

KVALITET NATIVNIH EJAKULATA PASA IZVAN I TOKOM SPOLNE SEZONE

QUALITY OF NATIVE EJACULATE IN DOG OUT AND DURING SEXUAL SEASON

Podžo K., Varatanović N., Podžo M., Mutevelić T., Čengić B.

Abstract - The seasonal influence, i.e. the influence of climatic changes on the dog semen was investigated. Dog age varied between 2-4. German-shepard-type dog body weight was about 25 kg, and the other mixed breed dogs about 9 kg. All were kept in good zoo-hygienic conditions (sunny, ventilated and dry rooms). Dogs were served ready-made pellet food with the daily meals adjusted to their body mass. Experimental researches were mainly performed before and during the sexual season. Sperm from the dogs was taken manually every 5-6 days. After obtaining the ejaculate, the sperm-sampler was inserted in pre-heated cotton, and brought to the andrologic laboratory. Tools and instruments used for ejaculate sampling were heated to +35°C before use. Quality control was performed with the devices and instruments heated to +38°C in order to avoid detrimental effect of rapid cooling to sperm movement, metabolism, etc. Sampled native ejaculates were analyzed for the volume, motility, concentration, etc.

Key words: dog, sperm, sexual season

Kratak sadržaj - Istraživan je utjecaj sezone tj. utjecaj promjene klimatskih prilika na kvalitete sperme pasa. Psi su bili u dobi 2-4 godine. Tjelesna masa pasa koji su u tipu njemačkog ovčara bila je oko 25 kg, a drugih pasa križanca oko 9 kg, a držani su u dobrim zoohigijenskim uslovima (sunčane, zračne i suhe prostorije). Ishrana pasa bila je na bazi gotove peletirane hrane, a količina dnevnog obroka određivana je prema tjelesnoj masi psa. Eksperimentalna istraživanja su uglavnom rađena neposredno prije i tokom spolne sezone. Sperma je od pasa uzimana manuлно svakih 5-6 dana. Nakon dobivanja

Mr. sc. Podžo Kenan, DVM, viši asistent; sarajevo15@live.com; dr. sc. Varatanović Nazif, DVM, vanredni profesor; dr. sc. Podžo Mustafa, DVM, redovni profesor; dr. sc. Mutevelić Tarik, DVM, docent; Čengić Benjamin, DVM, asistent. Katedra za fiziologiju i patologiju razmnažanja, Veterinarski fakultet, Univerzitet u Sarajevu.

Podžo Kenan, DVM, MSc, Senior Assistant; sarajevo15@live.com; Varatanović Nazif, DVM, PhD, Associate Professor; Podžo Mustafa, DVM, PhD, Professor; Mutevelić Tarik, DVM, PhD, Assistant Professor; Čengić Benjamin, DVM, Assistant. Department of Physiology and Pathology in domestic animal reproduction, Veterinary faculty, University in Sarajevo.

ejakulata spermohvatač je stavljan u zagrijanu vatu i tako se donosio u andrološku laboratoriju. Pomagala i instrumenti koji su korišteni za uzimanje nativnih ejakulata bili su prije upotrebe zagrijani na +35 °C. Ocjena kvaliteta ejakulata obavljena je aparatima i instrumentima koji su bili zagrijani na temperaturu +38 °C da bi se izbjegao nepovoljan utjecaj naglog hlađenja na pokretljivost spermatozoida, njihov metabolizam, itd. U istraživanim nativnim ejakulatima istraživan je volumen, postotak pokretljivosti, koncentracija, itd..

Ključne riječi: Pas, sperma, spolna sezona

Uvod

Danas, kada su uslovi življenja, način života, navike i standard savremenog čovjeka izmijenjeni i poboljšani, dolazi do većeg interesovanja za držanje kućnih ljubimaca, među kojima značajno mjesto zauzimaju psi. Psi, koji se drže u stanovima, kućama, ili koji se drže u lošim zoohigijenskim uslovima, mogu imati određene zdravstvene poremećaje, a među njima i reproduktivne. Kod muških životinja klimatski faktori, uslovi držanja, ishrana itd., mogu između ostaloga, imati utjecaja na kvalitet nativnih ejakulata. Ispitivanjem utjecaja klimatskih faktora na kvalitet nativne i duboko zamrznute sperme bikova i njenu oplodnu sposobnost Perović (14) je utvrdio da ovi faktori imaju izrazitog utjecaja na promjenljivost volumena ejakulata i na broj patoloških spermatozoida, dok ostali pokazatelji kvaliteta nativne sperme nisu imali većih variranja. Pržulj (16) ističe da klimatski faktori imaju utjecaja na kvalitet nativnih ejakulata kod bikova. Autor iznosi da je kod bikova najveća količina ejakulata tokom jeseni, a najmanja tokom zime. Kod istih bikova najveća koncentracija i progresivna pokretljivost spermatozoida u ejakulatima je u proljeće, a najmanja zimi. Tokom ljetnjeg i zimskog perioda pokazatelji kvaliteta ejakulata kod nerasta su bili različiti (15). Autori navode da su prosječne vrijednosti volumena ejakulata, postotka morfološki promijenjenih i nezrelih spermatozoida veće tokom zime, a pH vrijednost, progresivna pokretljivost, koncentracija i postotak živih spermatozoida bili su smanjeni.

Bartlett (1) je istraživao fizičko hemijske karakteristike nativnih ejakulata kod pasa. Analize su provedene na kompletnim ejakulatima i frakcionirano uzetim ejakulatima. Prosječna vrijednost jona vodonika u kompletnim ejakulatima psa je pH 6,4. Kod frakcionirano uzetih ejakulata u prvoj frakciji prosječni pH je 6,2 u drugoj 6,3 i trećoj 6,5. Karakteristika nativnih ejakulata pasa je da imaju vrlo nisku koncentraciju fruktoze. Studije metabolizma sperme pasa su pokazale da spermatozoidi psa mogu u anaerobnim uslovima koristiti dodanu fruktozu istim intenzitetom kao u ejakulatima koji su bogati fruktozom. Prosječni volumen ejakulata kod odraslih pasa kako navodi Bartlett (1) je 12,0 ml, broj spermatozoida u 1 ml je 530 miliona, a broj obojenih glava spermatozoida u kompletnom ejakulatu (metodom po Blomu) je do 20%. Prosječni postotak abnormalnih spermatozoida u kompletnom ejakulatu je 14%. Dužina normalnih

spermatozoida je 68 μ , 7 μ je dužina glave, 5 μ širina glave, dužina tijela spermatozoida je 11 μ , a dužina repa je 50 μ . Prema navodima autora, volumeni ejakulata kod pasa signifikantno ($P < 0,01$) zavise od sezone i frekvencije uzimanja ejakulata.

Sezonske promjene serumskog testosterona, volumena testesa i kvaliteta sperme kod kojota, koji ima izraženu spolnu sezonu, istraživali su Minter i DeLiberto (11). Autori su utvrdili da je najveći volumen testesa u februaru, kada im je i spolna sezona ($20,2 \pm 5,4 \text{ cm}^3$). Cirkulatorni serumski testosteron najveću koncentraciju ima tokom januara ($3,31 \pm 0,9 \text{ ng/ml}$) i u pozitivnoj je korelaciji sa volumenom testesa. Takođe, količina ejakulata ($1,67 \pm 0,4 \text{ ml}$) i koncentracija spermatozoida ($549,000/\text{ml}$) najveći su tokom januara i februara. Volumen ejakulata i koncentracija spermatozoida su u pozitivnoj korelaciji sa veličinom testesa i sa serumskom koncentracijom testosterona. Progresivna pokretljivost, dužina života i normalna morfologija spermatozoida su sezonski promjenljivi. Najbolje vrijednosti su tokom spolne sezone i postepeno se smanjuju sa prestankom spolne sezone. Istraživanjem morfologije spermatozoida i plodnosti pasa Oettlé (12) iznosi da broj abnormalnih spermatozoida u ejakulatima ima značajnog utjecaja na plodnost pasa. Kod pasa kod kojih u ejakulatima ima više od 60% spermatozoida sa očuvanom histološkom strukturom (normalni spermatozoidi) prosječna koncepcija osjemenjenih kuja je 61%. Međutim, kada u ejakulatima ima manje od 60% normalnih spermatozoida, prosječna koncepcija kod kuja je 13%. Pored ovih rezultata autor ističe da nema statistički značajnih razlika između dobi pasa.

Istraživanjem utjecaja godišnjih sezona na karakteristike i sastav sperme pasa Taha i sar. (18) navode da libido pasa, volumen ejakulata, procenat mrtvih i abnormalnih spermatozoida, pokretljivost spermatozoida i koncentracija testosterona nisu pokazali evidentne sezonske promjene.

S obzirom na naprijed iznijete tvrdnje i rezultate pojedinih istraživača, naše istraživanje ima za cilj da istraži mogu li i u kojoj mjeri makro i mikro klimatski faktori našeg regiona utjecati na kvalitet nativnih ejakulata pasa tokom spolne i izvan spolne sezone.

Materijal i metode

Istraživanja utjecaja spolne sezone, odnosno klimatskih faktora na kvalitet nativnih ejakulata pasa vršena su u dva perioda. Prvi period bio je sa nižim temperaturama vazduha, odnosno tokom decembra, januara i februara, a drugi sa višim temperaturama vazduha tokom aprila, maja i juna. Psi su držani na Veterinarskom fakultetu u veoma dobrim zoohigijenskim uslovima (sunčane, zračne i suhe prostorije). Za istraživanja su korištena 4 psa čije su tjelesne mase bile od 12 do 25 kg. Ishrana pasa bila je na bazi gotove peletirane hrane, a količina dnevnog obroka određivana je prema tjelesnoj masi psa. Sperma je uzimana od pasa svakih 4-5 dana. Nativne ejakulate smo uzimali pomoću umjetne vagine, a nakon navikavanja psa manuelnom metodom uz pomoć gumenog konusnog nastavka u kojem je bio fiksiran spermohvatač (sl. 1.).



Slika 1. Pribor za uzimanje sperme od pasa

Figure 1. Tools for semen sampling in dog

Pomagala i instrumentarij koji je korišten za uzimanje nativnih ejakulata bili su prije upotrebe zagrijani na 35 °C, kako bi se izbjegao negativni utjecaj naglog hlađenja na pokretljivost spermatozoida, njihov metabolizam, itd.

Subjektivnom metodom, na mikroskopu koji ima TV kameru i monitor i čiji se stolić može zagrijavati na +38 °C, ocjenjivali smo progresivnu pokretljivost spermatozoida, broj živih i mrtvih spermatozoida u nativnom ejakulatu bojenim metodom po Blomu, odnosno bojenjem razmaza sperme 5%-tnim eozinom i 10%-tnim nigrozinom. Koncentraciju, odnosno broj spermatozoida u jedinici volumena odredjivali smo pomoću hemocitometra (Thomova komorica) uz korištenje leukocitnog melanžera.

Spermigram, odnosno procentualni udio normalnih, patoloških i nezrelih spermatozoida u ejakulatima utvrđivan je u razmazima koje smo bojili Gimzom (koncentrovana otopina azura, eozina i metilenskog modrila).

Rezultati

S obzirom na različite klimatske prilike i mogućnosti da one utječu na aktivnosti genitalnih organa pasa pratili smo kretanje volumena ejakulata tokom hladnog i toplog perioda godine (tab. 1 i 2). Iz tabelarnih prikaza uočava se da je volumen ejakulata bio varijabilan. Tokom hladnog perioda prosječne vrijednosti volumena ejakulata su za 4,522 ml manje od vrijednosti u toku toplijeg perioda godine.

Pored volumena tokom pomenuta dva perioda u nativnim ejakulatima pratili smo varijabilnost broja progresivno pokretljivih i broja spermatozoida u 1 ml (tab. 1 i 2). U zimskom periodu broj progresivno pokretljivih spermatozoida je manji za oko 3%, a koncentracija za 0,043 mlrd/ml manja u odnosu na iste pokazatelje u toplijem periodu.

Takođe, minimalne vrijednosti broja progresivno pokretljivih spermatozoida i broja spermatozoida u 1 ml, te maksimalna vrijednost progresivne pokretljivosti su manje u hladnom periodu u odnosu na topliji period, dok je prosječna vrijednost broja spermatozoida u 1 ml veća u hladnom periodu.

Prosječne vrijednosti broja neobojenih (živih) spermatozoida su manje, a obojenih (mrtvih) veće tokom zime u odnosu na topli period.

Minimalne vrijednosti neobojenih i obojenih spermatozoida su manje tokom hladnog perioda. U ovom periodu su veće maksimalne vrijednosti obojenih i neobojenih spermatozoida.

Tabela 1. Kvalitet ejakulata kod pasa tokom hladnog perioda

Table 1. Quality of ejaculate in dogs during cold period

hladni	n	x	Sx	S	min.	max.
vol /ml	34	7,644	1,230	7,177	1,5	21
% pokret.	34	79,264	0,923	5,384	65	85
mlrd/ml	34	0,389	0,017	0,102	0,159	0,585
% neobojenih	34	79,173	0,902	5,262	67,1	87,9
% obojenih po Blom	34	21,179	9,911	5,315	12,1	32,9
% patol.	34	12,376	0,429	2,506	6,6	16,6

Tabela 2. Kvalitet ejakulata kod pasa tokom toplog perioda

Table 2. Quality of ejaculate in dogs during warm period

topli	n	x	Sx	S	min.	max.
vol /ml	27	12,166	1,315	6,837	2	21
% pokretljivih	27	82,222	0,815	4,236	75	90
mlrd/ml	26	0,432	0,015	0,079	0,286	0,555
% neobjenih	27	81,092	0,665	3,457	73,9	86,4
% obojenih po Blom	27	18,996	0,671	3,486	13,6	26,1
% patoloških	27	12,277	0,597	3,103	4,1	16,4

Vrijednosti broja patoloških spermatozoida nisu imale znatnih razlika između hladnog i toplog perioda (razlika 0,09%). Minimalni broj patoloških spermatozoida tokom hladnog perioda manji je za 2,5% u odnosu na topli period. Maksimalni broj patoloških spermatozoida je gotovo isti u obadva perioda.

Diskusija

Tokom istraživanja, odnosno na osnovu laboratorijske ocjene nativnih ejakulata, utvrdili smo da su prosječne vrijednosti volumena kompletnog ejakulata kod psa tokom hladnog i toplog perioda godine bile u fiziološkim i zadovoljavajućim granicama. Međutim, volumen ejakulata bio je veći tokom toplog perioda od iste vrijednosti u hladnom periodu. Naši rezultati volumena ejakulata su u saglasnosti sa podacima

Swensona (17) i Hajvanlarda (8), odnosno utvrđeno je da je prosječni volumen ejakulata kod pasa 10,0 ml, a može biti od 1,0 do 25,0 ml. Feldman i Nelson (5) navode da je kod pasa volumen ejakulata od 1-40 ml, a Bratanov i sar. (3) 1-18 ml. Cole i Cupps (4) navode da je kod pasa prosječni volumen ejakulata oko 9,5 ml.

Postotak progresivno pokretljivih spermatozoida u nativnim ejakulatima bio je u okviru fizioloških normi 83,1% što se podudara sa vrijednostima koje navode Hajvanlard (8), 73,6% Goodrowe i sar. (6), Miljković (10) 70%-90%, 85% Paufler (13). Analizom dobivenih podataka utvrdili smo da je pokretljivost spermatozoida veća tokom toplog perioda.

Analizom vrijednosti broja spermatozoida u 1 ml nativnog ejakulata kod pasa utvrđeno je da je ovaj pokazatelj imao veće vrijednosti tokom toplog perioda u odnosu na vrijednosti iz hladnog perioda. Vrijednosti broja spermatozoida u 1 ml su bile zadovoljavajuće i u saglasnosti su sa vrijednostima Goodrowe i sar. (7) koji navode da je kod pasa prosječni broj spermatozoida u 1 ml 146,5 miliona. Prema navodima Hayvanlarda (8) prosječna vrijednost broja spermatozoida u 1 ml je 300 miliona, prema navodima Miljkovića (10) je 100-200 miliona, Pauflera (13) 200-300 miliona, Lainga (9) 125-200 miliona, 200 miliona Feldmana i Nelsona (5), a 400-540 miliona Swensona (17). U odnosu na ove podatke broj spermatozoida u nativnim ejakulatima tokom naših istraživanja je zadovoljavajući.

U razmazima sperme koji su obojeni metodom po Blomu neobojeni spermatozoidi su živi, jer oni imaju intaktnu histološku i biohemijsku strukturu lipoproteinske ovojnice koja onemogućava uzlazak histoloških boja u glavu spermatozoida i njihove glave nisu obojene. Broj neobojenih spermatozoida treba da se, uglavnom, podudara sa brojem progresivno pokretljivih spermatozoida, a to smo i mi utvrdili tokom naših istraživanja jer se broj neobojenih spermatozoida u odnosu na postotak pokretljivih spermatozoida razlikovao u veoma niskom procentu.

Obojeni spermatozoidi su mrtvi, njihova lipoproteinska ovojnica je oštećena, a histološke boje ulaze u glave spermatozoida koje su tada crveno obojene. Broj obojenih spermatozoida po Blomu tokom naših istraživanja uglavnom je odgovarao broju nepokretnih spermatozoida.

Patološki spermatozoidi i histološka oštećenja njihove strukture nastaju na dva načina, odnosno kao primarna i kao sekundarna oštećenja. Primarna oštećenja nastaju tokom spermatogeneze, a sekundarna nakon izlaska spermatozoida iz sjemenih kanalića, dolaskom u ostale dijelove genitalnih organa ili nakon ejakulacije i dolaska u vanjsku sredinu. U blažim slučajevima histološka oštećenja se manifestuju zavnutim i smotanim repovima, a drastičnije promjene se manifestuju u oštećenjima histološke strukture glave i akrozoma spermatozoida. Posljedica oštećenja glave i akrozoma spermatozoida je izlazak fermenta iz akrozoma u vanjsku sredinu, što umanjuje oplodnu sposobnost spermatozoida, jer su fermenti bitni za otapanje ovojnice jajne ćelije i penetraciju glave spermatozoida u jajnu ćeliju. Iz tih razloga broj patoloških spermatozoida je u nativnim ejakulatima svih rasplodnjaka, pa i pasa, limitiran. Tokom istraživanja, odnosno na osnovu urađenih spermograma, utvrdili smo da je broj patoloških spermatozoida u

nativnim ejakulatima bio u okviru fizioloških vrijednosti i nije bilo većih razlika između vrijednosti tokom toplog i hladnog perioda godine. Feldman i Nelson (5), te Miljković (10) i Bratanov i Radev (3) navode da u nativnim ejakulatima kod pasa ima prosječno 10%-20% patoloških spermatozoida, a što je više od rezultata, koje smo mi utvrdili.

Zaključci

Na osnovu provedenih istraživanja kvaliteta nativnih ejakulata izvan i tokom spolne sezone može se zaključiti slijedeće:

- Tehnika uzimanja sperme od pasa pomoću ljevkastog (konusnog) gumenog nastavka, koji se koristi za uzimanje sperme od bikova, pogodno je pomagalo da se od psa dobije kvalitetan nativni ejakulat.
- Laboratorijskom ocjenom nativnih ejakulata utvrdili smo da su prosječne vrijednosti volumena ejakulata, postotak progresivne pokretljivosti, broj spermatozoida u 1 ml u okviru fizioloških vrijednosti. Broj nebojenih i obojenih spermatozoida (po Blomu) i broj patoloških spermatozoida u okviru je fizioloških normi.
- Klimatski uslovi hladnog i toplog perioda godine imale su utjecaj na laboratorijske pokazatelje kvaliteta nativnih ejakulata kod pasa. Pokazatelji kvaliteta (volumen, progresivna pokretljivost, koncentracija, broj živih i mrtvih spermatozoida (po Blomu) iz toplog perioda bili su povećani u odnosu na pokazatelje iz hladnog perioda. Broj patoloških spermatozoida imao je neznatno veću vrijednost u toplom periodu.

LITERATURA

1. Bartlett D. J. Studies on dog semen. Journal of Reproduction and Fertility. 1962a; (3): 173-189.
2. Bartlett DJ. Studies on dog semen. Journal of Reproduction and Fertility 1962b;(3): 190-205..
3. Bratanov K, Radev G. Biologija razmnožavanja i umjetno osemenjavanje domaćih životinja. Sofija, 1977.
4. Cole H H, Cupps P T. Reproduction in Domestic Animals. Academic Press, New York and London, 1959.
5. Feldman C E, Nelson W R. Canine and feline endocrinology and Reproduction. Davis California, 1996.

6. Goodrowe K L, Hay Ma, Platz C C , Behrns S K , Jones M H , Waddell W,T,: Characteristicks of fresh and frozen-thawed red wolf (*Canis rufus*) spermatozoa. Anim. Reprod. Sci. 1998a;(53):1-4, 299-308.
7. Goodrowe K L, Hay Ma, Platz C C, Behrns S K , Jones M H , Waddell W T. Characteristicks of fresh and frozen-thawed red wolf (*Canis rufus*) spermatozoa. Anim. Reprod. Sci. 1998b;(53):1-4, 299-308.
8. Hajvanlarda E. Reprodüksiyon sun'ı tohumlama doğum ve Infertitite. Birinci Baskı, 1994.
9. Laing J A. Fertility and infertility in the domestic animals. London, 1970.
10. Miljković V. Porodiljstvo, sterilitet i veštačko osemenjavanje domaćih životinja. Beograd, 1987.
11. Minter L J, DeLiberto T J. Seasonal variation in serum testosterone, testicular volume, and semen characteristics in the coyote (*Canis latrans*). Theriogenology.2008; (69), 8, 946-952.
12. Oettlé E E. Sperm morphology and fertility in the dog. Jurnal of reproduction and fertility. Supplement.1993;(01), (02), (47):257-260.
13. Paufler S K. Künstliche Besamung und Eitransplantation bei Tier und Mensch. Hannover, 1974.
14. Perović T. Ispitivanje uticaja klimatskih faktora na kvalitet native i duboko zamrznute sperme bikova i njenu oplodnu sposobnost. Magistarski rad. Sarajevo 1989.
15. Podžo M, Varadin M. Odnos između kvaliteta ejakulata nerastova i broja prasadi u leglu Veterinaris. 1983;(32),(1), 19-27.
16. Pržulj D. Prilog istraživanju sezonskih varijacija kvaliteta ejakulata bikova. Magistarski rad. Sarajevo 1989.
17. Swenson J M. Đuksova fiziologija domaćih životinja. Sarajevo, 1975.
18. Taha M B, Noakes D E , Edward Allen W. The effect of season of the year on the characteristics and composition of dog semen. Jurnal of Small Animal Practice 2008;(22), (4),177-184.

Uredništvo primilo rukopis: 28. 10. 2009.