**Sveučilište u Zagrebu**

**Veterinarski fakultet**

**Iva Raič**

**KINEMATIČKI POKAZATELJI POKRETLJIVOSTI SPERMIJA PASA RAZLIČITIH PASMINA**

**Zagreb, 2020.**

Ovaj rad izrađen je u Klinici za porodništvo i reprodukciju Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Martine Lojkić i izv. prof. dr. sc. Nina Maćešića i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2019./2020.

**POPIS KRATICA**

ALH (*amplitude of the lateral head displacement*) = amplituda bočnog pomicanja glave

AREA = površina

BCF (*beat cross frequency*) = ritam frekvencije

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

CASA (*computer assisted sperm analysis*) = računalno potpomognuta analiza spermija

ELONG (*elongation*)= elongacija

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

HTR = Hamilton Thorne

LIN (*linearity*) = linearnost

MED (*medium*) = srednje kretanje spermija

MOT (*motility*) = postotak pokretnih spermija

PMOT (*progressive motility*) = postotak populacije spermija s progresivnom pokretljivošću

RAP (*rapid*) = brzo kretanje spermija

SLOW = sporo kretanje spermija

STAT (*static*) = statični spermiji

STR (*straightness*) = pravocrtnost

VAP (*velocity average pathway)* = prosječna brzina putanje

VCL (*velocity curvilinear*) = liearno zakrivljena brzina

VSL (*velocity straight line*) = pravocrtna brzina

Sadržaj

[1. UVOD 1](#_Toc49716868)

[2. HIPOTEZA 7](#_Toc49716869)

[3. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI 7](#_Toc49716870)

[3.1. Specifični ciljevi 7](#_Toc49716871)

[4. MATERIJALI I METODE 8](#_Toc49716872)

[4.1. Dizajn istraživanja i postupak sa životinjama 8](#_Toc49716873)

[4.2. Klinički i androloški pregled 9](#_Toc49716874)

[4.3. Ultrazvučni pregled 9](#_Toc49716875)

[4.4. Uzimanje ejakulata 10](#_Toc49716876)

[4.5. Ocjena ejakulata 11](#_Toc49716877)

[4.5.1. Koncentracija i ukupan broj spermija 11](#_Toc49716878)

[4.5.2. Računalno potpomognuta analiza spermija (CASA) 11](#_Toc49716879)

[4.5.3. Ocjena integriteta stanične membrane spermija 13](#_Toc49716880)

[4.5.4. Metoda supravitalnog bojanja spermija po Bloom-u 13](#_Toc49716881)

[4.5.5. Morfologija spermija 14](#_Toc49716882)

[4.6. Statistička obrada podataka 14](#_Toc49716883)

[5. REZULTATI 16](#_Toc49716884)

[6. RASPRAVA 23](#_Toc49716885)

[7. ZAKLJUČCI 27](#_Toc49716886)

[8. POPIS LITERATURE 28](#_Toc49716887)

[9. SAŽETAK 35](#_Toc49716888)

[10. SUMMARY 35](#_Toc49716889)

[11. ŽIVOTOPIS 37](#_Toc49716890)

# UVOD

Domestikacija pasa (*Canis familiaris*) je započela prije 12 – 15 000 godina. Pas je izravni potomak vuka (*Canis lupus, L.*), a u pratnji čovjeka je duže nego bilo koja druga životinjska vrsta. U početku su korišteni kao psi čuvari, pomagači i lovni psi, dok danas, osim svojih izvornih namjena, predstavljaju bitan dio života ljudi poput pasa za pratnju i druženje, policijskih i vojnih pasa, pasa vodiča slijepih i invalidnih osoba, terapijskih pasa te pasa za spašavanje.

Danas postoji više od 400 različitih pasmina pasa, čime pas postaje jedna od najraznolikijih vrsta u carstvu životinja. Aktivno se selekcijski uzgajaju zadnjih 200 godina s obzirom na namjenu i njihovu ulogu u društvu. Poznato je da su ovčari u službi čovjeka već 7 000 godina, a smatra se da su stanovnici Sibira zapravo prvi započeli uzgoj pasa još prije 9 000 godina (SINDING i sur., 2020.). Iako uzgoj pasa seže daleko u prošlost, tek u 19-om stoljeću su se počela zapisivati imena pasa unutar pojedinih pasmina u rodovne knjige, čime je započeo uzgoj u „čistoj krvi“. Selekcija uzgojno vrijednih jedinki od velikog je značaja u svrhu dobivanja stabilnih pasa s obzirom na namjenu, stoga je važno pratiti reproduktivni i klinički potencijal reproduktivnih psa koji će omogućiti uzgoj najkvalitetnijih jedinki.

Unatoč velikim različitostima između pasmina, primjerice između Chihuaue i njemačke doge, ove jedinke predstavljaju istu vrstu (VON HOLDT i sur., 2010.). Slijedom toga, postavlja se pitanje trebamo li različite pasmine, s obzirom na velike fenotipske različitosti, klasificirati kao jednu vrstu ili svrstati u različite taksonomske kategorije. Usporednim analizama utvrđene su važne selekcijske osobine koje bi mogle objasniti razlike u reproduktivnim osobinama pasa, uključujući oblik i funkciju spermija. Jedna od važnih selekcijskih osobina je kompetitivnost spermija za koju se zna da je uvelike utjecala na morfologiju spermija i njihova funkcionalnost (GOMENDIO i ROLDAN, 2008., SOLER i sur., 2017., TOURMENTE i sur., 2011.). Nije razjašnjeno utječe li ova osobina na evoluciju reproduktivnih osobina pasa, s obzirom da masa testisa i dimenzije samih spermija nisu ovisne o kompetitivnosti spermija (IOSSA i sur., 2008.). Razlike u osobinama spermija mogu biti i rezultat jake selekcije u ženskom spolnom traktu, jer spermiji moraju svladati nekoliko prepreka da bi došli do mjesta oplodnje. Specifičnost u rasplođivanju pasa je da postoji potencijalno velik vremenski razmak između parenja i oplodnje, pa spermiji moraju biti sposobni preživjeti više dana u ženskom spolnom traktu, uz zadržavanje sposobnosti kretanja i sposobnosti oplodnje. U svakom slučaju, svojstva spermija, pogotovo morfološka, pokazuju znatne razlike između vrsta i obično je moguće razlikovati vrste zbog ove fenotipske osobine (LIANA i WITALIŃSKI, 2005). Proučavanje reproduktivnih razlika, posebice kvalitete sjemena između različitih pasmina pasa, omogućuje definiranje rasplodne strategije pasa (NUNEZ MARTINEZ i sur., 2007., SCHAFER SOMI i AURICH, 2007.).

Jedna od važnijih osobina u rasplođivanju pasa je spolna zrelost mužjaka, što omogućuje normalno spolno ponašanje i odgovarajuću kvalitetu sjemena. Spolna zrelost ovisi o veličini samog psa pa su male pasmine spolno zrele sa 6-8 mjeseci, a velike s 10 i više mjeseci, odnosno kada dosegnu 80% svoje odrasle težine.

Pregled rasplodne sposobnosti pasa (engl. *Breeding Soundnes Examination,* BSE) metoda je za ocjenjivanje rasplodnog potencijala (MEMON, 2007.), a uključuje klinički pregled reproduktivnog sustava, provjeru libida, pregled i ocjenu kvalitete sjemena, endokrinološko testiranje te ultrazvučni pregled reproduktivnog sustava (MEMON, 2007., LOPATE, 2012.).

Klinički pregled uključuje palpaciju i ultrazvučni pregled testisa, mjerenje volumena testisa, palpaciju i ultrazvučni pregled prostate te inspekciju penisa, skrotuma i prepucija. Zdravi testisi trebaju biti meko elastične, u cijelosti homogene konzinstencije te pomični unutar skrotuma. Uobičajeno je da je jedan testis nešto veći od drugog, dok se omjer testisa i epididimisa procjenjuje iskustvom stoga bilo kakva značajna promjena u omjeru ukazuje na atrofiju samog testisa ili natečenost epididimisa. Bilo kakva patološka promjena kao povećana temperiranost, bolnost ili dermatitis testisa ili skrotuma treba biti primijećena i zabilježena (KOLSTER, 2018.).

Smještaj testisa unutar skrotuma omogućava jednostavnost i pristupačnost ultrazvučnom pregledu. Ultrazvuk omogućuje prikaz unutrašnjih struktura u testisima i omogućava vizualizaciju eventualnih abnormalnosti, pa predstavlja nezaobilaznu dijagnostičku metodu u dijagnostici neplodnosti.

Testis psa je ehogen s homogenom ehostrukturom. Promjena ehogenosti povezana je sa smanjenom kvalitetom sjemena, posebice s morfologijom spermija (MOXON i sur., 2015.). Isto tako, protok krvi kroz testikularnu arteriju je povezan s kvalitetom sjemena jer korelira sa stupnjem spermatogeneze (DE SOUZA i sur., 2014., ENGLAND i sur., 2017.). Veličina testisa i dnevna proizvodnja spermija povezana je pak s tjelesnom masom životinje, no veličina testisa u pasa slične tjelesne mase ne predstavlja pouzdani pokazatelj plodnosti (DE SOUZA i sur., 2014.)

Uzimanje ejakulata i njegova pretraga sastavni je dio pregledna rasplodnih pasa, s obzirom da kvaliteta ejakulata izravno utječe na reproduktivni potencijal pasa. Sjeme se uzima neposredno nakon kliničkog i ultrazvučnog pregleda tehnikom manualne fiksacije penisa, uz ili bez prisutnosti kuje (ENGLAND, 1999.). Uzimanje ejakulata u prisustvu kuje je uspješnije, jer se povećava hormonalna sekrecija u očekivanju parenja (GARY, 2015.). Kod procjene kvalitete sjemena treba uzeti u obzir starost psa jer psi starije životne dobi uslijed staračke atrofije testisa kao i suviše mladi psi proizvode veći postotak morfološki abnormalnih spermija (HESSER i sur., 2017.).

Standardna ocjena sjemena uključuju makroskopsku (volumen, boja, pH) i mikroskopsku ocjenu sjemena (broj živih spermija u ejakulatu, pokretljivost, morfologija i ocjena integriteta membrane spermija) te određivanje koncentracije spermija u ejakulatu (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.). Normalno sjeme psa volumena je 1 do 30 ml, ovisno o pasmini, te sadrži 300 milijuna do 2 milijarde spermija, od kojih je više od 70% morfološki normalnih i progresivno pokretljivih (JOHNSTON, 1991., AROKIA i sur., 2016.).

Progresivna pokretljivost predstavlja jedan od najvažnijih parametara ocjene sjemena povezanih s oplodnim potencijalom spermija jer pokazuje vitalnost i strukturni integritet spermija (MURPHY i sur., 2018.). Zato procjena pokretljivosti spermija predstavlja nezaobilazni dio ocjene ejakulata. Prilikom ocjene pokretljivosti utvrđuje se ukupan postotak pokretljivih spermija, postotak progresivne pokretljivosti te brzina kretanja spermija. Ocjena sjemena tradicionalno se u laboratorijima obavlja manualno. Zadnjih je godina sve popularnija računalno potpomognuta analiza spermija (CASA, engl. *computer assisted sperm analysis*) (AMAN, 2014.). Kod pasa i mačaka računalno potpomognuta analiza spermija izvorno je opisana prije 20 godina (GUNZEL-APEL i sur.,1993.). CASA sustavi nude točnu, brzu, objektivnu i istodobnu procjenu različitih parametara sjemena koji omogućuju vizualizaciju suptilnih promjena karakteristika spermija, što se ne može prepoznati konvencionalnom analizom. Glavni problemi ovih računalnih mjernih uređaja su relativno visoki troškovi ulaganja i potreba za standardizacijom i validacijom te subjektivnost i varijabilnost rezultata (OETTLE ́, 1993., IGUER-OUADA i VERSTEGEN, 2001.), što može rezultirati pogreškama i oprečnim rezulatima (SMITH i ENGLAND 2001.). U usporedbi s automatiziranom procjenom pokretljivosti i koncentracije, automatizirana procjena morfometrije i morfologije složenija je i dugotrajna. Procjena pokretljivosti predstavlja dodatni problem jer uvelike ovisi o temperaturi te stručnosti samog veterinara pri manipulaciji s ejakulatom (YEUNG i sur. 1997.), što dovodi do velike varijabilnosti u rezultatima različitih laboratorija (IGUER-OUADA AND VERSTEGEN, 2001.). Nakon validacije, CASA sustavi mogu se rutinski koristiti u veterinarskim klinikama za procjenu plodnosti pasa i poboljšanje tehnika krioprezervacije sjemena pasa i mačaka.

Računalno potpomognutu analizu spermija izvorno su opisali DOTT i FOSTER (1979) prije više od 40 godina u širokom rasponu vrsta, uključujući govedo, konja, svinju, zeca, štakora i ovcu, a sve se više primjenjuje u veterinarskoj medicini tijekom posljednja dva desetljeća. U pasa i mačaka, CASA-u su prvi put opisali prije više od 20 godina GUNZEL-APEL i sur. (1993) i STACHECKI i sur. (1993). Nakon toga, brojni komercijalni CASA sustavi, uključujući računalnu videomikrografiju CellSoft, analizator pokreta Stromberg-Mika Cell, Hobson Sperm Tracker, Cell Track sustav, Hamilton-Thorne, Sperm Vision, Sperm Class Analyzer, validirani su uglavnom kod pasa i u manjoj mjeri u mačaka, kako u istraživačke svrhe, tako i za različite kliničke primjene (SMITH i ENGLAND, 2001.,VERSTEGEN i sur., 2002., RIJSSELAERE i sur. 2003., SCHAFER-SOMI i AURICH 2007., DORADO i sur. 2011.).

Kompjuterizirani mjerni uređaji obično se sastoje od fazno-kontrastnog mikroskopa, fotoaparata, grijača, digitalizatora slike i računala za spremanje i analizu podataka. Ovi uređaji djeluju tako da analiziraju kretanje stanica, rekonstruirajući putanje spermija iz položaja glave spermija u uzastopnim okvirima i istovremeno računajući različite parametre pokretljivosti i koncentracije. Mogućnost reprodukcije slike umetnuta je u većinu ovih uređaja, što omogućava projekciju video sekvence zadnjeg skeniranog polja, pružajući dodatnu kontrolu kako bi se potvrdilo jesu li identificirani svi spermiji i je li ispravno rekonstruirana njihova putanja. Računalno podržani sustavi za analizu sperme nude preciznu, brzu i istodobnu procjenu različitih parametara kao što su koncentracija, ukupna i progresivna pokretljivost, sporo, srednje i brzo kretanje spermija, linearnost kretanja spermija, frekvencija ritma udara, lateralno pomicane glave te različite parametre brzine (VERSTEGEN i sur. 2002., RIJSSELAERE i sur. 2005.). Zbog toga su ovi računalni mjerni uređaji vrijedni za otkrivanje suptilnih promjena u kretanju spermija, koje se ne mogu prepoznati klasičnom analizom sjemena. Štoviše, veliki broj spermija (nekoliko tisuća) može se pojedinačno analizirati u kratkom vremenu (<1 min), što ove sustave čini vrlo praktičnim za svakodnevnu kliničku upotrebu. S obzirom na veliku koncentraciju spermija u nativnom psećem ejakulatu, prije računalne analize potrebno je razrijediti uzorak prije unošenja u CASA sustav. Štoviše, važno je uzeti u obzir da postavke za svježe sjeme nisu optimalne za ohlađeno ili duboko smrznuto/odmrznuto sjeme jer medij često sadrži žumanjak koji onemogućuje analizu (VERSTEGEN i sur. 2002., RIJSSELAERE i sur. 2003. )

Sljedeći parametri analiziraju se CASA sustavom: prosječna brzina putanje (*velocity average pathway*, VAP): prosječna brzina kretanja spermija (µm/s); pravocrtna brzina (*velocity straight line*, VSL): prosječna brzina mjerena ravno pravcem od početka do kraja staze (µm/s); linearno zakrivljena brzina (*velocity curvilinear*, VCL): prosječna brzina izmjerena preko stvarne staze od točke do točke, (µm/s); amplituda bočnog pomicanja glave (*amplitude of the lateral head displacement*, ALH): srednja širina oscilacije glave tijekom ketanja (µm); ritam frekvencije (*beat cross frequency*, BCF): frekvencija glave spermija koja prelazi prosječni put u bilo kojem smjeru (Hz), pravocrtnost (*straightness*, STR): prosječna vrijednost omjera VSL/ VAP (%), linearnost (*linearity*, LIN): prosječna vrijednost omjera VSL/VCL (%), elongacija (*elongation*): prosječna vrijednost odnosa između male i velike osi glave spermija (%); površina (*area*): prosječna veličina glava spermija (µm2);postotak pokretnih spermija (MOT,%) i postotak populacije spermija s progresivnom pokretljivošću (PMOT,%) dodatno podijeljeno u četiri kategorije kretanja: brzo (RAP), srednje (MED), sporo (SLOW) i statično (STATIC; udio spermija koji se nisu kretali tijekom analize). Kvantitativna pokretljivost i kinematička analiza spermija dobivena računalno potpomognutom analizom spermija omogućuje analiziranje brojnih parametara na velikom broju spremija, što osigurava primjenu prikladnih statističkih metoda i objektivnost rezultata (BOMPART i sur., 2018.).

Pokretljivost je u pozitivnoj korelaciji s integritetom membrane spermija i normalnom morfologijom (JOHNSTON i sur., 2001.). Integritet membrane procjenjuje se testom hipoosmotskog bubrenja (HOS test), gdje se spermiji izlažu hipoosmotskoj otopini. Spermiji s intaktnom membranom bubre zbog priljeva tekućine u stanicu pa dolazi do savijanja njihova repa (SILVA i GADELLA, 2006., MOCÉ i GRAHAM, 2008., ZELLI i sur., 2013.), što je vidljivo pod mikroskopom. Integritet membrane moguće je utvrditi supravitalnim bojenjem po Bloom-u, koje se temelji se na činjenici da mrtvi spermiji imaju oštećenu staničnu membranu koja propušta eozin. Prema tome, postotak eozin pozitivnih spermija smatra se postotkom mrtvih spermija (DOBRANIĆ i sur., 2005.).

Pregled morfologije spermija je jedna od najčešće korištenih metoda u analizi sjemena, a zahtjeva stručnost i iskustvo u prepoznavanju anomalija spermija. Najčešće korištena metoda je eozin-nigrozin test te bojanje po Giemsi (KRUGER i sur., 1987.), dok Spermac omogućuje dobru vizualizaciju akrosomske membrane (GOERICKE-PESCH i FAILING, 2013.).

Postoji nekoliko sustava za kategorizaciju morfoloških abnormalnosti spermija kao što u primarne nepravilnosti koje nastaju tijekom spermatogeneze i spermiogeneze, a uzrokovane su patološkim procesima u sjemenim kanalićima testisa te sekundarne nepravilnosti koje nastaju posttestikularno, radi abnormalne funkcije epididimisa ili nakon ejakulacije zbog nepropisnog rukovanja sa ejakulatom (KOLSTER, 2018.). Patološki oblici spermija obuhvaćaju gigantske spermije s velikom glavom, mikrospermije sitne glave, višeglave spermije te ostale deformacije glave (osmica, polumjesec, okrugla ili šiljasta glava, kratka i široka, preuska, premalena, prevelika, normalna otpala glava), promjene na srednjem dijelu (spiralno oštećenje, protoplazmatska kapljica), promjene na repu (dvostruki repovi, savijeni, prekinuti, zavrnuti rep, prekratki itd.) i promjene na lipoproteinskoj ovojnici ili akrosomi (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.). Drugi sustav klasificira abnormalnosti u značajne, koje uzrokuju neplodnost, te manje značajne za koje se pretpostavlja da ne utječu na plodnost (BARTH i OKO, 1989.).

# HIPOTEZA

Velika raznolikost u karakteristikama različitih pasmina pasa može se očitovati različitom kvalitetom ejakulata. Računalno potpomognuta analiza ejakulata pruža uvid u suptilne promjene koje je nemoguće otkriti standardnom mikroskopskom pretragom i predstavlja metodu izbora u otkrivanju različitosti u pojedinim karakteristikama spermija u različitih pasmina pasa.

# OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI

Cilj ovog istraživanja je ustanoviti kinematičke pokazatelje pokretljivosti spermija pasa različitih pasmina pasa unutar 3 skupine s obzirom na tjelesnu masu. Kinematička analiza spermija se oslanja na upotrebu računalno potpomognute analize pokretljivosti spermija, sustava koji omogućava prikupljanje velikog broja parametara koji se koriste za odgovarajuću statističku analizu u različitim pasminama pasa. Korištenjem parametara računalno potpomognute analize spermija i dobivenih rezultata standardne mikroskopske analize ejakulata dobiti ćemo precizniji uvid je li umjetna selekcija unutar vrste dovela do značajnih reprodukcjskih razlika između pasmina pasa.

* 1. **Specifični ciljevi**

1. Ocijeniti kvalitetu ejakulata malih, srednjih i velikih pasmina pasa standardnom mikroskopskom pretragom
2. Ocijeniti kvalitetu ejakulata malih, srednjih i velikih pasmina pasa računalno potpomognutom analizom spermija
3. Usporediti povezanost tjelesne mase pasa s parametrima pokretljivosti spermija dobivenih računalno potpomognutom analizom i parametrima standardne mikroskopske pretrage
4. Usporediti povezanost obujma testisa s kvalitetom ejakulata
5. Usporediti parametre pokretljivosti spermija dobivene računalno potpomognutom analizom u različitih pasmina pasa

# MATERIJALI I METODE

Fakultetsko vijeće Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu temeljem članka 40. Statuta Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, na prijedlog Povjerenstva za etiku u veterinarstvu, na 10. redovitoj sjednici održanoj 15. srpnja 2020. godine donijelo je odluku da se odobrava provođenje ovog istraživanja (klasa 640-01/20-17/53, ur. broj 251-61-41-20-01).

* 1. **Dizajn istraživanja i postupak sa životinjama**

Istraživanje je provedeno na 25 spolno zrelih pasa različitih dobnih kategorija, starosti od 1 do 8 godina. Psi koji su uključeni u istraživanje su samo psi sa rodovnicom u, privatnom vlasništvu te su reprezentativni predstavnici svoje pasmine. Uzorci su uzeti tijekom rutinske kontrole ejakulata, na zahtjev vlasnika. Psi su svrstani u 3 osnovne skupine s obzirom na tjelesnu masu: mali psi do 10 kg, srednji psi od 10 do 20 kg i veliki psi preko 20 kg. Unutar te 3 skupine od 25 pasa 17 ih je dokazane plodnosti , dok ostali još nisu bili korišteni u uzgoju.



Slika 1. Psi malih pasmina uključeni u istraživanje

Istraživanje je provedeno na mužjacima pasmina: australskog ovčara (1), goden retrivera (3), labrador retrivera (3), vajmarskog ptičara (1) koji pripadaju skupini velikih pasa preko 20 kg, engleskog koker španijela (4), španjolskog psa za vodu (2), graničarskog kolija (1) koji pripadaju skupini srednjih pasa od 10 do 20 kg, standardnog jazavčara (1), šiperke (1), jack russel terijera (1), patuljastog šnaucera (3), kern terijera (1), papijona (1), bostonskog terijera (1), kavalir king Charles španijela (1) koji pripadaju skupini malih pasa do 10kg.

Svi psi su uredno cijepljeni protiv bjesnoće i zaraznih boolesti. Istraživanje je provedeno u razdoblju od 4 tjedna.

* 1. **Klinički i androloški pregled**

U sklopu općeg kliničkog i androloškog pregleda uzeta je detaljna reproduktivna anamneza te podatci o eventulanim bolestima.

Tjelesna masa je određena vaganjem životinje kako bi bili svrstani u 3 skupine, a opći klinički pregled obuhvaćao je uzimanje vrijednosti trijasa, sluznice konjuktiva, nosa i ustiju te palpaciju limfnih čvorova.

Androloški pregled uključivao je palpaciju i ultrazvučni pregled testisa, mjerenje volumena testisa, palpaciju i ultrazvučni pregled prostate te inspekciju penisa, skrotuma i prepucija. Prilikom palpacije skrotuma posebna se pažnja obraćala na simetričnost i veličinu testisa i repa epididimisa te na eventualne patološke promjene na testisima.

* 1. **Ultrazvučni pregled**

Ultrazvučni pregled testisa učinjen je ultrazvučnim uređajem SONOVET R5 (Samsung Medison, J. Koreja) s mikrokonveksnom sondom od 4 do 9 MHz-a za B-oblik (svjetlosni oblik) u realnom vremenu. Ultrazvučni aparat je postavljen prilikom prvog pregleda te su postavke ostale neizmijenjene za sve preostale preglede koji su provedeni u razdoblju od 2 tjedna. Testisi su pregledani na psima u stojećem stavu. Svakom testisu izmjerena je po 3 puta dužina (*D*) i visina (*V*) u sagitalnoj projekciji te širina, (*Š*) u transverzalnoj projekciji te je određena srednja vrijednost za svaku od vrijednosti. Medijastin testisa je bio referentna točka za svaku od projekcija: u transverzalnom presjeku medijastin se vidi kao centralno ehogeno žarište, a u sagitalnom kao ehogena linearna struktura u centralnom dijelu testisa. Na zamrznutoj i pohranjenoj slici pomoću pomične mjerke izračunata je svaka od navedenih vrijednosti. Zabilježena je ehostruktura i homogenost te eventualne promjene u strukturi testisa. Volumen testisa određen je prema Lambertovoj empirijskoj formuli: obujam = *D* x *V* x *Š* x 0,71 (LAMBERT, 1951., HSIEH i sur., 2009.).

* 1. **Uzimanje ejakulata**

U prostoriji Klinike za porodništvo i reprodukciju uzeti su uzorci ejakulata uz prisutnost vlasnika psa uz prethodno upoznavanje prostora. U svrhu lakšeg postizanja erekcije psi su olfaktorno stimuirani obriscima vaginalnog sekreta kuja, te su također korištene kuje u estrusu. Ejakulat je polučen u stabilnom stojećem položaju psa, s lijeve strane (SEAGER, 1986., JOHNSTON i sur., 2001., FRESHMAN, 2002.). Uzimanje ejakulata započeto je masiranjem bulbusa penisa preko prepucija. Kada je došlo do djelomične erekcije penisa i bulbusa glandisa, prepucij je povučen natrag preko bulbusa, prije postizanja pune erekcije, što također oponaša prirodno parenje pasa. Pritiskom na penis, naročito na području neposredno iznad bulbusa pojača se erekcija i pas poslije nekoliko koitalnih pokreta počne ejakulirati (BLENDINGER, 2007.). Prilikom koitalnih pokreta važno je lijevak i epruvete držati podalje od mužjaka kako bi se izbjegle ozljede penisa (LINDE-FORSBERG, 1995.). Čvrstim pritiskom iza bulbusa glandisa omogućen je nastavak ejakulacije. Psi ejakuliraju u 3 frakcije od kojih je druga bogata spermom, fiziološki mliječno bijele boje. Uzorci su skupljani u zasebne 15 mL epruvete (Falcon™, SAD) spojene s lijevkom (MiniTube™, Njemačka). Nakon prestanka ejakulacije i detumescencije, psima je pregledan prepucij kako bi bili sigurni da se penis adekvatno vratio u svoj položaj unutar prepucija.

Polučeni ejakulat je u kratkom vremenskom periodu pregledan te su određeni parametri koncentracije i pokretljivosti putem CASA sustava, određena je vitalnost i morfologija spermija bojanjem po Bloom-u putem svjetlosnog mikroskopa,te je ocjenjen integritet stanične membrane (HOS test). Uzorci ejakulata su držani na 37◦C.

* 1. **Ocjena ejakulata**

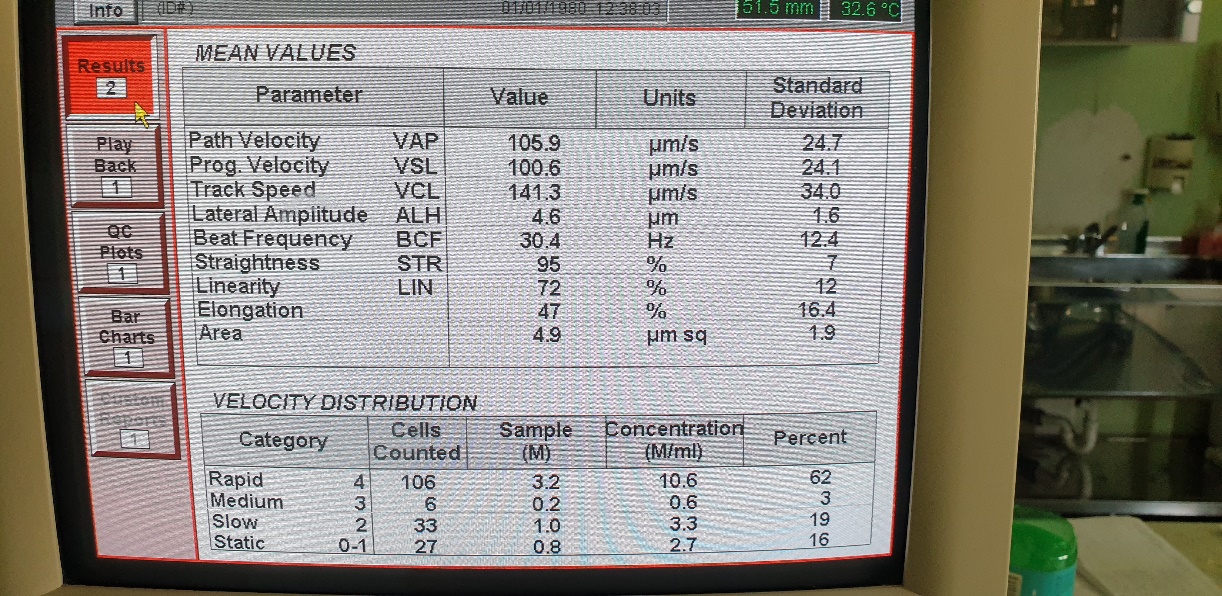
Ocjena ejakulata provedena je na drugoj, spermom bogatoj frakciji. Ejakulat je pregledan odmah nakon polučivanja, pažljivim rukovanjem, kako bi izbjegli utjecaj temperature ili predugog čekanja na rezultate. Pregled druge frakcije ejakulata obuhvaćao je standardnu ocjenu (provjeru volumena, makroskopsku i mikroskopsku procjenu te određivanje koncentracije spermija u ejakulatu) te računalno potpomognutu ocjenu. Volumen druge frakcije ejakulata određen je pomoću graduirane epruvete. Boja, konzistencija i miris procijenjeni su organoleptički. Očitavanje pH obavljeno je pomoću indikator papira na koji je stavljena kapljica sjemena. Ukupno i progresivno gibanje spermija procijenjeno je subjektivno pomoću binokularnog fazno-kontrastnog mikroskopa (Olympus BX51, Tokyo, Japan) s grijanim postoljem (37 °C). Kapljica sjemena volumena 10 µL stavljena je na zagrijanu predmetnicu i prekrivena zagrijanom pokrovnicom. Uzorci su pregledani pod povećanjem 200 x (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.). Postupak ocjenjivanja pokretljivosti temelji se na procjeni prosječnog postotka progresivno pokretljivih spermija u nekoliko različitih vidnih polja. Pri tome su se zbrajali samo spermiji koji su se gibali progresivno. Prosudba progresivne gibljivosti spermija izražena je u postotcima (%).

### Koncentracija i ukupan broj spermija

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

* + 1. **Računalno potpomognuta analiza spermija (CASA)**

Za procjenu kinematičkih parametara pokretljivosti spermija korišten je računalno potpomognuti analizator spermija (Hamilton Thorne Inc., Beverly, USA) sa softverskom verzijom 12.3. Ovaj se analizator sastoji od fazno-kontrastnog mikroskopa, kamere, grijaće ploče i računala. Postavke softvera korištene u ovom istraživanju prikazane su tablici xx. Neposredno nakon standardne mikroskopske pretrage ejakulat je razrijeđen s fiziološkom otopinom na 50x106 spermija/ml. Na zagrijanu Leja komoricu (Leja 20 µm, Leja Products B.V. Niuew Vennep, Nizozemska) naneseno je 5 µl razrijeđenog sjemena te ostavljeno na grijaćoj ploči (37 °C) da se spermiji slegnu prije analize. Leja komorica je zatim položena na grijaću ploču mikroskopa CASA sistema i pregledano je 8 nasumce izabranih polja svakog uzorka. Mjereni su sljedeći parametri: prosječna brzina putanje (*velocity average pathway*, VAP), pravocrtna brzina (*velocity straight line*, VSL), linearno zakrivljena brzina (*velocity curvilinear*, VCL), amplituda bočnog pomicanja glave (*amplitude of the lateral head displacement*, ALH), ritam frekvencije (*beat cross frequency*, BCF), pravocrtnost (*straightness*, STR), linearnost (*linearity*, LIN), elongacija (*elongation*), površina (*area*), postotak pokretnih spermija (MOT), postotak populacije spermija s progresivnom pokretljivošću (PMOT), dodatno podijeljeno u četiri kategorije kretanja: brzo (RAP), srednje (MED), sporo (SLOW) i statično (STATIC). Spermiji sa VAP >50 μm/s i STR >70% su svrstani u progresivno pokretljive.



Slika 2. Rezultati računalno potpomognute analize spermija

Tablica 1. Postavke softvera HTR 12.3.

|  |  |
| --- | --- |
| Parametar | Granične vrijednosti (*Cut off value*) |
| Temperatura (°C) | 37 |
| Najmanji kontrast | 25 |
| Najmana veličina stanice ( pikseli) | 4 |
| Najniža VAP granična vrijednost (μm/s) | 30 |
| Najniža VSL granična vrijednost (μm/s) | 15 |
| Sredna VAP granična vrijednost (μm/s) | 50 |

HTR, Hamilton Thorne; VAP, prosječna brzina putanje; VSL, pravocrtna brzina

* + 1. **Ocjena integriteta stanične membrane spermija**

Integritet stanične membrane spermija određen je testom hipoosmostskog bubrenja (HOS test). U 1 mL hipoosmotske otopine (0,73 g Na- citrata i 1,35 g fruktoze u 100 mL destilirane vode, osmolarnost 100 mOsm/kg) zagrijane na 37 °C dodano je 50 µL sjemena. Sjeme je inkubirano 30 minuta na 37 °C, nakon čega je kapljica dobro promiješanog sjemena stavljena na predmetnicu i pokrivena pokrovnicom. Brojano je 100 spermija po uzorku, a broj spermija sa zavinutim repom (spermiji s intaktnom staničnom membranom) izražen je u postotcima. Za ocjenu HOS testa korišten je fazno kontrastni mikroskop (Olympus BX 51, Tokyo, Japan) i povećanje 400 x.

### Metoda supravitalnog bojanja spermija po Bloom-u

Supravitalno bojanje spermija po Bloom-u je korišteno zbog određivanja vitalnosti i morfologije spermija. Na zagrijanu i prethodno odmašćenu predmetnicu stavljena je kap sjemena i kap eozina. Obje kapi su pomiješane zatim je nadodana dvostruko veća kap nigrozina i pomiješana s mješavinom sjemena i eozina. Napravljen je tanki razmaz pomoću predmetnice s brušenim rubom. Nakon sušenja brojano je 200 spermija pod imerzijskim povećanjem mikroskopa (1000X, Olympus CX 21, Tokyo, Japan). Spermiji su podjeljeni u dvije skupine: žive (neobojane glave) i mrtve (objane gave) te su rezultatu iskazani u postotcima.



Bijela glava – živi spermij; ljubičasta glava – mrtvi spermij; strelica- zavinuće repa

Slika 3. Vitalnost spermija po Bloom-u

* + 1. **Morfologija spermija**

Metoda supravitalnog bojanja omogućuje vizualizaciju glave, akrosome, središnjeg dijela i repa spermija pa je korištena u ocjeni morfologije spermija. Brojano je ukupno 200 spermija po uzorku, koristeći imerzijsko povećanje mikroskopa (1000X, Olympus CX 21, Tokyo, Japan). Patološki oblici su svrstani u kategorije ovisno o mjestu oštećenja (glava, vrat, srednji dio, rep i nezreli spermiji). Broj patološki promijenjenih spermija iskazan je u postotcima (%).

* 1. **Statistička obrada podataka**

Statistička analiza podataka rađena je pomoću programskog paketa SAS 9.4 (Statistical Analysis Software 2002-2012 by SAS Institute Inc., Cary, SAD). Deskriptivna statistika podataka rađena je pomoću modula PROC MEANS. Kada podatci nisu bili normalno distribuirani te kod heterogenosti varijanci, načinjena je transformacija varijabli (logaritam na bazu 10) upotrebom modula PROC TRANSREG. Za analizu kvantitativnih parametara korišten je generalni linearni model (PROC GLM). Statistički model uključivao je fiksni efekt skupine te starost pasa kao kontinuiranu varijablu. Proporcije su analizirane pomoću modula PROC GLIMMIX s binomijalnom distribucijom i link funkcijom logit. Srednje vrijednosti izračunate su metodom najmanjih kvadrata (LSM - least squares means) korištenjem LSMEANS naredbe i opcija PDIFF i CL Za usporedbu srednjih vrijednosti korištena je Tukey-Kramer-ova metoda višestrukih usporedbi na razini statističke signifikantnosti P<0.05. Pearson-ov ili Spearman-ov koeficijent korelacije izračunat je između različitih parametara ejakulata pomoću CORR modula (PROC CORR).

# REZULTATI

Prosječna dob i masa pasa malih, srednjih i velikih pasmina

Prosječna dob u skupini malih pasmina pasa (< 10 kg) iznosila je 3,35 ± 0,72 godine, skupini srednjih pasmina (10-20 kg) 4,42 ± 0,86 godine, a u skupini velikih pasmina (>20 kg) 4,25 ± 0,81 godine. Prosječna težina po skupinama iznosila je 7,75±1,22 kg za pse malih pasmina, 16,88 ± 1,47 kg za pse srednjih i 37,92±1,37 kg za pse velikih pasmina.

Rezultati ocjene ejakulata malih, srednjih i velikih pasmina pasa standardnom pretragom

Volumen ejakulata

Slika 4. pokazuje prosječan volumen druge frakcije ejakulata u tri ispitivane skupine pasa ovisno o masi. Volumen druge frakcije iznosio je kod malih pasmina pasa 1,98±0,35 mL, srednjih 3,69±0,42 mL, dok je kod velikih pasmina pasa iznosio 2,41±0,39 mL. Statističkom obradom utvrđeno je da je volumen druge frakcije ejakulata značajno veći u srednjih pasa u odnosu na male pse (p<0,05), dok se volumen ejakulata velikih pasa nije statistički razlikovao od druge dvije skupine.

a,b statistička značajnost između skupina na razini p<0,05

mali (< 10 kg); srednji (10-20 kg); veliki psi (> 20 kg)

Slika 4. Volumen druge frakcije u malih, srednjih i velikih pasmina pasa

Koncentracija spermija u ejakulatu i volumen testisa

Slika 5. prikazuje da psi velikih pasmina imaju veću koncentraciju spermija u ejakulatu (170,01±28,08 x 106/mL) u odnosu na pse malih pasmina (77,70±24,51 x 106/mL) (p<0,05). U iste je skupine utvrđena i statistički značajna razlika u veličini testisa u odnosu na pse malih i srednjih pasmina (p<0,01). Prema rezultatima, obujam testisa pozitivno korelira s koncentracijom spermija u ejakulatu (r=0,50, p<0,05). Gledajući ukupan broj spermija u ejakulatu, psi malih pasmina imaju značajno manji broj spermija (161,74±92,04 x 106) u odnosu na pse srednjih (566,79±113,05 x 106) i velikih pasmina (439,67±104,40 x 106) (p<0,05) (slika 6).

a,b statistička značajnost između skupina na razini p<0,05 unutar jednog parametra

mali (< 10 kg); srednji (10-20 kg); veliki psi (> 20 kg)

Slika 5. Obujam testisa i koncentracija spermija u ejakulatu malih, srednjih i velikih pasmina pasa

a,b statistička značajnost između skupina na razini p<0,05

mali (< 10 kg); srednji (10-20 kg); veliki psi (> 20 kg)

Slika 6. Ukupan broj spermija u ejakulatu pasa malih, srednjih i velikih pasmina

Pokretljivost, udio živih spermija u ejakulatu te morfologija spermija

Standardnom mikroskopskom procjenom pokretljivosti spermija nije utvrđena značajnost između 3 ispitivane skupine, međutim, udio živih spermija bio je značajno veći u pasa malih i srednjih pasmina u odnosu na velike (p<0,05) (tablica 2). Kako je vidljivo iz tablice 3, u skupini pasa velikih pasmina utvrđen i manji broj morfološki normalnih spermija, s tendencijom statističke značajnosti u odnosu na pse malih pasmina skupinu (p=0,05).

Tablica 2. Prikaz srednje vrijednosti i standardne pogreške pokretljivost i udjela živih spermija u ejakulatu malih, srednjih i velikih pasmina pasa

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| parametar |  |  | pokretljivost spermija  (%) | udio živih spermija (%) | |
| HOS | BLOOM |
| mali |  |  | 81,40±0,02 | 94,89±0,02a | 89,33±0,01a |
| srednji |  |  | 85,00±0,03 | 91,43±0,02a | 89,14±0,02a |
| veliki |  |  | 80,00±0,03 | 87,00±0,03b | 83,04±0,02b |

a,b statistička značajnost između skupina na razini p<0,05

mali (< 10 kg); srednji (10-20 kg); veliki psi (> 20 kg)

Tablica 3. Prikaz srednje vrijednosti i standardne pogreške morfoloških karakteristika ejakulata u malih, srednjih i velikih pasmina pasa

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| parametar | udio normalnih spermija % | abnormalnost glave % | abnormalnost repa % | abnormalnost srednjeg dijela % | protoplazmatska kapljica % |
| mali | 85,22±0,05 | 1,56±0,007 | 0,233±0,00008 | 2,33±0,008 | 5,70±0,03 |
| srednji | 85,14±0,06 | 1,43±0,009 | 0,257±0,00009 | 2,57±0,009 | 2,29±0,02 |
| veliki | 67,00±0,07 | 4,05±0,01 | 0,325±0,0001 | 3,25±0,01 | 14,75±0,05 |

mali (< 10 kg); srednji (10-20 kg); veliki psi (> 20 kg)

Kinematički pokazatelji spermija dobiveni računalno potpomognutom analizom sjemena

Kinematički pokazatelji spermija u pasa malih, srednjih i velikih pasmina

Računalno potpomognuta analiza kretanja spermija nije pokazali značajne razlike u većini kinematičkih parametara između pasa malih, srednjih i velikih pasmina. Utvrđena je razlika u pravocrtnosti kretanja (STR) koja je bila veća u velikih pasmina u odnosu na srednje (p<0,05).Pokretljivost je bila značajno veća u srednjih pasmina u odnosu na male i velike (p<0,05). Analizirajući brzinu kretanja spermija, ustanovljeno je da psi srednjih pasmina imaju veći udio brzih spermija u odnosu na velike pasmine pasa (p<0,05), a u istoj je skupini utvrđen i najmanji broj nepokretnih spermija (tablica 4).

Tablica 4. Kinematički pokazatelji spermija (srednja vrijednost ± standardna pogreška) pasa malih, srednjih i velikih pasmina

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| parametar | mali | srednji | veliki |
| VAP (µm/s) | 92,71±6,70 | 99,62±7,95 | 95,27±7,40 |
| VSL (µm/s) | 76,34±5,74 | 73,80±6,80 | 83,23±6,34 |
| VCL (µm/s) | 161,68±14,85 | 192,19±17,61 | 159,59±16,41 |
| ALH (µm) | 6,80±0,52 | 7,70±0,62 | 5,76±0,57 |
| BCF (Hz) | 24,47±0,78 | 23,83±0,92 | 25,11±0,86 |
| STR (%) | 81,40±0,02ab | 75,86±0,03a | 87,25±0,02b |
| LIN (%) | 49,00±0,03 | 42,43±0,04 | 55,50±0,03 |
| ELONG (%) | 46,50±0,02 | 42,57±0,03 | 47,25±0,02 |
| POVRŠINA (µm2) | 5,49±0,13 | 5,70±0,15 | 5,54±0,14 |
| MOT (%) | 81,90±0,03a | 91,86±0,03b | 82,25±0,03a |
| PROG (%) | 49,10±0,05 | 45,00±0,06 | 46,00±0,05 |
| RAP (%) | 51,90±0,06ab | 69,29±0,07a | 48,00±0,07b |
| MED (%) | 7,20±0,02 | 7,28±0,02 | 7,00±0,02 |
| SLOW (%) | 22,70±0,04 | 11,85±0,04 | 27,13±0,05 |
| STAT (%) | 18,10±0,03a | 8,14±0,03b | 17,63±0,03ab |

a,b statistička značajnost između uzoraka na razini p<0,05

mali (< 10 kg); srednji (10-20 kg); veliki psi > 20 kg); CASA, računalno potpomognuta analiza spermija; VAP, prosječna brzina putanje; VSL, pravocrtna brzina; VCL, linearno zakrivljena brzina; ALH, amplituda bočnog pomicanja glave, BCF, ritam frekvencije; STR, pravocrtnost; LIN, linearnost; ELONG, elongacija; MOT, pokretljivi spermiji; PROG, progresivno pokretljivi spermiji; RAP, brzi; MED, srednji, SLOW, spori; STAT, statični spermiji

Statistički značajne korelacije utvrđene su između brzine kretanja i vitalnosti spermija. Postotak spermija s intaktnom membranom (HOS test) i živih spermija (Bloom) pozitivno korelira s brojem brzih spermija (r=0,48, p<0,05), odnosno negativno s brojem nepokretnih spermija (r= -0,44, p<0,05). Također, obujam testisa i masa psa pozitivno koreliraju s koncentracijom spermija u ejakulatu (r=0,49, p<0,05). Korelacije između mase pasa i različitih karakteristika kretanja spermija analiziranih pomoću CASA uređaja i standardne mikroskopske analize spermija prikazane su u tablici 5.

Tablica 5. Pearsonove korelacije i p-vrijednosti između mase pasa i različitih karakteristika kretanja spermija analiziranih CASA sustavom i standardnom mikroskopskom analizom spermija

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  | masa (kg) | |
| parametar | korelacija | p-vrijednost |
| VAP (µm/s) | 0,012 | 0,952 |
| VSL (µm/s) | 0,183 | 0,381 |
| VCL (µm/s) | -0,080 | 0,703 |
| ALH (µm) | -0,318 | 0,120 |
| BCF (Hz) | 0,227 | 0,274 |
| STR (%) | 0,359 | 0,077 |
| LIN (%) | -0,319 | 0,120 |
| MOT (%) | -0,018 | 0,932 |
| PROG (%) | -0,076 | 0,717 |
| RAPID (%) | -0,084 | 0,689 |
| MEDIUM (%) | 0,027 | 0,897 |
| SLOW (%) | 0,105 | 0,615 |
| STATIC (%) | 0,010 | 0,961 |
| KONCENTRACIJA | 0,431 | 0,031 |
| UKUPAN BROJ SPERMIJA | 0,508 | 0,019 |
| BLOOM | -0,465 | 0,021 |
| HOS | -0,482 | 0,020 |
| NORMALNI MORF | 0,795 | 0,504 |
| OBUJAM TESTISA | 0,795 | <0,0001 |

CASA, računalno potpomognuta analiza spermija; VAP, prosječna brzina putanje; VSL, pravocrtna brzina; VCL, linearno zakrivljena brzina; ALH, amplituda bočnog pomicanja glave, BCF, ritam frekvencije; STR, pravocrtnost; LIN, linearnost; MOT, pokretljivi spermiji; PROG, progresivno pokretljivi spermiji; RAP, brzi; MED, srednji, SLOW, spori; STAT, statični spermiji

Kinematički pokazatelji spermija u različitih pasmina pasa

Uspoređujući kinematičke parametre spermija između pasmina, utvrđeno je da engleski koker španijel ima najveći VCL i ALH te najmanji udio srednje brzih spermija, dok labrador retriver ima najveći STR i LIN. Najmanje brzine (VAP, VCL, VSL) nađene su kod patuljastog šnaucera (tablica 6).

Tablica 6. Kinematički pokazatelji spermija (srednja vrijednost ± standardna pogreška) različitih pasmina pasa

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| parametar | engleski koker španijel | golden retriver | labrador retriver | patuljasti šnaucer |
| VAP (µm/s) | 116,89±8,93 | 95,54±10,28 | 101,99±10,43 | 76,43±10,12 |
| VSL (µm/s) | 84,31±6,78 | 84,60±7,81 | 88,78±7,92 | 56,85±7,68 |
| VCL (µm/s) | 235,62±14,85a | 139,34±17,09b | 187,95±17,34ab | 135,31±16,82b |
| ALH (µm) | 9,23±0,61a | 5,13±0,70b | 6,33±0,71ab | 5,80±0,69b |
| BCF (Hz) | 23,06±1,10 | 24,14±1,27 | 27,16±1,29 | 25,79±1,25 |
| STR (%) | 73,25±0,03a | 89,00±0,03b | 86,00±0,03bc | 76,33±0,04ac |
| LIN (%) | 37,75±0,02a | 64,33±0,03bc | 48,00±0,03b | 45,00±0,03ab |
| MOT (%) | 90,75±0,04 | 85,26±0,03 | 82,33±0,03 | 83,37±0,03 |
| PROG (%) | 45,32±0,05 | 43,67±0,06 | 53,22±0,05 | 47,12±0,05 |
| RAP (%) | 67,75±0,09 | 40,67±0,12 | 59,67±0,12 | 43,33±0,12 |
| MED (%) | 4,00±0,02a | 6,33±0,02ac | 7,33±0,02ac | 11,67±0,03bc |
| SLOW (%) | 20,00±0,06 | 38,67±0,09 | 16,33±0,07 | 29,33±0,08 |
| STAT (%) | 8,25±0,04 | 14,00±0,05 | 16,67±0,05 | 05,33±0,05 |

a,b,c statistička značajnost između pasmina na razini p<0,05

CASA, računalno potpomognuta analiza spermija; VAP, prosječna brzina putanje; VSL, pravocrtna brzina; VCL, linearno zakrivljena brzina; ALH, amplituda bočnog pomicanja glave, BCF, ritam frekvencije; STR, pravocrtnost; LIN, linearnost; MOT, pokretljivi spermiji; PROG, progresivno pokretljivi spermiji; RAP, brzi; MED, srednji, SLOW, spori; STAT, statični spermiji

# RASPRAVA

Opće je prihvaćeno da su psi nastali od sivog vuka, a nedavna evolucija pasmina pasa predstavlja vrlo iterativni proces koji se temeljio na ograničenom genetskom materijalu za stvaranje nevjerojatne fenotipske raznolikosti (von Holdt i sur., 2010.). S obzirom na tezu da su nastali od svega nekoliko divljih kanida, može se zaključiti da je do fenotipskih varijacija došlo uslijed djelovanja niza mutacija kroz 14 000 godina (OLSEN, 1985.). Suprotno navedenoj pretpostavci, ukoliko su psi nastali od velike populacije divljih kanida i dugo se križali kroz evoluciju, velika raznolikost može se objasniti uslijed većeg priljeva različitog genetskog bazena (Wayne i sur., 1987.). Međutim, genetska izolacija među nekim pasminama uslijed selekcije, morala je biti dovoljna kako bi uzrokovala divergenciju u učestalosti alela.

Dugotrajna i intenzivna selekcija pasa od strane uzgajivača rezultirala je dramatičnim razlikama u fenotipu između pasmina, uključujući i razlike u reproduktivnim osobinama odnosno kvaliteti ejakulata. Građa i funkcija spermija važne su reproduktivne vrijednosti mužjaka (TUSET i sur., 2008, Fitzpatrick i sur., 2010.). Uslijed snažne prirodne selekcije (Birkhead i sur., 2002.), primijećen je utjecaj i na kompeticijsko ponašanje spermija (Gómez Montoto i sur., 2011, Leivers i sur., 2014.). Razvojem pasmina pasa, prirodna selekcija zamijenjena je s umjetnom, te je ovo djelovanje moglo utjecati na funkciju i strukturu spermija uslijed stresa što ima za posljedicu izmjenu genetskog koda (Birkhead i sur., 2005.). Navedene promjene utjecale su na ko-evoluciju dužine jajovoda u ženki, veličinu testisa kao i na morfologiju spermija koji moraju biti sposobni prijeći barijere u ženskom spolnom sustavu (Anderson i sur., 2006.). Morfologija, pokretljivost i vitalnost spermija predstavljaju parametre koji ukazuju na kvalitetu ejakulata i pomoću kojih možemo otkriti poremećaj funkcije testisa i epididimisa. Ovi se parametri tradicionalno izvode manualno, standardnom mikroskopskom analizom uzorka sjemena. Međutim, danas je razvijena računalno potpomognuta analiza spermija (CASA) koja omogućava objektivnu analizu ispitivanih parametara sjemena, a istovremeno nudi uvid u neke suptilne promjene kretanja spermija koje ne bi bilo moguće otkriti standardnom mikroskopskom analizom (KOLSTER, 2018.).

SOLER i sur. (2016.) su dokazali da je morfologija spermija engleskog buldoga u potpunosti različita u odnosu na ostale pasmine pasa zbog snažne umjetne selekcija te zbog činjenice da je ova pasmina gotovo u potpunosti ovisna o asistiranoj reprodukciji. Također, SOLER i sur. (2016) su proučavali morfologiju glave spermija uz računalno potpomognutu analizu spermija (CASA) između 7 pasmina (engleski buldog, chihuahua, njemački ovčar, Labrador retriever, španjolski mastiff, stafordski bulterijer, valencian rat terijer) s naglaskom na dužinu (*length*), elongaciju (*elongation*) te eliptičnost (*ellipticity*) glave te su utvrdili da su to najobjektivniji parametri koji omogućavaju razlikovanje pasmina pasa. U našem istraživanju, nismo primijetili značajne razlike u morfologiji glave spermija unutar ispitivanih pasmina (Labrador retriever, golden retriever, engleski koker španijel, patuljasti šnaucer) već da unutar 3 skupine (mali do10 kg, srednji do 20 kg i veliki preko 20 kg) postoji razlika u postotku abnormalnosti glave spermija te je najveći udio primijećen u skupini velikih pasmina pasa (4,05±0,01 %).

Volumen sjemena često se navodi kao marker kvalitete, no kod pasa on se ne smatra osobitim pokazateljem kvalitete sjemena (AROKIA ROBERT i sur., 2016.). Ipak, ovaj je podatak bitan kod određivanja ukupne koncentracije spermija u ejakulatu pa predstavlja rutinski marker u standardnoj analizi sjemena. Povezanost tjelesne mase pasa i volumena sjemena utvrđena je u istraživanju RIJSSELAERE i sur. (2007.), što je potvrdilo i naše istraživanje gdje su psi srednjih pasmina imali najveći volumen ejakulata.

Ultrazvučna pretraga testisa omogućava točno i dosljedno određivanje veličine i obujma testisa te se stoga može rutinski koristiti za ocjenu rasplodne sposobnosti mužjaka. Prema rezultatima dobivenim našim istraživanjem psi velikih pasmina imaju veću koncentraciju spermija u ejakulatu (170,01±28,08 x 106/mL) u odnosu na pse malih pasmina (77,70±24,51 x 106/mL) (p<0,05). Koncentracija spermija u ejakulatu, koja se izražava kao broj spermija po mililitru, predstavlja važan indikator kvalitete sjemena i prognostički čimbenik u utvrđivanju plodnosti mužjaka. Ipak, ne predstavlja točan pokazatelj spermatogeneze jer je obrnuto povezana s volumenom ejakulata (ROOT KUSTRIZ, 2007.). Koncentracija spermija ovisi o masi sjemenih kanalića, pa je u pasa velikih pasmina utvrđena i statistički značajna razlika u veličini testisa u odnosu na pse malih i srednjih pasmina (p<0,01). Prema rezultatima, obujam testisa pozitivno korelira s koncentracijom spermija u ejakulatu (r=0,50, p<0,05). Gledajući ukupan broj spermija u ejakulatu, psi malih pasmina imaju značajno manji broj spermija (161,74±92,04 x 106) u odnosu na pse srednjih (566,79±113,05 x 106) i velikih pasmina (439,67±104,40 x 106) (p<0,05). Prema istraživanju DAHLBOM i sur. (1995.) koje je provedeno na irskim vučjim hrtovima koji se smatraju najvećom pasminom na svijetu te spadaju u gigantske pasmine (preko 55kg), rezultati su pokazali da su isti seksualno manje aktivni u odnosu na pse drugih pasmina, a kvaliteta ejakulata je puno lošija prema testiranim parametrima (volumen ejakulata, volumen testisa, koncentracija spermija, progresivna pokretljivost, VAP, RAPID) prema kontrolnoj skupini pasa različitih pasmina. U odnosu na veličinu tijela, testisi su im nježnije strukture, životna dob je neusporedivo kraća što uzrokuje brže degenerativne promjene u cijelom tijelu. Također, parenje u srodstvu značajno utječe na volumen testisa (Wildt i sur., 1982.).

Računalno potpomognuta analiza kretanja spermija nije pokazala značajne razlike u većini kinematičkih parametara između pasa malih, srednjih i velikih pasmina. Utvrđena je razlika u pravocrtnosti kretanja (STR) koja je bila značajno veća u velikih pasmina u odnosu na srednje (p<0,05). Pokretljivost je bila značajno veća u srednjih pasmina u odnosu na male i velike (p<0,05). Analizirajući brzinu kretanja spermija, ustanovljeno je da psi srednjih pasmina imaju veći udio brzih spermija u odnosu na velike pasmine pasa (p<0,05), a u istoj je skupini utvrđen i najmanji broj nepokretnih spermija. Većina referentnih vrijednosti za parametre psećeg ejakulata izvedena je iz uzoraka sjemena dobivenih od pasa srednjih ili velikih pasmina pasa kao što su biglovi, retriveri ili njemački ovčari (England, 1999.; England i Allen, 1989). Osim toga, u većini istraživanja nedostaju podaci jesu li su ispitivani psi imali potomstvo (Bartlett, 1962., Boucher, i sur., 1958., Christiansen, 1984.). Günzel‐Apel i sur. (1994.) su postavili referentne vrijednosti psećeg spermiograma na osnovu tjelesne težine pasa. Dostupnih podataka u literaturi o psima malih pasmina je malo. Istraživanje kvalitete sjemena pasa ispod 10 kg ( Zeller i sur., 2019.) pokazalo da postoje značajne razlike u volumenu, ukupnom broju spermija i dimenzijama testisa u dvije skupine pasa ( do 5 kg i 5-10 kg) što je u skladu sa dobivenim rezultatima našeg istraživanja. Također, standardnu dozu za umjetno osjemenjivanje od 150-200 x 106 (Linde‐Forsberg, 1991., Hollinshead i Hanlon, 2017.) često nije moguće ostvariti sa jednim polučivanjem ejakulata. WILSON (1993.) u provedenom istraživanju zabilježili su da je 85% kuja (<10 kg) ostalo gravidno kada je primijenjena doza od 30-35 x 106.

Povezanost dobi i tjelesne mase s karakteristikama spermija dobivenih računalno potpomognutom analizom prikazao je RIJSSELAERE i sur. (2007.) izvještivši da tjelesna masa pasa značajno korelira s postotkom normalnih spermija, ukupnim brojem spermija i VCL. Uspoređujući kinematičke parametre spermija između pasmina u našem istraživanju, utvrđeno je da engleski koker španijel (srednji psi 10-20kg) ima najveći VCL i ALH i najmanji udio srednje brzih spermija, dok labrador retriever (veliki psi preko 20kg) ima najveći STR i LIN. Najmanje brzine (VAP, VCL, VSL) nađene su kod patuljastog šnaucera (mali psi do 10kg). ALH je primjerice parametar koji je dokazano utječe na uspjeh oplodnje *in vitro* kod ljudi (BARLOW i sur., 1991.), dok su parametri brzine kretanja, poput VCL, VAP i VSL značajno povezane s postotkom gravidnosti u goveda (FARRELL i sur., 1998.). Problem u povezivanju parametara standardne ili računalno potpomognute analize spermija s *in vivo* plodnošću u pasa je mali broj parenja u odnosu na primjerice bika, te nizak postotak gravidnosti zbog neprecizno određenog vremena osjemenjivanja kuja (JOHNSTON i sur., 2001.). Postkopulatorna selekcija sjemena smatra se važnom u kinematici spermija između vrsta i pasmina. Najvažnija evolucijska promjena spermatozoa je kompetitivnost spermija što predstavlja proces rivalstva spermija dvaju kompetitivnih mužjaka u svrhu oplodnje (ENGQUIST, 2012). Postkopulatornom selekcijom sjemena poboljšava se ukupan broj, vitalnost, motilitet i morfologija što predstavlja glavne osobine spermija (MALO i sur., 2006., JAMIENSON, 2007.).

# ZAKLJUČCI

Iz rezultata dobivenih ovim istraživanjem možemo zaključiti:

Velike pasmine pasa imaju najveći postotak pravocrtnog kretanja (STR, LIN), veću koncentraciju spermija u ejakulatu u odnosu na pse malih pasmina te najveći obujam testisa.

Srednje pasmine pasa imaju značajno veću pokretljivost i najmanji udio nepokretnih spermija te najveći udio brzih spermija (VCL i ALH)

Male pasmine imaju najmanje brzine (VAP, VCL, VSL) kretanja spermija, najmanji volumen i koncentraciju spermija, što je u pozitivnoj korelaciji s veličinom testisa.

S obzirom na broj pasa uključenih u istraživanje (25), možemo donijeti zaključak da je umjetna selekcija imala utjecaj na kvalitetu ejakulata različitih pasmina pasa.

# POPIS LITERATURE

AMANN, R. P, D. WABERSKI (2104): Computer-assisted sperm analysis (CASA): capabilities and potential developments. Theriogenology 81, 5–17.

ANDERSON, M. J., A. S. DIXSON, A. F. DIXSON (2006): Mammalian sperm and oviducts are sexually selected: evidence for co-evolution. J Zool. 270, 682–686.

AROKIA, R. M., G. JAYAPRAKASH, M. PAWSHE, T. TAMILMANI, M. SATHIYABARATHI (2016): Collection and evaluation od canine semen. Int. J. Sci. Environ. Tech. 5, 1586-1595.

BARTH, A. D., R. J. OKO (1989): Abnormal morphology of bovine spermatozoa. Ames (IA): Iowa State University Press, 20-35.

Bartlett, D. J. (1962). Studies on dog semen. J. Reprod. Fertil. 3, 190–205.

BIRKHEAD, T. R., E. J. PELLATT, P. BREKKE, R. YEATES, H. CASTILLO-JUAREZ (2005): Genetic effects on sperm design in the zebra finch. Nature. 434, 383–387.

BIRKHEAD, T. R., T. PIZZARI (2002): Post-copulatory sexual selection. Nat. Rev. Genet. 3, 262–273.

BLENDINGER, K. (2007): Collection and evaluation of the semen in the dog. Proceedings of the SCIVAC Congress, Rimini, Italy, pp. 83-84.

BOUCHER, J. H., R. H. FOOTE, R. W. KIRK (1958): The evaluation of semen quality in the dog and the effects of frequency of ejaculation upon semen quality, libido, and depletion of sperm reserves. Cornell Vet. 48, 67–86.

BOMPART, D., A. GARCIA-MOLINA,.A. VALVERDE, C. CALDEIRA, J. YANIZ, M. NUNEZ DE MURGA, C. SOLER (2018): CASA‐Mot technology: How results are affected by the frame rate and counting chamber. Reproduction, Fertility and Development, 30, 810–819.

CERGOLJ, M., M. SAMARDŽIJA (2006): Veterinarska andrologija. Veterinarski fakultet, Sveučilita u Zagrebu, 110-160.

DAHLBOM, M., M. ANDERSON, G. HUSZENICZA, M. ALANKO (1995): Poor semen quality in Irish wolfhounds: A clinical, hormonal and spermatological – studv, J. Small Anim. Pract. 36, 547-552.

DOBRANIĆ, T., M. SAMARDŽIJA, M. CERGOLJ, N. PRVANOVIĆ (2005): Determination of membrane integrity of canine spermatozoa. Vet. arhiv 75, 23-30.

DORADO, J., T. RIJSSELAERE, A. MUNOZ-SERRANO, M. HIDALGO (2011): Influence of sampling factors on canine sperm motility parameters measured by the Sperm Class Analyzer. Syst Biol Reprod Med 57, 318–325.

DOTT, H. M., G. C. FOSTER (1979): The estimation of sperm motility in semen on a membrane slide, by measuring the area change frequency with an image analyzing computer. J Reprod Fertil 55, 161–6.

ENGLAND, G., L. BRIGHT, B. PRITCHARD (2017). Canine reproductive ultrasound examination for predicting future sperm quality. Reprod. Domest. Anim. 52, 202–207.

ENGLAND G. C., W. E. ALLEN (1989): Seminal characteristics and fertility in dogs. Vet, Rec. 125, 399.

ENGLAND, G. C. W. (1999): Semen quality in dogs and influence of a short interval second ejaculation. Theriogenology 52, 981-986.

Engqvist, L. (2012). A general description of additive and nonadap‐ tative elements of sperm competitiveness and their relation to male fertilization success. Evolution, 67(5), 1396–1405.

FITZPATRICK, J. L., F. GARCIA-GONLAZES, J. P. EVANS (2010): Linking sperm length and velocity: the importance of intramale variation. Biol. Lett. 6, 797–799.

FRESHMAN, J. L. (2002): Semen collection and evaluation. Clin. Tech. Small Anim. Pract. 17, 104-107.

GARY, C. (2015): Althouse Guidelines for using the canine breeding soundness evaluation form. June 2015. p.51-54.

GOERICKE-PESCH, S., K. FAILING (2013): Retrospective analysis of canine semen evaluations with special emphasis on the use of the hypoosmotic swelling (HOS) test and acrosomal evaluation using Spermac. Reprod. Domest. Anim. 48, 213–217.

GOMENDIO, M., E. R. S. ROLDAN (2008). Implications of diversity in sperm size and function for sperm competition and fertility. Int. J. Dev. Biol. 52, 439–447. <https://doi.org/10.1387/ijdb.082595mg>

GOMEZ MONTOTO, L., C. MAGANA, M. TOURMENTE, J. MARTIN-COELLO, C. CRESPO (2011): Sperm competition, sperm numbers and sperm quality in muroid rodents. PLoS One. 6, e18173.

GUNZEL-APEL, A. R., P. TERHAER, D. WABERSKI (1994): Hodendimensionen und Ejakulatbeschaffenheit fertiler Rüden unterschiedlicher Körpergewichte. Kleintierpraxis. 7, 483–486.

GUNZEL-APEL, A. R., C. GUNTHER, P. TERHAER, H. BADER (1993). Computer-assisted analysis of motility, velocity and linearity of dog spermatozoa. J. Reprod. Fertil. Suppl. 47, 271–278.

HESSER, A., C. DARR, K. GONZALES, H. POWER, T. SCANLAN, J. THOMPSON, C. LOVE, B. CHRISTENSEN, S. MEYERS (2017): Semen evaluation and fertility assessment in a purebred dog breeding facility. Theriogenology 87, 115-123.

HOLLINSHEAD, F. K., D. W. HANLON (2017): Factors affecting the reproductive performance of bitches: A prospective cohort study involving 1203 inseminations with fresh and frozen semen. Theriogenology, 101, 62–72.

HSIEH, M. L., S. T. HUANG, H. C. HUANG, Y. CHEN, Y. C. HSU (2009): The reliability of ultrasonographic measurements for testicular volume assessment: comparison of three common formulas with true testicular volume. Asian J. Androl., 261–265.

IGUER-OUADA, M., J. P. VERSTEGEN (2001): Validation of the sperm quality analyzer (SQA) for dog sperm analysis. Theriogenology 55, 1143–58.

IOSSA, G., C. D. SOULSBURY, P. J. BAKER, S. HARRIS (2008). Sperm competition and the evolution of testes size in terrestrial mammalian carnivores. Functional Ecology, 22, 655–662.

Jamieson, B. (2007): Avian spermatozoa: Structure and phylogeny. U: Reprodcutive biology and phylogeny of birds (Jamieson, B. G. M., ed.). Enfield, NH and Plymouth, UK, Science publishers, pp. 349–511.

JOHNSTON, S. D. (1991): Performing a complete canine semen evaluation in small animal hospital. Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract. 21, 545-551.

JOHNSTON, S. D., ROOT-KUSTRITZ, M. V., OLSON, P. N. S. (2001): Canine and feline theriogenology. Saunders, Philadelphia, p. 592.

KOLSTER, K. A. (2018): Evaluation of canine sperm and management of semen disorders. Vet. Clin Small Anim. 48, 553-545.

KRUGER, T. F., S. B. ACKERMAN, K. F. SIMMONS, R. J. SWANSON, S. S. BRUGO, A. A. ACOSTA (1987): A quick, reliable staining technique for human sperm morphology. Arch. Androl. 18,275–277.

LAMBERT, B. (1951): The frequency of mumps and of mumps orchitis and the consequences for sexuality and fertility. Acta Gen. Stat. Med. 2, 161-166.

LEIVERS, S., G. RHODES, L. W. SIMMONS (2014): Sperm competition in humans: mate guarding behavior negatively correlates with ejaculate quality. PLoS One. 9, e108099.

LIANA, M., WITALINSKI, W. (2005). Sperm structure and phylogeny of Astigmata. Journal of Morphology, 265, 318–324. https://doi. org/10.1002/jmor.10361

LINDE FORSBERG, C. (1995): Artificial insemination with fresh, chilled extended, and frozen-thawd semen in dog. Semin. Vet. med. Surg. 10(1):48-58 (?)

LINDE-FORSBERG, C. (1991): Achieving canine pregnancy by using frozen or chilled extended semen. Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract. 21, 467–485.

LOPATE, C. (2012): The problem stud dog. Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract. 42, 469-488.

Malo, A. F., M. Gomendio, J. Garde, B. Lang‐Lenton, A. J. Soler, E. R. S. Roldan, (2006). Sperm design and sperm function. Biol. Lett. 2, 246–249.

MEMON, M. A. (2007): Common causes of male dog infertility. Theriogenology 68, 322-328.

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

MOXON, R., L. BRIGHT, B. PRITCHARD, I. M. BOWEN, M. B. de SOUZA, L. D. M. da SILVA, G .C. W. ENGLAND (2015): Digital image analysis fo testicular and prostatic ultrasonographic echogencity and heterogeneity in dog and the relation to semen quality. Anim. Reprod. Sci. 160, 112-119.

MURPHY, E. M., B. EIVERS, C. M. O'MEARA, P. LONERGAN, S. FAIR (2018): Effect of increasing equilibration time of diluted bull semen up to 72 h prior to freezing on sperm quality parameters and calving rate following artificial insemination. Theriogenology 108, 217-222.

NÚÑEZ-MARTÍNEZ, I., J. M. MORÁN, F. J. PEÑA (2007): Sperm indexes obtained using computer-assisted morphometry provide a forecast of the freezability of canine sperm. Int. J. Androl. 30, 182–189.

OETTLE, E.E. (1993): Sperm morphology and fertility in the dog. J Reprod Fertil. 47, 257–60.

OLSEN, S. J. (1985): Origins of the Domestic Dog. Tucson: University of Arizona Press, 111-150.

RIJSSELAERE, T., D. MAES, G. HOFLACK, A. DE KRUIF, A. VON SOOM (2007): Effect of Body Weight, Age and Breeding History on Canine Sperm Quality Parameters Measured by the Hamilton-Thorne Analyser. Reprod. Dom. Anim. 42, 143-148.

RIJSSELAERE, T., A. VAN SOOM, S. TANGHE, M. CORYN, D. MAES, A. DE KRUIF (2005): New techniques for the assessment of canine semen quality: a review. Theriogenology 64, 706–719.

RIJSSELAERE, T., VAN SOOM, A., MAES, D., DE KRUIF, A. (2003): Effect of technical settings on canine semen motility parameters measured by the Hamilton-Thorne analyzer. Theriogenology 60, 1553–1568.

ROOT KUSTRITZ, M. V. (2007): The value of canine semen evaluation for practitioners. Theriogenology. 68, 329-337

SCHÄFER-SOMI, S., C. AURICH (2007): Use of a new computer-assisted sperm analyzer for the assessment of motility and viability of dog spermatozoa and evaluation of four different semen extenders for predilution. Anim. Reprod. Sci. 102, 1–13.

SEAGER, S. W. J. (1986): Artificial insemination in dogs. U: Small Animal Reproduction and Infertility (Burke, T. J. ed.). Lea & Febiger, Philadelphia, pp. 207-217.

SILVA, P. F., B. M. GADELLA (2006): Detection of damage in mammalian sperm cells. Theriogenology 65, 958-78.

SINDING, M. H. S. i sur*.* (2020): Arctic-adapted dogs emerged at the Pleistocene-Holocene transition. Science368, 1495-1499. https://doi.org/10.1126/science.aaz8599

SMITH, S. C., G. C. W. ENGLAND (2001): Effect of technical settings and semen handling upon motility characteristics of dog spermatozoa measured by computer-aided sperm analysis. J. Reprod. Fertil. 57, 151–159.

SOLER, C., A. ALAMBLAGA, M. A. MARTI, A. GARCIA-MOLINA, A. VELVERDE, J. CONTELL, M. CAMPOS (2017): Dog sperm head morphometry: its diversity and evolution. Asian J. Androl. 19, 149-153.

SOLER, C., T. COOPER, A. VALVERDE, J. YANIZ (2016): Afterword to Sperm morphometrics today and tomorrow special issue in Asian Journal of Andrology. Asian J. Androl. 18, 895–897. https://doi. org/10.4103/1008-682X.188451

Souza, M. B., C. C. Barbosa, B. S. Pereira, C. L. B. Monteiro, J. N. Pinto, J. C. S. Linhares, L. D. M. Silva (2014). Doppler velocimetric parameters of the testicular artery in healthy dogs. Res. Vet. Sci. 96, 533– 536.

STACHECKI, J. J., K. A. GINSBURG, R. E. LEACH, D. R. ARMANT (1993): Computer assisted semen analysis (CASA) of epididymal sperm from the domestic cat. J. Androl. 14, 60–65.

TOURMENTE, M., M. GOMENDIO, E. R. S. ROLDAN (2011). Sperm competition and the evolution of sperm design in mammals. BMC Evol. Biol. 11,12. <https://doi.org/10.1186/1471-214811-12>

TUSET, V. M., E. A. TRIPPEL, J. J. DE MONSERRAT (2008): Sperm morphology and its influence on swimming speed in atlantic cod. J. Appl. Ichthyol. 24, 398–405.

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

VON HOLDT, B. M., J. P. POLLINGER, K. E. LOHMUELLER, H. G. PARKER (2010): Genome-wide SNP and haplotype analyses reveal a rich history underlying dog domestication. Nature. 464, 898–903.

WAYNE, R. K., W. G. NASH, S. J. O’BRIEN (1987): Chromosomal evolution of the Canidae. II. Divergence from the primitive carnivore karyotype. Cytogenet. Cell Genet. 44, 134–141.

WILDT, D. E., E. J. BAAS, P. K. CHAKRABORTY, T. L. WOLFLE, A. P. STEWART (1982): Influence of inbreeding on reproductive performance, ejaculate quality and testicular volume in the dog. Theriogenology 17, 445-451.

WILSON, M. S. (1993): Non‐surgical intrauterine artificial insemination in bitches using frozen semen. J. Reprod. Fertil. Suppl., 47, 307–311.

YEUNG, C. H., T. G. COOPER, E. NIESCHLAG (1997): A technique for standardization and quality control of subjective sperm motility assessments in semen analysis. Fertil. Steril. 67, 1156–1158.

ZELLER, R., A. MEYER-LINDENBERG, B. WALTER, C. LEYKAM, U. FLOCK, S. REESE, C. OTZDORFF (2019): Semen parameters and testicular dimensions in small breed dogs below ten‐kilogram bodyweight. Reprod. Dom. Anim. 54, 1244-1250.

ZELLI, R., A. TROISI, A. ELAD NGONPUT, L. CARDINALI, A. POLISCA (2013): Evaluationof testicular artery blood flow by Doppler ultrasonography as a predictor of spermatogenesis in the dog. Res. Vet. Sci. 95, 632-637.

# SAŽETAK

Cilj ovog istraživanja je ustanoviti kinematičke pokazatelje pokretljivosti spermija pasa različitih pasmina koje je provedeno na 25 spolno zrelih pasa u 15 pasmina različitih dobnih kategorija, starosti od 1 do 8 godina. Psi su podijeljeni u 3 skupine s obzirom na tjelesnu masu: mali psi (< 10 kg), srednji psi (10-20 kg) i veliki psi (>20 kg) na kojima je proveden klinički pregled, ultrazvučni pregled testisa te je ocjenjena kvaliteta ejakulata korištenjem parametara računalno potpomognute analize spermija (VAP, VSL, VCL, ALH, BCF, STR, LIN, ELONG, AREA, MOT, PMOT, RAP, MED, SLOW, STATIC) i standardnom mikroskopskom pretragom (volumen, pokretljivost, koncentracija i vitalnost spermija -HOS test i bojenje po Bloom-u). Prosječna težina po skupinama iznosila je 7,75±1,22 kg za pse malih pasmina, 16,88 ± 1,47 kg za pse srednjih i 37,92±1,37 kg za pse velikih pasmina. Računalno potpomognuta analiza kretanja spermija nije pokazala značajne razlike u većini kinematičkih parametara između pasa malih, srednjih i velikih pasmina. Utvrđena je razlika u pravocrtnosti kretanja (STR) koja je bila veća u velikih pasmina u odnosu na srednje (p<0,05).Pokretljivost je bila značajno veća u srednjih pasmina u odnosu na male i velike (p<0,05). Analizirajući brzinu kretanja spermija, ustanovljeno je da psi srednjih pasmina imaju veći udio brzih spermija u odnosu na velike pasmine pasa (p<0,05), a u istoj je skupini utvrđen i najmanji broj nepokretnih spermija. Statistički značajne korelacije utvrđene su između brzine kretanja i vitalnosti spermija. Postotak spermija s intaktnom membranom (HOS test) i živih spermija (Bloom) pozitivno korelira s brojem brzih spermija (r=0,48, p<0,05), odnosno negativno s brojem nepokretnih spermija (r= -0,44, p<0,05). Također, obujam testisa i masa psa pozitivno koreliraju s koncentracijom spermija u ejakulatu (r=0,49, p<0,05). Uspoređujući kinematičke parametre spermija između pasmina, utvrđeno je da engleski koker španijel ima najveći VCL i ALH te najmanji udio srednje brzih spermija, dok labrador retriver ima najveći STR i LIN. Najmanje brzine (VAP, VCL, VSL) nađene su kod patuljastog šnaucera. Na osnovu dobivenih rezultata dobili smo precizniji uvid je li umjetna selekcija unutar vrste dovela do značajnih reprodukcijskih razlika između pasmina pasa.

Ključne riječi: pasmine pasa, kompjuterski potpomognuta analiza spermija, pokretljivost spermija

# SUMMARY

**Kinematic sperm traits in different dog breeds**

The aim of this study was to determine kinematic characteristics of dog spermatozoa within 15 different breeds that included 25 sexually matured dogs aging 1 to 8 years. Dogs were divided into 3 groups considering the body mass: small dogs (< 10 kg), medium (10-20kg) and large dogs (>20kg) and were subjected to a clinical examination, B-mode ultrasonography of the testes, semen evaluation after collection using CASA system that included 11 parameters (VAP, VSL, VCL, ALH, BCF, STR, LIN, ELONG, AREA, MOT, PMOT, RAP, MED, SLOW, STATIC) as well as standard microscopic procedure (volume, progressive motility, concentration and semen viability – HOS test and Bloom staining). Average weight in the small dogs group was 7,75±1,22 kg , medium dogs 16,88 ± 1,47 kg and large dogs 37,92±1,37 kg. CASA did not show significant differences in most of the kinematic parameters between small, medium and large dogs, but there was a different value in STR in large dogs comparing to medium (p<0.05). Highest motility and as well as the lowest number of static spermatozoa was significantly higher in medium sized dogs in comparison to small and large (p<0.05). Percentage of spermatozoa with intact membrane (HOS test) and live spermatozoa (Bloom) is in positive correlation with the number of rapid spermatozoa in ejaculate (r=0,49, p<0,05). Comparing the kinematic parameters between breeds, English cocker spaniels have highest VCL and ALH and the lowest value of medium motile spermatozoa, while Labrador retrievers have highest STR i LIN. Lowest velocities (VAP, VCL, VSL) were determined in miniature schnauzers. Considering the given results, we got the more precise insight weather the artificial selection caused important reproductive changes within different dog breeds.

Keyword: dog breeds, computer assisted sperm analysis, sperm motility

# ŽIVOTOPIS

Rođena sam 30.05.1988. u Zadru. Osnovnu, a zatim i srednju školu Ivana Meštrovića završila sam u Drnišu. Aktivno uzgajam pse od 2003. godine od kada sam uključena u brojne uzgojne programe različitih pasmina u svrhu unaprijeđenja kako zdravlja pasa tako i očuvanja i proširivanja genetskog bazena. Sudjelovala sam na brojnim edukacijama vezanih za genetiku pasa i načine selekcije u Europi i SAD-u.

Trenutno sam studentica 6. godine veterinarske medicine na Veterinarskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, s istaknutim interesom za porodništvo i reprodukciju pasa što je i primarni razlog zašto sam pristupila istraživanju kinematičkih pokazatelja pokretljivosti spermija različitih pasmina pasa.

Prisustvovala sam na Simpoziju veterinara male prkse Srbije (SIVEMAP) 17.-19.11.2017. u Beogradu, Europskom seminaru studenata veterinarske medicine (EVSS) 14.-17.06.2018. u Zagrebu, Istočnoeuropskoj veterinarskoj konferenciji (EERVC) 4.-6.10.2018. u Beogradu, aktivno sudjelovala u organizaciji radionice na stručno-edukativnom skupu Inter Medical Vet Forum „Naša praksa“ 17.-18.05.2019. u Termama Tuhelj u organizaciji tvrtke Medical Intertrade d.o.o., sudjelovala sam u organizaciji događaja „Meet the breeds“ 25.05.2019. godine koji se održao na Veterinarskom fakultetu te okupio 16 različitih pasminskih klubova, pohađala radioncu „Ultrazvučni pregled abdomena: osnovna razina“ 12.10.2019., prisustvovala Simpoziju veterinara male prakse Srbije (SIVEMAP) 15.-17.11.2019 u Beogradu, Noći muzeja 31.01.2020. na „Stotoj obljetnici suživota“ te na brojnim drugim događajima u svrhu promocije Veternarskog fakulteta kao što su Festival znanosti, 08. – 13. travnja 2019. u Tehničkom muzeju Nikola Tesla i trodnevne Smotre sveučilišta u studenom 2019. Aktivno sam sudjelovala na kongresu „Veterinarska znanost i struka“, Zagreb, 10.-12.10.2019., gdje sam usmeno prezentirala slučaj „Prvo heterospermično leglo u Hrvatskoj“. Osim toga, volonterka sam na Klinici za porodništvo i reprodukciju od 2018. godine. Također sam bila predavač na radionicama o biomehanici pasa i njezi čistokrvih pasa u Finskoj, Švedskoj, Islandu i SAD-u.

Aktivno se služim engleskim jezikom, a pasivno češkim, slovačkim i njemačkim.