228±72.22 ^{Bb} (100-470)	262 (100-610)
Koncentracija spermatozoida ($\times 10^6/\text{ml}$)	244±65.6 ^A (103-391)	264±63.3 ^a (105-434)	289±67.97 ^{Bb} (110-421)	273 (103-434)
Ukupan broj sptz. u ejakulatu ($\times 10^9$)	71±25.06 ^a (30-122)	69±25.22 ^a (26-163)	65±22.64 ^b (27-112)	68 (26-163)
Progresivna pokretljivost (%)	79±14.11 ^a (65-90)	77±13.34 ^a (65-90)	82±18.09 ^b (65-95)	79 (65-95)
Broj progresivno pokretnih spermatozoida u ejakulatu ($\times 10^9$) ¹	57 (24-96)	52 (20-125)	53 (22-92)	54 (20-129)
Dobrih ejakulata (%) ²	92.5 (37/40)	95.8 (69/72)	94.6 (53/56)	94.6 (159/168)

*Izvor: Evidencije laboratorije za reprodukciju i VO, Poljoprivredni fakultet, Novi Sad.

¹Izračunata vrednost na osnovu ukupnog broja spermatozoida u ejakulatu i % progresivne pokretljivosti.

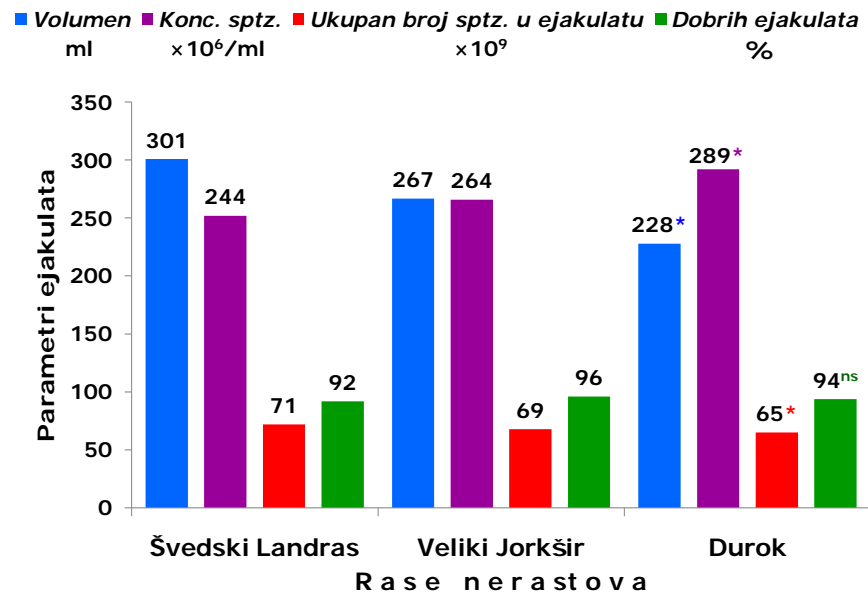
²Volumen ≥ 120 ml; Koncentracija spermatozoida $\geq 200 \times 10^6/\text{ml}$ ejakulata; Prog. pokret. $\geq 65\%$.

Vrednosti sa različitim superskriptima, u istom redu, značajno se razlikuju (^{A,B} $P < 0.01$; ^{a,b} $P < 0.05$).

Detaljnija statistička analiza je prikazana u prilogu (tabela 63).

Ukupan broj spermatozoida u ejakulatu je bio statistički najmanji ($P < 0.05$) kod nerastova rase Durok (65×10^9), u odnosu na nerastove rase Švedski Landras (71×10^9) i

Veliki Jorkšir (69×10^9). Ova vrednost se, između nerastova rase Švedski Landras i Veliki Jorkšir nije statistički značajno razlikovala ($P > 0.05$). Progresivna pokretljivost je bila najveća (82%) kod nerastova rase Durok i statistički se značajno ($P < 0.05$) razlikovala od ove vrednosti kod nerastova rase Švedski Landras (79%) i Veliki Jorkšir (77%). Razlike između ove dve poslednje rase, nisu bile statistički značajne ($P > 0.05$). Broj dobrih ejakulata je, međutim, bio vrlo sličan kod ispitivanih rasa i kretao se između 92% i 96%.



Grafikon 5. Poređenje prosečnog volumena ejakulata, koncentracije spermatozoida i ukupnog broja spermatozoida u ejakulatu, između ispitivanih rasa
*Vrednosti se značajno razlikuju ($P < 0.01$ ili $P < 0.05$) između rase Durok i ostale dve rase (ŠL i VJ).

D. Uticaj sadržaja proteina u spermalnoj plazmi na parametre ejakulata

Prosečne vrednosti svih ispitivanih parametara fertilizacionog potencijala ejakulata, bili su statistički značajno veći ($P < 0.01$) kod nerastova sa visokim, u odnosu na nerastove se niskim sadržajem proteina u spermalnoj plazmi (Tabela 34 i Grafikon 6).

Tako je volumen ejakulata iznosio 310 ml i 271 ml, koncentracija spermatozoida $301 \times 10^6/\text{ml}$ i $271 \times 10^6/\text{ml}$, ukupan broj spermatozoida u ejakulatu je bio 93×10^9 i 58×10^9 , progresivna pokretljivost je iznosila 82% i 76%, a broj progresivno pokretnih spermatozoida u ejakulatu je bio 76×10^9 i 44×10^9 .

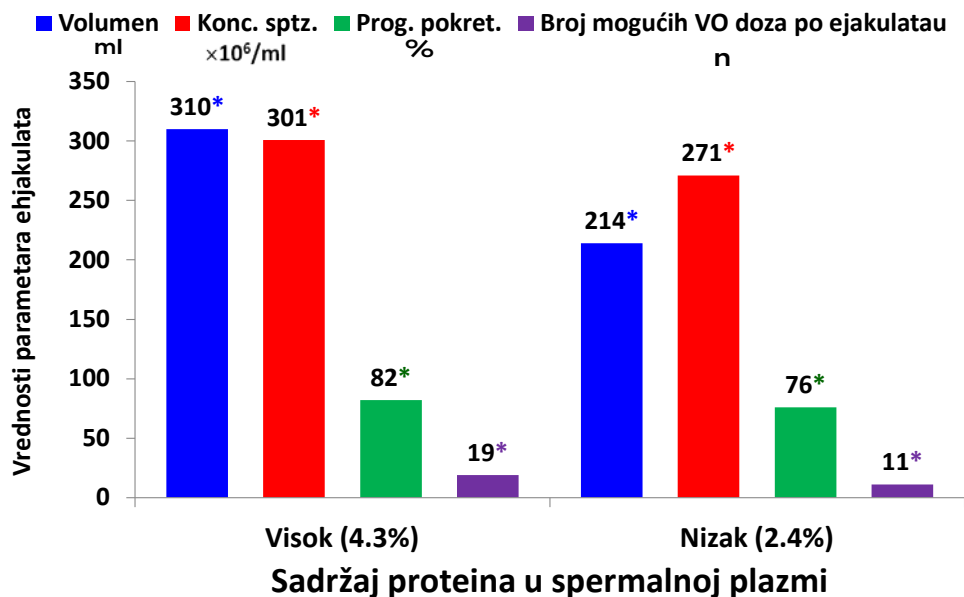
Od ejakulata sa visokim sadržajem proteina u spermalnoj plazmi, moguće je napraviti prosečno 19 inseminacionih (VO) doza, što je skoro dupo više od broja VO doza (11), koji se može napraviti od prosečnog ejakulata nerastova sa niskom sadržajem proteina u spermalnoj plazmi ($P < 0.01$). Pri tome je stepen potrebnog razređenja vrlo sličan i za ejakulate sa visokim (prosečno 1:3.8) i niskim sadržajem proteina u spermalnoj plazmi n (prosečno 1:3.7).

Tabela 34. Uticaj sadržaja proteina u spermalnoj plazmi na parameter ejakulata ($\bar{x} \pm SD$)

Parametri	Sadržaj proteina u spermalnoj plazmi (%)	
	Visok (4.3)	Nizak (2.4)
Broj ejakulata ^{1*}	96	96
Volumen (ml)	310±35,44 ^A (245-400)	214±58,09 ^B (125-321)
Koncentracija spermatozoida ($\times 10^6$ /ml ejakulata)	301±25,06 ^A (200-350)	271±43,74 ^B (248-350)
Ukupan broj spermatozoida u ejakulatu ($\times 10^9$)	93±18,18 ^A (64-120)	58±11,97 ^B (34-100)
Progresivna pokretljivost (%)	82±5,49 ^A (70-90)	76±6,29 ^B (65-90)
Broj progresivno pokretnih spermatozoida ($\times 10^9$)	76±12,24 ^A (46-96)	44±14,09 ^B (24-82)
Prosečan broj mogućih VO doza po ejakulatu ³	19±2,96 ^A (11-23)	11±3,59 ^B (6-20)
Prosečan stepen razređenja ejakulata	1:3.8 (1:2.5-1:4.8)	1:3.7 (1:2.5-1:6)

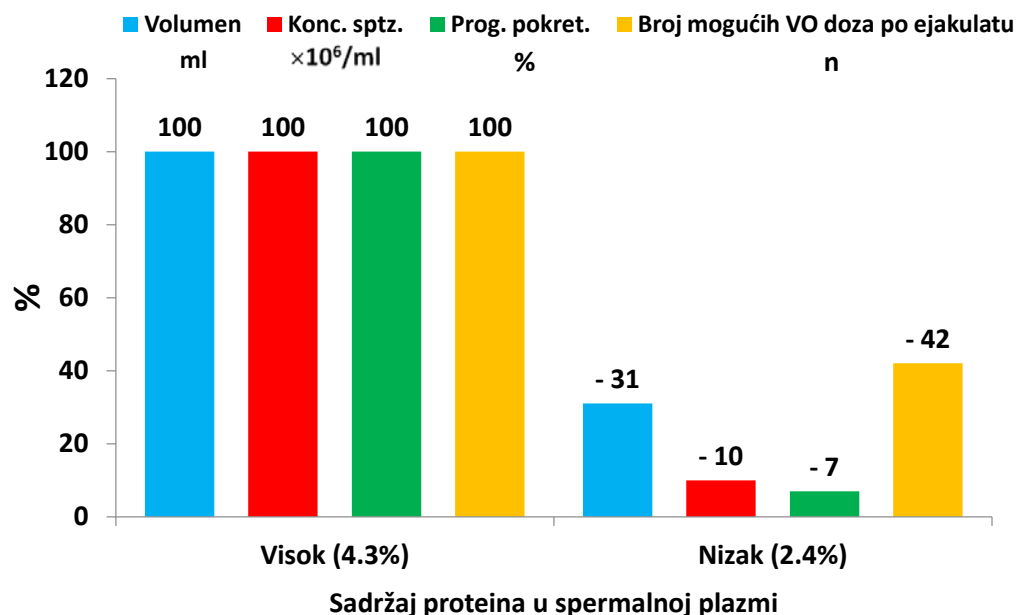
*Korišteni su samo dobri ejakulati: volumen ≥ 120 ml, koncentracija spermatozoida $\geq 200 \times 10^6$ /ml ejakulata, progresivna pokretljivost $\geq 65\%$. ¹12 nerastova po 8 ejakulata. ³Izračunato na bazi inseminacione doze volumena 80ml, sa 4×10^9 spermatozoida.

Vrednosti sa različitim superskriptima, u istom redu, značajno se razlikuju (^{A,B}P<0.01; ^{a,b}P<0.05). Detaljnija statistička analiza je prikazana u prilogu (Tabela 64).

**Grafikon 6.** Uticaj sadržaja proteina u spermalnoj plazmi na parametre ejakulata

*Vrednosti se statistički značajno razlikuju ($P < 0.01$).

U grafikonu 7 je prikazano procentualno smanjenje parametara fertilizacionog potencijala ejakulata nerastova sa niskim sadržajem proteina u spermalnoj plazmi, u odnosu na iste vrednosti parametara ejakulata kod nerastova sa visokim sadržajem proteina u spermalnoj plazmi, koji su uzeti kao referentna vrednost 100%.



Grafikon 7. Procentualno smanjenje parametara ejakulata sa niskim u odnosu na ejakulate sa visokim sadržajem protein u spermalnoj plazmi
(Parametri ejakulata sa visokim sadržajem proteina su uzeti kao 100%)

Najviše su smanjeni prosečna zapremina ejakulata (za 31%) i prosečan broj mogućih VO doza po ejakulatu (za 42%). Prosečna koncentracija spermatozoida u 1 ml ejakulata, smanjena je za 10%, a posečna progresivna pokretljivost u ejakulatima sa niskim, u odnosu na ejakulate sa viskim sadržajem proteina, smanjena je za 7%.

5.2.2. DRUGI EKSPERIMENT

A. Uticaj godišnje sezone na progresivnu pokretljivost spermatozoida u uzorcima razređene sperme

Održavanje progresivne pokretljivosti u uzorcima sperme različitog stepena razređenja i dužine čuvanja, zavisno od godišnje sezone, prokazano je u tabeli 35. Posle 24h čuvanja u razređenju 1:2, došlo je do visoko signifikantno značajnog ($p < 0.01$) pada progresivne pokretljivosti spermatozoida, kako u hladnoj (sa 79% na 67%), tako i u toploj sezoni godine (sa 69% na 59%).

Tabela 35. Uticaj sezone na održavanje progresivne pokretljivosti spermatozoida u svim ispitivanim uzorcima nativne i razređene sperme* ($\bar{x} \pm SD$)

	Sr	Vč	Godišnja sezona		Ukupno za celu godinu (n=270)
			Hladna ¹ (n=140)	Topla ² (n=130)	
Progresivna pokretljivost uzoraka nativne sperme, % ³			79±14.01 ^{AX} (0-95) ⁵	69±13.89 ^{BX} (20-90)	75±14.86 ^X (0-95)
Progresivna pokretljivost svih uzoraka razređene sperme, % ⁴	1:2	24h	67±19.53 ^{AY} (0-90)	59±18.62 ^{BY} (0-85)	63±19.43 ^Y (0-90)
		48h	60±20.77 ^a (0-90)	55±18.92 ^a (0-85)	58±20.04 (0-90)
		72h	53±23.36 ^A (0-85)	46±20.88 ^B (0-85)	50±22.50 (0-85)
	1:4	24h	53±24.12 ^a (0-85)	48±22.99 ^a (0-85)	51±23.69 (0-85)
		48h	46±26.29 ^a (0-85)	42±23.95 ^a (0-80)	44±25.24 (0-85)
		72h	42±25.52 ^A (0-85)	34±23.35 ^B (0-80)	38±24.78 (0-85)

Izvor: Evidencije laboratorije za reprodukciju i VO, Poljoprivredni fakultet, Novi Sad.

Sr – Stepen razređenja; Vč – Vreme čuvanja uzoraka razređene sperme na +17°C.

¹Novembar-Decembar-Januar-Februar-Mart-April (10 nerastova, po 14 ejakulata).

²Maj-Jun-Jul-Avgust-Septembar-Oktobar (10 nerastova, po 13 ejakulata).

³Iz ejakulata, neposredno pre formiranja uzoraka razređene sperme.

⁴Test značajnosti razlika između progresivne pokretljivosti uzoraka razređene sperme, zavisno od stepena razređenja i vremena čuvanja, u hladnoj i toploj sezoni, dat je u tabeli 36, a ukupno za celu godinu u tabeli 37. U zagradama su minimalne i maksimalne vrednosti.

Vrednosti sa različitim superskriptima, unutar istog reda, značajno se razlikuju (^{A,B}P<0.01; ^{a,b}P<0.05).

Vrednosti sa različitim superskriptima, unutar iste kolone, značajno se razlikuju (^{X,Y}P<0.01; ^{x,y}P<0.05).

Detaljna statistička analiza je data u prilogu (Tabela 66).

Prosečna godišnja progresivna pokretljivost ejakulata, neposredno pre razređivanja, takođe je bila statistički vrlo značajno ($p<0.01$) veća (75%) od one u uzorcima sperme čuvane 24h i razređene u odnosu 1:2 (63%) (Tabela 35). Prosečna progresivna pokretljivost u istom razređenju i pri istom vremenu čuvanja, bila je statistički visoko značajno ($p<0.01$) ili značajno ($p<0.05$) veća u hladnoj, od one u toploj sezoni (24h/1:2 = 67% u hladnoj i 59% toploj sezoni; 72h/1:4 = 42% u hladnoj i 34% toploj sezoni) (Tabela 35).

Test značajnosti razlika u prosečnim vrednostima progresivne pokretljivosti između pojedinih stepena razređenja i perioda čuvanja, unutar hladne ili tople godišnje sezone, prikazan je u tabeli 36, a za sve uzorke (topla + hladna sezona), prikazan je u tabeli 37.

Tabela 36. Značajnost razlika progresivne pokretljivosti u svim uzorcima razređene sperme, za hladnu i toplu godišnju sezonu

Sezona	Vreme čuvanja i stepen razređenja	Hladna sezona				Topla sezona			
		24h/1:2	24h/1:4	72h/1:2	72h/1:4	24h/1:2	24h/1:4	72h/1:2	72h/1:4
Hladna	24h/1:2	-	**	**	**	-	-	-	-
	24h/1:4	-	-	nz	**	-	-	-	-
	72h/1:2	-	-	-	**	-	-	-	-
	72h/1:4	-	-	-	-	-	-	-	-
Topla	24h/1:2	-	-	-	-	-	**	**	**
	24h/1:4	-	-	-	-	-	-	nz	**
	72h/1:2	-	-	-	-	-	-	-	**
	72h/1:4	-	-	-	-	-	-	-	-

** P<0.01; * P<0.05; nz – nije statistički značajno različito.

Detaljna statistička analiza je data u prilogu (Tabela 66).

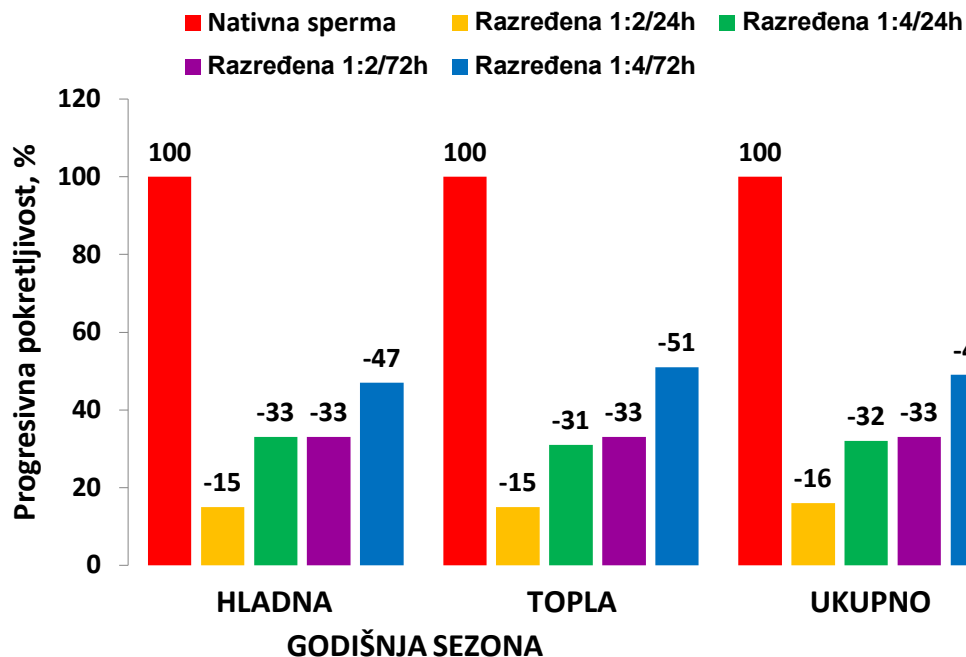
Tabela 37. Značajnost razlika progresivne pokretljivosti u svim uzorcima razređene sperme, ukupno za celu godinu (hladna + topla sezona)

		Ukupno za celu godinu			
		24h/1:2	72h/1:2	24h/1:4	72h/1:4
Ukupno za celu godinu	24h/1:2	-	**	**	**
	72h/1:2	-	-	nz	**
	24h/1:4	-	-	-	nz
	72h/1:4	-	-	-	-

*P<0.05; **P<0.01. nz – nije statistički značajno.

Detaljna statistička analiza je data u prilogu (Tabela 66).

Iz dobijenih rezultata, treba uočiti da je trend opadanja progresivne pokretljivosti uzoraka razređene sperme, zavisno od stepena razređenja i vremena čuvanja, u odnosu na progresivnu pokretljivost native sperme (uzeto kao 100%), skoro identičan u toploj i hladnoj sezoni, kao i u zbirnom uzorku za godinu dana. Tako je pad progresivne pokretljivosti uzoraka čuvanih 24h u razređenju 1:2 iznosio 15% u hladnoj, 15% u toploj i 16% u zbirnom uzorku, dok je ova vrednost iznosila 41% u hladnoj, 51% u toploj i 49% u zbirnom uzorku (Grafikon 8).



Grafikon 8. Procentualno smanjenje progresivne pokretljivosti uzoraka razređene sperme, u odnosu na progresivnu pokretljivost native sperme, koja je uzeta kao referentna vrednost – 100%

Prosečna progresivna pokretljivost (P_p) dobrih uzoraka native sperme ($P_p \geq 65\%$), neposredno pre razređivanja, iznosila je 82% u hladnoj i 75% u toploj sezoni, a razika je bila statistički visoko značajna ($p < 0.01$). Ova vrednost je, ukupno za celu godinu, iznosila 79%. Posle 24h čuvanja u razređenju 1:2, progresivna pokretljivost spermatozoida je je iznosila 75% u hladnoj 67% u toploj sezoni. Obe vrednosti su bile statistički visoko značajno ($p < 0.01$) niže od ove vrednosti u nativej spermiji (Tabela 38).

Prosečna progresivna pokretljivost u istom razređenju i pri istom vremenu čuvanja, bila je statistički visoko značajno ($p < 0.01$) veća u hladnoj, od one u toploj sezoni (24h/1:2 = 75% hladna i 67% topla sezona; 72h/1:4 = 69% hladna i 65% topla sezona). Međutim, vrednosti progresivne pokretljivosti, između pojedinih stepena razređenja i perioda čuvanja, nisu bili statistički značajno različite ($p > 0.05$) unutar hladne i tople sezona, kao i unutra zbirnog uzorka za celu godinu (Tabela 38).

Test značajnosti razlika u prosečnim vrednostima progresivne pokretljivosti između pojedinih stepena razređenja i perioda čuvanja, unutar hladne ili tople godišnje sezone, prikazan je u tabeli 39, a za sve uzorke (topla + hladna sezona), prikazan je u tabeli 40.

Tabela 38. Uticaj sezone na održavanje progresivne pokretljivosti u dobrim uzorcima native i razređene sperme ($\bar{x} \pm SD$)

	Sr	Vč	Godišnja sezona		Ukupno za celu godinu (n=270)
			Hladna (n=140)	Topla (n=130)	
Progresivna pokretljivost uzoraka native sperme, % ¹			82±7.59 ^{AX} (65-95) ³	75±7.24 ^{BX} (65-90)	79±8.11 ^X (65-95)
Progresivna pokretljivost dobrih uzoraka razređene sperme, % ²	1:2	24h	75±7.27 ^{AY} (65-90)	67±2.51 ^{BY} (65-70)	72±7.03 ^Y (65-90)
		48h	75±6.48 ^A (65-90)	65±2.18 ^B (65-70)	71±6.96 (65-90)
		72h	74±6.07 ^A (65-85)	65±0.0 ^B (65-65)	70±6.57 (65-85)
	1:4	24h	69±5.86 ^A (65-85)	65±0.86 ^B (65-70)	67±4.99 (65-85)
		48h	69±5.2 ^A (65-85)	65±1.03 ^B (65-70)	67±4.44 (65-85)
		72h	69±5.09 ^A (65-85)	65±0.0 ^B (65-65)	67±4.45 (65-85)

Sr – Stepen razređenja; Vč – Vreme čuvanja uzoraka razređene sperme na +17°C.

¹Iz ejakulata, neposredno pre formiranja uzoraka razređene sperme.

²Test značajnosti razlika progresivne pokretljivosti dobrih uzoraka razređene sperme, zavisno od stepena razređenja i vremena čuvanja, za toplu i hladnu sezonu, dat je u tabeli 39, a ukupno za celu godinu, u tabeli 40. U zagradama su minimalne i maksimalne vrednosti.

Vrednosti sa različitim superskriptima, unutar istog reda, značajno se razlikuju (^{A,B}P<0.01; ^{a,b}P<0.05).

Vrednosti sa različitim superskriptima, unutar iste kolone, značajno se razlikuju (^{x,y}P<0.01; ^{x,y}P<0.05).

Detaljna statistička analiza je data u prilogu (Tabela 67).

Tabela 39. Značajnost razlika progresivne pokretljivosti u dobrim uzorcima razređene sperme, za hladnu i toplu godišnju sezonu

Sezona	Vreme čuvanja i stepen razređenja	Hladna sezona				Topla sezona			
		24h/1:2	24h/1:4	72h/1:2	72h/1:4	24h/1:2	24h/1:4	72h/1:2	72h/1:4
Hladna	24h/1:2	-	nz	nz	nz	-	-	-	-
	24h/1:4	-	-	nz	nz	-	-	-	-
	72h/1:2	-	-	-	nz	-	-	-	-
	72h/1:4	-	-	-	-	-	-	-	-
Topla	24h/1:2	-	-	-	-	-	-	-	-
	24h/1:4	-	-	-	-	nz	-	-	-
	72h/1:2	-	-	-	-	nz	nz	-	-
	72h/1:4	-	-	-	-	nz	nz	nz	-

**P<0.01; *P<0.05; nz – nije statistički značajno različito.

Detaljna statistička analiza je data u prilogu (Tabela 67).

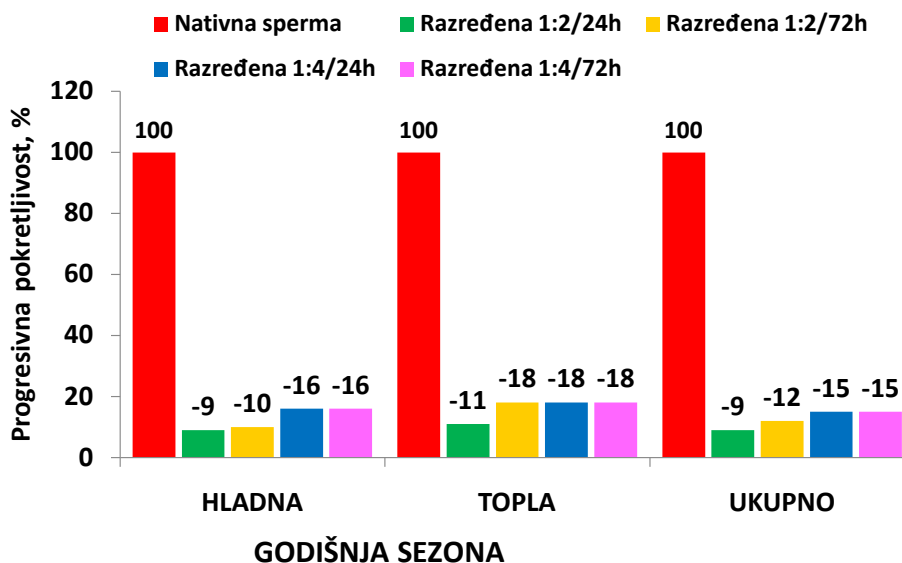
Tabela 40. Značajnost razlika u progresivnoj pokretljivosti dobrih uzoraka razređene sperme, ukupno za celu godinu (hladna + topla sezona)

		Ukupno za celu godinu			
		24h/1:2	72h/1:2	24h/1:4	72h/1:4
Ukupno za celu godinu	24h/1:2	-	nz	nz	nz
	72h/1:2	-	-	nz	nz
	24h/1:4	-	-	-	nz
	72h/1:4	-	-	-	-

*P<0.05; **P<0.01. nz – nije statistički značajno.

Detaljna statistička analiza je data u prilogu (Tabela 67).

Prosečna progresivna pokretljivost dobrih uzoraka ima sličnu tendenciju opadanja sa povećanjem stepena razređenja i perioda čuvanja, u odnosu na broj dobrih uzoraka native sperme (uzet 100%), kako u hladnoj (između -9% i -16%) i toploj (između -11% i -18%) sezoni, tako i kod zbirnog uzorka za celu godinu (između -9% i -15%) (Grafikon 9).



Grafikon 9. Smanjenje progresivne pokretljivosti (Pp) u dobrim uzorcima razređene sperme, u odnosu na Pp uzoraka native sperme, uzete kao 100%

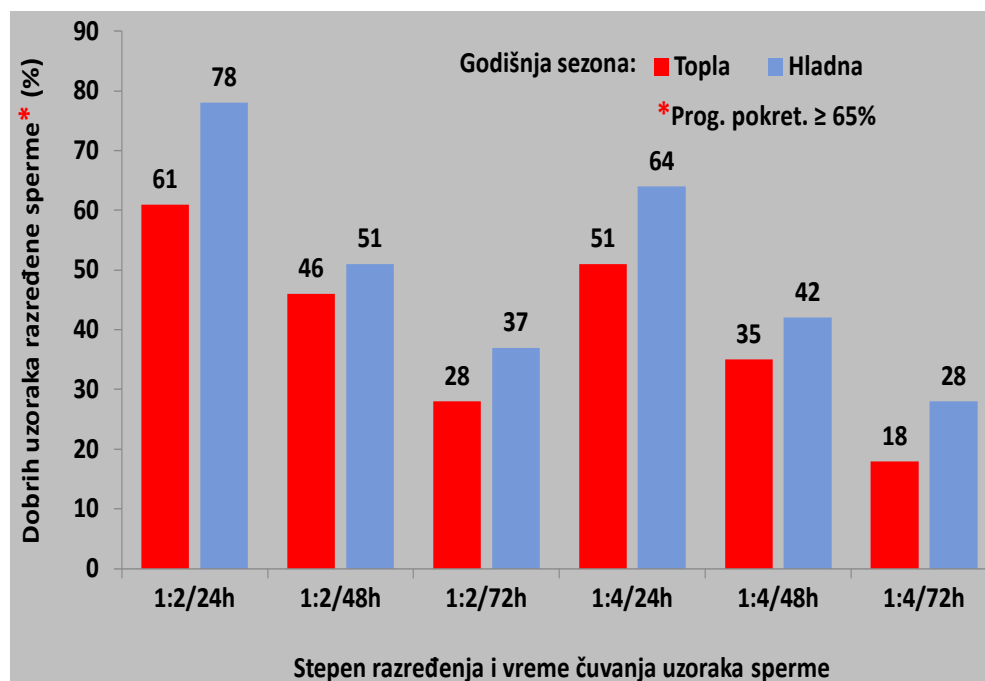
Broj dobrih uzoraka (progresivna pokretljivost $\geq 65\%$) native i razređene sperme, u hladnoj i toploj sezoni, kao i u zbirnom uzorku za godinu dana, prikazan je u tabeli 41.

Ovaj broj je, kod uzoraka native sperme, iznosio 96% u hladnoj i 78% u toploj sezoni, a 87% u zbirnom uzorku za celu godinu. Kod uzoraka razređene sperme, broj dobrih uzoraka razređenih 1:2 i čuvanih 24h, iznosio je 78% u hladnoj i 61% u toploj, a 69% u zbirnom uzorku za celu godinu. Nakon 72h čuvanja u razređenju 1:4, broj dobrih uzoraka je iznosio svega 28% u hladnoj i 18% u toploj sezoni, a 24% u zbirnom uzorku za celu godinu (Tabela 41 i Grafikon 10).

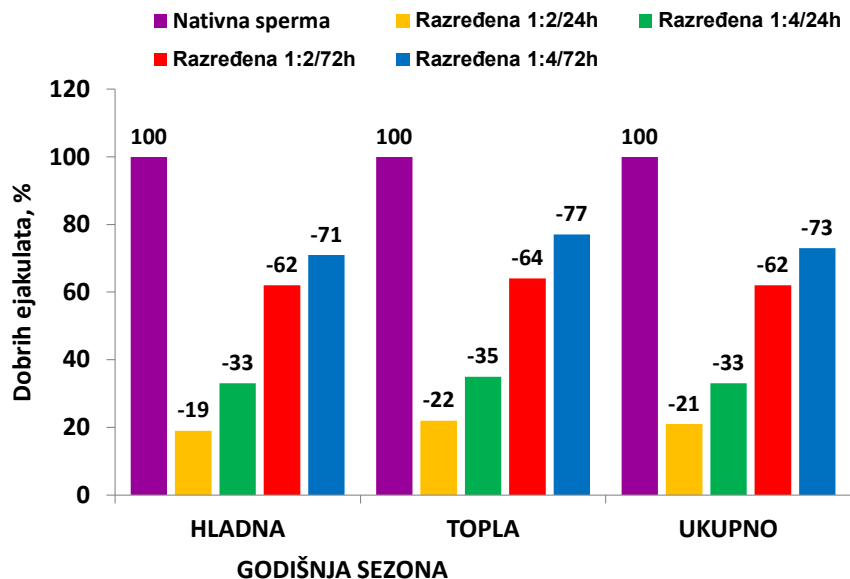
Tabela 41. Broj dobrih* uzoraka native i razređene sperme, zavisno od sezone

Godišnja sezona	Nativna sperma	Vreme čuvanja i stepen razređenja uzoraka						
		1:2/24h	1:2/48h	1:2/72h	1:4/24h	1:4/48h	1:4/72h	
Hladna	%	96	78	51	37	64	42	28
	n/n	134/140	110/140	72/140	52/140	90/140	59/140	40/140
Topla	%	78	61	46	28	51	35	18
	n/n	102/130	78/130	60/130	37/130	66/130	46/130	24/130
Ukupno	%	87	69	49	33	58	39	24
	n/n	236/270	188/270	132/270	89/270	156/270	105/270	64/270

*Dobri uzorci: progresivna pokretljivost $\geq 65\%$; n/n – broj dobrih uzoraka/ukupan broj uzoraka.

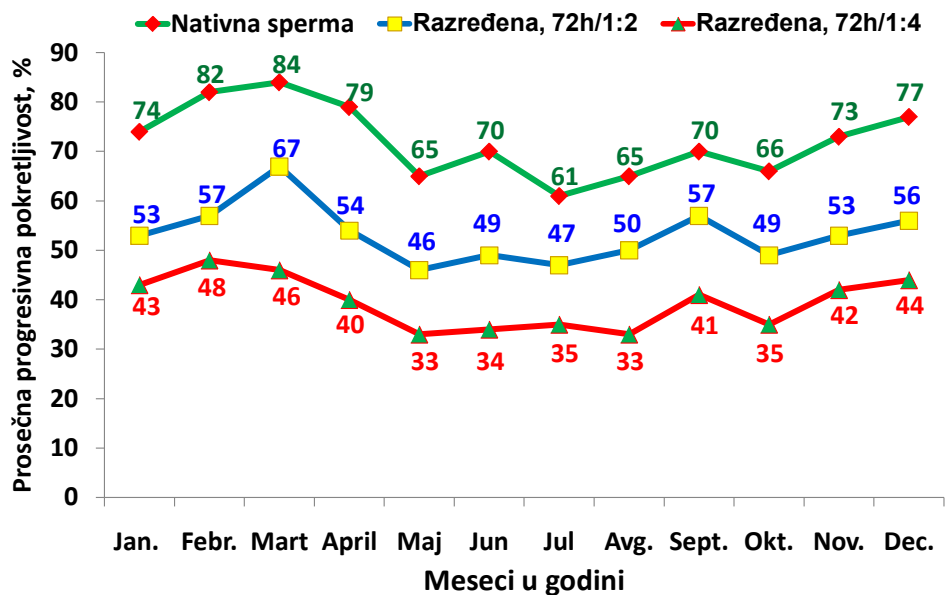
**Grafikon 10.** Broj (%) dobrih uzoraka razređene sperme u toploj i hladnoj sezoni godine, zavisno od stepena razređenja i vremena čuvanja

Slično kao i kod progresivne pokretljivosti dobrih uzoraka, i broj dobrih uzoraka ima sličnu tendenciju opadanja sa povećanjem stepena razređenja i perioda čuvanja, u odnosu na broj dobrih uzoraka native sperme (uzet 100%), kako u hladnoj (između -19% i -71%) i toploj (između -22% i -73%) sezoni, tako i kod zbirnog uzorka za celu godinu (između -21% i -73%) (Grafikon 11).



Grafikon 11. Procentualno smanjenje broja (%) dobrih uzoraka razređene sperme, u odnosu na broj (%) dobrih uzoraka native sperme, koji je uzet kao referentna vrednost – 100%

Variranje progresivne pokretljivosti, tokom pojedinih meseci u godini, pokazuje vrlo sličan trend kod uzoraka native i sperme čuvane 72h u razređenju 1:4. Tako se zapaža da su ove vrednosti znatno više tokom perioda novembar – april, u poređenju sa periodom maj – oktobar (Grafikon 12)



Grafikon 12. Variranje progresivne pokretljivosti (%) tokom meseci, u nativej spermi i uzorcima sperme čuvanih 72h, u razređenju 1:2 i 1:4

B. Uticaj rase nerastova na progresivnu pokretljivost spermatozoida u uzorcima razređene sperme

Prosečna progresivna pokretljivost nativne sperme (ejakulata), neposredno pre razređivanja, nije se značajno razlikovala ($P>0.05$) između nerastova rase Švedski Landras (78%) i Veliki Jorkšir (76%), kao i između nerastova Švedski Landras i Durok (81%) (Tabela 42).

Tabela 42. Uticaj rase nerasta na progresivnu pokretljivost (Pp) u svim uzorcima nativne i razređene sperme, tokom 72h čuvanja ($\bar{x} \pm SD$)

Rasa N=180	Pp nativne sperme (%)	Uzorcima razređene sperme		
		Vreme čuvanja	Stepen razređenja	Pp razređene sperme %
Švedski Landras n=60 ¹	78±11.02 ^{Axyz} (55-90)	24h	1:2	67±14.82 ^{Bd***} (10-85)
			1:4	61 (0-85)
		48h	1:2	60 (0-85)
			1:4	54 (0-85)
		72h	1:2	50 (0-75)
			1:4	44±21.74 ^{Bgff} (0-70)
Veliki Jorkšir n=60 ¹	76±13.23 ^{Axz} (40-95)	24h	1:2	63±18.26 ^{Bd***} (10-85)
			1:4	60 (10-85)
		48h	1:2	50 (0-85)
			1:4	47 (0-80)
		72h	1:2	41 (0-80)
			1:4	38±27.08 ^{Bgff} (0-80)
Durok n=60 ¹	81±11.34 ^{Ay} (45-90)	24h	1:2	63±15.02 ^{Bd***} (20-85)
			1:4	58 (20-85)
		48h	1:2	53 (0-80)
			1:4	47 (0-80)
		72h	1:2	43 (0-80)
			1:4	38±24.45 ^{Bgff} (0-75)

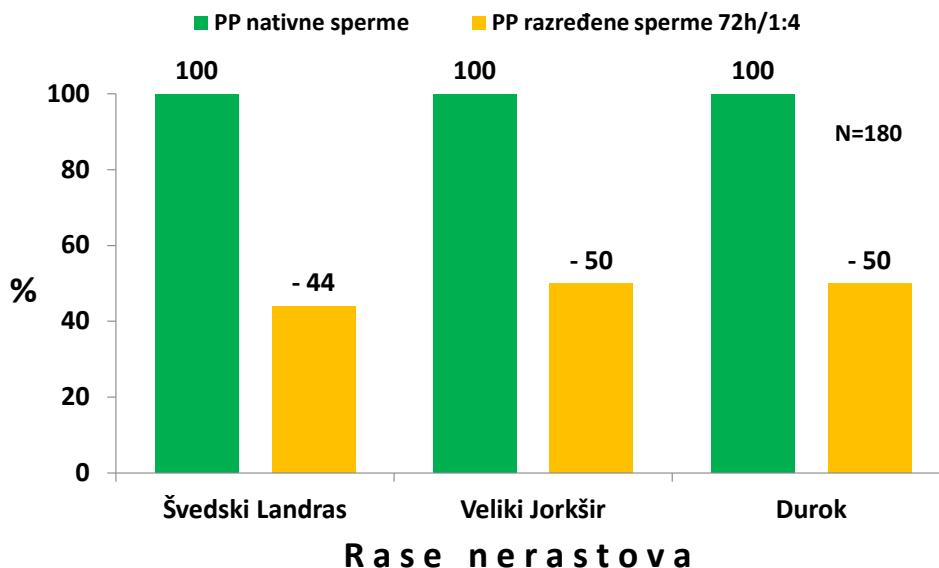
¹Pet nerastova, po 12 ejakulata (po 4 ejakulata u aprilu, avgustu i novembru).

Vrednosti sa različitim superskriptima, u istom redu (za istu rasu), između nativne i razređene sperme, se razlikuju (^{ABC}P<0.01; ^{abc}P<0.05). Vrednosti sa različitim superskriptima, u istoj koloni (između rasi), za nativnu spermu, se razlikuju (^{XYZ}P<0.01; ^{xyz}P<0.05). Vrednosti sa različitim superskriptima, u istoj koloni, za stepen razređenja 1:2 (između rasi), se razlikuju (^{DEF}P<0.01; ^{def}P<0.05). Vrednosti sa različitim superskriptima, u istoj koloni, za stepen razređenja 1:4 (između rasi), se razlikuju (^{GHI}P<0.01; ^{ghi}P<0.05). Vrednosti sa različitim superskriptima, u istoj koloni i istoj rasi, za razređenu spermu, se razlikuju (^{**ff}P<0.01; ^{*f}P<0.05). Statistička analiza u prilogu (Tab. 68).

Značajno veću progresivnu pokretljivost ($P < 0.05$) imali su nerastovi rase Durok, u odnosu na nerastove rase Veliki Jorkšir. Posle 24 sata čuvanja u razređenju 1:2, prosečna progresivna pokretljivost je iznosila 67% kod nerastova rase Švedski Landras (ŠL), 63% kod rase Veliki Jorkšir (VJ) i 63% kod rase Durok (D). Ove vrednosti se, međusobno, nisu statistički značajno razlikovale ($P > 0.05$). Prosečna vrednost progresivne pokretljivosti, posle čuvanja 72 sata, u razređenju 1:4, nije bila statistički značajno ($P > 0.05$) različita, između pojedinih rasa nerastova (ŠL=44%; VJ=38% i D=38%) (Tabela 42).

U poređenju sa prosečnom progresivnom pokretljivošću native sperme, kod iste rase nerastova, ova vrednost je, posle 24 sata čuvanja u razređenju 1:2, bila značajno niža: ŠL = 78%/67%, VJ = 76%/63% i D=81%/63% ($P < 0.01$). I prosečna vrednost progresivne pokretljivosti posle 72 sata čuvanja, u razređenju 1:4, bila je značajno niža ($P < 0.01$) u poređenju sa ovom vrednošću kod native sperme, neposredno pre razređivanja: ŠL = 78%/44%, VJ = 76%/38% i D=81%/38% (Tabela 42).

Procentualno smanjenje progresivne pokretljivosti uzoraka sperme čuvane 72 sata, u razređenju 1:4, u odnosu na progresivnu pokretljivost native sperme (ejakulata), koja je uzeta kao 100%, bilo je vrlo slično kod nerastova sve tri ispitivane rase. Tako je ova vrednost iznosila – 44% kod nerastova rase Švedski Landras, i po – 50% kod nerastova rase Veliki Jorkšir i Durok (Grafikon 13).



Grafikon 13. Procentualno smanjenje progresivne pokretljivosti uzoraka sperme razređene 1:4 i čuvane 72h na +17°C, u odnosu na progresivnu pokretljivost native sperme (ejakulata), neposredno pre razređenja (Vrednost progresivne pokretljivosti ejakulata je uzeta kao 100%)

Prosečna progresivna pokretljivost (Pp) dobrih ejakulata ($Pp \geq 65\%$), neposredno pre razređivanja, značajno se razlikovala između ispitivanih rasa nerastova. Tako je ova vrednost, kod nerastova rase Durok (86%), bila značajno veća ($P < 0.05$) od vrednosti kod

nerastova rase Švedski Landras (82%) i visoko značajno veća ($P<0.01$) od ove vrednosti kod nerastova rase Veliki Jorkšir (78%). Prosečna progresivna pokretljivost između rase Švedski Landras (82%) i Veliki Jorkšir (78%) je bila značajno različita ($P<0.05$) (Tabela 43).

Posle 24 sata čuvanja u razređenju 1:2, prosečna progresivna pokretljivost dobrih uzoraka, bila je veoma slična kod sve tri ispitivane rase i iznosila je 75% kod nerastova rase Švedski Landras (ŠL) i 74% kod rase Veliki Jorkšir (VJ) i Durok (D). Ove vrednosti se, međusobno, nisu statistički značajno razlikovale ($P>0.05$). Prosečna vrednost progresivne pokretljivosti, posle 72 sata čuvanja, u razređenju 1:4, takođe nije bila statistički značajno različita ($P>0.05$), između pojedinih rasa nerastova (ŠL = 68%; VJ = 69% i D = 67%). U poređenju sa prosečnom progresivnom pokretljivošću nativne sperme, kod iste rase nerastova, ova vrednost je, posle 24 sata čuvanja u razređenju 1:2, bila značajno niža: ŠL=82%/75%, VJ=78%/74% i D=86%/74% ($P<0.01$).

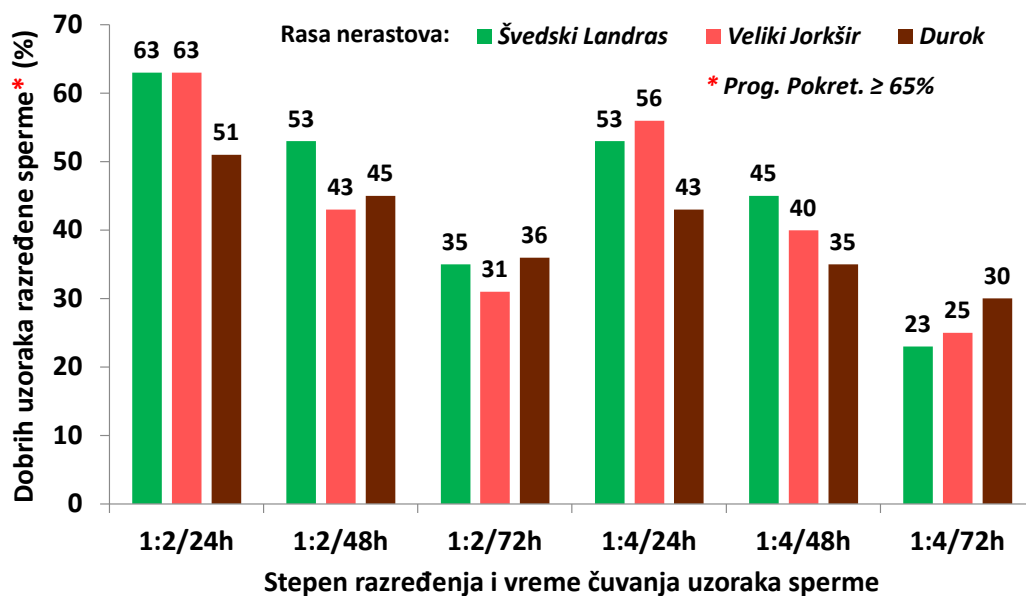
Tabela 43. Uticaj rase nerasta na progresivnu pokretljivost dobrih uzoraka nativne i razređene sperme, tokom 72h čuvanja ($\bar{x} \pm SD$)

Rasa N=180	Pp nativne sperme ² (%)	Uzorci razređene sperme		
		Vreme čuvanja ³	Stepen razređenja	Pp razređene sperme %
Švedski Landras n=60 ¹	82±6.44 ^{Ax} (70-95)	24h	1:2	75±29.11 ^{Bd*} (65-85)
			1:4	73 (65-85)
		48h	1:2	72 (65-85)
			1:4	70 (65-85)
		72h	1:2	68 (65-75)
			1:4	68±30.68 ^{Bg*} (65-70)
Veliki Jorkšir n=60 ¹	78±9.27 ^{AyY} (65-95)	24h	1:2	74±25.54 ^{Bd*} (65-85)
			1:4	74 (65-85)
		48h	1:2	72 (65-85)
			1:4	71 (65-80)
		72h	1:2	69 (65-80)
			1:4	69±30.77 ^{Bg*} (65-80)
Durok n=60 ¹	86±6.57 ^{AzZ} (70-95)	24h	1:2	74±27.00 ^{Bd*} (65-85)
			1:4	72 (20-80)
		48h	1:2	70 (65-80)
			1:4	69 (65-80)
		72h	1:2	70 (65-80)
			1:4	67±31.27 ^{Bg*} (65-75)

Vrednosti sa različitim superskriptima, u istom redu (za istu rasu), između nativne i razređene sperme, se razlikuju (^{ABC} $P<0.01$; ^{abc} $P<0.05$); Vrednosti sa različitim superskriptima, u istoj koloni (između rasa), za nativnu spermu, se razlikuju (^{XYZ} $P<0.01$; ^{xyz} $P<0.05$); Vrednosti sa različitim superskriptima, u istoj koloni, za stepen razređenja 1:2 (između rasa), se razlikuju (^{DEF} $P<0.01$; ^{def} $P<0.05$); Vrednosti sa različitim superskriptima, u istoj koloni, za stepen razređenja 1:4 (između rasa), se razlikuju (^{GHI} $P<0.01$; ^{ghi} $P<0.05$); Vrednosti sa različitim superskriptima, u istoj koloni i istoj rasi, za razređenu spermu, se razlikuju (^{**ff} $P<0.01$; ^{*f} $P<0.05$). Statistička analiza u prilogu (Tab. 69).

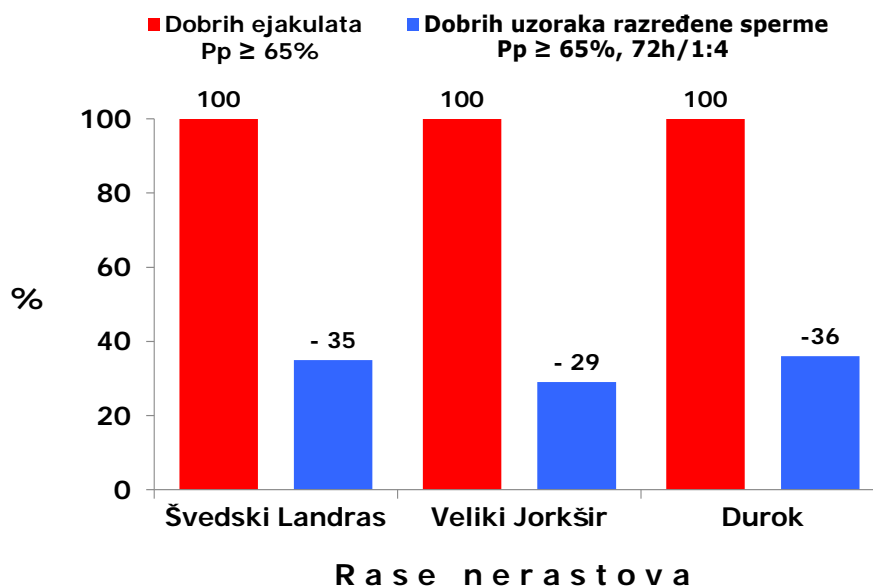
I prosečna vrednost progresivne pokretljivosti posle 72 sata čuvanja, u razređenju 1:4, bila je značajno niža ($P < 0.01$) u poređenju sa ovom vrednošću kod native sperme, neposredno pre razređivanja: ŠL = 82%/68, VJ = 78%/69% i D=86%/67% (Tabela 43).

Distribucija broja dobrih uzoraka sperme, kod tri ispitivane rase nerastova, zavisno od stepena razređenja i vremena čuvanja, prikazana je grafikonom 14. Iz ove distribucije se jasno vidi da broj dobrih uzoraka razređene sperme postepeno opada sa vremenom čuvanja, i to nešto intenzivnije u razređenju 1:4 od razređenja 1:2. Trend ovog opadanja je, međutim, vrlo sličan kod sve tri ispitivane rase nerastova. Tako je, kod rase ŠL, broj dobrih uzoraka razređenih u odnosu 1:2 iznosio 63, posle 24h, u i 35 posle 72h čuvanja. Kod rase VJ, ovaj broj je bio 63 i 31, dok je kod rase D, ovaj broj iznosio 51 i 36. Broj dobrih uzoraka je bio niži kod uzoraka razređenih u odnosu 1:4, čuvanih 24h i 72h (ŠL=53 i 23, VJ=56 i 25, D=43 i 30).



Grafikaon 14. Broj dobrih uzoraka kod ispitivanih rase nerastova, zavisno od stepena razređenja i vremena čuvanja uzoraka sperme

Procentualno smanjenje progresivne pokretljivosti uzoraka sperme čuvane 72h u razređenju 1:4, u poređenju sa progresivnom pokretljivosti native sperme (ejakulata) neposredno pre razređenja, bio je skoro identičan kod nerastova rase Švedski Landras (- 35%) i Durok (- 36%) i nešto manji kod nerastova rase Veliki Jorkšir (- 29%) (Grafikon 15).



Grafikon 15. Procentualno smanjenje broja (%) dobrih uzoraka sperme razređene 1:4 i čuvane 72h, u odnosu na broj dobrih ejakulata neposredno pre razređenja (Vrednost progresivne pokretljivosti ejakulata je uzeta kao 100%)

C. Uticaj sadržaja proteina u spermalnoj plazmi na progresivnu pokretljivost spermatozoida u uzorcima razređene sperme

Prosečna progresivna pokretljivost spermatozoida u uzorcima native sperme (ejakulatima) sa visokim sadržajem proteina u spermalnoj plazmi, neposredno pre razređenja, iznosila je 82% i bila je statistički visoko značajno ($P < 0.01$) veća od one u ejakulatima sa niskim sadržajem proteina u spermalnoj plazmi (76%). Ova vrednost je statistički značajno ($P < 0.05$) opala i u uzorcima sperme razređene u odnosu 1:2, posle 24h čuvanja, kako u uzorcima načinjenih od ejakulata sa visokim (77%), tako i u uzorcima načinjenih od ejakulata sa niskim sadržajem proteina u spermalnoj plazmi (68%), u odnosu na ovu vrednost kod nerazređene sperme (82% i 76%). Prosečna progresivna pokretljivost uzoraka u istom razređenju i čuvanih tokom istog perioda, bila je statistički visoko značajno veća ($P < 0.01$) kod uzoraka načinjenih od ejakulata sa visokim u poređenju sa uzorcima načinjenih od ejakulata sa niskim sadržajem proteina u spermalnoj plazmi (1:2/24h=77% prema 68%; 1:2/48h=73% prema 62%; 1:2/72h=70% prema 57%; 1:4/24h=73% prema 62%; 1:4/48h=69% prema 57%; 1:4/72h=64% prema 48%) (Tabela 44).

Tabela 44. Uticaj sadržaja proteina u spermalnoj plazmi na progresivnu pokretljivost svih uzoraka native i razređene sperme ($\bar{x} \pm SD$)

	Sr	Vč	Sadržaj proteina		Ukupno za sve uzorke (n=192)
			VISOK, 4.3% (n=96)*	NIZAK, 2.4% (n=96)*	
Progresivna pokretljivost uzoraka native sperme, % ¹			82±5,49 ^{Ax} (70-90)	76±6,29 ^{Bx} (65-90)	79±6.61 ^x (65-90)
Progresivna pokretljivost svih uzoraka razređene sperme, % ²	1:2	24h	77±8.64 ^{Ay} (60-90)	68±7.54 ^{By} (65-90)	73±9.25 ^y (65-90)
		48h	73±8.14 ^A (55-90)	62±6.74 ^B (65-90)	68±9.46 (65-90)
		72h	70±8.88 ^A (50-90)	57±10.25 ^B (65-90)	63±11.69 (65-90)
	1:4	24h	73±8.92 ^A (55-90)	62±5.28 ^B (65-90)	68±9.10 (65-90)
		48h	69±8.01 ^A (55-90)	57±7.30 ^B (65-90)	63±9.98 (65-90)
		72h	64±7.56 ^A (50-90)	48±10.49 ^B (65-90)	56±12.09 (65-90)

Sr – Stepen razređenja; Vč – Vreme čuvanja uzoraka razređene sperme na +17°C.

*4 nerasta × 8 ejakulata × 3 uzorka od svakog ejakulata.

¹Iz ejakulata, neposredno pre formiranja uzoraka razređene sperme.

²Test značajnosti razlika između progresivne pokretljivosti razređene sperme, zavisno od stepena razređenja i vremena čuvanja, za spermu sa visokim i niskim sadržajem proteina u spermalnoj plazmi, dat je u tabeli 45, a ukupno za sve uzorke, u tabeli 46. U zagradama: min. i max. vrednosti. Vrednosti sa različitim superskriptima, unutar iste kolone, značajno se razlikuju (^{x,y}P<0.01; ^{x,y}P<0.05). Vrednosti sa različitim superskriptima, unutar istog reda, značajno se razlikuju (^{A,B}P<0.01; ^{a,b}P<0.05). Detaljnija statistička analiza je prikazana u prilogu (Tabela 69).

Značajnost razlika progresivne pokretljivosti svih ispitivanih uzoraka razređene sperme, načinjenih od ejakulata sa visokim ili niskim sadržajem proteina u spermalnoj plazmi, zavisno od stepena razređenja i vremena čuvanja, prikazana je u tabeli 45. Progresivna pokretljivost statistički visoko značajno (P<0.01) opada sa povećanjem stepena razređenja i vremena čuvanja, i kod uzoraka koji potiču od ejakulata sa visokim, tako i kod uzoraka od ejakulata sa niskim sadržajem proteina u spermalnoj plazmi. Međutim, prosečna progresivna pokretljivost je statistički visoko značajno (P<0.01) niža kod uzoraka od ejakulata sa niskim (68%, 62% i 57% uzorci čuvani 24h, 48h i 72h u razređenju 1:2; 62%, 57% i 48% uzorci čuvani 24h, 48h i 72h u razređenju 1:4) u odnosu na uzorke sa visokim sadržajem proteina u spermalnoj plazmi (77%, 73% i 70% uzorci čuvani 24h, 48h i 72h u razređenju 1:2; 73%, 69% i 64% uzorci čuvani 24h, 48h i 72h u razređenju 1:4). Nije ustanovljena statistički značajna razlika u progresivnoj pokretljivosti (P>0.05) jedino između uzoraka iz ejakulata sa niskim sadržajem proteina, čuvanih 24h u razređenju 1:2 i uzoraka od ejakulata sa visokim sadržajem proteina, čuvanih 72h u razređenju 1:2. Ova razlika nije, takođe, bila statistički značajna (P<0.05)

između uzoraka od ejakulata sa niskim sadržajem proteina, čuvanih 24h u razređenju 1:4 i uzoraka od ejakulata sa visokim sadržajem proteina, čuvanih 72h u razređenju 1:4.

Tabela 45. Značajnost razlika progresivne pokretljivosti u svim uzorcima razređene sperme, načinjenih od sperme sa visokim i niskim sadržajem proteina¹

Sadržaj proteina	Vreme čuvanja i stepen razređenja	Visok sadržaj proteina				Nizak sadržaj proteina			
		24h/1:2	24h/1:4	72h/1:2	72h/1:4	24h/1:2	24h/1:4	72h/1:2	72h/1:4
Visok sadržaj proteina	24h/1:2	-	**	**	**	**	**	**	**
	24h/1:4	**	-	**	**	**	**	**	**
	72h/1:2	**	**	-	**	nZ	**	**	**
	72h/1:4	**	**	**	-	**	nZ	**	**
Nizak sadržaj proteina	24h/1:2	-	-	-	-	-	**	**	**
	24h/1:4	-	-	-	-	**	-	**	**
	72h/1:2	-	-	-	-	**	**	-	**
	72h/1:4	-	-	-	-	**	**	**	-

¹Detaljna statistička analiza je prikazana u prilogu (Tabela 69).

**P<0.01; *P<0.05; nZ – nije statistički značajno različito.

U tabeli 46 je prikazana značajnost razlika progresivne pokretljivosti svih uzoraka razređene sperme, ukupno za sve uzorke (visok + nizak sadržaj proteina). Ustanovljene su visoko značajne (P<0.01) razlike u progresivnoj pokretljivosti između sumarnih uzoraka ejakulata i sperme čuvane 24h u razređenju 1:2. Progresivna pokretljivost između sumarnih uzoraka sperme čuvane 24h, 48h i 72h, u razređenjima 1:2 i 1:4, takođe je bila statistički visoko značajno različita (P<0.01).

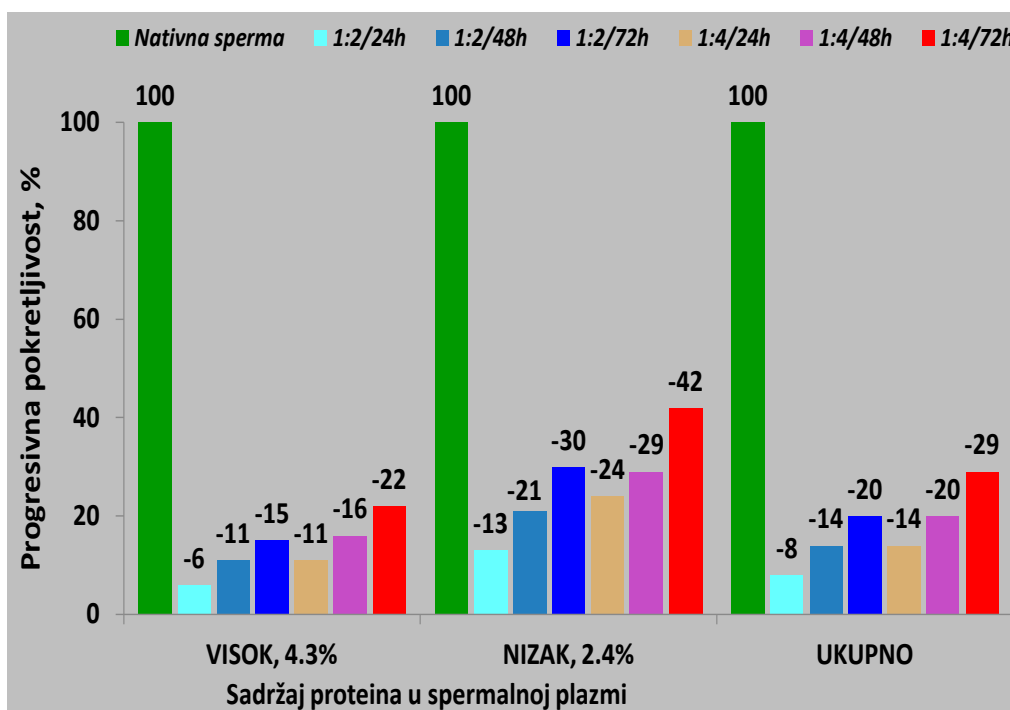
Tabela 46. Značajnost razlika progresivne pokretljivosti svih uzoraka razređene sperme, ukupno za sve uzorke (visok + nizak sadržaj proteina)¹

		Ukupno za sve uzorke			
		24h/1:2	72h/1:2	24h/1:4	72h/1:4
Ukupno za sve uzorke	24h/1:2	-	**	**	**
	72h/1:2	**	-	**	**
	24h/1:4	**	**	-	**
	72h/1:4	**	**	*	-

¹Detaljna statistička analiza je prikazana u prilogu (Tabela 69).

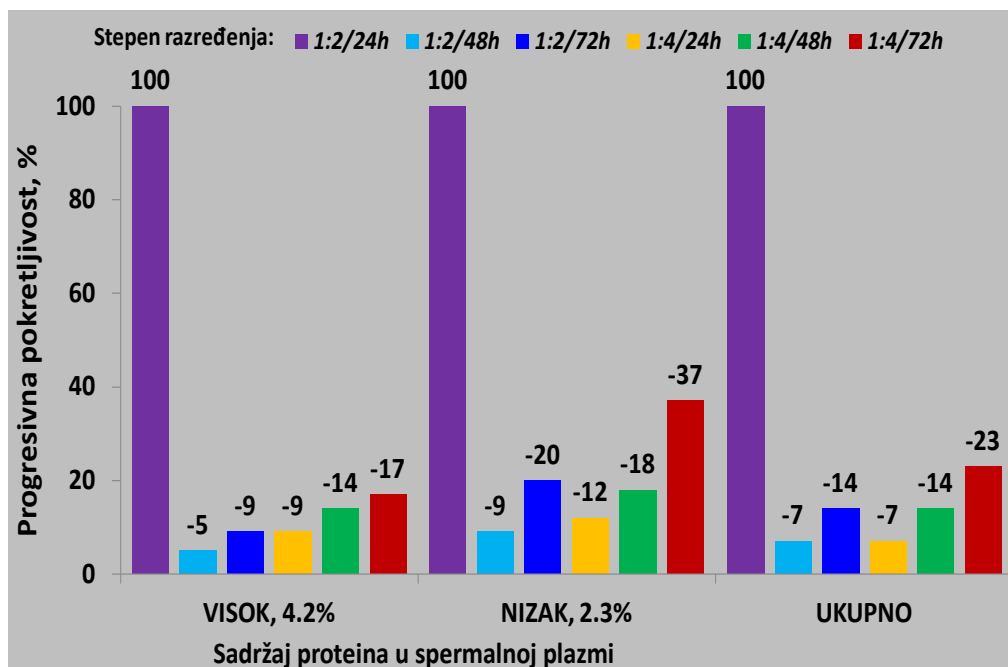
*P<0.05; **P<0.01. nZ – nije statistički značajno.

Iz grafikona 16 se jasno vidi da je procentualno smanjenje prosečne vrednosti progresivne pokretljivosti svih ispitivanih uzoraka razređene sperme, u odnosu na progresivnu pokretljivost u ejakulatima (koja je uzeta kao 100%), za oko duplo manje kod uzoraka od ejakulata sa visokim (od -6% do -22%), u odnosu na uzorke od ejakulata sa niskim sadržajem proteina u spermalnoj plazmi (od -13% do -42%). Iz ovog grafikona se, takođe, jasno vidi da progresivna pokretljivost skoro pravilno opada, u odnosu na progresivnu pokretljivost nativnih ejakulata, zavisno od povećanja stepena razređenja i vremena čuvanja, ali je ovaj pad znatno intenzivniji kod uzoraka od ejakulata sa nižim sadržajem proteina u spermalnoj plazmi.



Grafikon 16. Procentualno smanjenje progresivne pokretljivosti svih uzoraka razređene sperme, u odnosu na ovu vrednost kod native sperme, koja je uzeta kao referentna vrednost – 100%

Kada se posmatra variranje progresivne pokretljivosti uzoraka razređene sperme, u odnosu na progresivnu pokretljivost uzoraka čuvanih prvih 24h, u razređenju 1:2, takođe se vidi skoro pravilan trend opadanja ove vrednosti, zavisno od produžavanja vremena čuvanja i povećanja stepena razređenja. Ipak, ovaj pad ima znatno veće vrednosti, kod uzoraka od ejakulata sa niskim (od -9% do -37%), u poređenju sa uzorcima od ejakulata sa visokim (od -5% do -17%) sadržajem proteina u spermalnoj plazmi (Grafikon 17).



Grafikon 17. Procentualno smanjenje progresivne pokretljivosti svih uzoraka razređene sperme, u odnosu na progresivnu pokretljivost uzoraka sperme razređene 1:2 i čuvane 24h, uzete kao 100%.

Prosečna progresivna pokretljivost samo dobrih uzoraka razređene sperme (progresivna pokretljivost $\geq 65\%$), načinjenih od ejakulata sa visokim i niskim sadržajem proteina u spermatozoidnoj plazmi, prikazana je u tabeli 47. Prosečna progresivna pokretljivost dobrih uzoraka razređene sperme, načinjenih od ejakulata sa visokim sadržajem proteina, nije značajno ($P > 0.05$) opala posle 24h čuvanja u razređenju 1:2, u poređenju sa ovom vrednošću kod ejakulata pre razređenja (82% prema 79%). Ovaj pad je, međutim, bio statistički značajan ($P < 0.01$) kod uzoraka od ejakulata sa niskim sadržajem proteina u spermatozoidnoj plazmi (76% prema 72%).

Prosečna progresivna pokretljivost uzoraka razređene sperme je bila statistički vrlo značajno ($P < 0.01$) veća kod uzoraka od ejakulata sa visokim sadržajem proteina (79%, 76% i 75% uzorci razređeni 1:2 i čuvani 24h, 48h ili 72h; 74%, 73% i 71% uzorci razređeni 1:4 i čuvani 24h, 48h ili 72h), u poređenju sa uzorcima od ejakulata sa niskim sadržajem proteina, bez obzira na stepen razređenja i vreme čuvanja (72%, 66% i 66% uzorci razređeni 1:2 i čuvani 24h, 48h ili 72h; 67%, 65% i 66% uzorci razređeni 1:4 i čuvani 24h, 48h ili 72h) (Tabela 47).

Tabela 47. Uticaj sadržaja proteina u spermalnoj plazmi na progresivnu pokretljivost dobrih uzoraka nativne i razređene sperme ($\bar{x} \pm SD$)

	Sr	Vč	Sadržaj proteina		Ukupno za sve uzorke (n=192)
			VISOK, 4.3% (n=96)	NIZAK, 2.4% (n=96)	
Progresivna pokretljivost uzoraka nativne sperme, % ¹			82±5.49 ^{Ax} (70-90)	76±6.29 ^{Bx} (65-90)	79±SD (65-90)
Progresivna pokretljivost dobrih ² uzoraka razređene sperme, %	1:2	24h	79±5.96 ^{Ax} (65-90)	72±4.17 ^{By} (60-85)	76±6.36 (65-90)
		48h	76±5.15 ^A (65-85)	66±3.19 ^B (65-75)	72±6.54 (65-85)
		72h	75±4.40 ^A (65-80)	66±1.93 ^B (60-70)	72±5.85 (65-80)
	1:4	24h	74±4.84 ^A (65-85)	67±2.72 ^D ^B (60-75)	71±5.40 (65-85)
		48h	73±4.36 ^A (65-80)	65±1.33 ^B (65-70)	71±5.16 (65-80)
		72h	71±4.31 ^A (65-80)	66±1.95 ^B (65-70)	70±4.58 (65-80)

Sr – Stepen razređenja; Vč – Vreme čuvanja. ¹Neposredno pre razređenja. ²Prog. pokr. $\geq 65\%$. Vrednosti sa različitim superskriptima, unutar iste kolone, značajno se razlikuju (^{x,y}P<0.01; ^{x,y}P<0.05). Vrednosti sa različitim superskriptima, unutar istog reda, značajno se razlikuju (^{A,B}P<0.01; ^{a,b}P<0.05). Test značajnosti razlika između progresivne pokretljivosti dobrih uzoraka razređene sperme, zavisno od stepena razređenja i vremena čuvanja, za spermu sa visokim i niskim sadržajem proteina dat je u tabeli 48, a ukupno za sve uzorke, u tabeli 49. U zagradama: min. i max.vrednosti. Detaljna statistička analiza je prikazana u prilogu (Tabela 70).

Unutar grupe dobrih uzoraka razređene sperme, načinjenih od ejakulta sa visokim sadržajem proteina, nije ustanovljena značajna razlika u progresivnoj pokretljivosti između uzoraka čuvanih 24h u razređenju 1:4 i uzoraka čuvanih 72h u razređenju 1:2 i 1:4 (P<0.01). Unutar grupe uzoraka razređene sperme, načinjenih od ejakulta sa niskim sadržajem proteina, sve kombinacije stepena razređenja i vremena čuvanja, bile su statistički visoko značajno (P<0.01) ili statistički značajno (P<0.05) različite (Tabela 48).

Tabela 48. Značajnost razlika progresivne pokretljivosti u dobrim uzorcima razređene sperme, načinjenih od sperme sa visokim i niskim sadržajem proteina¹

Sadržaj proteina	Vreme čuvanja i stepen razređenja	Visok sadržaj proteina				Nizak sadržaj proteina			
		24h/1:2	24h/1:4	72h/1:2	72h/1:4	24h/1:2	24h/1:4	72h/1:2	72h/1:4
Visok sadržaj proteina	24h/1:2	-	*	*	**	**	**	**	**
	24h/1:4	*	-	nz	nz	nz	**	**	**
	72h/1:2	*	-	*	*	nz	**	**	**
	72h/1:4	**	*	-	-	nz	**	**	**
Nizak sadržaj proteina	24h/1:2	-	-	-	-	-	-	**	-
	24h/1:4	-	-	-	-	**	-	-	-
	72h/1:2	-	-	-	-	**	**	-	-
	72h/1:4	-	-	-	-	**	*	*	-

¹Detaljna statistička analiza je prikazana u prilogu (Tabela 70).

**P<0.01; *P<0.05; nz – nije statistički značajno različito.

Statistički značajna (P<0.01) razlika u progresivnoj pokretljivosti dobrih uzoraka, ukupno za uzorke od ejakulata sa visokim i niskim sadržajem proteina, ustanovljena je između uzoraka čuvanih 24h u razređenju 1:2 i uzoraka čuvanih 24h u razređenju 1:4, kao i između uzoraka čuvanih 72h u razređenju 1:2 i 1:4. Nisu statistički značajne razlike (P>0.05) između uzoraka čuvanih 24h u razređenju 1:4 i onih čuvanih 72h u razređenju 1:2, kao između uzoraka čuvanih 72h u razređenju 1:4 i uzoraka čuvanih 72h u razređenju 1:2 i onih čuvanih 24h u razređenju 1:4 (Tabela 49).

Tabela 49. Značajnost razlika progresivne pokretljivosti dobrih uzoraka razređene sperme, ukupno za sve uzorke (visok + nizak sadržaj proteina)

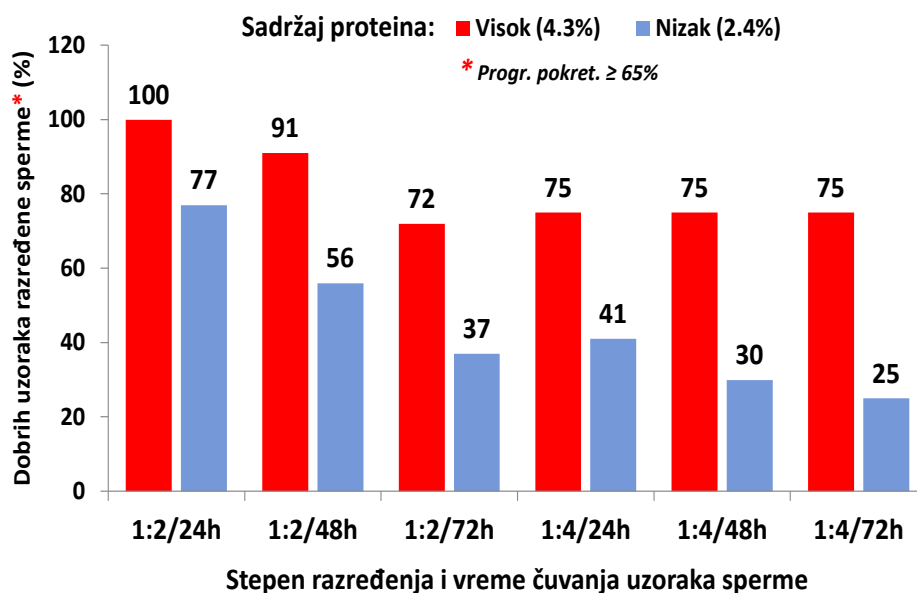
		Ukupno za sve uzorke			
		24h/1:2	72h/1:2	24h/1:4	72h/1:4
Ukupno za sve uzorke	24h/1:2	-	-	-	-
	72h/1:2	**	-	-	-
	24h/1:4	**	nz	-	-
	72h/1:4	**	nz	nz	-

¹Detaljna statistička analiza je prikazana u prilogu (Tabela 70).

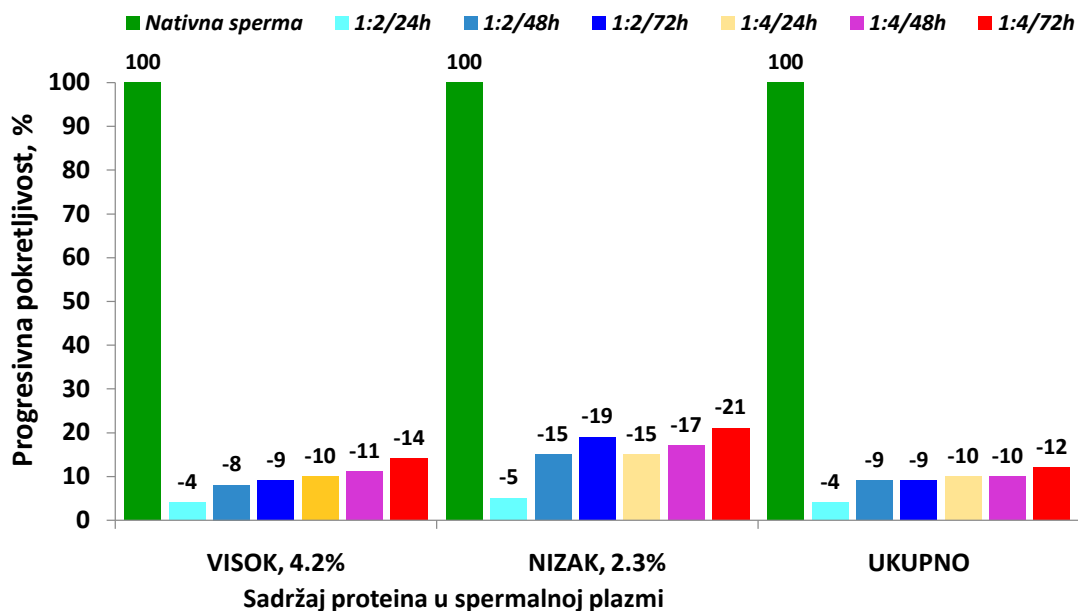
*P<0.05; **P<0.01. nz – nije statistički značajno.

Broj dobrih uzoraka razređene sperme, načinjenih od ejakulata sa visokim sadržajem proteina u spermalnoj plazmi, imao je upadljivo manji trend opadanja, u odnosu na broj dobrih uzoraka načinjenih od ejakulata sa niskim sadržajem proteina u spermalnoj plazmi. Tako je ovaj broj, kod uzoraka sa visokim sadržajem proteina, iznosio 100% posle čuvanja u razređenju 1:2, da bi se zadržao na 72% posle 72 sata čuvanja u razređenju 1:2, odnosno na 75% posle čuvanja tokom 24h, 48h i 72h, u razređenju 1:4. Međutim, kod uzoraka od ejakulata sa niskim sadržajem proteina, broj dobrih uzoraka je pokazao prilično ravnomerno opadanje sa vremenom čuvanja i povećanjem stepena razređenja. Tako je, posle 24h čuvanja, u razređenju 1:2, bilo 77% ovih uzora, dok ih je

posle 72h, u istom razređenju, bilo skoro duplo manje (37%), a u razređenju 1:4 ih je bilo samo 25% (Grafikon 18).



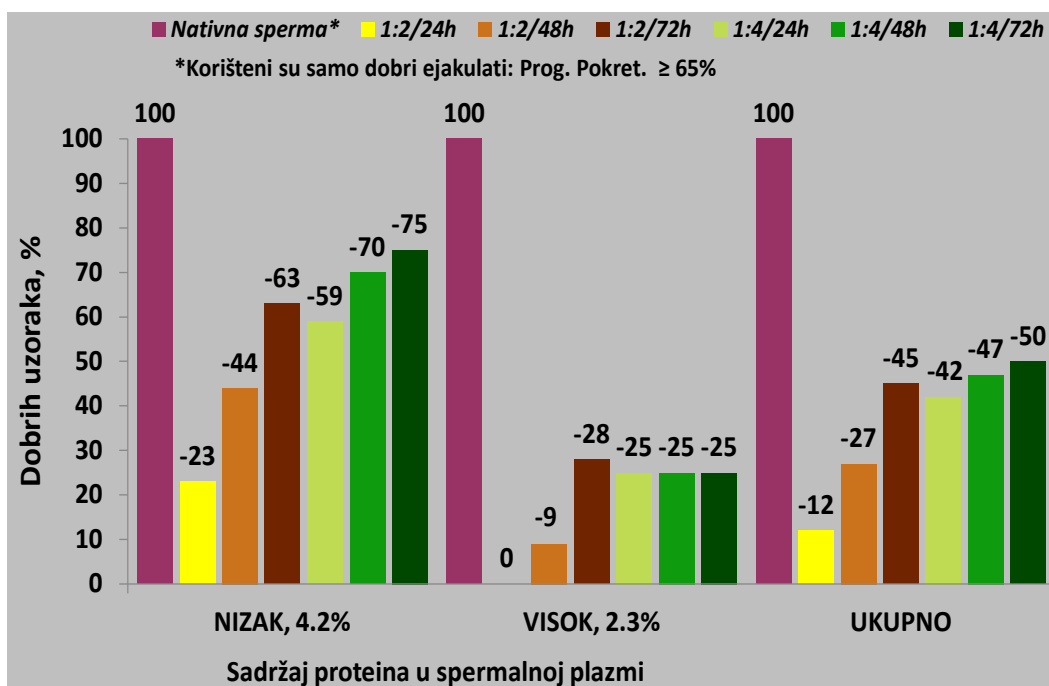
Grafikon 18. Broj (%) dobrih uzoraka razređene sperme, od ejakulata sa visokim i niskim sadržajem proteina, zavisno od stepena razređenja i vremena čuvanja



Grafikon 19. Procentualno smanjenje progresivne pokretljivosti dobrih uzoraka razređene sperme, u odnosu na progresivnu pokretljivost dobrih uzoraka native sperme, uzeta kao referentna vrednost – 100%

U odnosu na progresivnu pokretljivost dobrih ejakulata (100%), postoji znatna i ujednačena tendencija procentualnog opadanja progresivne pokretljivosti uzoraka razređene sperme, sa povećanjem stepena razređenja i vremena čuvanja, kako kod uzoraka od ejakulata sa visokim (od -4 do -14%), tako i kod uzoraka od ejakulata sa niskim sadržajem proteina (od -5% do -21%). Pri tome je ovaj pad uočljivo veći kod uzoraka od ejakulata sa niskim sadržajem proteina u spermalnoj plazmi (Grafikon 20).

Procentualno opadanje broja dobrih uzoraka razređene sperme, u odnosu na ovu vrednost kod ejakulata pre razređenja, koja je uzeta kao 100%, uočljivo je veće kod uzoraka sa niskim, u odnosu na uzorke sa visokim sadržajem proteina. Naime, broj dobrih uzoraka sperme sa niskim sadržajem proteina, čuvanih 24h u razređenju 1:2, opao je za 23%, a posle 72h čuvanja u razređenju 1:4, ovaj broj je opao za 75%, u odnosu na broj dobrih uzoraka neposredno pre razređenja.



Grafikon 20. Procentualno smanjenje broja (%) dobrih uzoraka razređene sperme, u odnosu na broj (%) dobrih uzoraka native sperme (ejakulata), uzet kao referentna vrednost – 100%

Međutim, trend opadanja broja dobrih uzoraka sa visokim sadržajem proteina je znatno blaži. Tako je broj dobrih uzoraka posle 24h čuvanja u razređenju 1:2 bio isti kao i broj dobrih uzoraka pre razređenja, da bi se smanjio za 28% posle 72h čuvanja u ovom razređenju. Tokom 24h, 48h i 72h čuvanja u razređenju 1:4, broj dobrih uzoraka je opao za 25% u odnosu na broj dobrih uzoraka pre razređenja (Grafikon 20).

Uticaj sadržaja proteina na citološke osobine spermatozoida

U tabeleli 50 je prikazan uticaj različitog sadržaja proteina u spermalnoj plazmi, na stepen oštećenja ćelijske membrane spermatozoida, hromozoma i akrozoma, posle 72h čuvanja sperme razređene u odnosu 1:4. Ove vrednosti su određene metodom protočne citometrije.

Broj živih spermatozoida, neposredno po razređenju uzorka nativnog ejakulata, sa visokim sadržajem proteina, iznosio je 78% od ukupnog broja spermatozoida, dok je ova vrednost bila niža (75%) u uzorcima od ejakulata sa niskim sadržajem proteina. Ove vrednosti su bile statistički značajno različite ($P < 0.01$). Međutim, ove vrednosti su bile značajno ($P < 0.01$) niže posle 72h čuvanja, kako kod uzoraka iz ejakulata sa visokim sadržajem proteina (66%), tako i kod uzorka iz ejakulata sa visokim sadržajem proteina (44%). Značajno ($P < 0.01$) povećanje (0h prema 72h) broja spermatozoida sa oštećenom ćelijskom membranom (sa 11% na 19%), spermatozoida sa oštećenim hromozomima (sa 6% na 13%) i ukupnog broja spermatozoida sa oštećenim akrozomom (sa 18% na 29%), ustanovljeno je kod uzoraka iz ejakulata sa visokim sadržajem proteina (Tabela 50).

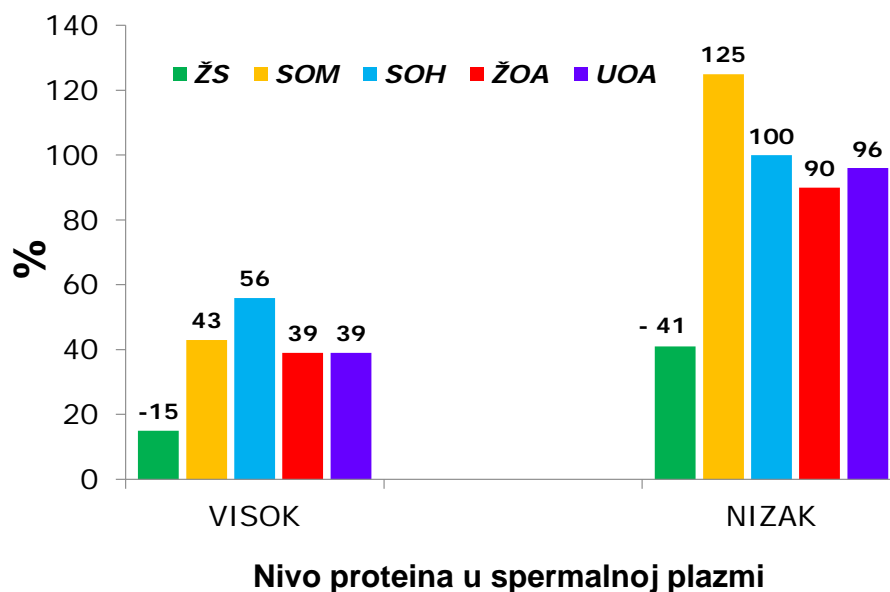
Tabela 50. Status ćelijske membrane spermatozoida, akrozoma i hromozoma, u spermi čuvanoj tokom 72 sata, u razređenju 1:4 ($\bar{x} \pm SD$)

	Sadržaj proteina u spermalnoj plazmi			
	Vreme čuvanja razređene sperme			
	VISOK (4.1%)		NIZAK (2.2%)	
	0h	72h	0h	72h
Ukupno ispitanih nerastova	4		4	
Ejakultata po nerastu	8		8	
Ukupno ispitanih ejakulata	32		32	
Živih spermatozoida - ŽS (%)	78.4 ^{AX} (71-90)	66 ± 6.2 ^{BZ} (46-77)	75 ± 4.1 ^{AY} (67-85)	44 ± 2.0 ^{BI} (33-58)
Spermatozoida sa oštećenom ćelijskom membranom - SOM (%)	11 ± 2.5 ^{Ax} (6-19)	19 ± 6.2 ^{BZ} (10-41)	12 ± 2.0 ^{Ax} (9-17)	27 ± 7.0 ^{BI} (15-44)
Spermatozoida sa oštećenim hromozomima - SOH (%)	6 ± 2.8 ^{AX} (2-12)	13 ± 5.3 ^{BZ} (4-25)	11 ± 4.8 ^{AY} (2-19)	22 ± 13.4 ^{BI} (10-84)
Živih spermatozoida sa oštećenim akrozomom - ŽOA (%)	9 ± 1.9 ^{Ax} (5-12)	15 ± 2.4 ^{BX} (10-20)	11 ± 3.9 ^{Ay} (5-21)	21 ± 6.5 ^{BY} (12-39)
Ukupno spermatozoida sa oštećenim akrozomom - UOA (%)	18 ± 3.3 ^{AX} (12-27)	29 ± 5.8 ^{BZ} (19-40)	23 ± 3.8 ^{AY} (15-30)	45 ± 9.1 ^{BI} (29-66)

^{ABab}Vrednosti sa različitim superskriptima, unutar istog reda, za isti sadržaj proteina, značajno se razlikuju (^{AB} $P < 0.01$; ^{ab} $P < 0.05$); ^{XYxy}Vrednosti sa različitim superskriptima, za različite sadržaje proteina i period čuvanja 0h, značajno se razlikuju (^{XY} $P < 0.01$; ^{xy} $P < 0.05$); ^{ZzIi}Vrednosti sa različitim superskriptima, za različite sadržaje proteina i period čuvanja 0h, značajno se razlikuju (^{ZI} $P < 0.01$; ^{xi} $P < 0.05$).

Značajno povećanje ovih vrednosti je ustanovljeno i kod uzoraka iz ejakulata sa niskim sadržajem proteina, ali je stepen tog povećanja, u odnosu na uzorke iz ejakulata sa visokim sadržajem proteina bio veći. Tako je, u odnosu na 0h, posle 72h čuvanja, broj spermatozoida sa oštećenom ćelijskom membranom povećan sa 12% na 27%, spermatozoida sa oštećenim hromozomima sa 11 na 22%, dok je ukupnog broja spermatozoida sa oštećenim akrozomom povećan sa 23% na 45% (Tabela 50 i Grafikon 21).

U odnosu na vrednosti ustanovljene neposredno posle razređenja, posle 72 sata čuvanja na 17°C, vrednosti svih ispitivanih parametara su bile znatno niže u uzorcima sa visokim od uzoraka sa niskim sadržajem proteina (Grafikon 21).



Grafikon 21. Procentualno smanjenje/povećanje vrednosti parametara kvaliteta spermatozoida, posle 72h čuvanja, u odnosu na ove vrednosti neposredno pre razređenja (0h)

ŽS - Živi spermatozoidi; SOM - spermatozoidi sa oštećenom ćelijskom membranom; SOH - Spermatozoidi sa oštećenim hromozomima; ŽAO - Živi spermatozoidi sa oštećenim akrozomom; UAO - Ukupno spermatozoida sa oštećenim akrozomom.

Tako je broj živih spermatozoida, u uzorcima sa visokim u odnosu na one sa niskim sadržajem proteina, bio manji za 26% (-15% prema -41%), broj spermatozoida sa oštećenom ćelijskom membranom je bio manji za 82% (43% prema 125%), broj spermatozoida sa oštećenim hromozomima je bio manji za 44% (56% prema 100%), broj živih spermatozoida sa oštećenim akrozomom je bio manji za 51% (39% prema 90%), dok je ukupan broj spermatozoida sa oštećenim akrozomom bio manji za 60% (39% prema 96%) (Grafikon 21).

5.2.3. TREĆI EKSPERIMENT

Uticaj homologne spermalne plazme na progresivnu pokretljivost razređene sperme

Cilj je bio da se ustanovi da li je moguće povećati fertilizacioni potencijal spermatozoida iz ejakulata sa niskim sadržajem proteina, dodavanjem spermalne plazme izdvojene iz ejakulata sa visokim sadržajem proteina.

Prosečna progresivna pokretljivost svih ispitivanih uzoraka razređene sperme, sa visokim sadržajem proteina (4%) u sopstvenoj spermalnoj plazmi (autologna sperma), posle 72h čuvanja u razređenju 1:4, iznosila je 64%. Međutim, kada je spermatozoidima izdvojenim iz sperme sa visokim sadržajem proteina, dodata spermalna plazma drugog nerasta (tzv. homologna sperma) sa niskim sadržajem proteina (2%), prosečna progresivna pokretljivost je opala na 55%. Razlika je bila statistički značajna ($P < 0.01$) (Tabela 50). Ovo smanjenje prosečne progresivne pokretljivosti iznosi 18%, ako se vrednost progresivne pokretljivosti autologne sperme uzme kao 100% (Grafikon 21). Obrnuto, prosečna progresivna pokretljivost uzoraka autologne razređene sperme sa niskom sadržajem proteina, posle 72h čuvanja u razređenju 1:4, iznosila je 52%.

Tabela 51. Progresivna pokretljivost (%) svih uzoraka razređene sperme sa autolognom i homolognom spermalnom plazmom ($\bar{x} \pm SD$)

Nivo proteina u ejakulatu iz koga potiču spermatozoidi ili spermalna plazma		Oznaka grupe (broj uzorka)	Progresivna pokretljivost (%)	
Spermatozoidi	Spermalna plazma		Nativna sperma ¹	Razređena sperma ²
Visok ³	Visok ³	VV (32)	82±4.16 ^{AX} (75 - 90)	65±5.87 ^{BX} (50 - 76)
Nizak ³	Nizak ³	NN (32)	76±6.01 ^{AY} (65 - 85)	52±12.03 ^{BZ} (40 - 75)
Visok ⁴	Nizak ⁴	VN (32)	-	55±11.56 ^Y (30 - 70)
Nizak ⁴	Visok ⁴	NV (32)	-	65±6.64 ^W (50 - 80)

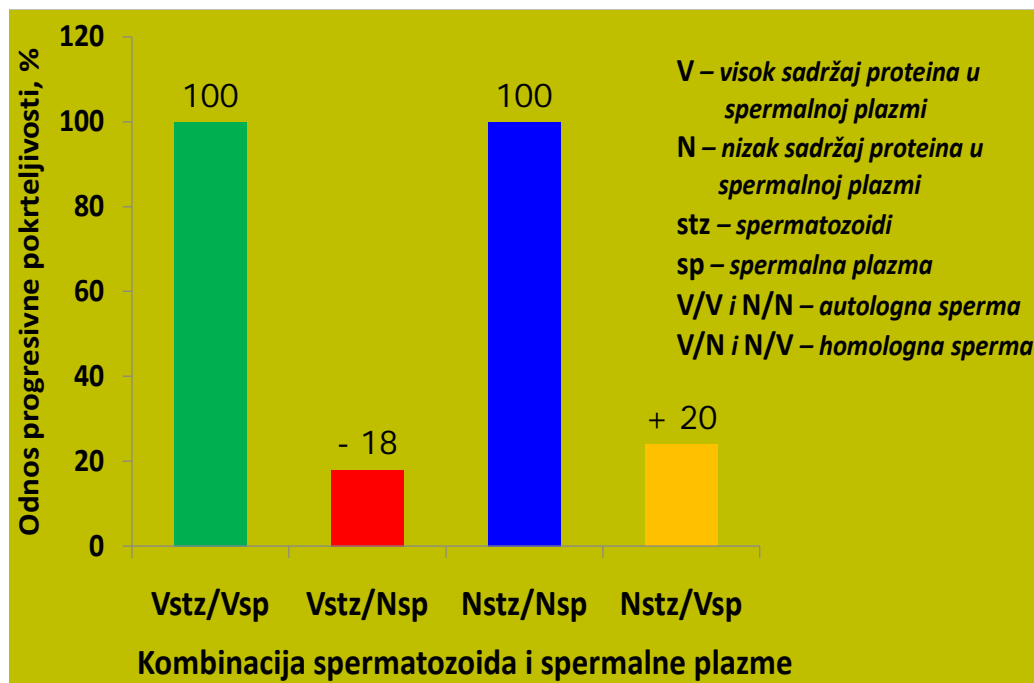
¹Neposredno pre razređivanja; ²Posle 72h čuvanja na +17°C, u razređenju 1:4.

³Autologna (VV i NN) i ⁴Homologna razređena sperma (VN i NV).

U zagradama su minimalne i maksimalne vrednosti.

Vrednosti sa različitim superskriptima se razlikuju (^{AB,XY,ZW} $P < 0.01$; ^{ab,xy,zw} $P < 0.05$).

^{ABab} Unutar istog reda; ^{XYxy,ZWzw} Unutar iste kolone (^{XYxy} za odnos VV/VN; ^{ZWzw} za odnos NN/NV).



Grafikon 22. Procentualno povećanje/smanjenje progresivne pokretljivosti homologne razređene sperme, u odnosu na ovu vrednost kod autologne razređene sperme
(Autologna sperma je uzeta kao referentna vrednost - 100%)

Kada je, međutim, spermatozoidima iz ove sperme dodata spermalna plazma sa visokim sadržajem proteina, njihova prosečna progresivna pokretljivost se povećala na 65%. Razlika je bila statistički značajna ($P < 0.01$) (Tabela 51). Ovo povećanje iznosi 20% (Grafikon 22).

Broj dobrih uzoraka razređene sperme. Progresivnu pokretljivost $\geq 65\%$, posle 72h čuvanja u razređenju 1:4, zadržalo je 75% uzoraka autologne razređene sperme visokim sadržajem proteina. Broj nerastova (3 od 4 ispitivana nerasta) sa ovakvim uzorcima se značajno ($P < 0.01$) smanjio na 50% (2 od 4 nerasta), kada je spermatozoidima dodata homologna spermalna plazma, sa niskim sadržajem proteina. Odnosno, broj dobrih uzoraka se smanjio za 25% u odnosu na broj dobrih uzoraka autologne razređene sperme (Tabela 51).

Sa druge strane, dobri uzorci autologne sperme sa niskim sadržajem proteina, posle 72h čuvanja u razređenju 1:4, ustanovljeni su kod samo jednog od četiri ispitivana nerasta (25%). Međutim, kada je spermatozoidima iz sperme sa niskim sadržajem proteina, dodata homologna spermalna plazma sa visokim sadržajem proteina, broj nerastova sa dobrim uzorcima homologne sperme se značajno ($P < 0.01$) povećao na 75% (3 od 4 nerasta). Odnosno, broj nerastova sa dobrim uzorcima homologne razređene sperme se povećao za 50% u odnosu na broj nerastova sa dobrim uzorcima autologne razređene sperme (Tabela 52).

Tabela 52. Broj i progresivna pokretljivost dobrih* uzoraka razređene sperme sa autolognom i homolognom spermalnom plazmom ($\bar{x} \pm SD$)

Nivo proteina u ejakulatu iz koga potiču spermatozoidi ili spermalna plazma		Dobrih uzoraka			Progresivna pokretljivost ¹ %
Spermatozoidi	Spermalna plazma	Nerastovi n/n	Ispitivani uzorci, n/n	%	
Visok ²	Visok ²	3/4	24/32	75±0.45 ^A	67±2.94 ^a
Nizak ²	Nizak ²	1/4	8/32	25±0.43 ^Y	71±3.20 ^x
Visok ³	Nizak ³	2/4	16/32	50±0.51 ^B	66±2.01 ^a
Nizak ³	Visok ³	3/4	24/32	75±0.45 ^Y	68±4.34 ^x

*Uzorci koji su zadržali $\geq 65\%$ progresivne pokretljivosti, posle 72h čuvanja u razređenju 1:4.

¹Posle 72h čuvanja na +17°C, u razređenju 1:4; ²Autologna i ³Homologna razređena sperma.

U zagradama su minimalne i maksimalne vrednosti.

Vrednosti sa različitim superskriptima se razlikuju (^{AB, XY}P<0.01; ^{ab, xy}P<0.05).

n/n – broj dobrih uzoraka razređene sperme / ukupan broj ispitanih uzoraka.

Prosečna vrednost progresivne pokretljivosti dobrih uzoraka autologne razređene sperme nerastova sa visokim i niskim sadržajem proteina, iznosila je 67% i 71%. Ova vrednost je iznosila 66% kod uzoraka dobijenim mešanjem spermatozoida iz sperme sa visokim sadržajem proteina i spermalne plazme sa niskim sadržajem proteina, odnosno 68% kod obrnute kombinacije mešanja. Dobijene razlike između ovih vrednosti nisu bile statistički značajna (P>0.05) (Tabela 52).

5.2.4. ČETVRTI EKSPERIMENT

A. Fertilitet krmača posle intracervikalnog ili postcervikalnog osemenjavanja

Vrednost prašenja krmača osemenjenih intracervikalno ili intrauterino, inseminacionim dozama različitog volumena i broja spermatozoida, prikazana je u tabeli 53.

Najniža vrednost prašenja (66.7%), postignuta je posle intracervikalne inseminacije, dozom duplo redukovanog volumena (50 ml) i broja spermatozoida (2×10^9), u poređenju sa svim ostalim vrednostima (P<0.05).

Tabela 53. Uticaj metode inseminacije, volumena i broja spermatozoida u dozi na vrednost prašenja ($\bar{x} \pm SD$)

Parametri inseminacione doze		Vrednost prašenja (%) ¹	
Volumen (ml)	Prog. pokr. sptz. po dozi (n)	Intracervikalna inseminacija*	Intrauterina inseminacija**
50	2×10^9	66.7±0.48 ^{acx} (20/30)	76.7±0.41 ^{bx} (23/30)
	4×10^9	73.3±0.45 ^{axy} (22/30)	83.3±0.38 ^{bdx} (25/30)
100	2×10^9	76.7±0.43 ^{adxy} (23/30)	83.3±0.38 ^{adx} (25/30)
	4×10^9	83.3±0.38 ^{ady} (25/30)	86.7±0.35 ^{adx} (26/30)

*Klasična doza = 100 ml sa 4×10^9 sptz; *Uobičajena doza = 50 ml sa 1 do 2×10^9 sptz.

¹Vrednosti u zagradama = broj oprašenih / broj osemenjenih.

Vrednost sa različitim superskriptima, unutar istog reda, značajno su različite (^{A,B}P<0.01; ^{a,b}P<0.05).

Vrednost sa različitim superskriptima, između različitih redova i kolona, značajno su različite (^{C,D}P<0.01; ^{c,d}P<0.05).

Vrednost sa različitim superskriptima, u istoj koloni, su značajno različite (^{X,Y}P<0.01; ^{x,y}P<0.05).

Unutar intracervikalne metode, najviša vrednost prašenja (83.3%) postignuta je posle inseminacije dozama klasičnog volumena (100 ml) i broja spermatozoida (4×10^9), a najniža (66.7%), posle inseminacije dozama duplo redukovano volumena (50 ml) i broja spermatozoida (2×10^9) (P<0.05). Prosečne vrednosti prašenja, posle intracervikalne inseminacije dozama volumena 100 ml sa 4×10^9 spermatozoida (83.3%) ili sa 2×10^9 (76.7%), kao i dozama duplo redukovano volumena (50 ml) sa 4×10^9 spermatozoida (73.35), nisu se statistički značajno razlikovale (P>0.05). Postignute vrednosti prašenja, posle intrauterine inseminacije, nisu bile međusobno statistički značajno različite (P>0.05), a kretale su se između 76.7% posle inseminacije dozama volumena 50 ml sa 2×10^9 spermatozoida, i 86.7% posle inseminacije dozama volumena 100 ml sa 4×10^9 spermatozoida (Tabela 53).

Ako se izvrši poređenje postignutih vrednosti prašenja između primenjenih metoda inseminacije, onda se vidi da su ove vrednosti statistički značajno (P<0.05) veće posle intrauterinog osemenjavanja dozama redukovano volumena (50 ml) sa 2×10^9 (76.7%) i sa 4×10^9 spermatozoida (83.3%), u poređenju sa klasičnim, intracervikalnim, osemenjavanjem dozama istog volumena i broja spermatozoida (66.7% i 73.3%). Međutim, vrednost prašenja, posle osemenjavanja dozama volumena 100 ml, sa 2×10^9 ili sa 4×10^9 spermatozoida, nije se značajno razlikovalo (P>0.05) između intracervikalne (76.7% i 83.3%) i intrauterine metode (83.3% i 86.7%) (Tabela 53).

Prosečan broj prasadi po leglu, kod krmača osemenjenih intracervikalno ili intrauterino, inseminacionim dozama različitog volumena i broja spermatozoida, prikazan je u tabeli 54.

Tabela 54. Uticaj metode inseminacije, volumena i broja spermatozoida u dozi na veličinu legla kod prašenja ($\bar{x} \pm SD$)

Parametri inseminacione doze		Prosečan broj prasadi po leglu					
		Intracervikalna inseminacija			Intrauterina inseminacija		
Volumen	Prog. pokr. sptz. u dozi (n)	živih	mrtvih	ukupno	živih	mrtvih	ukupno
50 ml	2×10^9	9.85 $\pm 4.87^{acx}$	0.50	10.35 $\pm 5.13^{ax}$	10.82 $\pm 4.56^{bcx}$	0.48	11.30 $\pm 4.78^{bx}$
	4×10^9	10.27 $\pm 4.71^{adx}$	0.50	10.77 $\pm 4.98^{ax}$	10.04 $\pm 4.48^{ay}$	0.44	10.48 $\pm 4.76^{ax}$
100 ml	2×10^9	10.17 $\pm 4.51^{adx}$	0.52	10.70 $\pm 4.76^{ax}$	10.25 $\pm 4.19^{ay}$	0.64	11.16 $\pm 4.47^{ax}$
	4×10^9	10.16 $\pm 4.13^{adx}$	0.48	10.64 $\pm 4.36^{ax}$	10.31 $\pm 3.86^{ady}$	0.54	10.85 $\pm 4.11^{ax}$

Vrednost sa različitim superskriptima, unutar istog reda, su značajno različite ($^{A,B}P < 0.01$; $^{a,b}P < 0.05$).
 Vrednost sa različitim superskriptima, unutar iste kolone, su značajno različite ($^{X,Y}P < 0.01$; $^{x,y}P < 0.05$).
 Vrednost sa različitim superskriptima, između metoda inseminacije, su značajno različite ($^{C,D}P < 0.01$; $^{c,d}P < 0.05$).

Najmanji prosečan broj živo rođene prasadi po leglu (9.85), dobijen je posle intracervikalnog osemenjavanja dozama redukovano volumena (50 ml) i broja spermatozoida (2×10^9). Međutim, ovaj broj živo rođene prasadi je bio statistički značajno manji ($P < 0.05$) samo od broja živo rođene prasadi po leglu posle intrauterinog osemenjavanja dozama duplo redukovano volumena i broja spermatozoida (10.82) i klasičnim dozama volumena 100 ml sa 4×10^9 spermatozoida (10.31). Najveći prosečan broj živo rođene prasadi po leglu, ostvaren je posle intrauterinog osemenjavanja dozama volumena 50 ml sa 2×10^9 spermatozoida (10.82). Ovaj broj živo rođene prasadi po leglu je bio statistički značajno ($P < 0.05$) veći od svih ostalih vrednosti, dobijenih primenom metode intrauterine inseminacije (10.04, 10.25 i 10.31), kao i od svih vrednosti dobijenih posle osemenjavanja klasičnom intracervikalnom metodom (9.85, 10.27, 10.17 i 10.16) (Tabela 54).

I prosečan broj ukupno rođene prasadi po leglu je bio najveći (11.30), posle intrauterinog osemenjavanja. Ova vrednost se značajno ($P < 0.05$) razlikovala od ostalih vrednosti dobijenih posle intrauterinog osemenjavanja, kao i od prosečnog broja ukupno rođene prasadi posle intracervikalnog osemenjavanja dozama duplo redukovano volumena (50 ml) i broja spermatozoida (2×10^9) (10.35). Ukupan broj rođene prasadi po leglu, nije se značajno ($P > 0.05$) razlikovao u zavisnosti od volumena doze i broja spermatozoida u dozi, kada je primenjena metoda klasičnog intracervikalnog osemenjavanja (10.35, 10.77, 10.70 i 10.64) (Tabela 54).

B. Fertilitet krmača osemenjenih intracervikalno sa infuzijom native spermalne plazme

Transcervikalna intrauterina infuzija 30 ml spermalne plazme, neposredno pre aplikacije konvencionalne VO doze, proizvela je veću vrednost prašenja (97%, 92% i 93%) na sve tri ispitivane farme, u poređenju sa kontrolnim krmačama (84%, 80% i 86%). Razlike ovih vrednosti između tretiranih i kontrolnih krmača, međutim, nisu bile statistički značajne ($P>0.05$) (Tabela 55).

Tabela 55. Uticaj infuzije spermalne plazme, na vrednost prašenja kod intracervikalne inseminacije* ($\bar{x} \pm SD$)

Farma	Grupa	Broj krmača	Vrednost prašenja (%) ¹	Vrednost povadanja (%)			
				regularnog ²		neregularnog ³	
				a	b	a	b
A Pobeda	Ogledna	31	96.8±0.18 ^a (30/31)	-	-	3.2 (1/31)	100.0 (1/1)
	Kontrolna	31	83.91±0.37 ^a (26/31)	9.7 (3/31)	60.0 (3/5)	6.4 (2/31)	40.0 (2/5)
B Voganj	Ogledna	40	92.5±0.26 ^a (37/40)	-	-	7.5 (3/40)	100.0 (3/3)
	Kontrolna	40	80.0±0.35 ^a (32/40)	15.0 (6/40)	75.0 (6/8)	5.0 (2/40)	25.0 (2/8)
C Temerin	Ogledna	43	93.02±0.27 ^a (40/43)	2.32 (1/43)	33.33 (1/3)	4.65 (2/43)	66.66 (2/3)
	Kontrolna	43	86.05±0.40 ^a (37/43)	4.65 (2/43)	33.33(2/6)	9.30 (4/43)	66.66 (4/6)
Ukupno	Ogledna	114	93.8±0.24 ^a (107/114)	0.88 (1/114)	14.28 (1/7)	5.28 (6/114)	85.72 (6/7)
	Kontrolna	114	83.33±0.37 ^b (95/114)	9.65 (11/114)	57.89 (11/19)	7.01 (8/114)	42.11 (8/19)

*Spermalna plazma je aplikovana neposredno pre aplikacije inseminacione doze.

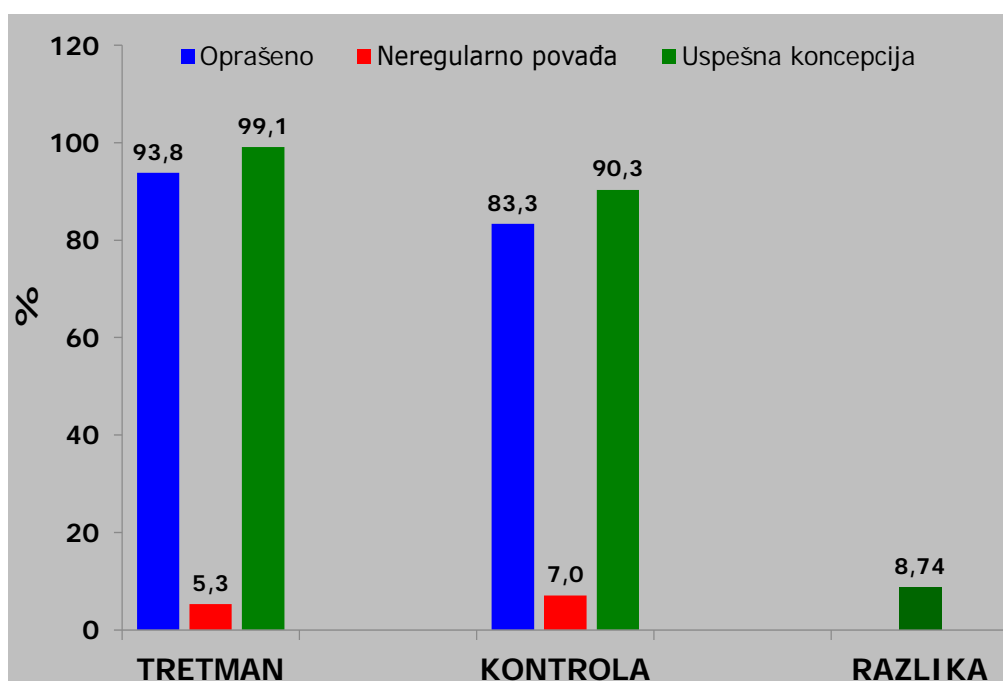
Ogledna: 30 ml spermalne plazme* + VO doza (80 ml / 4×10^9); Kontrolna: VO doza (80 ml / 4×10^9).

¹U zagradama: broj oprušenih / broj osemenjenih krmača.

Vrednost sa različitim superskriptima, u istoj koloni i za istu farmu, su značajno različite (^{AB} $P<0.01$; ^{ab} $P<0.05$); ²Interval VO-povadanje = ≤ 24 dana i 36 do 48 dana; ³Interval VO-povadanje = 25 do 35 dana i ≥ 49 dana; a - od broja osemenjenih krmača; b - od broja povadalih krmača.

Posmatrajući ukupan broj tretiranih (n=114) i kontrolnih (n=114) krmača, pokazalo se da je postignuta vrednost prašenja, posle tretman krmača infuzijom spermalne plazme (94%), bila statistički značajno ($P<0.05$) veća, u poređenju sa kontrolnim, netretiranim krmačama (83%).

Neregularnih povađanja, koja ukazuju da je gravidnost bila uspostavljena, ali je prekinuta zbog nekog razloga infektivne ili neinfektivne etiologije, 5.3% od osemenjenih tretiranih i 7% od osemenjenih kontrolnih krmača. Ovo znači da se vrednost uspešne koncepcije povećava na 99% kod krmača tretiranih infuzijom spermalne plazme in a 90% kod kontrolnih krmača (Grafikon 23).



Grafikon 23. Vrednost uspešne koncepcije kod krmača tretiranih spermalnom plazmom i kod kontrolnih krmača

Prosečan broj živo rođene prasadi po leglu, bio je visoko značajno ($P<0.01$) veći kod krmača tretiranih infuzijom spermalne plazme, na farmama A i B (12.5 i 12.2 prasadi) i signifikantno veći ($P<0.05$) na farmi C (12.2 prasadi), u poređenju sa kontrolnim krmačama (10.2 i 10.5 prasadi na farmama A i B, a 10.6 prasadi na farmi C). I ukupno, na sve tri farme, broj živo rođene prasadi je bio visoko značajno ($P<0.01$) veći kod krmača tretiranih infuzijom spermalne plazme (12.3 prasadi), od broja živo rođene prasadi po leglu (10.5 prasadi) kod kontrolnih krmača (Tabela 56).

Tabela 56. Uticaj infuzije spermalne plazme, na veličinu legla kod prašenja ($\bar{x} \pm SD$)

Farma	Grupa	Oprašeno krmača (n)	Prosečan broj prasadi po leglu		
			živih	mrtvih	ukupno
A Pobeda	Ogledna	30	12.50±1.33 ^A	0.73 ^a	13.20
	Kontrolna	27	10.23±0.71 ^B	0.61 ^a	10.84
B Voganj	Ogledna	37	12.19±3.22 ^A	0.70 ^a	12.89
	Kontrolna	32	10.53±1.64 ^B	0.94 ^a	11.47
C Temerin	Ogledna	40	12.17±2.37 ^a	0.70 ^a	12.87
	Kontrolna	37	10.62±1.95 ^b	0.94 ^a	11.56
Ukupno	Ogledna	107	12,27±2.49 ^A	0.71 ^a	12.98
	Kontrolna	96	10.48±1.56 ^B	0.85 ^a	11.33

Vrednost sa različitim superskriptima, u istoj koloni, su značajno različite (^{A,B,X,Y}P<0.01; ^{a,b,x,y}P<0.05); ^{A,B,a,b} Unutar iste farme; ^{X,Y,x,y} Između farmi.

Broj mrtvo rođene prasadi se kretao od 0.61 do 0.94 i nije bio značajno ($P>0.05$) različit kod tretiranih i kontrolnih krmača, kako unutar, tako i između ispitivanih farmi, kao i između ukupnog broja tretiranih i kontrolnih krmača (Tabela 56).

**CITOMORFOLOŠKE ANOMALIJE SPERMATOZOIDA,
POSLE ČUVANJA 72 SATA U RAZREĐENJU 1 : 4**
(Originalne fotografije)

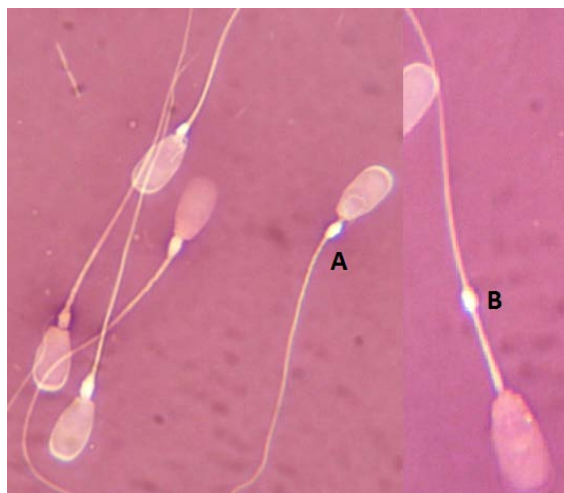
A. MORFOLOŠKE ANOMALIJE



Slika 9. Normalni spermatozoidi nerasta



Slika 10. Živi i mrtvi (*crvena glava*) spermat.



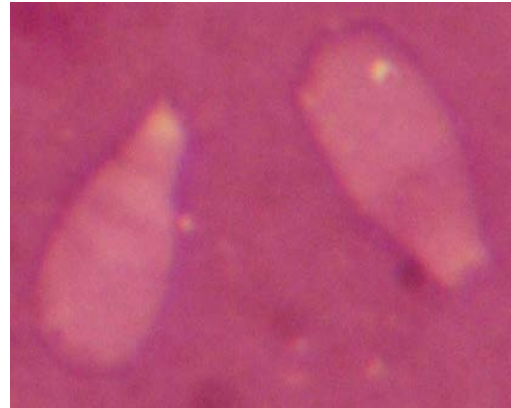
Slika 11. Proksimalna (A) i distalna (B) citoplasmatska kap



Slika 12. Prelomljen rep i oštećen akrozom (*strelica*)



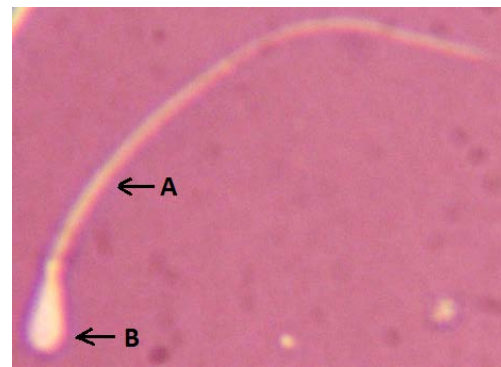
Slika 13. Uvrnut rep spermatozoida



Slika 14. Glave bez repa spermatozoida



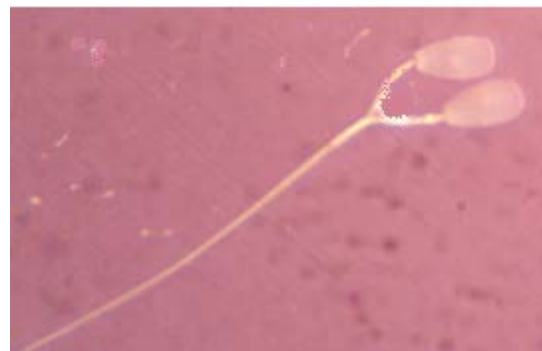
Slika 15. Odvojena glava od repa



Slika 16. Dezintegracija membrane (A) i mala glava spermatozoida (B)

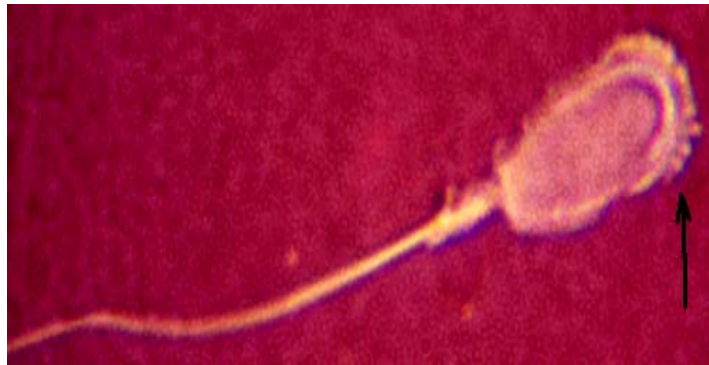


Slika 17. Mala (loptasta) glava (*strelica*)

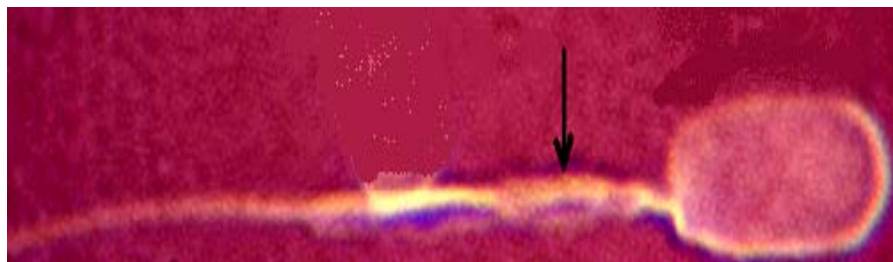


Slika 18. Spermatozoid sa dve glave

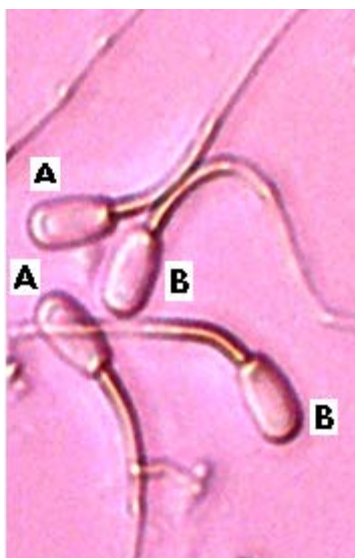
B. CITOLOŠKE ANOMALIJE



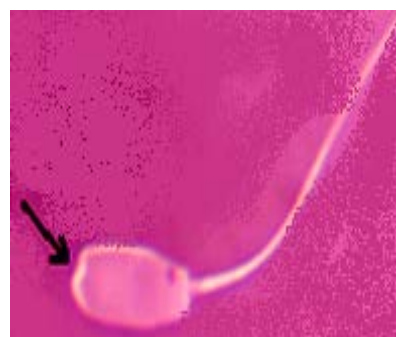
Slika 19. Dezintegracija akrozoma (strelica)



Slika 20. Dezintegracija ćelijske membrane repa spermatozoida (strelica)



Slika 21. Odvojen akrozom (A) i normalni spermat. (B)



Slika 22. Oštećen akrozom (strelica)

6. DISKUSIJA

Potrošnja svinjskog mesa u svetu zauzima prvo mesto, sa 37% od ukupne potrošnje mesa ostalih vrsta domaćih životinja. Tako, *McGlone (2013)* navodi podatke FAO da je, u 2012. godini, potrošnja svinjskog mesa iznosila 110 miliona metričkih tona (mmt), ispred potrošnje pilećeg (104 mmt), goveđeg (67 mmt) i ovčijeg (14 mmt) mesa. Neke analize pokazuju da proizvodnja svinjskog mesa, u 2014. godini, može dostići 115.5 mmt (*FAO, 2014*). Pre svega, zbog sve intenzivnijeg povećanja broja ljudi u svetskoj populaciji, rast proizvodnje svinjskog mesa će se nastaviti i, prema nekim analizama, pretpostavlja se da će biti udvostručena za sledećih 30 do 50 godina (*McGlone, 2013*).

Danas je opšte prihvaćeno mišljenje da se značajno povećanje proizvodnje svinjskog mesa, pre svega, može postići intenzivnim genetskim poboljšanjem ekonomski važnih produktivnih osobina svinja, kao što su veći dnevni prirast, povećana efikasnost konverzije hrane, tj. smanjenje potrebne količine hrane za kilogram prirasta, povećanje parametara reproduktivne efikasnosti nerastova i krmača, kao i povećana otpornost životinja na različite stresogene i zarazne bolesti (*See, 2002; Pierzchala i sar., 2006; Maes i sar., 2008; Shirali, 2014*). Za postizanje ovog cilja, nezaobilaznu i veoma važnu ulogu ima visok stepen reproduktivnog iskorištavanja genetski superiornih nerastova, kao i postizanje visokih vrednosti fertiliteta (% prašenja i broj živo rođene i zalučene prasadi po leglu) veštački osemenjenih krmača (*Smital, 2009; Stančić i Dragin, 2011; Heise, 2012; Khalifa i sar., 2014*). U ovom pogledu je važno istaći da nerastovi imaju mnogostruko veći uticaj na genetsko unapređenje zapata od krmača (*Robinson and Buhr, 2005; Smital, 2009*). Naime, u tehnologiji konvencionalnog (intracervikalnog) veštačkog osemenjavanja (VO), sa prosečno 1200 inseminacionih doza od jednog nerasta, godišnje se može osemeniti oko 240 krmača, odnosno dobiti 2400 do 2900 živo rođene prasadi sa novim genetskim osobinama. Dok se, od jedne krmače, godišnje može dobiti 20 do 25 živo rođene prasadi (*Gerrits i sar., 2005; Stančić i sar., 2006; Maes i sar., 2011; Radović i sar., 2011; Broekhuijse i sar., 2012; Maletić, 2012*). Međutim, u savremenoj intenzivnoj proizvodnji svinja, sve se češće ističe problem nedovoljno brzog dobijanja potrebnog broja jedinki sa novim (poboljšanim) ekonomski i zootehnoški važnim produktivnim osobinama. Kao osnovni razlozi se ističu: (a) nedovoljna efikasnost reproduktivnog iskorištavanja genetski superiornih nerastova (*Singleton, 2001; Stančić i sar., 2009; Khalifa i sar., 2014*) i (b) sve češća pojava niže vrednosti fertiliteta veštački, u odnosu na prirodno osemenjene krmače (*Spronk i sar., 1997; Stančić, 2000; Gadea, 2003; Zvekić, 2003; Alm i sar., 2006*).

Nedovoljna efikasnost reproduktivnog iskorištavanja genetski superiornih nerastova je, pre svega, posledica malog broja proizvedenih inseminacionih doza po nerastu godišnje. Naime, u klasičnoj tehnologiji intracervikalnog VO, koja se koristi u 99% slučajeva intenzivne proizvodnje razvijenih zemalja, od jednog ejakulata se, dobija 21 do 23 inseminacione doze, odnosno oko 1200 doza po nerastu godišnje (*Singleton, 2001*;

Almin i sar., 2006). Ovim brojem doza se, godišnje, može osemeniti oko 240 krmača i dobiti oko 2400-2900 živo rođene prasadi. To ne obezbeđuje dovoljan broj potomaka sa novim ili poboljšanim genetskim osobinama, odnosno ne obezbeđuje dovoljno brz genetski napredak u povećanju proizvodnje svinjskog mesa (*See, 2012; McGlone, 2013; Shirali, 2014*). Sa druge strane, niža vrednost parametara fertiliteta (% prašenja i prosečan broj živo rođene prasadi u leglu), takođe značajno smanjuju broj proizvedenih potomaka sa novim ili poboljšanim produktivnim osobinama. Broj inseminacionih doza po ejakulatu, direktno je ograničen parametrima ejakulata (volumen, koncentracija spermatozoida u 1ml ejakulata, te broj progresivno pokretnih i morfološki normalnih spermatozoida), sa jedne i parametrima VO doze (volumen i broj progresivno pokretnih spermatozoida), sa druge strane (*Stančić, 2006*). U savremenoj konvencionalnoj tehnologiji intracervikalnog VO, koriste se doze tečne razređene sperme, volumena 80 ml do 100 ml, sa 3×10^9 do 6×10^9 spermatozoida (prosečno 4×10^9) (*Rutten i sar., 2000; Singleton, 2001; Almin i sar., 2006; Stančić i sar., 2009; Maes i sar., 2011; Heise, 2012*).

Povećanje broja inseminacionih doza istog volumena i broja spermatozoida, zahteva značajnije povećanje stepena razređenja ejakulata (tj. dodavanje veće količine rezređivača u nativnu spermu). Prekomerno razređenje ejakulata ima za posledicu značajno smanjenje fertilizacionog kapaciteta inseminacione doze (*Waberski i sar., 1994; Rozeboom, 2000; Kommisurd i sar., 2002; Stančić i sar. 2003b; Stančić i sar., 2011; Stančić i sar., 2012*), odnosno smanjen fertilitet krmača osemenjenih takvim dozama (*Spronk i sar., 1997; Stančić, 2000; Gadea, 2003; Zvekić, 2003; Alm i sar., 2006*). Veliki broj istraživanja ukazuje na činjenicu da spermalna plazma (naročito njeni proteini) ima značajan uticaj na stepen progresivne pokretljivosti spermatozoida i održavanje njihove oplodne sposobnosti *in vivo* i *in vitro* (*Waberski i sar., 1994; Stančić, 2002; Kommisrud i sar., 2002; Wolf i Smital, 2009; Nasrini Calogero, 2012*). Osim toga, spermalna plazma ima važnu ulogu u regulaciji i stimulaciji fizioloških funkcija ženskog polnog trakta, važnih za normalan transport, preživljavanje i funkciju spermatozoida *in utero*, kao i za uspešnu oplodnju i rani embrionalni razvoj (*Stančić, 2005; Stančić, 2006; Muiño-Blanco i sar., 2008; Rodriguez-Martinez i sar., 2011; López Rodríguez, 2012; Nasrini Stelletta, 2012*).

U vezi sa navedenim činjenicama, osnovni cilj istraživanja u ovoj doktorskoj disertaciji je bio da se ustanovi: (1) da li i u kojoj meri, sadržaj proteina u spermalnoj plazmi ima uticaja na kvalitet nativne sperme i održavanje zadovoljavajućeg stepena progresivne pokretljivosti spermatozoida u razređenoj spermi, kao i (2) da li aplikacija spermalne palzme, neposredno pre aplikacije VO doze, kod konvencionalne (intracervikalne) inseminacije, može povećati fertilitet osemenjenih krmača.

A. Reproktivna performansa nerastova i krmača u našim proizvodnim uslovima

Primenom konvencionalne tehnologije veštačkog osemenjavanja, spermom jednog nerasta se, godišnje, mogu uneti novi geni kod prosečno 2500 prasadi. Zbog toga je stepen efikasnosti reproduktivnog iskorištavanja genetski superiornih nerastova, od primarnog uticaja na genetsko unapređenje produktivnih osobina svinja u nekom zapatu (*Robinson and Buhr, 2005; Smital, 2009*). Osnovni parametri, kojima se meri stepen

reproduktivnog iskorištavanja nerasta su: frekvencija uzimanja sperme nedeljno, broj inseminacionih doza po ejakulatu, odnosno po nerastu godišnje, starost nerasta na početku reproduktivnog iskorištavanja i period reproduktivnog iskorištavanja. Sa stanovišta upotrebe nerasta u priplodnom zapatu krmača, osnovne mere njegove reproduktivne performanse su broj osemenjenih krmača, broj oprашenih od broja osemenjenih krmača, kao i broj proizvedene živo rođene prasadi godišnje i za ceo period reproduktivnog iskorištavanja (*Singleton i Flowers, 2001; Stančić, 2006*).

Zbog toga su istraživanja u ovoj doktorskoj disertaciji, obuhvatila i analizu reproduktivnog iskorištavanja nerastova, koji se koriste za veštačko osemenjavanje na tri reprezentativne farme intenzivne proizvodnje svinja u AP Vojvodini. Ukupno je ispitano 28 nerastova (po 9 na dve farme i 10 na jednoj farmi), od kojih je sperma uzimana kontinuirano, tokom jedne kalendarske godine. Sumarnim pregledom podataka za sve tri farme, pokazalo se da je sperma uzimana jednom nedeljno, odnosno prosečno svakih 7.2 dana. Dobijeno je prosečno 50.3 ejakulata po nerastu godišnje. Volumen ejakulata je prosečno iznosio 287 ml (od 116 ml do 629 ml). Progresivna pokretljivost se kretala između 60% i 90% (prosečno 77%). Formirano je prosečno 12 VO doza po ejakulatu, sa vrlo širokim variranjem od 4 do 32 VO doze. Po nerastu je godišnje, dobijeno prosečno 611 VO doza, sa dosta širokim variranjem, između 416 i 1019 VO doza. Prosečan stepen razređenja ejakulata je iznosio 1:3.5, sa vrlo velikim variranjem od 1:1 do 1:9. Prosečno je bilo 35.4% ejakulata, koji su razređeni u odnosu $\geq 1:4$ (Tabela 24). Značajno je istaći da, na ispitivanim farmama, nema podataka o koncentraciji spermatozoida u 1 ml ejakulata, o ukupnom broju spermatozoida u ejakulatu, kao ni o broju mrtvih i morfološki abnormalnih spermatozoida u ejakulatu. Zbog toga, nije poznat ni broj spermatozoida u pojedinim inseminacionim dozama. Prosečan volumen ejakulata (287 ml) i prosečna progresivna pokretljivost (77%), su slični vrednostima koji su dobili i drugi autori kod nas i u drugim državama: 256 ml i 77% (*Katanić, 2004*), 280 ml i 75% (*Smital, 2009*), 278 ml i 84% (*Stančić i sar., 2011*), 253 ml i 78% (*Stančić i sar., 2012*), 265 ml i 77% (*Stančić i sar., 2013*), 260 ml i 76% (*Wolf i Smital, 2014*). Prosečna frekvencija uzimanja sperme na ispitivanim farmama (7.2 dan ili jednom nedeljno), kao i prosečan broj ejakulata po nerastu godišnje (50.3), vrlo su slični, praktično isti, kao i oni u drugim državama (1 do 1,2 puta nedeljno) (*Rutten i sar., 2000; Singleton, 2001; Wolf i Smital, 2009; López Rodríguez, 2012; PIC Sires, 2013*). Međutim, prosečan broj formiranih doza po ejakulatu (12 doza), kao i prosečan broj VO doza po nerastu godišnje (611 doza), na tri naše ispitivane farme, praktično je upola manji od ovih vrednosti, koje se dobijaju u drugim državama sa razvijenom industrijskom proizvodnjom svinja. Tako, na primer, *Singleton (2001)* navodi da se u evropskim zemljama, od jednog ejakulata dobija prosečno 21 inseminaciona doza, odnosno 1200 doza po nerastu godišnje. Pri tome, jedna inseminaciona doza je volumena 80 ml razređene sperme, sa prosečno 3×10^9 spermatozoida. *Ruten i sar. (2000)* su ispitivali 1646 nerastova, na nekoliko farmi u SAD i ustanovili da se, od jednog ejakulata, prosečno dobija 27 inseminacionih doza, ili 1404 doze godišnje po nerastu. Doze su bile volumena 80 ml, sa prosečno 3×10^9 fertilnih spermatozoida po dozi. Slične vrednosti ovih parametara navode i drugi autori (*Wolf i Smital, 2009; Frunzã i sar., 2008; Heise, 2012; Khalifa i sar., 2014*).

Istraživanja koja su, u našoj zemlji, izveli *Stančić i sar. (2009)*, pokazuju da se na našim farmama proizvodi prosečno 11 VO doza (između 8 i 13), sa pretpostvakom da se u svakoj dozi nalazi prosečno 5×10^9 progresivno pokretnih spermatozoida. Ovi autori

navode da bi se redukcijom broja spermatozoida u dozi na 4×10^9 , broj doza mogao povećati na 14, dok bi se broj doza mogao povećati na 28, ako bi se broj spermatozoida u dozi smanjio na 2×10^9 . Do sličnih rezultata su, u kasnijim istraživanjima na vojvođanskim farmama, došli *Stančić i sar. (2011)*, *Stančić i sar. (2012)* i *Stančić i sar. (2013)*. Ova redukcija broja spermatozoida u dozi je moguća, jer se pokazalo da, u tehnologiji klasičnog intracervikalnog VO, smanjivanje broja spermatozoida u dozi, do 2×10^9 , nema uticaja na smanjenje fertiliteta krmača, osemenjenih takvim dozama (*Garcia i sar., 2007*; *Stančić i sar., 2010*).

Prema rezultatima kontrole produktivnosti 34.001 umatičenih krmača i 461 umatičena nerasta, koju je izvela Glavna odgajivačka organizacija za AP Vojvodinu, u 2013 godini, prosečan broj živo rođene prasadi po leglu je iznosio 10.83, a mrtvo rođene 0.85. Po leglu je prosečno zalučeno 9.33 prasadi (Tabela 25). Ista odgajivačka organizacija je izvršila i biološki test ukupno 8.726 legala, sa 101.530 prasadi, poreklom od 97 nerastova. Pokazalo se da u leglima 26 nerastova (26.8% od ukupno testiranih), ima prasadi sa anomalijama, kao što su: laka prasad (23.2%), avitalna prasad (66.6%), raskrećena prasad (5.6%) i ostale anomalije (4.6%) (Tabela 26).

Osnovni parametri reproduktivne performanse krmača, u 2013. godini, prikazani su na osnovu izveštaja o kontroli produktivnosti Glavne odgajivačke organizacije za AP Vojvodinu, kao i na osnovu baze reproduktivnih podataka sa ispitivanih farmi.

Prosečan broj prašenja po krmači, u periodu reproduktivnog iskorištavanja, iznosio je 3.6 (od 3.1 do 4.4). Prosečan godišnji indeks prašenja (prosečan broj prašenja po krmači godišnje), iznosio je 2.12 (od 1.8 do 2.3). Prosečna vrednost prašenja (broj oprашenih od broja osemenjenih krmača), kretala se između 72% i 82% (prosečno 78.9%). Prosečan broj živo rođene prasadi po leglu je iznosio 11.95 (od 9.59 do 14.86), mrtvo rođene prasadi je prosečno bilo 0.84 (od 0.54 do 1.25), a ukupan broj prasadi u leglu kod rođenja se kretao između 9.99 i 15.85 (prosečno 12.79). Prosečno je, po leglu, zalučeno 9.74 prasadi (od 8.76 do 11.68). Za svih 34001 kontrolisanih krmača (51 umatičena farma) prosečan broj živo rođene prasadi je bio nešto niži i iznosio je 10.83, dok je prosečno, po leglu, zalučeno 9.33 prasadi (Tabela 27). Kontrola produktivnosti ukupno 13607 nerastovskih majki, za period od 2005. do 2013. godine, pokazuje da je prosečan broj živo rođene prasadi po leglu iznosio 11.21, dok je, po leglu, prosečno zalučeno 9.63 prasadi. Nešto veći prosečan broj živo rođene i zalučene prasadi po leglu, ustanovljen je 2009., 2010. i 2012. godine (Tabela 28).

Reproduktivna efikasnost krmača je važan faktor, koji direktno utiče na intenzitet proizvodnje svinjskog mesa (*Stančić, 2005*; *Varley, 2012*). Broj zalučene prasadi po krmači godišnje je osnovni parametar, kojim se meri reproduktivna efikasnost krmača u jednom zapatu (*Wilson i Dewey, 1994*; *Stančić, 1994*; *Koketsu, 2005*; *Stančić, 2005*; *Tanaka i Koketsu, 2007*). Trajanje jednog reproduktivnog ciklusa (tj. međuprasidbenog intervala), paritetna struktura zapata, trajanje perioda reproduktivnog iskorištavanja krmača (broj prašenja po krmači), prosečan broj živo rođene prasadi i stepen mortaliteta prasadi tokom laktacionog perioda, predstavljaju osnovne faktore koji utiču na broj zalučene prasadi po krmači godišnje (*Koketsu, 2005*; *Stančić, 2005*; *Tanaka i Koketsu, 2007*). Međuprasidbeni interval je određen trajanjem gestacije, laktacije i intervala od zalučnja do fertilnog estrusa. Kako je gestacija biološka konstanta, a trajanje laktacije se, u praksi, može vrlo ograničeno menjati, to trajanje međuprasidbenog intervala može

biti značajno modifikovano variranjem trajanja intervala od zalučenja do prvog, odnosno fertilnog estrusa (*Stančić i sar., 2000; Timotijević, 2001; Stančić, 2005; Koketsu, 2005*). Većina istraživanja jasno pokazuje da krmače sa kratkim intervalom zalučenje - estrus (do 7 dana), imaju veću vrednost (%) prašenja, tj. uspešnog osemenjavanja u prvom postlaktacijskom estrusu (80% do 90%), kao i da rađaju veći broj živo rođene prasadi po leglu (11 do 13), u odnosu na krmače kod kojih je ovaj interval prolongiran (vrednost prašenja 60% do 77%, a broj živo rođene prasadi po leglu 8,5 do 10,5) (*Le Cozler i sar., 1997; Stančić, 1997a; Stančić, 1997b; Borchart Netto, 1998; Jotanović, 2000; Stančić i sar., 2000; Timotijević i sar., 2003*). Zbog toga se, na trajanje jednog reproduktivnog ciklusa, može značajnije uticati biotehnološkim i veterinarsko medicinskim merama, koje mogu skratiti interval od zalučenja do prvog estrusa (IZE), odnosno do fertilnog estrusa (*Stančić i sar., 2000; Timotijević, 2001; Stančić, 2005; Koketsu, 2005*). Poznato je, naime, da na trajanje IZE utiče nekoliko paragenetskih faktora, koji se, manje ili više uspešno, mogu kontrolisati u praktičnoj proizvodnji. Važniji među ovim faktorima su: paritet prašenja (*Timotijević i sar., 2003*), ishrana krmača, posebno tokom laktacije, i trajanje laktacije (*Tubbs, 1990*), godišnja sezona (*Stančić i sar., 2010*), uslovi smeštaja krmača (*Hemsworth, 1982*), tretman egzogenim hormonima (*Stančić i sar., 2010*) i infektivne bolesti, posebno uterusa i vimena, (*Hogg i Levis, 1997; Waller i sar., 2002; Stančić i sar., 2010; Stančić i sar., 2011*). Neka istraživanja pokazuju da postoji mogućnost genetske predispozicije krmača za trajanje intervala zalučenje – estrus (*Hoshino i Koketsu, 2008*). Trajanje intervala od zalučenja do fertilnog estrusa je zbir prosečnog trajanja IZE i prosečnog trajanja intervala od osemenjavanja do povoda, tj. reuspostavljanja estrusa posle neuspešne inseminacije (*Stančić, 2008*). Neuspešna inseminacija je, u praksi, najčešće, posledica greške u tehnologiji inseminacije ili intrauterinog (embrionalnog ili fetalnog) mortaliteta, koji je, u oko 80% slučajeva, infektivne etiologije (*Floss i Tubbs, 1993; Vanroose i sar., 2000; Gagrcin i sar., 2003; Stančić i sar., 2004; Stančić, 2006; Maes i sar., 2008; Stančić i sar., 2010; Stančić i sar., 2011*).

Sledeći od faktora, koji značajno utiče na nivo produkcije prasadi je vrednost (%) prašenja (*Koketsu, 2005; Stančić, 2005*). Ova vrednost treba da se kreće između 85% i 90%, u zapažima visoke reproduktivne efikasnosti (*López i Milling, 2008; Yuong i sar., 2010*). U poslednjih dve do tri decenije, zapaža se stalna tendencija opadanja vrednosti prašenja u svetu (*Spronk i sar., 1997; Gadea, 2003; Alm i sar., 2006; López i Milling, 2008*) i kod nas (*Stančić, 2000; Zvekić, 2003; Stančić i sar., 2010; Stančić i sar., 2011; Maletić, 2012*). Naime, na vojvođanskim farma, 80-ih godina prošlog veka, vrednost prašenja se kretala između 85% i 95% (*Žaja, 1989; Šijačić i sar., 1981; Mišković i sar., 1981*). Međutim, istraživanja, koje su izveli *Stančić i sar. (2011)*, na nekoliko većih vojvođanskih farmi, prosečna vrednost prašenja je iznosila 77% (65% kod prvopraskinja, a 74% do 78% kod krmača viših pariteta prašenja). Do sličnih rezultata je došao i *Maletić (2012)*, na većim farmama u Srbiji, BiH i Hrvatskoj, gde se vrednost prašenja kretala između 73% i 80%.

Broj živo rođene prasadi u leglu zavisi od ovulacione vrednosti u fertilnom estrusu, broja oplodjenih od broja ovuliranih oocita, stepena intrauterinog (prenatalnog) preživljavanje embriona i fetusa, kao i od vrednosti mortaliteta plodova tokom procesa prašenja (*Stančić i sar., 2004; Stančić, 2005; Trujillo-Ortega i sar., 2007*). Broj živo rođene prasadi u leglu, kod savremenih belih rasa svinja, varira između 8.5 i preko 12

prasadi, zavisno od brojnih genetskih i paragenetskih faktora (Todd, 2000; Tummaruk i sar., 2000; Stančić i sar., 2002; Gagrčin i sar., 2002; Radović i sar., 2003; Radović i sar., 2006; Kovičtin i sar., 2006; Kovičtin i sar., 2008; Smith i sar., 2008; Radović i sar., 2010; Stančić i sar., 2011; Radović i sar., 2011). Prosečan broj živo rođene prasadi u razvijenim zemljama EU, je znatno veći: 12.7 (Danska), 12.5 (Francuska), 12.1 (Švedska), 11.9 (Holandija) i 11.2 (Irska) (Pigsys, 2006), od onog koji smo ustanovili u našem istraživanju (10.8). Rezultate slične našima, nalazi i Maletić, (2012). Ovaj autor je, analizom podataka iz više farmi u BiH, Srbiji i Hrvatskoj, ustanovio da se prosečan broj živo rođene prasadi po leglu kreće između 9.4 do 10.6, zavisno od farme i godine istraživanja. Broj zalučene prasadi po leglu, predstavlja razliku između broja živo rođene i uginule prasadi tokom laktacije. I ovaj broj prasadi je niži kod nas, i kreće se između 8.0 i 9.8 (Maletić, 2012), nego u razvijenim zemljama, gde se kreće između 10 i 10.5 (Koketsu, 2007). Mortalitet prasadi tokom laktacije se kreće između 10% i 15% i uzrok je vrlo značajnih ekonomskih gubitaka u intenzivnoj proizvodnji svinja, jer se događa kod preko 60% legala (KilBride i sar., 2012). Najveći broj prasadi uginu zbog ugnječenja, zatim zbog izgladnjivanja, diareje i drugih razloga (Hong i sar., 2006; McManus, 2011; KilBridge i sar., 2012; Apić, 2014).

Istraživanja u ovom radu, kao i rezultati drugih naših autora, pokazuju da su osnovni parametri fertiliteta krmača (% prašenja i broj živo rođene prasadi po leglu), u našoj intenzivnoj proizvodnji svinja, niži za 10% do 20%, u poređenju sa razvijenim evropskim zemljama i SAD. Razlozi za ovo su brojni, ali bi jedan od važnijih mogao biti neadekvatna tehnologija veštačkog osemenjavanja. Naime, istraživanja koja smo izveli u ovoj disertaciji, kao i istraživanja koja su izveli Stančić i sar. (2012), na primer, pokazuju da se na farmama ne vrši brojanje spermatozoida u svakom ejakulatu, niti određivanje broja mrtvih i morfološki abnormalnih spermatozoida. Na taj način, formiraju se doze sa nepoznatim brojem progresivno pokretnih spermatozoida, a stepen razređenja ejakulata se određuje na osnovu broja potrebnih doza od datog nerasta toga dana. To ima za posledicu da se osemenjavanje, često, vrši dozama niskog fertilizacionog potencijala. U prilog ovoj pretpostavci ide i činjenica da istraživanje u ovoj disertaciji, pokazuje da je na tri ispitivane farme, 35% inseminacionih doza bilo formirano od ejakulata različitog volumena, ali razređenih u odnosu 1:4 i više (Tabela 24). Sasvim je moguće da je, među ovim dozama, bilo i onih koje su sadržavale manje od 2×10^9 progresivno pokretnih spermatozoida. Poznato je da upotreba takvih doza značajno smanjuje fertilitet osemenjenih krmača (Garcia i sar., 2007; Stančić i sar., 2010). Osim toga, poznata je i činjenica da prekomerno razređenje ejakulata, takođe, smanjuje fertilizacioni potencijal spermatozoida u tako formiranim dozama (Rozeboom, 2000; Stančić i sar., 2011). I, konačno, istraživanja koja su izveli Weitze, (1990b), u zemljama EU, i Stančić i sar. (2003b), u našoj zemlji, pokazuju da ejakulati svega 20% nerastova dobro tolerišu razređenje 1:4 i više, kao i čuvanje tako dobijenih doza do 72h na temperaturi $+17^{\circ}\text{C}$. S tim u vezi, iako se, na našim farmama, pravi prosečno duplo manji broj inseminacionih doza po ejakulatu (12 doza), u poređenju sa prosečno 21 dozom po ejakulatu u razvijenim evropskim zemljama, to ne znači da su naše VO doze većeg fertilizacionog potencijala, nego, izgleda, obrnuto. Zbog čega je fertilitet krmača u razvijenim zemljama veći nego kod nas, kada je broj inseminacionih doza po ejakulatu skoro duplo veći nego kod nas? Prvo, u ovim zemljama je volumen doze tečne razređene sperme 80 ml, a kod nas 100 ml. Drugo, u evropskim zemljama se, u jednoj dozi nalazi 3×10^9 do 4×10^9 progresivno

pokretnih (fertilizaciono sposobnih) spermatozoida. I, treće, koncentracija spermatozoida u jednom mililitru ejakulata i ukupan broj spermatozoida u ejakulatu su znatno veći kod nerastova u razvijenim evropskim zemljama: 352×10^6 i 98×10^9 (Smital, 2009), odnosno 396×10^6 i 103×10^9 (Wolf i Smital, 2014), u odnosu na ove vrednosti kod naših nerastova, koje se kreću između 204×10^6 i 52×10^9 (Katanić, 2004) i 254×10^6 i 64×10^9 (Stančić i sar., 2012) (Tabela 1). Zbog ovih razloga je moguće napraviti veći broj doza, sa manjim stepenom razređenja ejakulata. Konačno, u razvijenim evropskim zemljama se određuju svi osnovni parametri fertilizacionog kapaciteta ejakulata, pa je moguće lako odrediti koliko VO doza se može napraviti od svakog pojedinačnog ejakulata, odnosno u kom odnosu se može razrediti svaki ejakulat. Time se sigurnije obezbeđuje veći fertilizacioni potencijal inseminacionih doza. Zbog toga je ispitivanje kvaliteta svakog ejakulata, pre njegove upotrebe za veštačko osemenjavanje, apsolutno potrebno (Roseboom, 2000; Knox, 2004; Milovanović i sar., 2012). Ovo je naročito važno kod odabira nerastova visokog fertiliteta, koji će biti upotrebljeni za poboljšanje fertiliteta veštački osemenjenih krmača (Maes i sar., 2011; López Rodríguez, 2012). Tim pre, što razlike u fertilitetu nerastova više zavise od gentskih, nego od paragenetskih faktora (Smital i sar., 2004).

B. Kvalitet native sperme nerastova na ispitivanim farmama

Količina sperme, koju nerast izluči u aktu kopulacije, ili prilikom veštačkog uzimanja sperme, naziva se ejakulat. Volumen ejakulata, koncentracija spermatozoida u 1 ml ejakulata, ukupan broj spermatozoida u ejakulatu, progresivna pokretljivost spermatozoida, broj mrtvih, morfološki abnormalnih i spermatozoida sa proksimalnom ili distalnom citoplazmatskom kapljicom, kao i broj spermatozoida sa oštećenim akrozomom ili ćelijskom membranom, predstavljaju osnovne parametre kojima se meri potencijalni fertilizacioni kapacitet ejakulata (Jovićin, 1991; Popwell i Flowers, 2004; Gadea, 2005; Waberski i sar., 2005; Stančić, 2006; Tsakmakidis i sar., 2010; Maes i sar., 2011; López Rodríguez, 2012). Na parametre ejakulata nerasta utiče veći broj genetskih (rasa, linija, kombinacija ukrštanja, stepen inbreedinga i individua) i paragenetskih (godišnja sezona, starost nerasta i frekvencija uzimanja sperme) faktora (Colenbrander i Kemp, 1990; Gordon, 1997; Singleton i Flowers, 2001; Stančić i sar., 2003a; Smital i sar., 2004; Stančić, 2008; Wolf i Smital, 2009; Lapuste i sar., 2011; Stančić i sar., 2012; López Rodríguez, 2012; Stančić i sar., 2013; Knox, 2013). Neka novija istraživanja (Rodríguez-Martínez i sar., 2011; Dyck i sar., 2011; López Rodríguez, 2012) pokazuju da na parametre fertiliteta ejakulata mogu imati uticaj i neke komponente spermalne plazme, naročito sadržaj proteina.

S tim u vezi, u ovoj doktorskoj disertaciji, izvršena su istraživanja osnovnih parametara kvaliteta ejakulata u zavisnosti od godišnje sezone (hladna i topla), rase nerastova (Švedski Landras, Veliki Jorkšir i Durok, koji se najčešće koriste u intenzivnoj proizvodnji svinja na vojvođanskim farmama), kao i u zavisnosti od sadržaja proteina (visok i nizak) u spermalnoj plazmi.

Godišnja sezona. Prosečan volumen, koncentracija spermatozoida, ukupan broj spermatozoida u ejakulatu i progresivna pokretljivost, iznosili su 274 ml, 229×10^6 /ml, 60×10^9 i 79% u hladnoj sezoni, dok su iste ove vrednosti u toploj sezoni bile statistički visoko značajno ($P < 0.01$) niže, izuzev progresivne pokretljivosti ($P < 0.05$) i iznosile su 218

ml, 208×10^6 /ml, 45×10^9 i 68%. U hladnoj sezoni je bilo 96% dobrih ejakulata (volumen ≥ 120 ml; koncentracija spermatozoida $\geq 200 \times 10^6$ /ml ejakulata; prog. pokret. $\geq 65\%$), dok je u toploj sezoni ovakvih ejakulata bilo statistički vrlo značajno ($P < 0.01$) manje (78%) (Tabela 31). Variranje navedenih parametara, po pojedinim mesecima, je prikazano u grafikonu 4, iz koga se jasno vidi da svi parametri pokazuju najniže vrednosti u toplim mesecima godine. Posebno je značajno istaći vrlo jasan pad vrednosti svih parametara ejakulata, sem volumena ejakulata, u oktobru mesecu. To je posledica negativnog uticaja povišene ambijentalne temperature tokom toplih meseci (naročito jul i avgust), na proces spermatogeneze. Naime, pošto spermatogeneza traje oko 45 dana, a transport spermatozoida kroz epididimis, do rezervoara spermatozoida u repu epididimisa, još oko 15 dana, to se manja koncentracija spermatozoida, niža progresivna pokretljivost, veći broj morfološki abnormalnih i spermatozoida sa proksimalnom citoplazmatskom kapi, mogu naći u ejakulatima oko 2 meseca posle delovanja povišene ambijentalne temperature (Setshell, 1998; Stančić i sar., 2003a; Stančić, 2006).

Godišnja sezona je najznačajniji spoljašnji (paragenetski) faktor, koji utiče na fertilitet nerastova (Ciereszko i sar., 2000; Smital, 2009; Lapuste i sar., 2011; Stančić i sar., 2011; Stančić i sar., 2012; Stančić i sar., 2013; Savić i sar., 2013). Brojna istraživanja, vrlo jasno pokazuju da su parametri kvaliteta sperme nerasta statistički značajno niži tokom toplije, u odnosu na hladniju sezonu godine (Claus i sar., 1985; Colenbrander and Kemp, 1990; Liao et al., 1996; Ciereszko et al., 2000; Stančić et al., 2002; Corcuera i sar., 2002; Stančić et al., 2003a; Sancho i sar., 2004; Kondracki i sar., 2009; Lapuste et al., 2011; Kunowska-Słószarz i Makowska, 2011). Broj fertilnih (progresivno pokretnih) spermatozoida u ejakulatu je najveći u jesen (75×10^9) i zimu (72×10^9), a značajno manji u proleće (68×10^9) i leto (70×10^9) (Smital i sar., 2004). Procent morfološki abnormalnih spermatozoida je značajno niži u hladnoj (19%) u odnosu na toplu sezonu (25%) (Lipensky et al., 2010). Neki istraživači nalaze da se volumen ejakulata ne menja značajno pod uticajem variranja sezonske ambijentalne temperature (Huang i sar., 2000). I broj dobrih ejakulata (progresivna pokretljivost $\geq 65\%$, volumen ejakulata ≥ 120 ml, koncentracija spermatozoida $\geq 200 \times 10^6$ /ml) je značajno veći (86.5%) tokom hladne, a manji tokom tople sezone (73.5%) (Stančić i sar., 2012). Istraživanja naših autora (Stančić et al., 2002; Stančić et al., 2003a; Katanić, 2004; Stančić et al., 2006; Stančić i sar., 2012; Stančić i sar., 2013), takođe, jasno pokazuju značajne razlike u osnovnim parametrima kvaliteta ejakulata (volumen, koncentracija, ukupan broj i progresivna pokretljivost spermatozoida) između tople i hladne godišnje sezone (Tabela 9).

Variranje intenziteta produkcije sperme i vrednosti pojedinih parametara fertilizacionog potencijala (kvaliteta) ejakulata, posledica su značajnog sezonskog variranja dva osnovna faktora: (1) ambijentalne temperature i (2) trajanja dnevnog fotoperioda (Corcuera i sar., 2002; Sancho et al., 2004; Stančić i sar., 2011). Ambijentalna temperatura deluje direktno na proces spermatogeneze. Naime, dobro je poznata činjenica da normalno (fiziološko) odvijanje ovog procesa zahteva da intratestikularna temperatura bude niža za 5°C do 7°C od normalne telesne temperature (Setshell, 1998; Stančić i sar., 2006). Povišena ambijentalna (Wettemann et al., 1979), ili telesna temperatura (zbog različitih oboljenja), dovodi do oštećenja spermatogenih ćelija, u procesu spermatogeneze, kada temperatura testisa dostigne 40.5°C (Cheon i sar., 2002). Pokazalo se da nerastovi izloženi dugotrajnom (hroničnom) toplotnom stresu (tokom više

od 14 dana, na temperaturi višoj od 29°C), imaju povećanu koncentraciju specifičnih proteina (tzv. "heat shock proteins" ili HSPs) u ejakulatu, koji skraćuju sposobnost preživljavanja spermatozoida čuvanih *in vitro* u razređenom stanju, na niskim temperaturama (Knox, 2004). Sa druge strane, produženo trajanje dnevnog fotoperioda, tokom letnjih meseci, indirektno utiče na smanjenu i/ili poremećenu produkciju spermatozoida. Naime, pokazalo se da produžen dnevni fotoperiod inhibira osetljivost Laydig-ovih ćelija testisa, na delovanje hipofizarnog LH. To dovodi do smanjene produkcije androgena (testosterona) i, posledično, do poremećaja procesa spermatogeneze i smanjene produkcije spermatozoida (Kunavongkrit i sar., 2005; Cheon et al., 2002). I, konačno, fenomen smanjenog kvaliteta ejakulata, tokom toplije godišnje sezone, može biti posledica nasleđa domaćih rasa od svojih divljih srodnika. Naime, poznato je da su divlji nerastovi izrazito sezonski polno aktivni, u godišnjem periodu sa znatno kraćim dnevnim fotoperiodom i nižim ambijentalnim temperaturama (Kozdrowski i Dubiel, 2004). Smanjen fertilitet sperme nerastova, tokom toplije godišnje sezone, mora biti uzet u obzir, jer je to jedan od faktora nižeg fertiliteta krmača osemenjenih u ovom periodu (Stančić i sar., 2002; Almond i Bilkei, 2005; Stančić i sar., 2010; Stančić i sar., 2011; Stančić i sar., 2014). S tim u vezi, važno je vršiti potpunu kontrolu svih parametara fertiliteta svakog ejakulata, koristiti nerastove koji daju sperm u većeg fertilizacionog potencijala i praviti VO doze manjeg razređenja, sa većim brojem progresivno pokretnih spermatozoida.

Rasa nerasta. Osnovni parametri ejakulata nerastova rase Švedski Landras - ŠL (40 ejakulata od 8 nerastova), Veliki Jorkšir - VJ (72 ejakulata od 8 nerastova) i Durok - D (56 ejakulata od 8 nerastova), ispitivani su na tri velike vojvođanske farme. Volumen ejakulata je iznosio 301 ml, 267 ml i 228 ml, koncentracija spermatozoida je iznosila $244 \times 10^6/\text{ml}$, $264 \times 10^6/\text{ml}$ i $289 \times 10^6/\text{ml}$, ukupan broj spermatozoida u ejakulatu je iznosio 71×10^9 , 69×10^9 i 65×10^9 , a prosečna progresivna pokretljivost je bila 79%, 77% i 82% kod nerastova rase ŠL, VJ i D. Broj dobrih ejakulata je bio dosta sličan kod pojedinih rasa i iznosio je 92%, 96% i 94%, od ukupnog broja ispitanih ejakulata (Tabela 33). Primetno je da nerastovi rase Durok daju ejakulate najmanjeg volumena, ali najveće koncentracije ($P < 0.01$) i progresivne pokretljivosti spermatozoida ($P < 0.05$), u poređenju sa nerastovima rase ŠL i VJ. Ove vrednosti nisu bile statistički značajno različite između rasa ŠL i VJ ($P > 0.05$). Kod nerastova rase ŠL, ove su vrednosti obrnute: volem ejakulata je najveći, dok su koncentracija i progresivna pokretljivost najniži u odnosu na ostale dve rase. Wolf i Smital (2009) su, takođe, ustanovili da je prosečan volumen ejakulata nerastova rase Durok (200 ml) značajno manji, a koncentracija spermatozoida ($491 \times 10^3/\text{mm}^3$), značajno veća od ovih vrednosti kod nerastova rase Veliki Jorkšir (270 ml i $461 \times 10^3/\text{mm}^3$). Kommissurd i sar. (2002) nalaze da prosečan volumen ejakulata nerastova rase Durok iznosi 147 ml, rase Landras 265 ml, a rase Veliki Jorkšir 245 ml. Dok Johnson i sar. (2000), nalaze da prosečan ejakulat rase Durok iznosi 170 ml, rase Landras 252 ml, a rase Veliki Jorkšir 243 ml. Značajne razlike između pojedinih parametara kvaliteta ejakulata kod pojedinih rasa, ustanovili su i drugi autori (Ciereszko i sar., 2000; Stančić, 2002; Jankevičiūtė i Žilinskas, 2002; Katanić, 2004; Stančić i sar., 2003a; Smital, 2009; Stančić i sar., 2009; Stančić i sar., 2013).

Rezultati istraživanja u ovoj disertaciji, kao i rezultati do kojih su došli drugi autori, vrlo konzistentno pokazuju da postoje značajne razlike u vrednostima osnovnih

parametara fertilizacionog potencijala ejakulata, između pojedinih rasa nerastova. S tim u vezi, i pored toga što je nasledivost (heritabilnost - h^2) vrednosti ovih parametara niska (See, 2000), rasne razlike se mogu iskoristiti u selekcijskim programima za povećanje fertiliteta sperme nerastova (Smital i sar., 2004; Wolf i Smital, 2009).

Sadržaj proteina u spermalnoj plazmi. U našem istraživanju, nije ustanovljeno znatnije variranje sadržaja proteina u spermalnoj plazmi kod jednog istog nerasta, kako kod onih iz grupe sa visokim, tako i kod onih iz grupe sa niskim sadržajem proteina. Međutim postoje variranja u sadržaju proteina između pojedinih nerastova. Tako se sadržaj proteina, između pojedinih nerastova u grupi sa visokim sadržajem proteina, kretao od 3.4% do 4.4%, a u grupi sa niskim sadržajem proteina od 1.4% do 2.6% (Grafikon 2). Sa druge strane, važno je istaći da nisu ustanovljene značajne razlike ($P>0.05$) prosečnih vrednosti sadržaja proteina u spermalnoj plazmi između nerastova ispitivanih rasa (Landars=2.98%, V. Jorkšir=2.92% i Durok=3%), kao ni u zavisnosti od starosti nerastova (≤ 16 meseci=3%, 17 do 21 meseci=3.1%, 21 do 24 meseci=3% i ≥ 25 =2.7%) (Tabela 30).

Distribucija nerastova na osnovu sadržaja proteina u njihovoj spermalnoj plazmi, ustanovljena je kod ukupno 106 nerastova rase Landras, Veliki Jorkšir i Durok, sa nekoliko većih vojvođanskih farmi, od kojih je ispitano ukupno 212 ejakulata. Pokazalo se da 69% nerastova ima nizak nivo proteina u spermalnoj plazmi (prosečno 2,4%), dok je kod 31% nerastova ustanovljen visok nivo proteina u spermalnoj plazmi (prosečno 4,2%) (Grafikon 1). *Frunzä i sar. (2008)* navode da se sadržaj ukupnih proteina u spermalnoj plazmi nerasta kreće između 1.8% i 4.5%, što je ustanovljeno i u našem istraživanju. U spermi nerasta, preko 90% proteina pripada grupi spermadhezina, koja se sastoji od pet članova (AQN-1, AQN-3, AWN, PSP-I, and PSP-II). Svaki od ovih članova ima različitu biološku aktivnost (*Töpfer-Petersen, 1998; Centurion i sar., 2003*). Značajnije variranje sadržaja proteina u spermalnoj plazmi tokom godine, nisu našli ni drugi autori, ali su ustanovili da se najniži nivo proteina u spermalnoj plazmi nalazi tokom toplijeg perioda godine, od jula do septembra (*Murase i sar., 2007*). Međutim, naša istraživanja, kao i istraživanja drugih autora (*Flowers, 2001; Novak i sar., 2010*), pokazuju da sadržaj proteina ne varira značajno kod jednog istog nerasta, ali da postoje značajna variranja ove vrednosti između pojedinih nerastova. Zbog toga, *Novak i sar. (2010)* navode da sadržaj spermadhezina, odnosno ukupnih proteina u spermalnoj plazmi, može biti značajan marker fertilizacionog potencijala određenog nerasta. Uzimajući u obzir ove činjenice, naši rezultati potvrđuju pretpostavku da je sadržaj proteina u spermalnoj plazmi genetska osobina svakog nerasta.

Uticaj sadržaja proteina u spermalnoj plazmi, na osnovne parametre ejakulata, ispitan je kod ukupno 48 ejakulata, uzetih svake nedelje u mesecu, tokom jedne godine, od četiri nerasta. Prosečne vrednosti svih ispitivanih parametara fertilizacionog potencijala ($V=310$ ml, koncentracija $=301 \times 10^6$ /ml, ukupan broj $=93 \times 10^9$ i progresivna pokretljivost spermatozoida=82%), u ejakulatima sa visokim sadržajem proteina, su statistički visoko značajno ($P<0.01$) veće od ovih vrednosti kod ejakulata sa niskim sadržajem proteina ($V=214$ ml, koncentracija $=271 \times 10^6$ /ml, ukupan broj $=58 \times 10^9$ i progresivna pokretljivost spermatozoida=76%). Zbog toga je, od ejakulata sa visokim sadržajem proteina, bilo moguće formirati prosečno 19 VO doza, a od ejakulata sa niskim sadržajem proteina svega 11 VO doza. Pri tome je stepen razređenja za formiranje VO doza bio skoro

identičan i za ejakulate sa visokim (1:3.8) i za ejakulate sa niskim (1:3.7) sadržajem proteina (Tabela 34 i Grafikon 6). To je veoma važno za održavanje maksimalno mogućeg fertilizacionog potencijala razređene sperme, tj. VO doza. Kod ejakulata sa niskim sadržajem proteina, volumen je bio manji za 31%, koncentracija spermatozoida je bila manja za 10%, progresivna pokretljivost je bila manja za 7%, dok je od jednog ejakulata bilo moguće formirati 42% manje VO doza, u odnosu na ejakulate sa visokom sadržajem proteina (Grafikon 6). Ustanovljeno je da spermalna plazma sadrži veći broj bioaktivnih supstanci, koje imaju značajan uticaj na fertilitet sperme nerasta *in vitro* i *in vivo* (O'Leary et al. 2002). U ovom pogledu se, naročito, ističu peptidi i proteini (Töpfer-Petersen, 1998; Centurion i sar., 2003), za koje se pokazalo da mogu biti povezani sa fertilizacionim kapacitetom sperme nerasta (Rodriguez-Martinez i sar., 2011; Dyck i sar., 2011; López Rodríguez, 2012). Proteini spermalne plazme nerasta utiču na stepen progresivne pokretljivosti spermatozoida (Strzeżek i sar., 2005). Zbog toga, određivanje sadržaja proteina u spermalnoj plazmi, može biti značajan indikator fertiliteta spermatozoida nerasta (Mogielnicka-Brzozowska i Kordan, 2011). Takva mogućnost se bazira na rezultatima do kojih je došao Flowers (1998). Ovi rezultati, naime, pokazuju da je relativna koncentracija proteina u semenoj plazmi, u visokoj pozitivnoj korelaciji sa fertilitetom sperme nerasta, te da ovo može biti značajan faktor rangiranja nerastova prema stepenu njihovog fertiliteta prilikom osemenjavanja krmača. Ovaj autor (Flowers, 2001) je, kasnije, tu pretpostavku i potvrdio, jer je pokazao da su vrednost prašenja i prosečan broj živo rođene prasadi u leglu, bili značajno veći kod krmača osemenjenih spermom koja sadrži veću koncentraciju proteina.

C. Tolerancija sperme na stepen razređenja i period čuvanja *in vitro*

Ispitivan je uticaj sezone, rase nerastova i sadržaj proteina u spermalnoj plazmi, na održavanje progresivne pokretljivosti u uzorcima sperme čuvane tokom 24h, 48h i 72h, u razređenju 1:2 i 1:4, na temperaturi + 17°C.

Sezona godine. Neposredno pre formiranja uzoraka razređene sperme, progresivna pokretljivost ispitivanih ejakulata je iznosila prosečno 79% u hladnoj sezoni i bila je statistički visoko značajno ($P < 0.01$) veća od one u toploj sezoni godine (69%). Posle 24h čuvanja u razređenju 1:2, progresivna pokretljivost u hladnoj sezoni je opala na 67%, a u toploj na 59%. Ovaj pad progresivne pokretljivosti je bio statistički vrlo značajan ($P < 0.01$) u odnosu početnu progresivnu pokretljivost u nativnim ejakulatima. Progresivna pokretljivost uzoraka razređene sperme istog stepena razređenja i perioda čuvanja, bila je statistički vrlo značajno ($P < 0.01$) ili statistički značajno ($P < 0.05$) veća u hladnoj od istih vrednosti u toploj sezoni (24h/1:2 = 67% u hladnoj i 59% toploj sezoni; 72h/1:4 = 42% u hladnoj i 34% toploj sezoni) (Tabela 35). Prosečna progresivna pokretljivost se permanentno značajno ($P < 0.05$ ili $P < 0.01$) smanjivala i sa povećanjem stepena razređenja i produžavanjem perioda čuvanja, kako u hladnoj, tako i u toploj sezoni godine (hladna sezona: sa 67% posle 24h čuvanja u razređenju 1:2, na 42% posle 72h čuvanja u razređenju 1:4; topla sezona: sa 59% posle 24h čuvanja u razređenju 1:2, na 34% posle 72h čuvanja u razređenju 1:4) (Tabela 35 i 36). Međutim, ako se posmatra distribucija procentualnog smanjenja progresivne pokretljivosti u razređenju 1:2 i 1:4, tokom tri dana čuvanja, u odnosu na vrednost progresivne pokretljivosti u ejakulatima neposredno pre

rezređivanja, onda se vidi da je opadanje ove vrednosti vrlo slično u hladnoj (-15%, -33%, -33% i -47%) i toploj sezoni (15%, 131%, -33% i -51%) (Grafikon 8). Prosečna progresivna pokretljivost dobrih uzoraka (progresivna pokretljivost $\geq 65\%$) se, u hladnoj sezoni, kretala između 75% (posle 24h čuvanja u razređenju 1:2) i 69% (posle 72h čuvanja u razređenju 1:4), dok se, u toploj sezoni, ova vrednost kretala između 67% (posle 24h čuvanja u razređenju 1:2) i 65% (posle 72h čuvanja u razređenju 1:4). Ove vrednosti su bile statistički visoko značajne ($P < 0.01$) (Tabela 38 i 39). Ako se broj dobrih uzoraka razređene sperme, iskaže kao procentualno smanjenje u odnosu na broj dobrih ejakulata neposredno pre rezređivanja (koji je uzet kao 100%), onda se jasno zapaža da ova vrednost pravilno opada sa povećanjem stepena razređenja i vremena čuvanja. Trend ovog opadanja je, međutim, skoro identičan u hladnoj i toploj sezoni (Grafikon 9). Sličan trend opadanja se zapaža i kod procentualnog opadanja progresivne pokretljivosti dobrih uzoraka razređene sperme, u odnosu na progresivnu pokretljivost početnih ejakulata, koja je uzeta kao 100% (Grafikon 10). Distribucija prosečnih vrednosti progresivne pokretljivosti ejakulata i uzoraka razređene sperme (čuvanih 72h u razređenju 1:2 i 1:4), tokom pojedinih meseci u godini, pokazuje skoro identičan trend. Naime, vrednosti progresivne pokretljivosti ejakulata, kao i uzoraka razređene sperme, pokazuju najviše vrednosti u hladnijem periodu godine (novembar, decembar, januar, februar, mart i april), a najniže u toplijem periodu godine (maj, jun, jul, avgust, septembar i oktobar).

Uzimajući u obzir sve dobijene rezultate, može se zaključiti da stepen razređenja ejakulata i vremena čuvanja uzoraka razređene sperme, imaju veći uticaj na progresivnu pokretljivost razređene sperme, od uticaja godišnje sezone na ovu vrednost. Ovo je i logično, jer su svi uzorci razređene, i oni ispitivani tokom hladne, kao i oni ispitivani tokom tople sezone, bili podvrgnuti istim laboratorijskim uslovima. Međutim, progresivna pokretljivost je bila značajno veća kod ejakulata dobijenih u hladnoj, u poređenju sa ejakulatima dobijenim u toploj sezoni godine. Istraživanja drugih autora, takođe, nisu pokazala direktan uticaj sezone na progresivnu pokretljivost spermatozoida u razređenoj spermi. Pokazalo se, međutim, da je sposobnost sperme nerasta za čuvanje *in vitro*, uzrokovana sezonskim variranjem parametara kvaliteta nativnih ejakulata (Johnson i sar., 2000; Stančić i sar., 2002; Stančić i sar., 2003; Wolf i Smital, 2009; Stančić i sar., 2012). Zbog toga postoji i statistički značajan uticaj godišnje sezone na broj upotrebljivih doza po ejakulatu i broj fertilnih spermatozoida po dozi (veći su tokom hladne, a manji tokom tople godišnje sezone) (Rutten i sar., 2000). Stim u vezi, sezonsko variranje kvaliteta sperme, ima značajnog uticaja na efikasnost reproduktivnog iskorištavanja nerastova (Glossop, 2000; Singleton, 2001; Stančić i sar., 2009; Stančić i sar., 2011).

Rasa nerasta. Prosečna progresivna pokretljivost svih ispitivanih ejakulata nerastova rase Švedski Landras (ŠL) iznosila je 78%, Veliki Jorkšir (VJ) 76%, a Durok (D) 81%. Statistički značajna razlika je ustanovljena samo između progresivne pokretljivosti kod nerastova rase Durok i Veliki Jorkšir ($P < 0.05$). Prosečna progresivna pokretljivost svih ispitivanih uzoraka razređene sperme se kretala između 67% (uzorci čuvani 24h u razređenju 1:2) do 44% (uzorci čuvani 72h u razređenju 1:4), kod nerastova rase ŠL, 63% (uzorci čuvani 24h u razređenju 1:2) i 38% (uzorci čuvani 72h u razređenju 1:4) kod nerastova rase VJ i između 63% (uzorci čuvani 24h u razređenju 1:2) i 38% (uzorci čuvani 72h u razređenju 1:4) kod nerastova rase D. Razlike u vrednostima progresivne pokretljivosti u istom razređenju i tokom istog perioda čuvanja, između pojedinih rasa

nerastova, nisu bile statistički značajne ($P > 0.05$) (Tabela 42). Broj dobrih uzoraka (progresivna pokretljivost $\geq 65\%$) je opadao u zavisnosti od stepena razređenja i perioda čuvanja, ali je trend ovog pada bio vrlo sličan kod sve tri ispitivane rase nerastova (Grafikon 14). Svi dobijeni rezultati pokazuju da rasa nerastova nema značajnog uticaja na progresivnu pokretljivost razređene sperme, nego da su razlike u dobijenim vrednostima, posledica različitog stepena razređenja i perioda čuvanja uzoraka razređene sperme.

Brojni autori su ustanovili da postoje značajne razlike u vrednostima pojedinih parametara kvaliteta ejakulata, između različitih rasa nerastova, kako je već opisano u prethodnom tekstu (kvalitet nativne sperme nerastova na ispitivanim farmama). Međutim, nema literarturnih podataka o uticaju rase na parametre kvaliteta razređene sperme. Većina autora, naime, navodi da su eventualne razlike u nekim parametrima razređene sperme, kao što je, na primer, progresivna pokretljivost, posledica razlika u parametrima nativnih ejakulata, od kojih su napravljeni uzorci razređene sperme, zatim uticaja godišnje sezone u kojoj su vršeni eksperimenti, sadržaja proteina u spermalnoj plazmi, stepena razređenja, uslova čuvanja razređene sperme i td. (*Johnson i sar., 2000; Ciereszko i sar., 2000; Stančić i sar., 2003b; Smital, 2009; Stančić i sar., 2009; Stančić i sar., 2013*).

Spermalna plazma. Sadržaj proteina u spermalnoj plazmi ima visoko značajan ($P < 0.01$) uticaj na progresivnu pokretljivost spermatozoida u nativnim ejakulatima i u uzorcima sperme razređene 1:2 i 1:4, čuvane 24h, 48h i 72h. Naime, pokazalo se da su ove vrednosti značajno veće kod ejakulata sa visokim sadržajem proteina u spermalnoj plazmi (82%), kao i kod uzoraka razređene sperme, koji potiču od ovih ejakulata (77% - uzorci čuvani 24h u razređenju 1:2, do 64% - uzorci čuvani 72h u razređenju 1:4), u poređenju sa ejakulatima sa niskim sadržajem proteina (76%) i uzorcima razređene sperme (68% - uzorci čuvani 24h u razređenju 1:2, do 48% - uzorci čuvani 72h u razređenju 1:4), koji su načinjeni od ovih ejakulata (Tabele 44 i 45). Procentualno opadanje progresivne pokretljivosti uzoraka razređene sperme, u odnosu na progresivnu pokretljivost ejakulata (koja je uzeta kao 100%), ima sličan trend i kod uzoraka razređene sperme načinjene od ejakulata sa visokim (od -6%, kod uzoraka čuvanih 24h u razređenju 1:2 do -22%, kod uzoraka čuvanih 72h u razređenju 1:4), kao i kod ejakulata sa niskim sadržajem proteina u spermalnoj plazmi (od -13%, kod uzoraka čuvanih 24h u razređenju 1:2 do -42%, kod uzoraka čuvanih 72h u razređenju 1:4). Ove vrednosti su skoro duplo veće kod uzoraka od ejakulata sa visokim, u odnosu na uzorke od ejakulata sa niskim sadržajem proteina u spermalnoj plazmi (Grafikon 16). I procentualno opadanje progresivne pokretljivosti razređene sperme, u odnosu na uzorke čuvane prvih 24h u razređenju 1:2 (koje je uzeto kao 100%), takođe pokazuje vrlo sličan trend, zavisno od vremena čuvanja i stepena razređenja, kod uzoraka od ejakulata sa visokim i niskim sadržajem proteina. Međutim vrednosti opadanja su, i u ovom slučaju, skoro duplo veće kod uzoraka od ejakulata sa niskim (od -9%, kod uzoraka čuvanih 24h u razređenju 1:2 do -37%, kod uzoraka čuvanih 72h u razređenju 1:4), u odnosu na uzorke od ejakulata sa visokim sadržajem proteina u spermalnoj plazmi (od -5%, kod uzoraka čuvanih 24h u razređenju 1:2 do -17%, kod uzoraka čuvanih 72h u razređenju 1:4) (Grafikon 17). Ravnomeran pad broja dobrih uzoraka (progr. pokret. $\geq 65\%$), sa povećanjem stepena razređenja i vremena čuvanja, jasno se uočava, kako kod uzoraka od ejakulata sa visokim (od 91% kod uzoraka čuvanih 24h u razređenju 1:2, do 41% kod uzoraka čuvanih 72h u

razređenju 1:4), tako i kod uzoraka od ejakulata sa niskim sadržajem proteina (od 72% kod uzoraka čuvanih 24h u razređenju 1:2, do 12% kod uzoraka čuvanih 72h u razređenju 1:4). Ipak se, takođe, jasno uočava da je trend ovog pada znatno manji kod uzoraka od ejakulata sa visokim, u odnosu na uzorke od ejakulata sa niskim sadržajem proteina (Grafikon 19). I progresivna pokretljivost uzoraka razređene sperme, bez obzira na stepen razređenja i vreme čuvanja, je statistički značajno manja ($P < 0.01$) kod uzorka od ejakulata sa niskim (od 72% posle 24h čuvanja u razređenju 1:2 do 66% posle 72h čuvanja u razređenju 1:4), u poređenju sa uzorcima od ejakulata sa visokim (od 79% posle 24h čuvanja u razređenju 1:2 do 71% posle 72h čuvanja u razređenju 1:4) (Tabele 47 i 48). Primenom metode protočne citometrije, ustanovili smo da je procent živih spermatozoida značajno veći (66% prema 44%), a da je procent spermatozoida sa oštećenom ćelijskom membranom (19% prema 27%), oštećenim akrozomom (29% prema 45%) ili oštećenim hromozomima (13% prema 22%) značajno manji ($P < 0.01$), posle 72h čuvanja u razređenju 1:4, kod uzoraka dobijenih od ejakulata sa visokim (4.1%) sadržajem proteina u spermalnoj plazmi, u poređenju sa ovim vrednostima, dobijenih kod uzoraka iz ejakulata sa niskim sadržajem proteina (2.2%) (Tabela 50).

Dobijeni rezultati, jasno pokazuju da visok sadržaj proteina u spermalnoj plazmi vrlo značajno povećava održavanje veće progresivne pokretljivosti spermatozoida kod uzoraka razređene sperme, u odnosu na uzorke napravljene od ejakulata sa niskim sadržajem proteina u spermalnoj plazmi. Ovu konstataciju vrlo lepo potvrđuje samo jedan od dobijenih rezultata. Naime, broj dobrih uzoraka (progresivna pokretljivost $\geq 65\%$), čuvanih 72h u razređenju 1:4, iznosio je 41% kod uzoraka od ejakulata sa visokim sadržajem proteina, u odnosu na broj dobrih ejakulata neposredno pre razređenja, dok je ova vrednost iznosila svega 12% kod uzoraka napravljenih od ejakulata sa niskim sadržajem proteina. *Waberski i sar. (1994)* su ustanovili da postoji značajna razlika između pojedinih nerastova u stepenu tolerancije njihove sperme na stepen razređenja i period čuvanja *in vitro*. Nešto ranije je *Weitze (1990b)* ustanovio da svega 20% nerastova u zemljama evropske unije, podnosi visok stepen razređenja i dug period čuvanja *in vitro*. Kod nas su *Stančić i sar. (2003b)* ispitivali ejakulate 276 nerastova, koji se koriste za VO na vojvođanskim farmama i ustanovili da ejakulati svega 19% nerastova zadržavaju progresivnu pokretljivost $\geq 65\%$, posle 72h čuvanja u razređenju 1:4.

Progresivna pokretljivost spermatozoida se značajno smanjuje sa povećanjem stepena razređenja i produžavanjem vremena čuvanja razređene sperme (*Stančić i sar., 2003b; Katanić, 2004: Rozeboom, 2000; Stančić i sar., 2012*). Tako je, na primer, ustanovljeno da se broj dobrih doza razređene sperme (progresivna pokretljivost $\geq 65\%$) značajno smanjuje sa produžavanjem vremena čuvanja: 61% posle 24h, 43% posle 48h i 20% posle 72h (*Stančić i sar., 2012*). Ovo smanjivanje progresivne pokretljivosti, sa povećanjem stepena razređenja i vremena čuvanja, nije moguće, u dovoljnoj meri, sprečiti primenom savremenih razređivača za spermum nerasta. S tim uvezi, pokazalo se da dodavanje spermalne plazme u doze razređene sperme, može povećati stepen progresivne pokretljivosti spermatozoida, odnosno povećati njihov fertizacioni kapacitet (*Johnson i sar., 2000; Stančić, 2006; Novak i sar., 2010*). Spermalna plazma ima značajnog uticaja na pokretljivost spermatozoida (*Komisurd i sar. 2002*). Takođe je ustanovljeno da prekomerno razređenje spermalne plazme, na primer u dozama za veštačko osemenjavanje, napravljenim od prekomerno razređenih ejakulata, dovodi do značajne redukcije progresivne pokretljivosti spermatozoida (*Maxwell i sar., 2007; Caballero i*

sar., 2008; Maxwell i Johnson, 1999; Stančić i sar., 2012; Chutia i sar., 2014). Istraživanja koja su izveli Strzeżek i sar. (2005) i Garcia i sar. (2009), pokazuju da su ovo posledice prekomerne redukcije koncentracije proteina u semenoj plazmi. Semena plazma ima značajan uticaj na stepen progresivne pokretljivosti i preživljavanje spermatozoida, tokom čuvanja *in vitro* u tečnom razređenom stanju (Waberski i sar., 1994; Stančić, 2002; Kommisrud i sar., 2002; Wolf i Smital, 2009), te da proteini semene plazme igraju ključnu aktivnu ulogu u ovim procesima (Garcia et al., 2009). Razređivanje spermalne plazme, kao i produžavanje vremena čuvanja razređene sperme, povećava broj spermatozoida sa oštećenom ćelijskom membranom, akrozomom i/ili hromozomima i smanjuje broj živih spermatozoida (Kommisrud i sar., 2002; Boe-Hansen i sar., 2005; Maxwell i sar., 2007; Gączarzewicz i sar., 2010; Stančić i sar., 2012; Chutia i sar., 2014). Ustanovljeno je i značajno smanjenje energetskeg metabolizma u mitohondrijama spermatozoida, tokom dužeg čuvanja tečne razređene sperme (Gączarzewicz i sar., 2003). Rezultati do kojih su došli Kommisrud i sar. (2002), pokazuju da je akrozom mnogo osetljiviji na oštećanja, zavisno od stepena razređenja sadržaja proteina u spermalnoj plazmi, kao i na dužinu čuvanja *in vitro*, u poređenju sa organelama koje su odgovorne za pokretljivost spermatozoida.

Preko 90% proteina sperme nerasta, pripada grupi spermadhezina, dok ostatak čine razne druge frakcije proteina (Töpfer-Petersen, 1998; Centurion i sar., 2003). Različite frakcije proteina spermalne plazme imaju uticaj na različite parametre fertiliteta spermatozoida (Garcia i sar., 2009). Specifični proteini spermalne plazme povećavaju stepen preživljavanja, pokretljivost i aktivnost mitohondrija spermatozoida u uzorcima ekstremno razređene sperme. Dodavanje spermalne plazme u jako razređenu spermnu nerasta, povećava progresivnu pokretljivost i preživljavanje spermatozoida *in vivo* i *in vitro* (Caballero et al. 2004). Zbog toga, dodavanje spermalne plazme u razređenu spermnu može biti dobar metod očuvanja fertilizacionog kapaciteta spermatozoida, u ekstremno razređenoj spermi (Centurion i sar., 2003; Caballero et al. 2004; Garcia i sar., 2006). Proteini i peptidi su biomarkeri spermalne plazme, jer su povezani sa fertilizacionim kapacitetom spermatozoida (Rodriguez-Martinez i sar., 2011; Dyck i sar., 2011; López Rodríguez, 2012). Ustanovljeno je značajno variranje sadržaja proteina u spermalnoj plazmi, između pojedinih nerastova (Flowers, 2001; Novak et al., 2010). Zbog toga, detekcija sadržaja proteina u spermalnoj plazmi može biti značajan indikator fertiliteta spermatozoida nerasta (Mogielnicka-Brzozowska i Kordan, 2011). Naime, još je Flowers (1998) ustanovio, u visoko pozitivnu korelaciju relativne koncentracije proteina u semenoj plazmi sa fertilitetom sperme nerasta *in vitro*. Ovo može biti značajan faktor rangiranja nerastova prema stepenu njihovog fertiliteta prilikom osemenjavanja krmača. Kasnije je ova pretpostavka i potvrđena, jer su vrednost prašenja i prosečan broj živo rođene prasadi u leglu, bili su značajno veći kod krmača osemenjenih spermom koja sadrži veću koncentraciju specifičnih protein (Flowers, 2001).

Pored uticaja na parametre fertilizacionog kapaciteta spermatozoida, veći broj bioaktivnih supstanci spermalne plazme kontrolišu i neke važne funkcije reproduktivnog sistema, koje utiču na fertilitet ženke (O'Leary et al. 2002). Među ovim supstancama se naročito ističu proteini spermalne plazme. Oni su povezani sa zaštitom spermatozoida tokom transporta kroz uterus, tako što se absorbuju na ćelijsku membranu spermatozoida, na kojoj ostaju sve do denudacije, tokom procesa kapacitacije, u kaudalnom istmusu jajovoda (Strzeżek i sar., 2005; Muiño-Blanco i sar., 2008). Inhibicija imunog odgovora

uterusa, na antigene spermatozoida, takođe se povezuje sa proteinima spermalne plazme (Roseboom i sar., 2000; Madej i sar., 2013). Uspostavljanje aktivne interakcije preimplantacionih embriona i uterusa, kao i indukcija factora rasta embriona, takođe se povezuje sa delovanjem specifičnih proteina spermalne plazme (Robertson i Sharkey, 2001). Proteini spermalne plazme učestvuju u procesu koordinacije ovulacije i prispeća spermatozoida u uterotubalni spoj, odnosno u kaudalni istmus (O'Leary i sar., 2002). Na taj način se postiže da oociti i kapacitirani spermatozoidi budu u ampuli jajovoda, u optimalno vreme za oplodnju (Gomeida i sar., 1998), tj. unutar 6 do 8 sati posle ovulacije (Hunter, 1986, Radović i sar., 2006). Spermalna plazma nerasta sadrži oksitocin (Frunzä i sar., 2008), koji stimuliše kontrakcije uterusa tokom i neposredno posle osemenjavanja (Willenburg i sar., 2004). Ove kontrakcije su veoma važne za pravilan i brz pasivan transport spermatozoida od mesta depozicije (cerviks) do uterotubalnih spojeva i formiranje adekvatne populacije spermatozoida u kaudalnom istmusu jajovoda (Langedijk i sar., 2002), što je od primarnog značaja za uspešnu fertilizaciji oocita (Soede i sar., 1995; Spronk i sar., 1997). U svakom slučaju, prekomerno razređivanje ejakulata dovodi do smanjenog fertilizacionog kapaciteta spermatozoida, kao i do smanjene koncentracije specifičnih proteina i drugih bioaktivnih supstanci u spermalnoj plazmi. Sve ovo ima za posledicu smanjen fertilitet krmača osemenjenih dozama od prekomerno razređenih ejakulata (Rozeboom, 2000; Tummaruk i sar., 2000; Caballero i sar., 2004; Stančić i sar., 2012). I, konačno, naši i rezultati drugih autora nedvosmisleno pokazuju da sadržaj proteina u semenoj plazmi može biti koristan metod za genetičku selekciju nerastova visokog fertilizacionog potencijala, koji će se koristiti u veštačkom osemenjavanju svinja. Ova mogućnost se zasniva na činjenici da postoji značajno variranje sadržaja proteina u spermalnoj plazmi između pojedinih nerastova, kao i na činjenici da nema značajnijeg variranja sadržaja proteina u spermalnoj plazmi kod jednog istog nerasta. Ipak, precizni mehanizmi delovanja aktivnih sastojaka spermalne plazme, na fertilitet nerastova i krmača, ostaju predmet daljih istraživanja (Nasrin i Calogero, 2012).

D. Uticaj homologne spermalne plazme na progresivnu pokretljivost spermatozoida u razređenoj spermi

Istraživanja u ovoj disertaciji su pokazala da sperma sa visokim sadržajem proteina (4%), ima značajno veći kapacitet za održavanje visoke progresivne pokretljivosti, tokom 72h čuvanja, u razređenju 1:4, u poređenju sa spermom koja ima nizak sadržaj proteina (2%). Na osnovu ovog nalaza, bilo je interesantno da se ustanovi da li je moguće povećati kapacitet održavanja progresivne pokretljivosti spermatozoida iz ejakulata sa niskim sadržajem proteina, tako što će se zameniti autologna spermalna plazma, sa spermalnom plazmom iz ejakulata sa visokim sadržajem proteina.

Rezultati naših istraživanja jasno pokazuju da je ovo moguće postići. Naime, rezultati dobijeni u našem istraživanju, pokazuju da dodavanje spermalne plazme sa visokim sadržajem proteina (4%), u spermatozoide izdvojene iz ejakulata sa niskim sadržajem proteina (2%), značajno ($P < 0.01$) povećava njihovu progresivnu pokretljivost, posle 72h čuvanja u razređenju 1:4 (sa 52% u autolognoj, na 65% u homolognoj spermi). Obrnuto, kada je spermatozoidima izdvojenim iz ejakulata sa visokim sadržajem

proteina, dodata spermalna plazma drugog nerasta (tzv. homologna sperma) sa niskim sadržajem proteina (2%), prosečna progresivna pokretljivost je opala sa 64% na 55%. Razlika je bila statistički značajna ($P < 0.01$) (Tabela 51). Broj nerastova, čiji su uzorci autologne razređene sperme zadržali $\geq 65\%$ progresivne pokretljivosti, posle 72h čuvanja u razređenju 1:4, iznosio je 75% (3 do 4 ispitivana nerasta). Međutim, kada je spermatozoidima ovih nerastova, dodata spermalna plazma iz ejakulata nerastova sa niskim sadržajem proteina, broj nerastova sa dobrim uzorcima homologne razređene sperme se značajno ($P < 0.01$) smanjio na 50% (2 od 4 nerasta). Kada je, obrnuto, u spermatozoide iz ejakulata sa niskim sadržajem proteina, dodata spermalna plazma iz ejakulata sa visokim sadržajem proteina, broj nerastova sa dobrim uzorcima homologne razređene sperme se značajno ($P < 0.01$) povećao sa 25% na 75% (sa 1 do 4, na 3 od 4 nerasta) (Tabela 52).

I ovi rezultati potvrđuju činjenicu da nivo proteina u spermalnoj plazmi ima značajnu ulogu u održavanju parametara fertilizacionog potencijala razređene sperme, posebno progresivne pokretljivosti, te da se ova činjenica može iskoristiti za povećanje fertiliteta razređene sperme nerastova sa niskim sadržajem proteina u spermalnoj plazmi. Ovo je naročito važno ako se uzme u obzir činjenica da ejakulati svega oko 20% nerastova zadržavaju $\geq 65\%$ progresivne pokretljivosti, kada se razrede 1:4 i čuvaju na $+17^{\circ}\text{C}$ 72 sata (*Weitze, 1990b; Stančić i sar., 2003b*). Sa druge strane, istraživanja u ovoj disertaciji pokazuju da ejakulati 31% od ukupno 106 ispitivanih nerastova, sadrže visok nivo proteina (prosečno 2.4%) u spermalnoj plazmi, dok je kod preostalog broja nerastova (69%) nivo proteina u spermalnoj plazmi nizak (prosečno 4.2%) (Tabela 30). Ova istraživanja su, takođe, pokazala da značajno veći broj uzoraka razređene sperme (41%), dobijenih iz ejakulata sa visokim sadržajem proteina, zadržava progresivnu pokretljivost $\geq 65\%$ posle 72h čuvanja u razređenju 1:4, od broja uzoraka dobijenih od ejakulata sa niskim sadržajem proteina (12%) (Grafikon 18). Nalazi do kojih su došli pomenuti autori, kao i rezultati dobijeni u ovom istraživanju, očigledno bi se mogli dovesti u vezu. Naime, ovi rezultati, u značajnoj meri, podržavaju pretpostavku da sperma 20% do 30% nerastova, koja toleriše veći stepen razređenja i duže čuvanje, sadrži visok nivo proteina u spermalnoj plazmi.

Rezultati istraživanja u ovoj disertaciji, kao i rezultati drugih autora, jasno pokazuju da vrednosti parametara fertilizacionog kapaciteta spermatozoida progresivno opadaju, sa stepenom razređenja i produžavanjem vremena čuvanja. Takođe se pokazalo da dodavanje spermalne plazme u uzorke visoko razređene sperme, značajno povećava vrednosti ovih parametara. Međutim, u ovom pogledu, postoji značajna razlika između spermalne plazme pojedinih nerastova. Naime, spermalna plazma nekih nerastova značajno povećava preživljavanje i motilitet spermatozoida u visoko razređenim uzorcima, čak i poništava negativan uticaj autologne sperme. Međutim, sperma nekih drugih nerastova ne ispoljava ovaj efekt, čak smanjuje stepen preživljavanja spermatozoida, u odnosu na uzorke razređene sperme, kojima je dodata sopstvena (autologna) spermalna plazma (*Caballero i sar., 2004*). Dodavanje semene plazme sa visokom koncentracijom proteina, u spermatozoide nerasta čija spermalna plazma sadrži nisku koncentraciju proteina, značajno povećava stepen (%) progresivne pokretljivosti ovih spermatozoida u razređenjima 1:2 i 1:4, čuvanih tokom 72h, na temperaturi $+17^{\circ}\text{C}$ i obrnuto (*Stančić i sar., 2012*).

Specifični proteini spermalne plazme (iz grupe spermathezina), povećavaju stepen preživljavanja, pokretljivost i aktivnost mitohondrija spermatozoida u uzorcima ekstremno razređene sperme, čuvanih 5h na fiziološkoj temperaturi (*Centurion i sar., 2003*). Ovi autori zaključuju da bi dodavanje spermalne plazme bio dobar biotehnološki metod čuvanja spermatozoida u ekstremno razređenoj spermi. *Garcia i sar. (2006)* su, takođe, pokazali da dodavanje spermathezina semene plazme, značajno poboljšava funkcionalne parametre spermatozoida u visoko razređenim uzorcima sperme nerasta. Neka ispitivanja su pokazala da različite frakcije proteina spermalne plazme imaju uticaj na različite parametre fertiliteta spermatozoida *in vitro*. Tako neke frakcije (1 do 3) povećavaju preživljavanje i funkciju spermatozoida, dok su neke druge frakcije (4 do 6) vrlo štetne za čuvanje spermatozoida u visoko razređenom stanju (*Garcia i sar., 2009*).

Održavanje zadovoljavajućih vrednosti parametara fertilizacionog potencijala spermatozoida, u uzorcima ekstremno razređene sperme, naročito je važno u tehnologiji dubokog zamrzavanja inseminacionih doza sperme nerasta (*Pech-Sansores i sar., 2011*). Naime, proces čuvanja visoko razređene sperme u zamrznutom stanju, kao i proces njenog otapanja, znatno redukuju fertilizacioni kapacitet spermatozoida (preživljavanje, pokretljivost, integritet akrosoma i membrane spermatozoida), kao i vreme preživljavanja spermatozoida u ženskom reproduktivnom traktu (*Johnson i sar., 2000; Roca i sar., 2003*).

Dodavanje spermalne plazme u medijume za zamrzavanje (*Muiño-Blanco i sar., 2008*) i/ili otapanje (*Okazaki i sar., 2012*) duboko zamrznute sperme nerasta, predstavlja ključni faktor postizanja većeg fertiliteta krmača osemenjenih dozama zamrznute pa otopljene sperme nerasata. Zamrzavanje inseminacionih doza sperme nerasta sa 10% ili 20% spermalne plazme, uspešno smanjuje oštećenja i povećava fertilizacioni kapacitet spermatozoida posle otapanja (*Vadnais i Roberts, 2007; Pech-Sansores i sar., 2011*). Isto tako, progresivna pokretljivost, broj spermatozoida sa nepovređenim integritetom ćelijske i akrosomalne membrane, bili su značajno veći u uzorcima sa dodatkom spermalne plazme u medijum za otapanje duboko zamrznutih inseminacionih doza (*Cremades i sar., 2004*). Rezultati ovih autora, međutim, pokazuju da postoji razlika u ovom efektu spermalne plazme, između pojedinih nerastova. Naime, sperma nekih nerastova ima visok efekt, dok spermalna plazma nekih drugih nerastova ima nizak ili uopšte ne ispoljava ovaj stimulativni efekt. Autori pretpostavljaju da je ovo posledica različitog odnosa sadržaja pojedinih frakcija proteina u spermalnoj plazmi različitih nerastova. *Garcia i sar. (2010)* su pokazali da otapanje duboko zamrznutih inseminacionih doza u medijumu sa dodatkom 50% semene plazme, značajno povećava preživljavanje i progresivnu pokretljivost spermatozoida. Moguće je da ovako otopljeni spermatozoidi imaju duži period preživljavanja u ženskim reproduktivnim organima i da se, na taj način, povećava fertilitet (% prašenja i broj živo rođene prasadi po leglu) krmača osemenjenih ovakvim dozama. Rezultati do kojih je došao *Stanković (2012)*, u svojoj doktorskoj disertaciji, pokazuju da postoji razlika u kvalitetu native sperme za uspešno zamrzavanje, između pojedinih nerastova. Naime testiranjem otpornosti spermatozoida u nativej spermi, na različite stresore (hiposmotski pritisak, kontrolisano povećanje temperature, do +41°C, stepen razređenja i period čuvanja razređene sperme *in vitro*), moguće je odrediti koji su nerastovi potencijalni donatori sperme za formiranje inseminacionih doza koje će se čuvati dubokim zamrzavanjem.

E. Fertilitet osemenjenih krmača

a) *Postcervikalna inseminacija*. Već je istaknuto da se, sve češće, registruje pojava niže vrednosti fertiliteta veštački, u odnosu na prirodno osemenjene krmače, kao i da je ovo posledica osemenjavanja dozama prekomerno razređene sperme, u nastojanju da se, od jednog ejakulata napravi što veći broj inseminacionih doza. Prekomerno razređene doze su slabijeg fertiliteta, jer sadrže značajno manju koncentraciju supstanci, u odnosu na nativnu spermu, koje su neophodne za održavanje visoke fertilizacione sposobnosti spermatozoida, kao i za procese u materici, koji su važni za uspešnu oplodnju.

Delimično rešavanje ovog problema se vidi u primeni novije postcervikalne (plitke intrauterine), umesto konvencionalne intracervikalne metode inseminacije. Brojna istraživanja su, naime, pokazala da je metodom plitke intrauterine inseminacije moguće koristiti doze duplo redukovanog volumena i broja spermatozoida, do onih koje se koriste za konvencionalno intracervikalno osemenjavanje, a da je, pri tome, fertilitet krmača sličan ili veći od onog koji se postiže posle konvencionalnog VO (*Rath, 2002; Stančić, 2002; Stančić i sar., 2003; Izco, 2004; Stančić i sar., 2009; Arujo i sar., 2009; Stančić i sar., 2010; Sbardella i sar., 2014*).

Tako se pokazalo da postcervikalno osemenjavanje dozama volumena 45 ml do 50 ml razređene sperme, rezultuje sa 67% do 95% prašenja i sa 9.3 do 11.6 živo rođene prasadi po leglu (*Vansickle, 2002; Rozeboom i sar., 2004; Serret i sar., 2005; Mezalira i sar., 2005; Stančić i sar., 2009; Araújo i sar., 2009, Dimitrov i Žmudski, 2009; Stančić i sar., 2010; Sbardella i sar., 2014*). Ovo su vrednosti koje se postižu i posle primene konvencionalnog intracervikalnog osemenjavanja.

Rezultati istraživanja u ovoj disertaciji, takođe pokazuju da je primenom postcervikalne inseminacije, dozama duplo redukovanog volumena i broja spermatozoida (50 ml i 2×10^9), moguće postići značajno ($P < 0.05$) veću vrednost prašenja (77%) i veći broj živo rođene prasadi (10.82) od konvencionalne intracervikalne inseminacije dozama istog volumena i broja spermatozoida (67% i 9.85). Vrednost prašenja je bila veća, ali ne statistički značajno ($P > 0.05$) i posle postcervikalnog osemenjavanja dozama duplo većeg volumena (100 ml) sa istim brojem spermatozoida. Međutim, vrednost prašenja, posle intracervikalnog osemenjavanja dozama volumena 50 ml sa 2×10^9 spermatozoida, bilo je značajno ($P < 0.05$) manje (67%) od osemenjavanja dozama volumena 100 ml sa istim brojem spermatozoida (77%). I kod postcervikalnog osemenjavanja, vrednost prašenja je bila manja (77%) posle osemenjavanja dozama volumena 50 ml sa 2×10^9 spermatozoida, od vrednosti prašenja postignute osemenjavanjem dozama volumena 100 ml sa istim brojem spermatozoida (83%). Međutim razlika između ovih vrednosti nije bila statistički značajna ($P < 0.05$) (Tabele 54 i 55).

Na osnovu rezultata drugih autora, kao i rezultata dobijenih u ovom radu, jasno je da postcervikalna inseminacija omogućava upotrebu inseminacionih doza značajno manjeg volumena i broja spermatozoida, u poređenju sa dozama koje se koriste u konvencionalnom veštačkom osemenjavanju. To znači da primena ove metode omogućava formiranje značajno većeg broja inseminacionih doza od jednog ejakulata, odnosno značajno povećanje broja doza po nerastu godišnje. Međutim, primena postcervikalne inseminacije je, u praktičnim uslovima, limitirana značajnim nedostacima, među kojima se ističu: (1) nije moguće osemenjavati nazimice, (2) povećan rizik infektivnih oboljenja, zbog unošenja infektivnih agenasa u dublje partije materice, (3)

primena skupljih katetera i druge opreme i (4) potreba dodatne edukacije stručnjaka (*Grafenau i sar., 2004; Stančić i sar., 2006*). Sa druge strane, ostaje problem smanjenog fertiliteta krmača osemenjenih dozama sa prekomerno razređenom spermom, zbog potrebe da se dobije što veći broj doza po ejakulatu od genetski superiornih nerastova (*Rozeboom, 2000; Tummaruk i sar., 2000; Caballero i sar., 2004; Maxwell i sar. 2007; Stančić i sar., 2012*).

b) Inseminacija sa dodatkom spermalne plazme.

Rezultati naših istraživanja su pokazali da je vrednost prašenja, posle transcervikalne intrauterine infuzije 30ml spermalne plazme, neposredno pre aplikacije konvencionalne VO doze, bila veća na sve tri ispitivane farme (97%, 92% i 93%), u poređenju sa kontrolnim krmačama (84%, 80% i 86%). Ove razlike, unutar iste farme, ipak, nisu bile statistički značajne ($P>0.05$). Međutim, kada se posmatra sumarno, tj. ukupan broj tretiranih i kontrolnih krmača na sve tri farme, onda se pokazalo da je postignuta vrednost prašenja, posle infuzije spermalne plazme (94%), bila statistički značajno ($P<0.05$) veća, u poređenju sa kontrolnim, netretiranim krmačama (83%) (Tabela 55). Ovo se može objasniti činjenicom da je, na pojedinim farmama, u ogleđnim i kontrolnim grupama bio manji broj krmača, što je imalo za rezultat manju varijabilnost uzorka. Ipak, na sve tri farme je ispoljena jasna tendencija da se vrednost prašenja povećava, ako se klasična intracervikalna inseminacija kombinuje sa intrauterinom infuzijom native spermalne plazme. Ovaj nalaz je posebno značajan ako se zna da ispitivane farme nemaju potpuno istu tehnologiju ishrane, smeštaja, zdravstvene zaštite, kao ni potpuno identičan menadžment u reprodukciji krmača i nerastova.

Transcervikalna infuzija 50ml spermalne plazme, neposredno pre aplikacije inseminacione doze, ubrzava ovulaciju, povećava stepen oplodivosti ovuliranih jajnih ćelija preživljavanje ranih embriona (*Waberski i sar., 1996*). Posle transcervikalne infuzije semene plazme, neposredno pre aplikacije konvencionalne VO doze, *Bortolozzo i sar. (2000)*, su dobili značajno ($P<0.05$) veću vrednost prašenja (92.3%) i veći broj živo rođene prasadi u leglu (12.72) kod tretiranih, u poređenju sa kontrolnim krmačama (88.8% i 10.41 prasadi). Slične rezultate su dobili i *Stahlberg i sar., 2001*). Naime, prosečan broj živo rođene prasadi (13.03) i vrednost prašenja (100%), bili su značajno ($P<0.05$) veći kod krmača tretiranih spermalnom plazmom, u poređenju sa krmačama kontrolne grupe (93.3% i 12.20 prasadi). *Garcia i sar. (2009)* su osemenjavali krmače konvencionalnim dozama (volumen = 80 ml, sa 3×10^9 spermatozoida) (I grupa) i istim ovim dozama, uz prethodnu aplikaciju 30 ml sintetičke spermalne plazme (Predil-MRA[®]) (II grupa). Vrednost prašenja je bila značajno niža (61.9%) kod prve (kontrolne) grupe, u odnosu drugu (tretmansku) grupu (74.1%). Prosečan broj rođene prasadi po leglu je bio značajno veći (za 1.28 prasadi) kod tretiranih, u odnosu na kontrolne krmače. Naročito su interesantni rezultati koje su, ovi autori dobili posle postcervikalne inseminacije dozama redukovanog broja spermatozoida (1.5×10^9), u kombinaciji sa 30 ml sintetičke spermalne plazme. Postignuta vrednost prašenja je iznosila 92.3%, a veličina legla 13.2 praseta. Dodavanje sintetičke spermalne plazme (Predil-MRA[®]) povećava fertilitet krmača (vrednost prašenja 83%, a broj živo rođene prasadi po leglu 10.75) u odnosu na kontrolne krmače (vrednost prašenja 76%, a broj živo rođene prasadi po leglu 10.07) (*Dimitrov i sar., 2012*). Primena konvencionalne intracervikalne inseminacije, dozama volumena 100

ml sa 4×10^9 spermatozoida, sa ili bez prethodne aplikacije 30 ml sintetičke spermalne plazme (Predil-MRA[®]), može biti korisna metoda povećanja feriliteta krmača osemenjenih tokom toplijeg perioda godine (*Stančić i sar., 2014*). Ovi autori su, naime, ustanovili da je vrednost prašenja, u toploj sezoni, značajno veća (82%) kod krmača osemenjenih sa dodatkom sintetičke semene plazme, u odnosu na krmače osemene bez dodatka ovog preparata (72%). U hladnoj sezoni su ove vrednosti bile nešto više (88% i 84%), ali se nisu statistički značajno razlikovale. I rezultati drugih autora (*Martin Rillo i sar., 1996*, *Lyczynski, i sar., 2000*, *Ramirez Ovalle, 2002*; *Garcia Ruvalcaba i sar., 2008*, *Garcia Ruvalcaba i sar., 2009*) pokazuju da primena dvofazne inseminacije (aplikacija sintetičke semene plazme pre aplikacije redovne inseminacione doze), kod klasične (intracervikalne) ili nove (postcervikalne) inseminacije, ima stimulativan efekt na ferilitet (vrednost prašenja i veličina legla) osemenjenih krmača. Ovaj efekt se pripisuje svojstvu preparata sintetičke semene plazme (Predil-MRA[®]), da stimuliše kontrakcije uterusa i povećava preživljavanje i fertilizacioni kapacitet spermatozoida u uterus. (*Martin Rillo i sar., 1996*, *Levis, 2002*, *Castaneda Morreno, 2002*; *Dimitrov i sar., 2012*). *Kasetrtut i Kaeoket (2010)* su osemenjivali krmače dozama otopljenim posle čuvanja dubokim zamrzavanjem, u koje su dodali 60 ml nativne spermalne plazme ili 60 ml klasičnog razređivača za sperm u nerasta (ModenaTM). Vrednost uspešne koncepcije je iznosila 100% kod krmača osemenjenih dozama sa spermalnom plazmom i 60% kod krmača osemenjenih dozama sa klasičnim razređivačem za sperm u nerasta. Transcervikalna infuzija 50 ml semene plazme, neposredno pre aplikacije inseminacione doze, ubrzava ovulaciju, povećava stepen oplodivosti ovuliranih jajnih ćelija preživljavanje ranih embriona (*Waberski i sar., 1996*). Vrednost prašenja i veličina legla, posle osemenjavanja krmača dozama odmrznutim u medijumu sa dodatkom semene plazme, značajno se povećavaju u odnosu na osemenjavanje bez ovog dodatka (*Okazaki i sar., 2009b*; *Garcia i sar., 2010*). Dodavanje 15% nativne semene plazme u medijum za otapanje duboko zamrznutih inseminacionih doza, značajno smanjuje procent spermatozoida abnormalnim akrozomom i povećava progresivnu pokretljivost. Osim toga, osemenjavanje dozama otopljenih u medijumu sa dodatkom semene plazme, značajno je povećalo vrednost prašenja i veličinu legla, u odnosu na krmače osemene dozama otopljenim bez dodatka semene plazme (*Okazaki i sar., 2012*).

Specifični proteini spermalne plazme (tzv. spermathezini) učestvuju u molekularnim mehanizmima transporta spermatozoida kroz uterus krmače (*Strzeżek i sar., 2005*). Oni se absorbuju na ćelijsku membranu spermatozoida tokom ejakulacije, a u kaudalnom istmusu dolazi do njihovog skidanja sa ćelijske membrane spermatozoida (tzv. denudacija spermatozoida). Ovo omogućava početak reakcije akrosoma, u procesu kapacitacije spermatozoida, neposredno pre fertilizacije oocita u ampuli jajovoda (*Muiño-Blanco i sar., 2008*). Ako se spermalna plazma deponuje u uterus, neposredno pre klasične inseminacione doze, značajno se povećavaju stepen oplodjenih oocita (96%) i broj akcesornih spermatozoida u njihovoj zoni pelucidi (75), u odnosu na krmače osemene bez pre-infuzije spermalne plazme (84.7% oplodjenih oocita i 8 akcesornih spermatozoida u zoni pelucidi) (*Johnson i sar., 2000*). Ovi autori povezuju ovaj efekt sa delovanjem sastojaka spermalne plazme na ubrzanje pasivnog transporta spermatozoida kroz uterus, kao i sa direktnim uticajem spermalne plazme na povećanje fertilizacione sposobnosti samih spermatozoida.

Proteini spermalne plazme inhibiraju imuni odgovor uterusa (stimulacijom pro-inflamatornih citokina) na antigene spermatozoida (tzv. postinseminaciona inflamacija uterusa, izazvana infiltracijom polimorfonuklearnih granulocita u lumen uterusa) (Roseboom i sar., 2000; Madej i sar., 2013). Specifični proteini spermalne plazme su medijatori uspostavljanja interakcije preimplantacionih embriona i uterusa, kao i indukcije faktora rasta embriona (Robertson i Sharkey, 2001). Neka istraživanja pokazuju da dodavanjem semene plazme u uterus krmača, stimuliše ekspresiju citokina (faktora koji stimulišu kolonizaciju uterusa makrofagnim granulocitima), što se povezuje sa povećanjem broja živih embriona (O'Leary i sar., 2004).

Mehanizmi koordinacije ovulacije i prispeća spermatozoida u utero-tubalni spoj, odnosno u kaudalni istmus, takođe su pod uticajem proteina spermalne plazme (O'Leary i sar., 2002). Ova koordinacija obezbeđuje da se oociti i kapacitirani spermatozoidi nađu u ampuli jajovoda, u optimalno vreme za oplodnju (Gomeida i sar., 1998), tj. unutar 6 do 8 sati posle ovulacije (Hunter, 1986, Radović i sar., 2006). Spermalna plazma ubrzava proces ovulacije (Waberski i sar., 2000), tako što proteini semene plazme indukuju povećanje koncentracije citokina u limfi uterusa, koji prelaze iz uterusne vene u ovarijalnu arteriju. Tako dospevaju do jajnika, gde ubrzavaju dozrevanje predovulatornih folikula (Waberski i sar., 2006).

Spermalna plazma nerasta sadrži oksitocin (Frunžá i sar., 2008), koji stimuliše kontrakcije uterusa tokom i neposredno posle osemenjavanja (Willenburg i sar., 2004). Ove kontrakcije su veoma važne za pravilan i brz pasivan transport spermatozoida od mesta depozicije (cerviks) do uterotubalnih spojava i formiranje adekvatne populacije spermatozoida u kaudalnom istmusu jajovoda (Langedijak i sar., 2002). Neadekvatan transport spermatozoida kroz lumen uterusa, značajno smanjuje fertilitet osemenjenih krmača (Spronk i sar., 1997). Smanjen fertilitet veštački osemenjenih krmača, dozama sa prekomerno razređenom spermom ili dozama znatno redukovanog volumena (kod intrauterine inseminacije) (Roseboom i sar., 2004; Stančić i sar., 2010), povezuje se sa neadekvatnim kontrakcijama miometriuma. Ovo je direktna posledica značajno smanjene koncentracije oksitocina i estrogena u prekomerno razređenim inseminacionim dozama (Langedijak i sar., 2003; Mezalira i sar., 2005). Kontrakcije miometriuma se mogu poboljšati dodavanjem oksitocina u inseminacione doze, injekcijom oksitocina u vulvu, neposredno pre inseminacije, i prisustvom nerasta neposredno pre, tokom i posle inseminacije (Peña i sar., 1998; Gibson i sar., 2004; Peláez, i sar., 2006; Stančić i sar., 2006; Stančić i sar., 2013).

Rezultati navedenih istraživanja jasno ukazuju na značajnu ulogu semene plazme u postizanju visokog stepena fertiliteta veštački osemenjenih krmača. Naime, specifične komponente spermalne plazme održavaju parametre fertiliteta spermatozoida *in vitro* (vitalnost, progresivna pokretljivost, integritet akrozoma i ćelijske membrane) i *in vivo* (transport, preživljavanje i funkcija u ženskom reproduktivnom traktu). Osim toga, spermalna plazma ima i ključnu ulogu u kontroli funkcija važnih za uspešnu oplodnju i rani embrionalni razvoj. Osnovne od tih funkcija su: kontrakcije miometrijuma, kontrola procesa ovulacije, koordinacija prispeća spermatozoida i oocita u ampule jajovoda, u optimalno vreme za oplodnju, kao i procesi povezani sa razvojem ranih embriona. Proteini spermalne plazme su ključna komponenta koja obezbeđuje navedene funkcije spermalne plazme (Caballero i sar., 2008; Nasrin i Calogero, 2012). Ovim činjenicama se, sasvim logično i realno, mogu objasniti znatno veće vrednosti fertiliteta (procent

prašenja i veličina legla) krmača, koji su postignuti u našem istraživanju, posle dvofaznog osemenjavanja krmača, dodatkom nativne spermalne plazme, neposredno pre aplikacije konvencionalne inseminacione doze. S tim u vezi, istraživanja u vezi sa mogućnosti povećanja fertiliteta veštački osemenjenih krmača, konvencionalnim ili dozama redukovano volumena i broja spermatozoida, uz dodatak nativne ili sintetičke semene plazme (tzv. dvofazna inseminacija), imaju sve veći značaj za unapređenje savremene industrijske proizvodnje svinja.

Prikazani rezultati, koji su dobijeni u našem istraživanju, pokazuju da su, u potpunosti, ostvareni postavljeni ciljevi, kao i da su potvrđene pretpostavke istraživanja u ovoj doktorskoj disertaciji. Naime, izvršeno je ispitivanje uticaja godišnje sezone, rase nerastova i sadržaja proteina u spermalnoj plazmi, na parametre fertilizacionog kapaciteta nativne i razređene sperme. Takođe je izvršeno i ispitivanje variranja sadržaja proteina u spermalnoj plazmi pojedinačnih nerastova, tokom godine, kao i distribucije nerastova prema sadržaju proteina u spermalnoj plazmi. Konačno, izvršena su ispitivanja fertiliteta krmača, posle konvencionalnog intracervikalnog i novog postcervikalnog osemenjavanja konvencionalnim i dozama redukovano volumena i broja spermatozoida, kao i posle konvencionalnog osemenjavanja uz dodatak spermalne plazme. Postizanjem ovih ciljeva, potvrđene su sledeće glavne pretpostavke istraživanja: (1) ejakulati nerastova sa visokim sadržajem proteina, značajno bolje podnose veći stepen razređenja i duže čuvanje *in vitro*, u odnosu na ejakulate nerastova sa niskim sadržajem proteina u spermalnoj plazmi, (2) dodavanje spermalne plazme sa visokim sadržajem proteina, u spermatozoide izdvojene iz ejakulata nerastova sa niskim sadržajem proteina, može se povećati njihova progresivna pokretljivost i produžiti period njihovog čuvanja *in vitro*, (3) ove činjenice se mogu upotrebiti za povećanje fertilizacionog kapaciteta nerastova sa niskim sadržajem proteina, kao i za selekciju nerastova sa višim fertilizacionim potencijalom, na osnovu sadržaja proteina u njihovoj spermalnoj plazmi, (4) primenom postcervikalne (plitke intrauterine) inseminacije, moguće je koristiti doze duplo redukovano volumena i broja spermatozoida, u odnosu na konvencionalne doze, pri čemu je fertilitet osemenjenih krmača sličan ili veći od onog koji se postiže konvencionalnim veštačkim osemenjavanjem i (5) fertilitet krmača, veštački osemenjenih konvencionalnom intracervikalnom metodom, može se značajno povećati dodatkom 30 ml semene plazme, neposredno pre aplikacije konvencionalne inseminacione doze. Time se znatno ublažava negativan efekt inseminacije prekomerno razređenim dozama na fertilitet krmača. Postignuti rezultati predstavljaju naučni doprinos boljem razumevanju fizioloških mehanizama uticaja semene plazme na fertilizacioni kapacitet spermatozoida *in vitro*, kao i na fertilitet krmača. Osim toga, ovi rezultati mogu biti primenjeni u praktičnoj proizvodnji, jer pružaju mogućnost definisanja efikasnije tehnologije reproduktivnog iskorištavanja genetski superiornih nerastova, kao i povećanja fertiliteta veštački osemenjenih krmača.

Rezultati dobijeni u ovom istraživanju, kao i oni do kojih su došli drugi autori, pokazuju da sadržaj proteina u spermalnoj plazmi može biti važan kriterijum za procenu i poboljšanje parametara fertilizacionog potencijala sperme nerasta. Zbog toga, određivanje sadržaja proteina u spermalnoj plazmi, treba da bude ustaljena metoda za izbor nerastova donatora sperme visokog fertilizacionog potencijala. Osim toga,

kombinacija konvencionalne inseminacione doze, sa aplikacijom spermalne plazme, može značajno povećati fertilitet veštački osemenjenih krmača, naročito kada se koriste prekomerno razređene doze. Međutim, precizni mehanizmi delovanja aktivnih sastojaka spermalne plazme, na fertilitet nerastova i krmača, ipak, nisu potpuno razjašnjeni, pa ostaju predmet daljih istraživanja.

Prema našem mišljenju, dalja istraživanja ove složene problematike bi trebalo detaljno da razjasne: (a) ulogu pojedinih vrsta proteina iz pojedinih frakcija spermalne plazme (iz epididimisa i akcesornih polnih žlezda) na parametre fertilizacionog kapaciteta spermatozoida *in vivo* i *in vitro*, (b) fiziološke mehanizme interakcije proteina spermalne plazme i uslova čuvanja spermatozoida *in vitro* u tečnom i duboko zamrznutom stanju, kao i uticaj ove interakcije na parametre fertilizacionog kapaciteta spermatozoida i (c) fiziološke mehanizme delovanja pojedinih bioaktivnih komponenti spermalne plazme, naročito njenih proteina, na funkcije ženskog reproduktivnog trakta, važne za uspešnu oplodnju oocita i rani embrionalni razvoj.

7. ZAKLJUČCI

Na osnovu rezultata eksperimentalnih istraživanja, moguće je izvesti sledeće zaključke:

1. Prosečne vrednosti svih osnovnih parametara fertilizacionog potencijala sperme ispitivanih nerastova (volumen, koncentracija, ukupan broj i progresivna pokretljivost spermatozoida) su značajno ($P < 0.01$) veći u hladnom (274 ml, $229 \times 10^6/\text{ml}$, 60×10^9 i 79%), u odnosu na topli period godine (218 ml, $208 \times 10^6/\text{ml}$, 45×10^9 i 68%).
2. Nerstovi rase Durok imaju statistički značajno manji volumen ejakulata i ukupan broj spermatozoida u ejakulatu (228ml i 65×10^9) od nerastova rase Švedski Landras (301ml i 71×10^9 , $P < 0.01$) i Veliki Jorkšir (267ml i 69×10^9 , $P < 0.05$). Međutim, koncentracija spermatozoida i progresivna pokretljivost su veće kod nerastova rase Durok ($289 \times 10^6/\text{ml}$ i 82%) od nerastova rase Švedski Landras ($244 \times 10^6/\text{ml}$ i 79%, $P < 0.01$) i Veliki Jorkšir ($264 \times 10^6/\text{ml}$ i 77%, $P < 0.01$). Vrednosti navedenih parametara nisu bile značajno različite između nerastova rase Švedski Landras i Veliki Jorkšir ($P > 0.05$).
3. Prosečne vrednosti svih ispitivanih parametara fertilizacionog potencijala ejakulata, bili su statistički značajno veći ($P < 0.01$) kod nerastova sa visokim, u odnosu na nerastove se niskim sadržajem proteina u spermalnoj plazmi.
4. Sadržaj proteina u spermalnoj plazmi, nije značajnije varirao kod jednog istog nerasta. Međutim, ova vrednost je pokazakla značajna variranja između pojedinih nerastova. Tako je ova vrednost varirala između 1.31% i 3.01% (prosek 2.26%), kod nerastova sa niskim sadržajem proteina u spermalnoj plazmi, dok je kod nerastova sa visokim sadržajem proteina u spermalnoj plazmi, ova vrednost varirala između 3.70% i 4.80% (prosek 4.17%).
5. Nizak sadržaj proteina u spermalnoj plazmi (prosečno 2.44%), ustanovljen je kod 69% nerastova, a visok sadržaj proteina (prosečno 4.18%) kod 31%, od ukupno 106 ispitivanih nerastova. Rasa i starost ispitivanih nerastova nisu imali statistički značajan ($P > 0.05$) uticaj na sadržaj proteina u spermalnoj plazmi.
6. Step en razređenja ejakulata i vremena čuvanja uzoraka razređene sperme, imaju veći uticaj na progresivnu pokretljivost razređene sperme, od uticaja godišnje sezone na ovu vrednost.
7. Rasa nerastova nema značajnog uticaja na progresivnu pokretljivost razređene sperme ($P > 0.05$). Ustanovljene statistički značajno različite vrednosti progresivne pokretljivosti kod svake rase, posledica su različitog stepena razređenja i perioda čuvanja uzoraka razređene sperme.
8. Sadržaj proteina u autolognoj spermalnoj plazmi je značajno uticao na prosečnu progresivnu pokretljivost. Ova vrednost je bila značajno veća ($P < 0.01$) u svim

- razređenjima i periodima čuvanja, kod uzoraka sa viskim sadržajem proteina, u odnosu na uzorke sa niskim sadržajem proteina. Uzorci sa visokim sadržajem proteina nisu značajno ($P > 0.05$) smanjili progresivnu pokretljivost posle 72h čuvanja u razređenju 1:4, u odnosu na ovu vrednost posle 24h čuvanja u razređenju 1:2 (77% prema 64%). Međutim, ove vrednosti su bile statistički značajno različite ($P < 0.01$) kod uzoraka sa niskim sadržajem proteina (68% prema 48%).
9. Sadržaj proteina u spermalnoj plazmi ima značajan uticaj na vrednosti citomorfoloških parametara spermatozoida, tokom 72h čuvanja, u razređenju 1:4. Tako je broj spermatozoida sa oštećenom ćelijskom membranom, akrozomom ili hromozomima, u uzorcima sa visokim sadržajem proteina, bio značajno ($P < 0.01$ ili $P < 0.05$) manji (10.6%, 17.6% i 5.7%) u poređenju sa uzorcima sa niskim sadržajem proteina (18.6%, 29.2% i 13.2%).
 10. Dodavanje homologne spermalne plazme u centrifugirane spermatozoide, značajno manja stepen njihove progresivne pokretljivosti, posle 72h čuvanja u razređenju 1:4. Tako, dodavanje homologne spermalne plazme sa niskim sadržajem proteina (2%), u spermatozide izdvojene iz ejakulata sa visokim sadržajem proteina (4%), značajno smanjuje ($P < 0.01$) njihovu progresivnu pokretljivost (55%), u odnosu na ovu vrednost kod autologne razređene sperme (65%). I obrnuto, ako se spermatozoidima iz ejakulata sa niskim sadržajem proteina, doda homologna spermalna plazma sa visokim sadržajem proteina, njihova progresivna pokretljivost se značajno ($P < 0.01$) povećava (sa 52% kod autologne razređene sperme, na 65% kod homologne razređene sperme).
 11. Takođe se pokazalo da značajno veći broj (75%) uzoraka razređene autologne sperme sa visokim sadržajem proteina, zadržava $\geq 65\%$ progresivne pokretljivosti (tzv. dobri uzorci) posle 72h čuvanja u razređenju 1:4, u odnosu na uzorke sa niskim sadržajem proteina (25%). Ova vrednost dobrih uzoraka se značajno povećava (na 75%), ako se spermatozoidima izdvojenim iz ejakulata sa niskim sadržajem proteina, doda homologna spermalna plazma iz ejakulata sa viskim sadržajem proteina. Međutim, ako se spermatozoidima izdvojenim iz ejakulata sa visokim sadržajem proteina, doda homologna spermalna plazma sa niskim sadržajem proteina, broj dobrih uzoraka se smanjuje sa 75% na 50%.
 12. Navedene činjenice, u vezi sa uticajem sadržaja proteina u homolognoj spermalnoj plazmi, na progresivnu pokretljivost spermatozoida u razređenoj spermiji, pruža mogućnost povećanja fertilizacionog kapaciteta sperme nerastova sa niskim sadržajem proteina. Osim toga, sadržaj proteina u spermalnoj plazmi, može biti efikasan marker fertilizacionog potencijala nerastova, na osnovu koga se oni mogu selekcionisati za upotrebu u veštačkom osemenjavanju.
 13. Intrauterina inseminacija omogućava primenu doza duplo redukovano volumena i broja spermatozoida, jer su postignute vrednosti fertiliteta, vrednost prašenja (77% do 83%) i broj živo rođene prasadi (10.04 do 10.82), bile vrlo slične onima dobijenim posle konvencionalnog intracervikalnog osemenjavanja (83% do 87% i 10.25 do 10.31).
 14. Primenom intrauterine inseminacije, dozama duplo redukovano volumena i broja spermatozoida, moguće je duplirati broj inseminacionih doza po ejakulatu, bez povećanja stepena razređenja i njegovog negativnog uticaja na fertilizacioni

- potencijal inseminacionih doza. Na taj način je moguće značajno povećati broj osemenjenih krmača po nerastu godišnje, odnosno povećati efikasnost reproduktivne eksploatacije nerastova. Međutim, masovna praktična primena intrauterinog osemenjavanja je, još uvek, značajno ograničena.
15. Dobijeni rezultati pokazuju da osemenjavanje krmača konvencionalnim dozama, uz aplikaciju 30 ml native spermalne plazme, značajno ($P < 0.05$) povećava vrednost prašenja (94%) i prosečan broj živo rođene prasadi po leglu (12.27), u poređenju sa kontrlnim, ne tretiranim, krmačama (83% i 10.48 prasadi).
 16. Rezultati dobijeni u ovom radu, pokazuju da su postignuti postavljeni ciljevi, kao i da su potvrđene pretpostavke istraživanja.

8. LITERATURA

1. **Almin, K., Peltoniemi, O.A.T., Koskinen, E., Andersson, M.:** Porcine Field Fertility with Two Different Insemination Doses and the Effect of Sperm Morphology. *Reprod. Dom. Anim.*, 41(3)210-213, 2006.
2. **Almond, P.K. and Bilkei, G.:** Seasonal infertility in large pig production units in a Eastern-European climate. *Australian Veterinary Journal*, 83(6)344-346, 2005.
3. **Althouse, G., Wilson, M., Kuster, C., Parsley, M.:** Characterisation of lower temperature storage limitations of fresh-extended porcine semen. *Theriogenology*, 50:535-543, 1998.
4. **Althouse, G. and Lu, K.:** Bacteriospermia in extended porcine semen. *Theriogenology*, 63:573-584, 2005.
5. **Anil, S.S, Anil, L., Deen, J.:** Evaluation of patterns of removal and associations among culling because of lameness and sow productivity traits in swine breeding herds. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 226:956-961, 2005.
6. **Apić, I.:** Uticaj peroralnog tretmana probioticima na zdravstveno stanje i produktivnost krmača i prasadi u uslovima intenzivne proizvodnje (Doktorska disertacija). *Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet*, 2014.
7. **Araújo, B.E., da Costa, P.E., Aurea Helena Assis da Costa, A.H.A., Lopes, G.F., Macedo, G.G., Tarcízio Antônio Rêgo de Paula, T.A.R.:** Reproductive performance of sows submitted to intrauterine insemination. *R. Bras. Zootec.*, 38(8)1460-1467, 2009.
8. **Belstra, A.B.:** Review: Intrauterine (transcervical) and fixed-time artificial insemination in swine. *Swine Reproduction*, 3:1-6, 2002.
9. **Belstra, A.B.:** Artificial Insemination Equipment Developments. *International Pig Topics*, 19(4)37-41, 2004.
10. **Boe-Hansen, B.G., Ersbøll, K.A., Greve, T., Christensen, P.:** Increasing storage time of extended boar semen reduces sperm DNA integrity. *Theriogenology*, 63:2006-2019, 2005.
11. **Borchart Netto, G.:** Causes of Variations of Oestrus Length and Onset of Oestrus-Ovulation Interval and their Relationships with Pregnancy Rate and Litter Size in Multiparous Sows. (PhD Thesis). *Institute of Reproduction, Hanover*, 1998.
12. **Broekhuijse, M.L., Feitsma, H., Gadella B.M.:** Artificial insemination in pigs: predicting male fertility. *Vet. Q.*, 32:151-157, 2012.
13. **Bortolozzo, P.F., Wentz, I., Brandt, G., Antônio Lourenço Guidoni, L.A.:** Reproductive performance of sows submitted to uterine infusions in the beginning of oestrus. *Pesq. Agropec. Bras.*, 35(3)623-629, 2000.
14. **Buranaamnuay, K., Termpong Wongtawan, T., Masuwatana, S., Tummaruk, P., Techakumphu, M.:** Intra-uterine and Deep intra-uterine Insemination using Cryopreserved Boar Semen in Spontaneously-ovulating Sows. *Thai J. Vet. Med.*, 2010 40(2)215-219, 2010.

15. **Caballero, I., Vazquez, J.M., Gil, M.A., Calvete, J.J., Rocam J., Sanz, L., Parrilla, I., García, E.M., Rodríguez-Martínez, H., Martínez, E.A.:** Does seminalplasma PSP-I / PSP-II spermadhesin modulate the ability of boarspermatozoa to penetrate homologous oocytes in vitro? *J. Androl.*, 25:1004–1012, 2004.
16. **Caballero, I., Vazquez, J.M., Centurión, F., Rodríguez-Martínez, H., Parrilla, I., Roca, J., Cuello, C., Martínez, E.A.:** Comparative effects of autologous and homologous seminal plasma on the viability of largely extended boar spermatozoa. *Reproduction in Domestic Animals*, 39(5)370-375, 2004.
17. **Caballero, I., Vazquez, M.J., García, M.E., Parrilla, I., Roca, J., Calvete, J.J., Sanz, L., Martínez, A.E.:** Major proteins of boar seminal plasma as a tool for biotechnological preservation of spermatozoa. *Theriogenology*, 70:1352–1355, 2008.
18. **Castaneda Morreno, J.:** Effect of sexual stimulus applied during artificial insemination on reproductive performance in pigs (PhD Thesis). *University of Colima*, 2002.
19. **Centurion, F., Vazquez, M.J., Calvete, J.J., Roca, J., Sanz, L., Parrilla, I., Garcia, M.E., Emilio A. Martinez, A.E.:** Influence of Porcine Spermadhesins on the Susceptibility of Boar Spermatozoa to High Dilution. *Biology of Reproduction*, 69:640–646, 2003.
20. **Cheon, Y.M., Kim, H.K., Yang, C.B., Yi, Y.J., Park, C.S.:** Effect of Season Influencing Semen Characteristics, Frozen-Thawed Sperm Viability and Testosterone Concentration in Duroc Boars. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.*, 15(4)500-503, 2002.
21. **Chutia, T., Biswas, K.R., Tamuli, K.M., Deka, C.B., Sinha, S., Goswami, J., Banikb, S., Kayasth, B.R.:** Effect of holding of semen and washing of seminal plasma on quality and fertility of Hampshire boar semen preserved at liquid state. *Animal Reproduction Science*, 145:141–149, 2014.
22. **Ciereszko, A., Ottobre, S.J., Glogowski, J.:** Effects of season and breed on sperm acrosin activity and semen quality of boars. *Anim. Reprod. Sci.*, 64:89–96, 2000.
23. **Claus R., Weiler U., Wagner H.G.:** Photoperiodic influences on reproduction of domestic boars. II. Light influences on semen characteristics and libido. *J. Vet. Med. Ser. A*, 72:2038-2050, 1985.
24. **Claus, R.:** Physiological role of seminal components in the reproductive tract of the female pig. *J. Reprod. Fertil., Suppl.* 40:117–131, 1990.
25. **Colenbrander, B. and Kemp, B.:** Factors influencing semen quality in pigs. *J. Reprod. Fert. Suppl.*, 40:1005.109, 1990.
26. **Corcuera D.B., Hernandez I.L., R. De Alba C., Martin Rillo, S.:** Relationship of environmental temperature and boar facilities with semen quality. *Livestock Prod. Sci.*, 74(1)55-62, 2002.
27. **Cordova-Izquierdo, A., Amaya-Mejia, E.S., Cordova-Jimenez, S.M., Cordova-Jimenez, A.C.:** Comparison of Two Methods of Artificial Insemination in Sows. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 7(1)110-112, 2008.
28. **Cremades, T., Carvajal, G., Hernandez, M., Vazquez, J.M., Martinez, E.A., Roca, J.:** Head addition of seminal plasma from individual boars to freezing extender can improve the post-thaw sperm survival. *Reproduction, Fertility and Development*, abstract 92, pp. 163, 2004.
29. **Christensen, P., Stenvang, J., Godfrey, W.:** A flow cytometric method for rapid determination of sperm concentration and viability in mammalian and avian semen. *Journal of Andrology*, 25:255-264, 2004.

30. **Christensen, P., Stryhn, H., Hansen, C.:** Discrepancies in the determination of sperm concentration using Bürker-Türk, Thoma and Makler counting chambers. *Theriogenology*, 63: 992–1003, 2005.
31. **De Andrade, A., de Arruda, R., Celeghini, E., Nascimento, J., Martins, S., Raphael, C., Moretti, A.:** Fluorescent stain method for the simultaneous determination of mitochondrial potential and integrity of plasma and acrosomal membranes in boar sperm. *Reproduction in Domestic Animals*, 42:190-194, 2007.
32. **Dimitrov, S. and Żmudzki, J.:** Post-Cervical Insemination of Sows With Low Sperm Concentration Dose in the Commercial Pig Farm. *Bull. Vet. Inst. Pulawy*, 53:225-228, 2009.
33. **Dimitrov, S.:** Postcervical artificial insemination of sows in combination with synthetic seminal plasma (Predil MR-A®). *Contemporary Agriculture*, 61(3-4)169-174, 2012.
34. **Dziuk, J.P.:** Factors that influence the proportion of offspring sired by a male following heterospermic insemination. *Anim. Reprod. Sci.*, 43(2)65-88, 1996.
35. **Dyck, M.K., Foxcroft, G.R., Novak, S., Ruiz-Sanchez, A., Patterson, J., Dixon, W.T.:** Biological markers of boar fertility. *Reprod. Domest. Anim.*, 46:55-58, 2011.
36. **Engblom, L., Lundeheim, N., Dalin, A.M., Andersson, K.:** Sow removal in Swedish commercial herds. *Livest. Sci.*, 106:76–86, 2007.
37. **Engblom, L., Lundeheim, N., Strandberg, E., Schneider, M.D., Dalin, A.M., Andersson, K.:** Factors affecting length of productive life in Swedish commercial sows. *J. Anim. Sci.*, 86:432–441, 2008.
38. **FAO Outlook 2014:** World meat production is anticipated to grow modestly in 2014. http://www.pig333.com/latest_swine_news/fao-outlook-world-meat-production-is-anticipated-to-grow-modestly_8678/
39. **Floss, L.J. and Tubbs, C.R.:** Infectious Causes of Infertility in Sows. *University of Missouri Extension, Review October*, pp. 216-224, 1993.
40. **Flowers, W.L.:** Boar fertility and artificial insemination. *Proc. 15th IPVC Congress, Birmingham, Rngland, 5-9 July, 1998. Pp 45-51, 1998.*
41. **Flowers, W.L.:** Relationship between seminal plasma proteins and boar fertility. *Swine News (USA)*, 6:1-4, 2001.
42. **Flowers, W.L.:** Effect of age at which semen collection regimes are initiated on production of spermatozoa in boars. *Annual Swine Report*, 5:1-3, 2001.
43. **Foote, H.R.:** The history of artificial insemination: Selected notes and notables. *Amer. Soc. Anim. Sci.*, 1-10, 2002.
44. **Frunză, I., Cernescu, H., Korodi, G.:** Physical and chemical parameters of boar sperm. *Lucrări Stiințifice Medicină Veterinară (Timisoara)*, 41:634-640, 2008.
45. **Fülöp, L., Bírová, M., Miklós, A.:** Vplyv inseminačnej pipety s makkou olovkou na reprodukčnu užitkovost inseminovanych prasnic. *J. Farm Anim. Sci.*, 25:53-58, 1992.
46. **Gadea, J.:** Semen extenders used in the artificial insemination of swine. A review. *Spanish J. Agric. Res.*, 1(2)17-27, 2003.
47. **Gadea, J.:** Sperm factors related to *in vitro* and *in vivo* porcine fertility. *Theriogenology*, 63:431–444, 2005.
48. **Gagrčin, M., Kovčín, S., Stančić, B.:** Zdravstveni i proizvodni rezultati u farmama svinja na području Vojvodine za 2001. godinu. *Savremena poljoprivreda*, 51(3-4)265-268, 2002.
49. **Gagrčin, M., Stančić, B., Božić, A., Orlić, D.:** Intrauterine infections in pigs. *Lucrari*

- Stiintifice Medicina Veterina, Timisoara, XXXVI, pp. 479-482, 2003.*
50. **Garcia, E.M., Vázquez, J.M., Calvete, J.J., Sanz, L., Caballero, I., Parrilla, I., Gil, M.A., Roca, J., Martinez, E.A.:** Dissecting the protective effect of the seminal plasma .spermadhesin PSP-I/PSP-II on boar sperm functionality. *Andrology*, 27(3)434-43, 2006.
 51. **Garcia Ruvalcaba, J.A., Pham Duy, P.:** Effect of transcervical infusion of synthetic seminal plasma (Predil MR-A[®]) prior to insemination in sows as a method to improve reproductive results. *Proc. XIIIth AAAP Congr., Hanoi, Vietnam, 2008. P. 332, 2008.*
 52. **Garcia Ruvalcaba, J.A., Pallas Alonso, R., Hernandez-Gil, R. And Dimitrov, S.:** The use of synthetic seminal plasma (Predil MR-A[®]) as a method to facilitate procedures with cervical and post-cervical artificial insemination of sows, *Agricultural science and technology*, 1(1)2-7, 2009.
 53. **Garcia, M.E., Calvete, J.J., Sanz, L., Roca, J., Martinez, A.E., Vazquez, M.J.:** Distinct Effect of Boar Seminal Plasma Fractions Exhibiting Different Protein Profiles on the Functionality of Highly Diluted Boar Spermatozoa. *Reproduction of Domestic Animals*, 44:200-205, 2009.
 54. **Garcia, J.C., Abad, M., Kirkwood, R.N.:** Effect of sperm numbers and time of insemination relative to ovulation on sow fertility. *Anim. Reprod. Sci.*, 100(3-4)397-401, 2007.
 55. **Garcia, C.J., J.C. Domingueza, C.J., Penac, J.F., Alegreb, B., Gonzalezb, R., M.J. Castroa, J.M., Habingd, G.G., Kirkwoodd, N.R.:** Thawing boar semen in the presence of seminal plasma: Effects on sperm quality and fertility. *Animal Reproduction Science*, 119:160–165, 2010.
 56. **Gączarzewicz, D., Piasecka, M., Udała, J., Błaszczyk, B., Laszczyńska, M., Kram, A.:** Oxidoreductive capability of boar sperm mitochondria in fresh semen and during their preservation in BTS extender. *Reproductive Biology*, 3(2)161-172, 2003.
 57. **Gączarzewicz, D., Piasecka, M., Udała, J., Błaszczyk, B., Stankiewicz, T., Laszczyńska, M.:** Plasma membrane changes during the liquid storage of boar spermatozoa: a comparison of methods. *Acta Veterinaria Hungarica*, 58(1)105–116, 2010.
 58. **Gerrits, R., Lunney, J., Johnson, A., Pursel, V., Kraeling, R., Rohrer, G., Dobrinsky, J.:** Perspectives for artificial insemination and genomics to improve global swine populations. *Theriogenology*, 63:283–299, 2005.
 59. **Gibson, S., Tempelman, R.J., Kirkwood, R.N.:** Effect of oxytocin-supplemented semen on fertility of sows bred by intrauterine insemination. *J. Swine Health Prod.*, 12(4)182-185, 2004.
 60. **Glossop, C.E.:** AI in pigs: production of quality-assured, healthy semen. *In Practice*, 20(4)182-188, 1998.
 61. **Glossop, C.E.:** Animal welfare and the artificial insemination industry. *Boar Semen Preservation IV. Beltsville, Maryland, August 2000. Pp.207-211, 2000.*
 62. **Gomeida, M., Harkourt, H.A., Roldan, S.R.F.:** Sperm Competition and Sexual Selection. *Acad. Press, San Diego, pp.667-752, 1998.*
 63. **Gordon, I.:** *Controlled Reproduction in Pigs. CAB Int. University Press, Cambridge, UK, 1997.*
 64. **Grafenau, P. Sen., Grafenau, P. Jr.:** Intrauterinná Inseminácia u prasnic. *Odborný seminár: Nove Trendy v inseminácii hospodárskych zvierat, VUŽV Nitra, 25. maj, 2004. Pp.18-21.*

65. **Grafenau, P. Sen., Pivko, J., Grafenau, P. Jr., Riha, L., Kubovičova, E., Stančić, B.:** Influence of different forms of insemination catheters on fertility in sows. *J. Farm. Anim. Sci.*, XXXVIII: 53-56, 2005.
66. **Haugana, T., Reksenb, O., Y.T. Gröhnc, T.Y., Gaustadd, H.A., Hofmod, O.P.:** A retrospective study on effects of storage time of liquid boar semen on reproductive performance in Norwegian swine. *Theriogenology*, 64:891–901, 2005.
67. **Heise, A.:** Artificial Insemination in Veterinary Science. *Intech, Veterinary Medicine and Sciences, Chapter 2, pp. 19-32, 2012.*
<http://www.intechopen.com/books/a-bird-s-eye-view-of-veterinary-medicine/artificial-insemination-in-veterinary-science>
68. **Hemsworth, H.P.:** Control of Pig Reproduction. *Butterworth, London, pp. 585-612, 1982.*
69. **Hernández-Caravaca, I., Izquierdo-Rico, M.J., Juan; M.C., Luis Vieira, A.C., Abrila, D., Soriano-Úbedaa, C., Francisco, C., Vázquez, G.A.:** Reproductive performance and backflow study in cervical and post-cervical artificial insemination in sows. *Animal Reproduction Science*, 136:14– 22, 2012.
70. **Ho, H-C. and Suarez, S.S.:** Hyperactivation of mammalian spermatozoa: function and regulation. *Reproduction*, 122:519-526, 2001.
71. **Hogg, A. and Levis, G.D.:** Swine Reproductive Problems: Infectious Causes. *NebGuide, Edu., G89-926-A, pp.1-9,1997.*
72. **Hong, T.T.T., Linh, Q. N., Ogle, B., Lindberg, E. J.:** Survey on the prevalence of diarrhoea in pre-weaning piglets and on feeding systems as contributing risk factors in smallholdings in Central Vietnam. *Trop. Anim. Health Prod.*, 38:397–405, 2006.
73. **Hoshino, Y. and Koketsu, Y.:** A repeatability assessment of sows mated 4–6 days after weaning in breeding herds. *Anim. Reprod. Sci.*, 108(1-2)22-28, 2008.
74. **Huang, S.Y., Kuo, Y.H., Lee, W.C., Tsou, H.L., Lin, C.E., Ju, C.C., Lee, C.W.:** Association of heat shock protein 70 with semen quality in boars. *Animal Reproduction Science*, 63:231–240, 2000.
75. **Hughes, E.P.:** Gilt management to maximise lifetime productivity. 1. Getting gilts cycling and mated. *Pigs, Queensland Gov., South Australia, pp. 1-4, 2004.*
76. **Hunter, R.H.F.:** Transport, migration and survival of spermatozoa in the female genital tract: species with intrauterine deposition of semen. *In: Hafez, E.S.E., Thibault, C., (eds.). Sperm Transport, Survival and Fertilizing Ability. INSERM,26, pp.309-342, 1973.*
77. **Hunter, R.H.F.:** Sperm transport and reservoirs in the pig oviduct in relation to the time of ovulation. *J. Reprod. Fert.*, 63:109-115, 1981.
78. **Hunter, R.H.F.:** Pre-ovulatory arrest and peri-ovulatory redistribution of competent spermatozoa in the isthmus of the pig oviduct. *J. Reprod. Faert.*, 72:202-211, 1984.
79. **Hunter, R.H.F.:** A preovulatory temperature gradient between the isthmus and ampulla of pig oviducts during the phase of sperm storage. *J. Reprod. Faert.*, 77:599-606, 1986.
80. **Hunter, R.H.F.:** Ovarian endocrine control of sperm progression in the Fallopin tubes. *Oxf. Rev. Reprod. Biol.*, 17:85-124, 1995.
81. **Izco, L.M.:** Comparison between classical insemination and postcervical insemination applied with different doses. *Navarra agrarian, No. 144, Pp. 1-11, April-May 2004.*
82. **Jalali, M.B., Kitewska, A., Wasielak, M., Bodek, G., Bogacki, M.:** Effects of Seminal Plasma and the Presence of a Conceptus on Regulation of Lymphocyte-Cytokine Network in Porcine Endometrium. *Molecular Reproduction & Development*,

- 81:270–281, 2014.
83. **Jankevičiūtė, N. and Žilinskas, H.:** Influence of some factors on semen quality of different breeds of boars. *Veterinarija ir Zootechnika*, 19(41)1-3, 2002.
 84. **Jovičin, M.:** Ispitivanje uticaja stepena oštećenja akrozoma spermatozoida bika na koncepciju osemenjenih junica (Doktorska disertacija). *Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine*, 1991.
 85. **Jovičin, M., Petrujkić, B., Jocić, A., Stančić, I., Došen, R., Rogožarski, D., Mirilović, M.:** Morfološka analiza spermatozoida nerastova po uzrastu i rasama. *Savremena poljoprivreda*, 61(1-2)84-94, 2012.
 86. **Johnson, L.A., Weitze, K.F., Fiser, P., Maxwell, W.M.C.:** Storage of boar semen. *Anim. Reprod. Sci.*, 62:143-172, 2000.
 87. **Jotanović, S.:** Fertilitet krmača sa različitim intervalom zalučenje – estrus. (Magistarska teza). *Poljoprivredni fakultet, Novi Sad*, 2000.
 88. **Juonala, T., Lintukangas, S., Nurttala, T., Andersson, M.:** Relationship between semen quality and fertility in 106 AI-boars. *Reprod. Domest. Anim.*, 33:155–158, 1998.
 89. **Kaczmarek, M.M., Krawczynski, K., Filant, J.:** Seminal plasma affects prostaglandin synthesis and angiogenesis in the porcine uterus. *The Society for the Study of Reproduction*, 6:1-21, 2013.
 90. **Kaeoket, K., Tantasuparuk, W., Kunavongkrit, A.:** The Effect of Post-ovulatory Insemination on the Subsequent Embryonic Loss, Oestrus Cycle Length and Vaginal Discharge in Sows. *Reprod. Dom. Anim.*, 40:492-494, 2005.
 91. **Karg, H. and Bilkei, G.:** Causes of sow mortality in Hungarian indoor and outdoor pig production units. *Berl. Münchn. Tierärztl. Wochenschr.*, 115:366–368, 2002.
 92. **Kasetrut, C. and Kaeoket, K.:** Effect of Using Supernatant for Post-thawing Solution and Semen Extender prior to Insemination on Sow Reproductive Performance. *Thai J. Vet. Med.*, 40(2)171-178, 2010.
 93. **Katanić, N.:** Fertilizacioni kapacitet native i razređene sperme nerastova (Magistarska teza). *Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet*, 2004.
 94. **Kemp, B. and Soede, M.N.:** Relationship of Weaning-to-Estrus Interval to Timing of Ovulation and Fertilization in Sows. *J. Anim. Sci.*, 74:944-949, 1996.
 95. **Kennedy, B.W. and Wilkins, J.N.:** Boar, breed and environmental factors influencing semen characteristics for boars used in artificial insemination. *Can. J. Anim. Sci.*, 64:833-840, 1984.
 96. **Khalifa, T., Rekkas, C., Samartzi, F., Lymberopoulos, A., Kousenidis, K., Dovenski, T.:** Highlights on artificial insemination (AI) technology in the pigs. *Mac. Vet. Rev.*, 37(1)5-34, 2014.
 97. **KilBride, A.L., Mendl, M., Statham, P., Held, S., Harris, M., Cooper, S., Green, L.E.:** A cohort study of preweaning piglet mortality and farrowing accommodation on 112 commercial pig farms in England. *Preventive Vet. Medicine*, 104:281– 291, 2012.
 98. **Knox, V.R.:** Practicalities and Pitfalls of Semen Evaluation. *Advances in Pork Production*, 15:315-322, 2004.
 99. **Knox, V.R.:** The Anatomy & Physiology of Sperm Production in Boars. *Dep. of Anim. Sci., Univ. of Illinois*, pp. 1-11, 2013.
<http://livestocktrail.illinois.edu/swinerepronet/publications>
 100. **Koketsu, Y.:** Longevity and efficiency associated with age structures of female pigs and herd management in commercial breeding herds. *J. Anim. Sci.*, 85:1086–1091,

- 2007.
101. **Koketsu, Y.:** Six component intervals of nonproductive days by breeding-female pigs on commercial farms. *J. Anim.Sci.*, 83:1406-1412, 2005.
 102. **Koketsu, Y.:** Technical note: High-performing swine herds improved their reproductive performance differently from ordinary herds for five years. *J. Anim.Sci.*, 85:3110-3115, 2007.
 103. **Kommisrud, E., Paulenz, H., Sehested, E., Grevle, I.S.:** Influence of Boar and Semen Parameters on Motility and Acrosome Integrity in Liquid Boar Semen Stored for Five Days. *Acta Vet. Scand.*, 43:49-55, 2002.
 104. **Kovčín, S., Pejin, B., Stanačev, V., Stančić, B., Korovljev, Z.:** Uticaj ishrane krmača u prvoj fazi suprasnosti na veličinu legla i telesnu masu prasadi. *Međunarodni Simpozijum: „Stočarstvo, veterinarstvo i ekonomika u proizvodnji zdravstveno bezbedne hrane, Herceg Novi, 22. – 29. jun, 2008., Zbornik kratkih sadržaja, str. 88, 2008.*
 105. **Kovčín, S., Stančić, B., Stanačev, V., Beuković, M., Korovljev, Z., Pejin, B.:** Ishrana nazimica uslov efikasne reprodukcije. *Savremena poljop.*, 55(1-2)111-117, 2006.
 106. **Kondracki, S., Wysokińska, A., Kowalewski, D., Muczyńska, E., Adamiak, A.:** Season's influence on the properties of male domestic pig semen. *Rozprawy naukowe Pope John Paul II State School of Higher Vocational Education in Biała Podlaska, Vol. III, pp. 177-187, 2009.*
 107. **Kozdrowski, R. and Dubiel, A.:** The effect of season on the properties of wild boar (*Sus scrofa*, L.) semen. *Anim. Reprod. Sci.*, 80:281–289, 2004.
 108. **Kragić, S.:** Fertilitet krmača veštački osemenjenih konvencionalnom intracervikalnom ili novom postcervikalnom metodom (Magistarska teza). *Uiverzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet, 2014.*
 109. **Krüger, C., Rath, D.:** Intrauterine insemination in sows with reduced sperm number. *Reprod. Fertil. Develop.*, 12:113-117, 2000.
 110. **Kunowska-Słószarz, M. and Makowska, A.:** Effect of breed and season on the boar's semen characteristics. *Annals of Warsaw University of life sciences- SGGW, Animal Science*, 49:77-86, 2011.
 111. **Kunavongkrit, A., Suriyasomboon, A., Lundeheim, N., Heard, T.W., Einarsson, S.:** Management and sperm production of boars under differing environmental conditions. *Theriogenology*, 63:657-667, 2005.
 112. **Kuster, C.:** Sperm concentration determination between hemacytometric and CASA systems: Why they can be different? *Theriogenology*, 64:614–617, 2005.
 113. **Langendijak, P., Bouwman, E.G., Kidson, A., Kirkwood, N.R., Soede, N.M., Kemp, B.:** Role of myometrial activity in sperm transport through the genital tract and in fertilization in sows. *Reproduction*, 123:663-690, 2002.
 114. **Langendijak, P., Bouwman, E.G., Schams, D., Soede, N.M., Kemp, B.:** Effects of different sexual stimuli on oxytocin release, uterine activity and receptive behavior in estrus sows. *Theriogenology*, 59(3-4)849-861, 2003.
 115. **Lapuste, C., Diaconescu, S., Hincu, M., Pascoveanu, G.:** Influence of Season on the Quantity and Quality of Boar Semen. *Animal Science and Biotechnologies*, 44(1)270-272, 2011.
 116. **Le Cozler, Y., Dagorn, J., Dourmand, J.Y., Johansen, S., Aumaitre, A.:** Effect of weaning-to-conception interval and lactation length on subsequent litter size in sows. *Livest. Prod. Sci.*, 51:1-11, 1997.

117. **Levis, D.G.:** Use of additives to a dose of boar semen. *Ohio Pork Ind. Center. The Ohio State Univ., Columbus, pp. 46-53, 2002.*
118. **Liao, C.W., Shen, T.F., Chyr, S.C.:** Monthly changes in the semen characteristics of Duroc boars. *Journal Taiwan Livestock Res., 29(2)137-144, 1996.*
119. **Lipenský, J., Lustyková, A., Čeřovský, J.:** Effect of season on boar sperm morphology. *Journal of Central European Agriculture, 11(4)(465-468, 2010.*
120. **López, Rodríguez, A. and Milling, K.:** Low reproductive performance and high sows mortality in a pig breeding herd: a case study. *Irish Veterinary Journal, 61(12)818-826, 2008.*
121. **López Rodríguez, A.:** Fresh boar semen: quality control and production (PhD Thesis). *Faculty of Veterinary Medicine, Ghent University, 2012.*
122. **Lyczynski, A., Soczywko, T., Martin Rillo, S., De Alba Romero, C.:** The effect of Predil MR-A synthetic seminal plasma used to inseminate sows and gilts on their reproductive efficiency. *Proc. of IVth International Conference on Boar Semen Preservation. Beltsville, MD, Allen Press, Inc., Lawrence, KS, 2000. Pp. 250, 2000.*
123. **Madej, M., Hansen, C., Johannisson, A., Madej, A.:** Heparin-binding proteins from boar seminal plasma affecting the release of prostaglandins and interleukin-6 by porcine endometrial and cervical cells and bovine endometrial cells. *Natural Science, 5(7A)21-30, 2013.*
124. **Maletić, Z.:** Reproaktivna efikasnost krmača u zavisnosti od modela ishrane u suprasnosti i laktaciji (Doktorska disertacija). *Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet, 2012.*
125. **Maes, D., Nauwynck, H., Rijsselaere, T., Mateusen, B., Vyt, Ph., de Kruif, A., Van Soom, A.:** AI transmitted diseases in swine: an overview. *Theriogenology, 70:1337-1345, 2008.*
126. **Maes, D., Lopez Rodriguez, A., Rijsselaere, T., Vyt, P., Van Soom, A.:** Artificial Insemination in Pigs. *In: Artificial Insemination in Farm Animals (Dr. Milad Manafi, Ed.), pp. 80-94, 2011. 2011. <http://www.intechopen.com/books/artificial-insemination-in-farm-animals>*
127. **Martin Rillo, S., Lapuente, S., Hernandez-Gil, R., Garcia Ruvalcaba, J.A., Garcia Artiga, C.:** Improvement of fertility results by means of usage of synthetic seminal plasma before artificial insemination. *Proc. 14th Internat. Pig Veterinary Society Congr., Bologna, Italy, 1996. Pp 605, 1996.*
128. **Martinez, E.A., Vazquez, J.M., Roca, J., Cuello, C., Gil, M.A., Parrilla, I.:** An update on reproductive technologies with potential short-term application in pig production. *Reproduction in Domestic Animals, 40:300-309, 2005.*
129. **Maxwell, W.M.C. and Johnson, A.L.:** Physiology of spermatozoa at high dilution rates: the influence of seminal plasma. *Theriogenology, 52:1353-1362, 1999.*
130. **Maxwell, W.M.C., de Graaf, S.P., Ghaoui, R.E.-H., Evans, G.:** Seminal plasma effects on sperm handling and female fertility. *Soc. Reprod. Fertil., Suppl 64:13-38, 2007.*
131. **McGlone, J.J.:** The Future of Pork Production in the World: Towards Sustainable, Welfare-Positive Systems. *Animals, 3:401-415, 2013.*
132. **McManus, D.:** Strategies to Reduce Prewaning Mortality in Pigs. *Swine Technical Bulletin, 2011.*
133. **Mezalira, A., Dallanora, D., Bernardi, L.M., Wentz, I., Bortolozzo, F.P.:** Influence

- of Sperm Cell Dose and Post-insemination Backflow on Reproductive Performance of Intrauterine Inseminated Sows. *Reprod. Dom. Anim.*, 40:1-5, 2005.
134. **Milovanović, A., Barna, T., Maksimović, N., Vasiljević, T., Milanov, D., Bošković, N.:** Import of boars - semen quality control and possibility of complaints. *Biotechnology in Animal Husbandry*, 28(4)759-769, 2012.
135. **Mircu, C., Cernescu, H., Igna Violeta, Knop, Frunză Ilinca, Ardelean, V., Bonca, G.H., Otava, G., Zarcu Simona, Gabriela Korodi Renate, Ardelean A.:** Boar semen evaluation using casa and its relation to fertility. *Lucrări științifice medicină veterinară (Timisoara)*, 41:203-212, 2008.
136. **Mišković, M., Simić, M., Stančić, B., Mrvić, V.:** Reproductivna performansa krmača u industrijskim uslovima gajenja. "Zbornik radova", *Institut za sočarstvo, Novi Sad*, 1-2:87-93, 1981.
137. **Mogielnicka-Brzozowska, M. and Kordan, W.:** Characteristics of selected seminal plasma proteins and their application in the improvement of the reproductive processes in mammals. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 14(3)489-499, 2011.
138. **Muiño-Blanco, Pérez-Pé, R., Cebrián-Pérez, A.J.:** Seminal Plasma Proteins and Sperm Resistance to Stress. *Reprod. Dom. Anim.*, 43(4)18-31, 2008.
139. **Murase, T., Imaeda, N., Yamada, H., Miyazawa, K.:** Seasonal changes in semen characteristics, composition of seminal plasma and frequency of acrosome reaction induced by calcium and calcium ionophore A23187 in Large White boars. *J. Reprod. Dev.*, 53(4)853-65, 2007.
140. **Nacu, Gh.:** Researches regarding the effect of heterospermic inseminations on the some reproduction indices. *Bulletin UASVM Animal Science and Biotechnologies*, 65(1-2)104-108, 2008.
141. **Napel, J., Meuwissen, T.H.E., Johnson, K.R., Barascamp, E.W.:** Genetics of the Interval from Weaning to Estrus in First-Litter Sows: Correlated Responses. *J. Anim. Sci.*, 76:937-947, 1998.
142. **Nasrin, S.J. and Calogero, S.:** Seminal Plasma: An Essential Attribute to Spermatozoa (A Review). *Journal of Andrology*, 33(4)536-551, 2012.
143. **Nebesni, A., Stančić, B., Grafenau, P., Šahinović, R.:** Reproductive performance of sows inseminated with three types of insemination pipette. *Proc. Int. Conf. Reprod. Farm Anim., Liptovski Jan, Slovak Republik, May 21.22, 1998*, pp.88-89, 1998.
144. **Novak, S., Ruiz-Sanchez, A., Dixon, T.W., Foxcroft, R.G., Dyck, K.M.:** Seminal Plasma Proteins as Potential Markers of Relative Fertility in Boars. *Jurnal of Andrology*, 27:1-24, 2009.
145. **Novak, S., Ruiz-Sa-Nchez, A., Dixon, T.W., Foxcroft, R.G., Michael, G.R., Dyck, K.:** Seminal Plasma Proteins as Potential Markers of Relative Fertility in Boars. *Journal of Andrology*, 31(2)188-200, 2010.
146. **O'Leary, S., Robertson, A.S., David T. Armstrong, T.D.:** The influence of seminal plasma on ovarian function in pigs—a novel inflammatory mechanism? *Journal of Reproducti_e Immunology*, 57:225-238, 2002.
147. **O'Leary, S., Jasper, J.M., Warnes, M.G., Armstrong, T.D., Robertson, A.S.:** Seminal plasma regulates endometrial cytokine expression, leukocyte recruitment and embryo development in the pig. *Reproduction*, 128:237-247, 2004.
148. **Oliveira, J.B.A., Petersen, B.C., Mauri, L.A., Vagnini, D.L., Ricardo L.R., Baruffi, R.L.R., Franco, G.J. Jr.:** The effects of age on sperm quality: an evaluation of 1,500 semen samples. *JBRA Assisted Reproduction*, 18(2):34-41, 2014.

149. **Okazaki, T., Abe, S., Yoshida, S., Shimada, M.:** Seminal plasma damages sperm during cryopreservation, but its presence during thawing improves semen quality and conception rates in boars with poor post-thaw semen quality. *Theriogenology*, 71:491–498, 2009b.
150. **Okazaki, T., Akiyoshi, T., Kan, M., Mori, M., Teshima, H., Shimada, M.:** Artificial Insemination With Seminal Plasma Improves the Reproductive Performance of Frozen-Thawed Boar Epididymal Spermatozoa. *Journal of Andrology*, 33(5)990-998, 2012.
151. **Okere, C., Joseph, A., Ezekwe, M.:** Seasonal and genotype variations in libido, semen production and quality in artificial insemination boars. *Journal of animal and veterinary advances*, 4(10)885-888, 2005.
152. **Pech - Sansores, C., Centurión- Castro, F. G., Rodríguez-Buenfil, J. C., Segura-Correa, J. C., Aké-Lopez, J. R.:** Effect of the addition of seminal plasma, vitamin e and incubation time on post-thawed sperm viability in boar semen. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 14:965-971, 2011.
153. **Peláez, J., Riol, A.J., Alegre, B., Peña, F.J., Domínguez, C.J.:** Evaluation of the hypothetic suitability of using oestrogens and oxytocin as a semen additive to reduce the time required for the completion of pig artificial insemination. *Revue Méd. Vét.*, .157(1)20-24, 2006.
154. **Peña F.J., Domínguez, J.C., Carbajo, M., Anel, L., Alegre, B.:** Treatment of swine summer infertility syndrome by means of oxytocin under field conditions. *Theriogenology*, 49:829-836, 1998.
155. **Pérez-Llano, B., Lorenzo, J., Yenes, P., Trejo, A., Garcia-Casado, P.:** A short hypoosmotic swelling test for the prediction of boar sperm fertility. *Theriogenology*, 56:387-398, 2001.
156. **Pierzchała, M., Pareek, Sh.C., Kuryłł, J.:** Use of modern genetics achievements for improvement of pork quality – a review. *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, 15/56(4)369–377, 2006.
157. **PIC Sires:** *Boar Stud Management Manual*, pp. 1-58, March, 2013. <http://PIC Boar Stud Management Manual 2013>.
158. **Pigsys:** PIGSYS data analizys. *Teagasc Pig Production Development Service, Athenry*, p. 11, 2005.
159. **Ponsart, C., Gérard, O., Caplin, S.:** Insemination: development and actual trends in animals. *Gynécologie, Obstétrique and Fertilité*, 32(10)880-886, 2004.
160. **Popwell, M.J. and Flowers, L.W.:** Variability in relationships between semen quality and estimates of *in vivo* and *in vitro* fertility in boars. *Anim. Reprod. Sci.*, 81:97–113, 2004.
161. **Radović, I., Dragin, S., Stančić, I.:** Spermatozoidi nerasta u ženskom reproduktivnom traktu (pregled). *Letopis naučnih radova, Poljoprivredni fakultet Novi Sad*, 30(1)90-99, 2006.
162. **Radović, I., Dragin, S., Stančić, I., Stančić, B., Božić, A., Cincović, M.:** Litter size in first litter sows in relation to age at mating. *Proc. 22nd International symposium »Food safety production«, Trebinje, Bosnia and Herzegovina, 19 –25 June, 2011. Pp. 534-537, 2011.*
163. **Radović, I., Dragin, S., Stančić, I., Stančić, B., Cincović, M., Božić, A.:** Reproductivna performansa prvopraskinja i krmača u zavisnosti od pariteta i intervala zalučenje – estrus. *21. Međunarodni Simpozijum »Stočarstvo, veterinarska medicina i*

- ekonomika u ruralnom razvoju i proizvodnji zdravstveno bezbedne hrane», Divčibare, 20. – 27. Jun, 2010. Zbornik kratkih sadržaja, str. 66, 2010.*
164. **Radović, I., Stančić, B., Božić, A., Gagrčin, M., Grafenau, P., Jr., Grafenau, P., Sen.:** Fertilitet krmača posle intrauterine (transcervikalne) inseminacije. *Savremena poljoprivreda*, 56(1-2)12-18, 2007.
 165. **Radović, I., Stančić, B., Popov, R., Trivunović, S., Teodorović, M.:** Reproductivna performansa prvopraskinja i krmača viših pariteta. *Savremena poljop.*, 55(1-2)83-90, 2006.
 166. **Radović, I., Stančić, B., Timotijević, M., Gagrčin, M.:** Uticaj pariteta prašenja i perioda zalučenje-estrus na fertilitet krmača. *Savremena poljop.*, 52(3-4)251-256, 2003.
 167. **Ramirez Ovalle, F.:** Aplicación de semen muerto y del plasma seminal sintético en el estro anterior a la primera inseminación en nulíparas para evaluar su respuesta reproductiva (PhD Thesis). *Universidad Mayor, Escuela Medicina Veterinaria, Santiago de Chile, 2002.*
 168. **Rath, D.:** Low Dose Insemination in the Sow – A Review. *Reprod. Dom. Anim.*, 37:201-205, 2002.
 169. **Roberts, P. and Bilkei, G.:** Field experiences on post-cervical artificial insemination in the sow. *Reprod. Domest. Anim.*, 40:489–491, 2005.
 170. **Robertson, S.A. and Sharkey, D.J., 2001.:** The role of semen in induction of maternal immune tolerance to pregnancy. *Semin. Immunol.* 13:243–254, 2001.
 171. **Robinson, J.A.B. and Buhr, M.M.:** Impact of genetic selection on management of boar replacement. *Theriogenology*, 63:668–678, 2005.
 172. **Roca, J., Carvajal, G., Lucas, X., Vazquez, J.M., Martinez, E.A.:** Fertility of weaned sows after deep intrauterine insemination with a reduced number of frozen-thawed spermatozoa. *Theriogenology*, 60:77–87, 2003.
 173. **Roca, J., Vasquez, J.M., Gil, M.A., Cuello, C., Parrilla, I., Martinez, E.A.:** Challenges in Pig Artificial Insemination. *Reproduction in Domestic Animals*, 41(2), 43-53, 2006.
 174. **Rodriguez-Martinez, H., Kvist, U., Ernerudh, J., Sanz, L., Calvete, J.J.:** Seminal plasma proteins: what role do they play? *Am. J. Reprod. Immunol.*, 66:11-22, 2011.
 175. **Rogožarski, D., Petrujkić, B., Prokić, N., Bojkovski, J., Mirilović, M.:** Improving of pig production by intrauterine artificial insemination and other biotechnological solutions. *Bulletin UASVM, Veterinary Medicine*, 70(2)310-316, 2013.
 176. **Roseboom, J.K., Reicks, L.D., Wilson, E.M.:** The reproductive performance and factors affecting on-farm application of low-dose intrauterine deposition of semen in sows. *J. Anim. Sci.*, 82:2164-2168, 2004.
 177. **Rozeboom, K.:** Improving fertility with seminal plasma. *Swine News*, 23(2)1-4, 2000.
 178. **Rozeboom, J.K., Troedsson, T.H.M., Hodson, H.H., Shurson, C.G., Crabo, G.B.:** The importance of seminal plasma on the fertility of subsequent artificial inseminations in swine. *J. Anim., Sci.*, 78:443-448, 2000.
 179. **Rutten, C.S., Morrison, B.R., Reicks, D.:** Boar stud production analysis. *Swine Health and Production*, 8(1)11-14, 2000.
 180. **Saito, H., Sasaki, Y., Koketsu, Y.:** Associations between Age of Gilts at First Mating and Lifetime Performance or Culling Risk in Commercial Herds. *J. Vet. Med. Sci.*, 73(5)555–559, 2011.
 181. **Sancho S., Pinart E., Briz M., Garcia-Gil N., Badia E., Bassols J., Kadar E., Pruneda A., Bussalleu E., Yeste M., Coll M.G., Bonet S. (2004):** Semen quality of

- postpubertal boars during increasing and decreasing natural photoperiods. *Theriogenology*, 62:1271-1282, 2004.
182. **Sasaki, Y. and Koketsu, Y.:** Sows having high lifetime efficiency and high longevity associated with herd productivity in commercial herds. *Livest. Sci.*, 118:140–146, 2008.
183. **Savić, R., Petrović, M., Radojković, D., Radović, Č., Parunović, N.:** The effect of breed, boar and season on some properties of sperm. *Biotechnology in Animal Husbandry*, 29(2)299-310, 2013.
184. **Sbardella, P.E., Ulguim, R.R, Fontana, D.L., Ferrari, C.V., Bernardi, M.L., Wentz, I., Bortolozzo, F.P.:** The Post-Cervical Insemination does not Impair the Reproductive Performance of Primiparous Sows. *Reprod. Dom. Anim.*, 49:59–64, 2014.
185. **Setchell, P.B.:** The Parkers Lecture: Heat and the testis. *J. Reprod. Fert.*, 114:179-194, 1998.
186. **See, T.:** Genetic selection for AI traits. *Swine News*, 25(6)1-6, 2002.
187. **See, T.:** Genetic Improvement of the Pig to Satisfy the Consumer. *North Carolina State University, Swine Extension*, April, 2012.
<http://www.thepigsite.com/articles/564/genetic-improvement-of-the-pig-to-satisfy-the-consumer>
188. **Serret, G.C., Alvarenga, M.V.F., Cória, A.L.P., Dias, C.P., Corcini, C.D., Corrêa, M.N., Deschamps, J.C., Bianchi, I., Lucia Jr., T.:** Intrauterine artificial insemination of swine with different sperm concentrations, parities, and methods for prediction of ovulation. *Anim. Reprod.*, 2(4)250-256, 2005.
189. **Shirali, M.:** Improvement of Energy and Nitrogen Utilisation in Pork production – Genetics and Growth Models (PhD Thesis). *Wageningen University, the Netherlands*, 2014.
190. **Singelton, W.L.:** State of the art in artificial insemination in the United States. *Theriogenology*, 56:1305-1310, 2001.
191. **Singleton, L.W. and Flowers, B.:** Managing Boars in Artificial Insemination Centers. *Pork Information Gateway (Purdue University & North Carolina State University)*, pp. 1-7, 2001.
192. **Smital, J., De Sousa, L.L., Mohsen, A.:** Differences among breeds and manifestation of heterosis in AI boar sperm output. *Anim. Reprod. Sci.*, 80:121–130, 2004.
193. **Smital, J.:** Effects influencing boar semen. *Anim. Reprod. Sci.*, 110:335–346, 2009.
194. **Smith, L.A., Stalder, J.K., Serenius, V.T., Baas, J.T., Mabry, W.J.:** Effect of weaning age on nursery pig and sow reproductive performance. *J. Swine Health Prod.*, 16(3)131–137, 2008.
195. **Spronk, G.D., Kerkaert, B.R., Bobb, J.D., Kennedy, G.F.:** Managing the Breeding Herd. *International Pig Topics*, 12(7)7-11, 1997.
196. **Soede, N.M., Wetzels, C.C.H., Zondag, W., De Koning, M.A.I., Kemp, B.:** Effects of time of insemination relative to ovulation, as determined by ultrasonography, on fertilization rate and accessory sperm count in sows. *J. Reprod. Fert.*, 104:99-106, 1995.
197. **Stahlberg, R., Bortolozzo, F.P., Wentz, I., Nagae, R., Santin, E., Lagares, M.A.:** Influência da infusão transcervical de plasma seminal ou de estrógeno na concepção, no ciclo estral e na ovulação de porcas [Influence of transcervical infusion of seminal plasma or oestrogen on conception, oestrus cycle and ovulation in sows]. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 53(2)323-329, 2001.

198. **Stanković, B.:** Procena uspeha dubokog zamrzavanja na osnovu kvaliteta spermatozoida u nativnoj spermi nerasta i fertilitet intrauterino osemenjenih krmača (Doktorska disertacija). *Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet*, 2012.
199. **Stančić B. i Šahinović, R.:** Biotehnologija u reprodukciji svinja (monografija). *Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet*, 1998.
200. **Stančić I. and Dragin S.:** Modern technology of artificial insemination in domestic animals. *Contemporary Agriculture*, 60(1-2)204-214, 2011.
201. **Stančić I., Stančić B., Dragin S., Radović I., Božić A.:** Sows fertility after intracervical or postcervical artificialinsemination (AI) in worm and cold season, *Journal of microbiology, biotechnology and food science, (Special issue 1):1592-1601*, 2013.
202. **Stančić Jelena, Gagrčin, M., Apić, I., Dragin, S.:** Estrusno reagovanje krmača tretiranih sa PMSG posle zalučenja u toplom i hladnom periodu godine. 21. *Međunarodni S i m p o z i j u m »Stočarstvo, veterinarska medicina i ekonomika u ruralnom razvoju i proizvodnji zdravstveno bezbedne hrane«, Divčibare, 20. – 27. jun, 2010. Zbornik kratkih sadržaja, str. 71, 2010.*
203. **Stančić, B. i Veselinović, S.:** Biotehnologija u reprodukciji domaćih životinja (udžbenik za poslediplomske studije). *Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet*, 2002.
204. **Stančić, B., Božić, A., Radović, I., Grafenau, P., Sen., Pivko, J., Hrenek, P., Stančić, I.:** Veštačko osemenjavanje svinja dozama sa smanjenim brojem spermatozoida (pregled). *Savremena poljoprivreda*, 56(1-2)1-11, 2007.
205. **Stančić, B., Božić, A., Stančić, I., Dragin, S., Radović, I., Petrović, M.:** Effect of worm and cold period of the year on boar semen quality parameters. *Contemporary Agriculture*, 61(1-2)163-168, 2012.
206. **Stančić, B., Božić, A., Stančić, I., Harvey, R.B., Radović, I., Anderson, R.C., Dragin, S., Erdeljan, M., Jotanović, S.:** The possibility of increasing AI boars reproductive exploitation in AP Vojvodina (Serbia). 22nd *International symposium »Food safety production«, Trebinje, Bosnia and Herzegovina, 19 –25 June, 2011. Pp.66-69, 2011.*
207. **Stančić, B., Božić, A., Stančić, I., Radović, I., Dragin, S.:** Sow seasonal infertility. *Contemporary Agriculture*, 60(1-2)195-203, 2011.
208. **Stančić, B., Gagrčin, M., Kovčín, S.:** Mortalitet embriona svinje (pregled). *Veterinarski glasnik (Bgd.)*, 58(3-4)481-491, 2004.
209. **Stančić, B., Gagrčin, M., Kovčín, S.:** Uticaj sezone na fertilitet krmača (pregled). *Vet. glasnik*, 56(1-2)97-104, 2002.
210. **Stančić, B., Gagrčin, M., Radović, I., Stančić, I.:** Sows fertility after transcervical intrauterine insemination (the summarize of ours results). *International Symposium Anim. Prod., May, 29 – 30, Temisoara (Romania). Lucrari stiintifice Zootehnie si Biotehnologii*, 41(2)624-628, 2008.
211. **Stančić, B., Gagrčin, M., Radović, I.:** Uticaj godišnje sezone, rase i starosti nerastova na kvalitet sperme. 1. Nativna sperma. *Biotechnology in Animal Husbandry*, 19(1-2)17-23, 2003a.
212. **Stančić, B., Gagrčin, M., Radović, I.:** Uticaj godišnje sezone, rase i starosti nerastova na kvalitet sperme. 2. Razređena sperma. *Biotechnology in Animal Husbandry*, 19(3-4)25-29, 2003b.
213. **Stančić, B., Gagrčin, M., Stančić, J., Stevančević, O., Potkonjak, A.:** Infective and

- non-infective etiology of sow infertility. *Contemporary Agriculture*, 59(1-2)180-193, 2010.
214. **Stančić, B., Grafenau, P. Jr., Radović, I., Petrović Milica, Božić, A.:** Intenzitet iskorištavanje sperme nerastova u vojvodini i mogućnost njegovog povećanja. *Savremena poljoprivreda*, 58(1-2)19-26, 2009.
215. **Stančić, B., Grafenau, P., Pivko, J., Gagrčin, M.:** Influence of dilution rate and preservation time on the boar sperm quality. *Proc. XVIII Int. Conf. Farm Anim. Reprod. Liptovsky Jan (Slovakia), May 30-31, 2002. PP. 110-112, 2002.*
216. **Stančić, B., Kovčín, S., Gagrčin, M.:** Nazimica za priplod- fiziologija i tehnologija proizvodnje (monografija). *Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet, 2003.*
217. **Stančić, B., Radović, I., Božić, A., Dragin, S.:** Postlactational estrus reaction and sows farrowing rate in cold and warm seasons. *Contemporary Agriculture*, 60(3-4)253-259, 2011.
218. **Stančić, B., Radović, I., Gagrčin, M.:** Interval zalučenje-estrus i njegov uticaj na fertilitet krmača (pregled). *Arhiv za poljoprivredne nauke*, 61(213)85-92, 2000.
219. **Stančić, B., Radović, I., Stančić, I., Božić, A.:** Sows fertility after intracervical or postcervical insemination with reduced spermatozoa number in AI dose. *Contemporary Agriculture*, 62(3-4)154-159, 2013.
220. **Stančić, B., Radović, I., Stančić, I., Dragin, S., Božić, A., Gvozdić, D.:** Fertility of sows after intracervical or intrauterine insemination with different spermatozoa number in reduced volumen doses. *Acta veterinaria (Beograd)*, 60(2-3)257-262, 2010.
221. **Stančić, B., Radović, I., Stančić, I., Gagrčin, M., Božić, A., Kragić, S., Grafenau, P. Jr., Chrenek, P., Pivko, J.:** Fertilitet krmača posle intracervikalne i intrauterine inseminacije dozama redukovano volumena. *Biotechnology in Animal Husbandry*, 22(special issue)273-281, 2006.
222. **Stančić, B. i Radović, I.:** Trajanje postlaktacijskog estrusa i optimalno vreme VO krmača. *Biotechnology in Animal Husbandry*, 20(5-6)117-121, 2004.
223. **Stančić, B., Zvekić, D., Radović, I., Božić, A., Erdeljan, M.:** Increasing reproductive exploitation of AI boars (a review). *Proc. 23rd Internat. Symp. „New Technologies in Contemporary Animal Production”, Novi Sad (Serbia), 19. – 21. Jun, 2013. Pp 141-143, 2013.*
224. **Stančić, B.:** Faktori koji utiču na neke parametre reproduktivne performanse krmača (pregled). *Veterinarski glasnik (Bgd.)*, 48(5-6)407-415, 1994.
225. **Stančić, B.:** Interval zalučenje-estrus u krmača. 1. Faktori koji određuju trajanje ovog intervala (pregled). *Veterinarski glasnik (Bgd)*, 51(3-4)109-118, 1997a.
226. **Stančić, B.:** Interval zalučenje-estrus u krmača. 2. Uticaj trajanja ovog intervala na vrednost prašenja i veličinu legla (pregled). *Veterinarski glasnik (Bgd.)*, 51(3-4)119-126, 1997b.
227. **Stančić, B.:** Kvalitet sperme nerastova na vojvođanskim farmama. *Biotechnology in animal husbandry*, 18(5-6)103-107, 2002.
228. **Stančić, B.:** Reprodukcijska svinja (monografija). *Poljoprivredni fakultet, Novi Sad, 2005.*
229. **Stančić, B.:** Reprodukcijska životinja (osnovni udžbenik). *Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet, 2008.*
230. **Stančić, B.:** Savremeni principi tehnologije veštačkog osemenjavanja svinja (pregled). 3. Simpozijum “Uzgoj i zaštita zdravlja svinja”. *Vršac, 21-23. jun, 2000. Zbornik radova, str. 35-41, 2000.*

231. **Stančić, B.:** Tehnologija veštačkog osemenjavanja svinja (monografija). *Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet, 2006.*
232. **Stančić, I., Dragin, S., Stančić, B., Harvey, R., Božić, A., Anderson, R.:** Effects of breed, spermatozoa concentration, and storage on progressive motility of extended boar semen. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences, 1(3)287-295, 2012.*
233. **Stančić, I., Dragin, S., Stanković, B., Jotanović, S.:** Effect of protein contents in seminal plasma on sperm motility in diluted boar semen. *Proc. 1st International Symposium on Animal Science, November 8 – 10, 2012., Belgrade, Serbia. Pp.149-154, 2012.*
234. **Stančić, I., Radović, I., Dragin, S., Erdeljan, M., Apić, I.:** Veterinary and zootechnical situation in artificial insemination at swine farm units in Vojvodina (Srbia). *Contemporary Agriculture, 61(1-2)54-60, 2012.*
235. **Stančić, I., Radović, I., Erdeljan, M., Stančić, B., Vasiljević, T., Božić, A., Žarković, I.:** Sow fertility after the intracervical AI in cool and warm seasons using conventional doses in combination with synthetic seminal plasma (Predil MR-A[®]). *Contemporary Agriculture, 63(1-2)29-35, 2014.*
236. **Stančić, I., Stančić, J., Apić, I.:** Poremećaji reprodukcije krmača infektivne etiologije. *XV Savetovanje o biotehnologiji (sa međunarodnim učešćem). Čačak, 04. – 05. mart, 2011. Zbornik radova, 16(18)255-260, 2011.*
237. **Stančić, Jelena, Gagrčin, M., Dragin, S.:** Seasonal differences in sow reproductive performances. *Contemporary Agriculture, 59(1-2)37-48, 2010.*
238. **Stančić, B., Božić, A., Stančić, I., Dragin, S., Radović, I., Erdeljan, M.:** Effect of Season and Boars Breed on Ejaculate Quality. *Contemporary Agricult., 62(1-2)8-13, 2013.*
239. **Stančić, I., Apić, I., Stančić, B., Stojanac, N.:** Sows fertility after oxytocin addition in semen dose or vulvar injection to stimulate myometrial activity around insemination. *Contemporary Agriculture, 62(1-2)21-27, 2013.*
240. **Stančić, B., Grafenau, P. Jr., Hrenek, P., Radović, I., Gagrčin, M.:** The influence od catheter types and post-insemination cervix stimulation on the soows fertility. *Contemporary Agriculture, 55(1-2)91-94, 2006.*
241. **Stančić, B., Radović, I., Božić, A. (2006):** Intrauterina inseminacija krmača (pregled). *XI Savetovanje o biotehnologiji, Čačak, 3.-4. mart, 2006. Zbornik radov, 11(11-12), knjiga II, str. 3383-389, 2006.*
242. **Stančić, I., Apić, I., Apić, Jelena, Kragić, S.:** The influence of cervix stimulation and boar presence at artificial insemination on sows fertility. *Contemporary Agriculture, 62(1-2)1-7, 2013.*
243. **Stančić, B., Radović, I., Božić, A., Gagrčin, M.:** Sow fertility after conventional AI with insemination doses of various volumes and spermatozoa number. *Contemporary agriculture, 58(1-2)62-66,2009.*
244. **Stančić, B., Stančić, I., Radović, I., Božić, A.:** Postweaning estrus reaction of sows after the treatment with eCG in warm and cold season. *Contemporary Agriculture, 63(4-5)381-387 2014.*
245. **Strzerek, J., Wysocki, P., Kuklinska, M.:** Proteomiks of boar seminal plasma – current studies and possibility of their application in biotechnology of animal reproduction. *Reproductive Biology, 5:279-290, 2005.*
246. **Szostak, B. and Przykaza, L.:** The influence of breed, age of boars and exploitation

- season on their libido in conditions of the insemination station. *Journal of Central European Agriculture*, 12(1)124-134, 2011.
247. **Šerniene, L., Riškevičienė, V., Banys, A., Henrikas Žilinskas, H.:** Effects of age, and season on sperm qualitative parameters in lithuanian white and petren boars. *Veterinarija ir zootechnika*, 17(39)1-8, 2002.
248. **Šijačić, L., Mišković, M., Crveni, L.J., Hajdu, B.:** Reproductive performance of sows during the last few years on AIC "Bečej" at Bečej. Proc. 32nd Ann. Meeting of Europ. Assoc. Anim. Prod., pp. 1-7, 1981.
249. **Tanaka, Y., Koketsu, T.:** A survey of reproductive performance and growth performance of pigs on commercial farrow-to-finnish swine farms. *J. Vet. Epid.*, 11(2)18-22, 2007.
250. **Thibier, M. and Wagner, H.-G.:** World statistics for artificial insemination in cattle. *Livestock Production Science*, 74: 203–212, 2002.
251. **Timotijević, M., Stančić, B., Gagrčin, M.:** Postlaktacijsko estrusno reagovanje i fertilitet krmača (monografija). *Poljoprivredni fakultet, Novi Sad*, 2003.
252. **Timotijević, M.:** Reproduktivna performansa krmača sa različitim intervalom zalučenje-estrus (Doktorska disertacija). *Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultete*, 2001.
253. **Todd, S.:** Managing the sow for optimum productivity. *North Carolina State University, NC 27695-7621*, 2000.
254. **Töpfer-Petersen, E., Romero, A., Varelam P.F., Ekhlesi-Hundrieser, M., Dostálová, Z., Sanz, L., Calvete, J.J.:** Spermadhesins a new protein family: Facts, hypotheses and perspectives. *Andrologia*, 30:217–224, 1998.
255. **Troedson, M.H.T., Desvouses, A., Alghamdi, A.S., Dahms, B., Dow, C.A., Hyana, J., Valesco, R., Collahan, P.T., Macpherson, M.L., Pozor, M., Buhi, W.C.:** Components in seminal plasma regulating sperm transport and elimination. *Animal Reproduction Science*, 89:171-186, 2005.
256. **Trujillo-Ortega, E.M., Mota-Rojas, D., Olmos-Hernández, A., Alonso-Spilsbury, M., González, M., Orozco, H., Ramírez-Necochea, R., Nava-Ocampo, A.A.:** A study of piglets born by spontaneous parturition under uncontrolled conditions: could this be a naturalistic model for the study of intrapartum asphyxia? *Acta Biomed.*, 78: 29-35, 2007.
257. **Tsakmakidis, I.A., Lymberopoulos, A.G., Khalifa, T.A.:** Relationship between sperm quality traits and field-fertility of porcine semen. *J. Vet. Sci.*, 11:151-154, 2010.
258. **Tubbs, C.R., Hurd, S., Dargatz, D., Hill, G.:** Prewaning morbidity and mortality in the United States swine herd. *Swine Health and Production*, 1(1)21-28, 1993.
259. **Tubbs, C.R.:** Factors That Influence the Weaning-to-Estrus Interval in Sows. *Comp. Cont. Education for the Pract. Vet.*, 12(1)105-115, 1990.
260. **Tummaruk, P., Luneheim, N., Einarsson, S., Dalin, A-M.:** Reproductive performance of purebred Swedish Landrace and Swedish Yorkshire sows: II. Effect of mating type, weaning-to-first-service interval and lactation length. *Acta Agric. Scand., A, Anim. Sci.*, 50:217–224, 2000.
261. **Tvrđá, E., Kňazická, Z., Massányi, P., Lukáč, N.:** Relationships between levels of nitrogen compounds with antioxidant properties and semen quality in bulls. *Contemporary Agriculture* 60(3-4), 244-252, 2011.
262. **Vadnais, M.L. and Roberts, K.P.:** Effects of seminal plasma on cooling-induced capacitative changes in boar sperm. *J. Androl.*, 28, 416–422, 2007.

263. **Vanroose, G., Kruift, de A., Soon Van A.:** Embryonic mortality and embryo – pathogen interactions. *Anim. Reprod. Sci.*, 60-61:131-143, 2000.
264. **Vansickle, J.:** New Insemination Tool Still Unproven. *National HogFarmer*, 7:1-3, 2002.
265. **Varley, A.M.:** Re-visiting the weaning age debate – optimize for piglets or sows? *International Pig Topics*, 27(8)9-11, 2012.
266. **Vazquez, J.M., Martinez, E.A., Roca, J., Gil, M.A., Parrilla, I., Cuello, C., Carvajal, G., Lucas, X., Vazquez, J.L.:** Improving the efficiency of sperm technologies in pigs: the value of deep intrauterine insemination. *Theriogenology*, 63(2)536-547, 2005.
267. **Vazquez, J.M., Roca, J., Gil, M.A., Cuello, C., Parrilla, I., Vazquez, J.L.:** New developments in low-dose insemination technology. *Theriogenology*, 70(8)1216-1224, 2008.
268. **Vyt, P., Maes, D., Rijsselaere, T., Deley, W., Aarts, M., de Kruif, A., Van Soom, A.:** Detailed motility evaluation of boar semen and its predictive value for reproductive performance in sows. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift*, 77:291-299, 2008.
269. **Waberski, D., Meding, S., Dirksen, G., Weitze, K.F., Leiding, E.C., Hahn, R.:** Fertility of long term-stored boar semen: Influence of extender (Androhep and Kiev), storage time and plasma droplets in the semen. *Anim. Reprod. Sci.*, 36:145-151, 1994.
270. **Waberski, D., Soares, J.A.G., de Arruda, E.B., Weitze, K.F.:** Effect of a transcervical infusion of seminal plasma prior to insemination on the fertilising competence of low numbers of boar spermatozoa at controlled AI-ovulation intervals. *Animal Reproduction Science*, 44(3) 165-173, 1996.
271. **Waberski, D.:** Critical steps from semen collection to insemination. *Proceedings of the Annual Meeting of the EU-AI-Vets, September 2009, Gent Belgium*, pp. 66-69, 2009.
272. **Waberski, D., Töpfer-Petersen, E., Weitze, K.F.:** Does seminal plasma contribute to gamete interaction in the porcine female tract? In *Proc. IV Conf. Boar Semen Preservation, IV Edited by: Jihson, L.A., Guthrie, H.D. Allen Press Inc., Lawrence, K.S., USA*, pp. 165-172, 2000.
273. **Waberski, D., Magnus, F., Mendonca, F.F., Petrunkina, A.M., Weitze, K.F., Topfer-Petersen, E.:** Importance of sperm-binding assays for fertility prognosis of porcine spermatozoa. *Theriogenology*, 63:470-484, 2005.
274. **Waberski, D., Döhring, A., Ardon, F., Ritter, N., Zerbe, H., Schubert, H-J., Hewicker-Trautwen, M., Witze, F.K., Hunter, R.H.F.:** Physiological routes from intra-uterine seminal contents to advancement of ovulation. *Acta Vet. Scand.*, 48(13)1-8, 2006.
275. **Waller, C.M., Bilkei, G., Cameron, R.D.:** Effect of periparturient diseases accompanied by excessive vulval discharge and weaning to mating interval on sow reproductive performance. *Australian Veterinary Journal*, 80(9)545-549, 2002.
276. **Watson, P.F.:** Artificial Insemination and Preservation of Semen. In: *Marshall's Physiology of Reproduction, Fourth Edition, vol. II, Reproduction in The Male (G.E. Lamming Ed.)*, Churchill Livingstone, Edinburg, London, Melbourne and New York, 1990.
277. **Watson, P.F. and Behan, J.R.:** Intrauterine insemination of sows with reduced sperm numbers: results of a commercially based field trial. *Theriogenology*, 57(6)1683-16-93, 2002.
278. **Weitze, K.F., Lotz, J.H., Everwand, A., Willmen, T., Waberski, D.:** Interaction

- between inseminate, uterine and ovarian function in the sow. II. Investigations into the influencing of ovulation by the use of sperm-free media. *Reprod. Dom. Anim.*, 25:197-204, 1990b.
279. **Wettemann, P.R., Wells, E.M., Johnson, K.R.:** Reproductive Characteristics of Boars during and after Exposure to Increased Ambient Temperature. *J. Anim. Sci.*, 49:1501-1505, 1979.
280. **Wilson, E.M., Rozeboom, J.K., Crenshaw, D.T.:** Boar Nutrition for Optimum Sperm Production. *Advances in Pork Production*, 15:295-306, 2004.
281. **Wilson, R.M. and Dewey, E.C.:** Maximizing Mating Efficiency. *Proc. 18th IPVS Congress, Bangkok, Thailand, 26-30, June. Pp. 30-33, 1994.*
282. **Wilson, R.M.:** Postcervical Artificial Insemination. *Oskotz AI Center, Technical Institute and Livestock Management, pp. 1-34, 2006.*
283. **Wolf, J. and Smital, J.:** Quantification of factors affecting semen traits in artificial insemination boars from animal model analyses. *J. Anim. Sci.*, 87: 1620-1627, 2009.
284. **Wolken, A., Rath, D., Bortolozzo, F.P., Wentz, I., Marquetti, A.:** Sows can successfully be inseminated non-surgically into distal uterine horn with a highly reduced number of sperm cells. *Theriogenology*, 57:392-400, 2002.
285. **Wongtawan, T., Saravia, F., Wallgren, M., Caballero, I., Rodriguez-Martinez, H.:** Fertility after deep intra-uterine artificial insemination of concentrated low-volume boar semen doses. *Theriogenology*, 62(1)1-2, 2005.
286. **Wongtawan, T., Saravia, F., Wallgren, M., Caballero, I., Rodríguez-Martínez, H.:** Fertility after deep intra-uterine artificial insemination of concentrated low-volume boar semen doses. *Theriogenology*, 65(4)773-787, 2006.
287. **Yanagimachi, R. (1994):** Mammalian fertilization. *In: Knobil, E., Neill, J.D. (ed.), The Physiology of Reproduction, vol. 1. Raven Press, New York, pp. 189-317.*
288. **Yeske, P.:** Health Problems That Affect Fertility. *Nat. Hog Farmer*, 15:21-32, 2007.
289. **Young, B., Dewey, E.C., Friendship, M.R.:** Management factors associated with farrowing rate in commercial sow herds in Ontario. *Can. Vet. J.*, 51:185-189, 2010.
290. **Zvekić, D.:** Fertilitet prirodno ili veštački osemenjenih krmača u proizvodnim uslovima (Magistarska teza). *Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet, 2003.*
291. **Žaja, M.:** Fertilitet krmača švedskog landrasa u industrijskom sistemu proizvodnje (Magistarska teza). *Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet, 1989.*

9. PRILOZI

PRILOG 1.

Detalji statističke analize svih testiranih rezultata, prikazani su u tabelama 62 do 77, word formata. Zbog prevelikog obima (34 stranice A4 formata, Font Size 9, Times New Roman), ovaj prilog nije prikazan u štampanoj formi ove disertacije. Original excel dokumenti detaljne statističke analize, kao i word tabele 62 do 77, nalaze se, u elektronskoj formi, kod autora disertacije.

PRILOG 2.

Tabela 78. Sadržaj proteina u spermalnoj plazmi ispitivanih nerastova
(od svakog nerasta ispitano po 3 ejakulata)

Tet. broj nerasta	Broj ejakulata	Visok sadržaj proteina (%)	Tet. broj nerasta	Broj ejakulata	Nizak sadržaj proteina (%)
18659	1	4.11	62836	1	2.41
	2	3.81		2	2.53
	3	4.4		3	1.31
19166	1	4.04	7234	1	2.36
	2	4.19		2	2.31
	3	4.43		3	1.33
75759	1	3.87	1172	1	2.45
	2	4.21		2	2.32
	3	4.4		3	2.33
76023	1	4.08	54203	1	2.04
	2	4.11		2	2.36
	3	4.43		3	2.36
81189	1	4.37	395	1	1.92
	2	4.52		2	3.01
	3	4.23		3	2.23
71704	1	3.88	881	1	2.13
	2	4.01		2	2.84

	3	4.04		3	2.43
74803	1	4.04	1030	1	2.48
	2	4.22		2	2.68
	3	4.27		3	2.51
77841	1	4.61	1159	1	2.91
	2	4.81		2	1.45
	3	4.09		3	2.51
Prosečan sadržaj proteina (%)		4.17 (3.70-4.8)	-		2.26 (1.31-3.01)
Ukupno ispitivanih nerastova* (n)		12	-		12
Ukupno ispitivanih ejakulata (n)		36 (3×12)	-		36 (3×12)

*Prikazani su samo nerastovi korišteni za ispitivanje kvaliteta nativnih ejakulata.

Tabela 79. Sadržaj proteina u spermalnoj plazmi nerastova korištenih u eksperimentu sa mešanom spermom

Broj ejakulata po nerastu	Nizak sadržaj proteina		Broj ejakulata po nerastu	Visok sadržaj proteina	
	Tetovir broj nerasta	Sadržaj proteina (%)		Tetovir broj nerasta	Sadržaj proteina (%)
1	9197	2.16	1	58666	4.01
2		2.42	2		4.21
3		2.60	3		3.94
4		1.40	4		4.13
5		1.54	5		3.78
6		1.56	6		4.02
7		2.01	7		4.13
8		2.22	8		4.04
	Prosek	1.99			4.03
	min.	1.40			3.78
	Max.	2.60			4.21
1	45279	1.56	1	2191	4.11
2		1.52	2		3.70
3		1.5	3		4.41
4		2.01	4		4.02
5		1.88	5		3.88
6		2.02	6		4.11
7		2.16	7		4.21

8		2.22	8		4.33
	Prosek	1.86			4.10
	min.	1.50			3.70
	Max.	2.22			4.41
1	5743	2.59	1	2307	4.06
2		2.28	2		3.80
3		2.21	3		3.44
4		2.32	4		3.76
5		2.02	5		4.08
6		1.98	6		4.11
7		1.88	7		4.04
8		1.99	8		4.08
	Prosek	2.16			3.92
	min.	1.88			3.44
	Max.	2.59			4.11
1	715	2.58	1	5591	4.43
2		2.22	2		4.24
3		2.01	3		4.21
4		1.87	4		3.88
5		2.01	5		3.79
6		2.11	6		4.12
7		1.89	7		3.99
8		2.11	8		3.87
	Prosek	2.1			4.07
	min.	1.87			3.79
	Max.	2.58			4.43
Ukupno nizak nivo proteina			Ukupno visok nivo proteina		
32 ejakulata			32 ejakulata		
	Prosek	2.03			4.02
	min.	1.40			3.44
	Max.	2.60			4.43
Ukupno za sve nerastove (nizak + visok nivo proteina)					
64 ejakulata					
	Prosek		3.02		
	min.		1.4		
	Max.		4.43		

10. BIOGRAFIJA



Jelena B. Apić, DVM je rođena 22. novembar 1983. godine, u Novom Sadu (Srbija), gde je završila osnovnu školu, a srednju poljoprivrednu školu (smer veterinarski tehničar) u Futogu. Poljoprivredni fakultet, Departman za veterinarsku medicinu, upisala je školske 2002/2003. godine u Novom Sadu. Integrisane osnovne i master akademske studije, prvog i drugog stepena, studijski program veterinarska medicina, na ovom fakultetu, završila je 2010. godine, sa prosečnom ocenom 8,32. Završni diplomski-master rad, pod naslovom „*Infektivna i neinfektivna etiologija infertiliteta krmača*”, odbranila je sa ocenom 10. Time je stekla akademski naziv doktor veterinarske medicine. Doktorske studije je upisala školske 2010/2011. godine, na Departmanu za veterinarsku medicinu, Poljoprivrednog fakulteta u Novom Sadu. Položila je sve ispite (ukupno 8), predviđene planom i programom ovih studija, sa prosečnom ocenom 9,75 i overila zadnji (šesti) semestar doktorskih studija.

Tokom osnovnih i doktorskih studija, pokazala je zainteresovanost i sposobnost za naučno istraživački rad, kao i sposobnost za timski rad, pa je bila angažovana u radu na jednom istraživačkom projektu. Bila je, povremeno, angažovana i za rad u laboratoriji za mlekarstvo, Poljoprivrednog fakulteta u Novom Sadu. Za izrađen naučni rad studenata, nagrađena je nagradom Univerziteta u Novom Sadu, 2008. godine. Osim toga, kao rezultat rada na istraživačkom projektu, referisala svoj je rad na: *25th International Animal Health and Nutrition Industry Symposium, Lexington, Kentucky, USA, May, 17-20, 2009.*

Po završetku integrisanih osnovnih i diplmskih-master studija, zasnovala je radni odnos u Naučnom institutu za veterinarstvo „Novi Sad“ u Novom Sadu, 07.05.2010. godine, na Odelenju za ispitivanje namirnica animalnog porekla, kao istraživač-pripravnik. Pripravnički ispit je položila 06.06.2011. godine, u Naučnom institutu za veterinarstvo „Novi Sad“ u Novom Sadu. U zvanje istraživača-saradnika, za naučnu oblast Bezbednost hrane, izabrana je na ovom institutu 2011. godine. Sada radi, kao istraživač-saradnik u Odelenju za reprodukciju domaćih životinja, u Naučnom institutu za veterinarstvo „Novi Sad“ u Novom Sadu.

Kao prvi autor ili jedan od koautora, objavila je ukupno 21 naučnih radova, kategorije M23, M24, M32, M33, M34 i M51 i M63. Do sada je učestvovala, kao istraživač-saradnik na dva nacionalna projekta tehnološkog razvoja. Kao autor ili koautor referata, učestvovala je na jednom nacionalnom i četiri međunarodna naučna simpozijumu.

Ima položen državni ispit za radnike sa visokom školskom spremom, u oblasti veterinarske delatnosti. Posедуje licencu za obavljanje veterinarske delatnosti, koju je izdala Veterinarska komora Srbije.

Član je Vetrinarske komore Srbije i Udruženja veterinara i veterinarskih tehničara Srbije.

Vrlo dobro se služi računarskom tehnikom (MS Office, Power Point, Internet).

Odlično čita, piše i govori engleski jezik.

Ima položen vozački ispit (B-kategorija).

Živi u Novom Sadu, udata je i ima jedno dete.