



**УНИВЕРЗИТЕТ У НОВОМ
САДУ**

**ПОЉОПРИВРЕДНИ
ФАКУЛТЕТ**

Департман за сточарство



Јована Грба

Дипл. инж. пољопривреде

ОЦЕНА КВАЛИТЕТА СПЕРМЕ ОВНА ФЛОУРЕСЦЕНТНИМ МАРКЕРИМА

Мастер рад

Нови Сад, 2022.



**УНИВЕРЗИТЕТ У НОВОМ
САДУ**
**ПОЉОПРИВРЕДНИ
ФАКУЛТЕТ**
Департман за сточарство



Кандидат

дипл. инж. Јована Грба

Ментор

проф. др Саша Драгин

ОЦЕНА КВАЛИТЕТА СПЕРМЕ ОВНА ФЛОУРЕСЦЕНТНИМ МАРКЕРИМА

Мастер рад

Нови Сад, 2022.

Комисија за оцену и одбрану мастер рада:

Проф. др Саша Драгин, ментор

Проф. др Иван Станчић, председник комисије

Проф. др Иван Пихлер, члан комисије



Редни број (РБР):

Идентификациони број (ИБР):

Тип документације (ТД):

Монографска документација

Тип записа (ТЗ):

Текстуални штампани материјал

Врста рада (ВР):

Мастер рад

Име и презиме аутора (АУ):

Јована Грба, дипл. инж.

Ментор (титула, име и презиме, звање)
(МН):

Др Саша Драгин, редовни професор

Наслов рада (НР):

**Оцена квалитета сперме овна
флуоресцентним маркерима**

Језик публикације (ЈП):

Српски

Језик извода (ЈИ):

Српски/Енглески

Земља публикавања (ЗП):

Република Србија

Уже географско подручје (УГП):

АП Војводина

Година (ГО):

2022.

Издавач (ИЗ):

Ауторски репринт

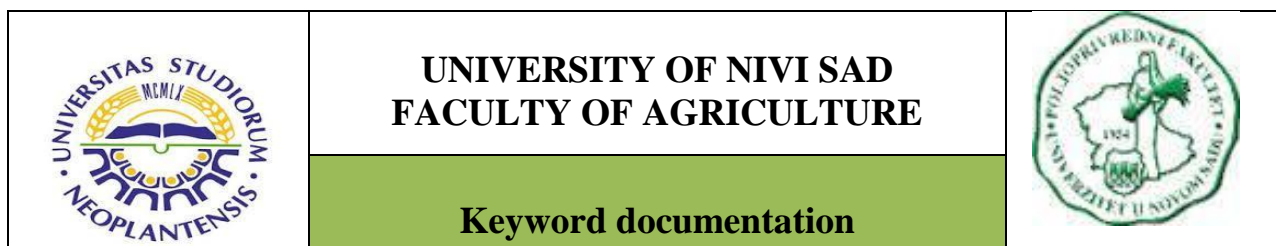
Место и адреса (МА):

21000, Нови Сад, Пољопривредни
факултет, Департман за сточарство, Трг
Доситеја Обрадовића 8.

Физички опис рада (ФО):

Научна област (НО):

Сточарство



Accession number (ANO):

Identification number (INO):

Document type (DT): Monographic documentation

Type of record (TR): Textual printed material

Contents code (CC): Msc. Thesis

Author (AU): **Jovana Grba, graduate engineer**

Mentor (MN): **Dr Saša Dragin, full professor**

Title (TI): **Ram sperm quality assessment by fluorescent markers**

Language of text (LT): Serbian

Language of abstract (LA): English/Serbian

Contry of publication (CP): Republic of Serbia

Locality of publication (LP): AP Vojvodina

Publication year (PY): 2022.

Publisher (PU): Autohor`s reprint

Publication place (PP): 21000, Novi Sad, Faculty of Agriculture,
Department of Animal Science, 8 Dositeja
Obradovića, Sq.

Physical description (PD):

Scientific discipline(SD):

Subject, Key words (SKW):

UDCHolding data(HD):

РЕЗИМЕ**Оцена квалитета сперме овна флуоресцентним маркерима****Дипл. инж. Јована Грба**

Флуоресцентна техника бојења репродуктивног материјала помоћу флуоресцентних маркера је новина која ће се све више користити у будућности. У овом раду описан је начин употребе две комбинације флуоресцентних маркера SYBR-14/PI и DAPI, који се користе да би се открило потенцијално морфолошко и физиолошко оштећење мушких гамета, тј. сперматозоида овна у нативном узорку сперме и након криопрезервације. Такође је рађен тест на одрживост сперматозоида, који подразумева откривање апоптичних сперматозоида који могу бити резултат физиолошког процеса током сперматогенезе или узроковано неким другим факторима. Оштећење сперматозоида је директно повезано са њиховом фертилношћу. Обрадом података свежег препарата и препарата након одмрзавања помоћу маркера дошло се до значајних разлика. Неопходно је проценити квалитет сперматозоида, односно, ејакулата који намеравамо да конзервишемо и сачувамо на дужи временски период.

Кључне речи: Флуоресцентни маркер, сперматозоиди, апоптоза, ован

SUMMARY**Ram sperm quality assessment by fluorescent markers**

The fluorescent technique of staining reproductive material using fluorescent markers is a novelty that will be increasingly used in the future. This paper describes the use of two methods of fluorescent markers SYBR-14/PI and DAPI, which are used to detect potential morphological and physiological damage to male gametes, ie ram sperm in a native sperm sample and after cryopreservation. A sperm viability test was also performed, which involves the detection of apoptotic sperm that may be the result of a physiological process during spermatogenesis or caused by some other factors. Sperm damage is directly related to their fertility. Significant differences were obtained by processing the data of fresh preparation and preparations after thawing with markers. It is necessary to assess the quality of sperm, ie ejaculate that we intend to preserve for a longer period of time.

Keywords: Fluorescent stains, spermatozoa, apoptosis, ram

САДРЖАЈ

1.	8	
1.1	9	
1.2	11	
1.2.1	Пубертет	12
1.2.2	Сперматогенеза овна	12
1.2.3	Морфологија сперматозоида овна	13
1.2.4	Ејакулат и његов састав	13
1.2.5	Спермална плазма	13
1.2.6	Сезона парења оваца	14
1.3	Припрема приплодних овнова за узимање ејакулта	15
1.3.1	Прикупљање сперме овна	15
1.3.1.1	Метода вештачке вагине	16
1.3.1.2	Метода електроејакулације	16
1.4	17	
1.4.1.	Оцена квалитета сперме	17
1.4.2.	Количина ејакулата	17
1.4.3.	Конзистенција сперме	17
1.4.4.	Концентрација сперме	18
1.4.5.	Покретљивост (Motility)	18
1.4.6.	Морфологија и виталност сперматозоида	20
1.5	22	
1.6	23	
1.6.1	Историјат криопрезервације	24
1.6.2	Криопрезервација сперматозоида овна	25
1.7	26	
1.7.1	Интегритет плазма мембране сперматозоида	27
1.7.2	Апоптоза (<i>Apoptosis</i>)	27
1.8	28	
1.8.1	Употреба флуоресцентних маркера у процени квалитета сперматозоида	30
2.	32	
3.	33	
3.1	33	
3.2	Анализа квалитета сперме	34
3.3	Припрема разређивача и процеса замрзавања	35
3.4	Флуоресцентни тест за одрживост сперматозоида	35
3.5	Флуоресцентни тест за апоптозу сперматозоида	36
4.	36	
5.	48	
6.	49	

1. УВОД

Биодиверзитет, као појам, описује све врсте организама које живе у одређеној области.

Данас, због константног раста броја људи на планети, последично долази до црпљења природних реурса и самим тим до смањења и нестанка природних станишта животиња. Повећавањем економичности производње употребом продуктивних раса домаћих животиња долази до потискивања слабо продуктивних аутохтоних раса. Дакле, аутохтоне расе постају угрожене и постоји све већи ризик од њиховог нестанка и смањења генетске варијабилности.

Овчарство је једна од важних грана пољопривреде која је тренутно у експанзији, где такође долази до замене примитивних раса племенитим. Очувањем аутохтоних раса сачувао би се генетски фонд, варијабилност гена и биодиверзитет. Постоје различити начини конзервације, први је *in situ* који подразумева гајење живих животиња у производним системима, где су настале или где се налазе. Други начин је *ex situ* који подразумева конзервацију изван производних система, углавном у банкама гена, применом лабораторијских метода. Оне могу бити реализоване *in vivo*, гајењем живих животиња у зоо вртвина, музејима, научним институцијама и *in vitro* методом криоконзервације сперматозоида, ембриона, оплођених јајних ћелија и другог биолошког материјала (Драгин и сар, 2016.).

Пре конзервације генетског материјала, неопходно је спровести детаљну анализу узорка, тј. проверу квалитета (у нашем случају, мушких гамета) сперматозоида. Поред стандардних анализа квалитета помоћу CASA система, такође смо за проверу квалитета сперматозоида користили флуоресцентне маркере. Употреба флуоресцентне боје може открити одрживост сперме. Ове флуоресцентне боје могу се груписати у две категорије. Једна група су мембрански непропусне боје које су способне да прођу кроз оштећену плазма мембрану мртве сперме и да се посматрају директно под флуоресцентним микроскопом, као што су PI и YoPro-1. Друга група су ацилиране мембранске боје које немају флуоресценцију, али се приликом проласка кроз нетакнуту плазма мембрану и уласка у живу сперму могу претворити у флуоресцентне супстанце, као што су SYBR-14 и Annexin V. Како технологија у свим подручјима константно напредује, тако се и у науци појављују иновације које нуде лакша техничка решења у области репродуктивне биотехнологије. Овај рад је последица иновативног истраживања, које користи

флуоресцентне маркере ради откривања оштећења сперматозоида и провере квалитета самих ејакулата који се користе за криопрезервацију и чување на дужи временски период.

1.1 Аутохтоне расе овнова коришћене у огледу

Изворна (домаћа) Влашка овца - Native Wallachian Sheep

У резултатима описана скраћеницом NWS

Представља најважнију аутохтону група оваца на територији Средње и Јужне Европе. Прилагођена је на лошије услове држања и саставни је део већине домаћинства ове регије.

Влашка раса оваца се протеже од подручја Урала-Кавказа (Руска федерација) до планина Бохемија (Чешка Република) и Пиндус (Грчка).

Појам на енглеском језику „*Valachian sheep*“ (који је Дарвин користио током 1860-их, а вероватно и други аутори тог времена) можда се односи на употребу оваца од стране Влаха у Румунији и Молдавији (*Drăgănescu и Grosu, 2010.*).

Сматра се да су Влашке овце настале од древних скитских оваца спиралних рогова, дугог репа (некадашњи назив *Aries rustica*, понекад *O. a. Longicauda*) припитомљених око 400 година пре Христа. (*Drăgănescu и Grosu, 2010.*). Генетска разноликост Влашке расе оваца је веома велика, то је продукт стварања пуно генерација током еволуције у различитим еколошким нишама, као и разноврсног оплемењивања у појединим регијама. Постоји доста варијетета Влашке расе оваца. У Мађарској и западној Румунији, ова раса је названа Рацка, а у Србији је названа Влашка витороба.

Влашке овце донете су на територију Словачке у 13. и 14. веку и насељавале су регионе Липтов, Кисуце, Орава, Спиш, Ниске Татре, Велка и Мала Фатра и Спишке Рудохорие на надморској висини од 600-1200 м. Поред Словачке, изворна Влашка овца се такође користи као генетски ресурс у Чешкој, где се до данас одвија ревитализација. Карактеристике јединки ове расе је да су малог формата, са висином гребена од 510-550 мм. Телесна маса оваца износи 30-35 кг, док код овнова износи 40-45 кг. Вуна је груба (40,1-86 микрометара), мешана, састављена од неколико врста вунских влакана.

Годишња производња масне вуне код оваца износи 1,2-2,4 кг, док код овнова износи 1,8-2,5 кг. Годишња производња млека по лактацији варира од 60 до 120 литара (екстремно и до 150 л). Изворне Влашке овце су сезонски полиестерична раса са масовном појавом еструса у јесен (октобар, новембар). Сматрају се врло плодном расом и граница се креће од 95-105 %. Тренутно стање оваца ове расе у Словачкој је 2554 грла. (Chrenek P., et all, 2019.)



Слика 1. Native Wallachian Sheep (<http://www.sheep101.html>)

Унапређена Влашка овца - Improved Wallachian Sheep

У резултатима описана скраћеницом IWS.

Унапређене Влашке овце су перспективна раса, углавном за планинска подручја. У Словачкој Републици ова раса се држи у планинским пределима, а посебно у пределима изнад 750-800м, односно у областима Орава, Липтов, Спиш и Гемер. За ову расу је карактеристична издржљивост на спољашње утицаје, живахан темперамент, чврста грађа, одличне способности за узгој. Добро подноси методе планинског узгоја у суровим климатским условима. Овце и овнови су средње великог телесног формата. Раса је настала укрштањем изворне Влашке овце са разним увозним расама полуфине и полугрубе вуне (Текел, Хемпшир, Шевиот, Лестер и Линколн). Употребом строге селекције, нарочито су побољшане квалитативне и квантитативне особине вуне. Као нова раса полугрубе вуне, побољшана Влашка овца препозната је 1982. године. Тренутно стање оваца ове расе у Словачкој је 128930 грла. (Chrenek P., et all 2019.)



Слика 2. Improved Wallachian Sheep (<http://www.google.com>)

Словачка млечна овца - Slovak Dairy Sheep

У резултатима описана скраћеницом SDS.

Процес настанка Словачких млечних оваца трајао је 25 година. То је специјализована млечна раса усмерена на повећање производње и квалитета млека. То је нова словачка национална раса оваца (од маја 2017. године). Настала је укрштањем изворних раса - Цигаје и унапређене Влашке овце (са мањим уделом Мерино оваца) са специјализованим млечним расама - Лакон и Источнофризијска овца. Оплемењивачки програм има за циљ производњу млека од преко 200 литара годишње. Плодност оваца прелази 160%. Веома важна чињеница је да овце имају виме са одличним функционалним и морфолошким особинама, што их чини погодним за услове машинске муже. Тренутно стање оваца ове расе у Словачкој је 5000 грла. (Chrenek P., et all 2019.)



Слика 3. Slovak Dairy Sheep (<http://www.google.com>)

1.2 Репродуктивни параметри овна

1.2.1 Пубертет

Грла која се користе у приплоду морају да достигну полну зрелост. На размножавање оваца утиче неурохормонални систем који чине: хипоталамус, хипофиза, гонаде (јајници код оваца, тестиси код овнова), као и вегетативни, односно периферни нервни систем и чула. Тај систем почиње да функционише са пубертетом, односно полном зрелошћу (Мекић и сар, 2007.).

Овнови достижу полну зрелост веома рано, као и овце. Брзина достизања полне зрелости код оваца зависи од расне припадности (раностасне расе сазревају са 6-7 месеци, док средњестасне и касностасне сазревају са 8-12 месеци) као и од постизања одговарајуће телесне масе.

Код овнова се уласком у пубертет сматра моменат када се у ејакулату нађу фертилни сперматозоиди.

1.2.2 Сперматогенеза овна

Сперматогенеза почиње са полном зрелошћу. Она подразумева процес стварања мушких полних ћелија (сперматозоида). Кроз развојне стадијуме од сперматогонија, које садрже диплоидан број хромозома, преко примарне и секундарне сперматоците (у којој под дејством мејозе 1 и мејозе 2 долази до редукције броја хромозома у хаплоидан број), до сперматиде које се касније модификују у функционалне сперматозоиде. Велик број ћелија сперматозоида пролази кроз дегенерацију и апоптозу током сперматогенезе код сисара. То је физиолошки начин обнављања сперматогених ћелија, а представља и начин да организам очисти сувишне или абнормалне ћелије (University of Wisconsin, 1998; Blanco-Rodríguez J. A, 1998.). Разни фактори, као што су генетски, фактори околине или комбинација генетских и фактора околине, доводе до оштећења сперматозоида током процеса сперматогенезе (Omar Ibrahim Farah et al., 2013.).

Сперматогенеза се одвија у семеним каналићима тестиса током целе године, али постоје специфичности у саставу сперме и плодности у току великих врућина као и јаких зима. Генерално, најосетљивије на температуру су примарне сперматоците, као и ране сперматиде, које показују хистолошки доказ оштећења 2 до 4 сата након подвргавања топлоти (A.D. Johnson et W.R Gomes, 1977.). Загревање скротума код овна

смањило је плодност, али је имало мало утицаја на ембрионалну смртност (Howart B. Jr. 1969; A. W. H. and Mattner, P.E, 1970.). Плодност је опадала од 14. – 34. дана након загревања и достигла нулу између 34. и 47. дана. Метаболички абнормални сперматозоиди такође су пронађени у течности тестиса у року од једног дана након излагања топлоти, а повећан је и удео мртвих и/или морфолошки абнормалних сперматозоида у ејакулту између 15. и 35. дана након загревања (Voglmaur J.K. et al., 1970.; Voglmaur J.K. et al 1971.; Brown-Woodman P.D.C. et al 1975.). Сперматозоиди присутни у епидидимису у време загревања били су релативно непромењени јер су овнови коришћени у приплоду, између 3. и 14. дана након загревања, показали нормалну плодност (A.D. Johnson et W.R Gomes, 1977.).

1.2.3 Морфологија сперматозоида овна

Сперматозоиди су мушке полне ћелије преко којих мужјак преноси своје генетске особине на потомство. Састоје се од главе, врата, тела и репа, чија је дужина 80 микрометара (Мекић и сар. 2007.). На врху главе сперматозоида се налази органела која се назива акрозом. Акрозом има веома важну улогу у процесу оплодње, јер садржи ензиме који омогућавају сперматозоиду да продре у јајну ћелију (Драгин и сар. 2016.). Оштећење акрозома је повезано са оплодном способношћу, али по Healei (1969.) не омета покретљивост. Статус акрозома и интегритет мембране сперматозоида се може оштетити разним видовима манипулације, као што је и криопрезервација. Након одмрзавања, примећује се значајно повећање сперматозоида са оштећеним акрозомом (M. Kaabi et al, 2003.).

1.2.4 Ејакулат и његов састав

Ејакулат се састоји од сперматозоида и секрета акцесорних полних жлезда. При једној ејакулацији ован просечно излучи 1,0 мл, односно количину од 0,5 до 3,0 мл сперме (Мекић и сар. 2007.).

1.2.5 Спермална плазма

Спермална плазма, односно течни део ејакулата, чини 80% запремине ејакулата и она има заштитну, транспортну и нутритивну улогу (Драгин и сар. 2016.).

То је производ акцесорних полних жлезда и епидидимиса. Сперма овна садржи релативно висок ниво протеина и слободних аминокиселина, укључујући глутаминску и аспарагинску киселину, аланин и глицин.

У семеној плазми се, од угљених хидрата, налазе фруктоза, сорбитол, инозитол, а код неких јединки и мало глукозе. (Драгин и сар. 2016.).

1.2.6 Сезона парења оваца

Овце су сезонски полиестричне животиње. Сезона парења оваца почиње када је светлосни део дана знатно краћи од ноћног дела. У нашем географском подручју сезона парења почиње од друге половине августа и траје до прве половине јануара. На почетак сезонске полне активности делује неуро-хормонални систем у организму овце. У мозгу оваца се налази пинеална жлезда која излучује хормон мелатонин. Довољне количине мелатонина се излучују у годишњој сезони када је тамни део дана дужи од светлог и излучују се ноћу. Зато се каже да су овце животиње „кратког дана“ (Мекић и сар. 2007.).

Наравно, и неки други фактори утичу на почетак сезоне парења, као што је кондиција, спољна температура (овце се почињу раније парити када је температура већа), појава болести, присуство овна у стаду, итд.

Почетак и трајање сезоне парења варира у зависности од расе оваца. Сезона парења почиње касније и краће траје код примитивнијих раса, док код племенитих почиње раније и траје дуже. Као што је наведено, сезона парења траје од августа до аануара, док је најинтензивнија полна активност током октобра и новембра.

Овнови су полно активни током целе године. Међутим, фертилизациона способност сперматозоида варира током сезоне и највећа је током сезоне парења. Ова варирања су последица деловања дневног фотопериода и истих фактора као и код женских грла.

1.3 Припрема приплодних овнова за узимање ејакулта

Овнови који се користе у приплодне сврхе треба да буду у приплодној кондицији и да имају задовољавајуће услове смештаја и микроклимата. Под тим се подразумева да се држе у чистим торовима, са адекватном температуром, индивидуално или групно. Нормирање исхране се успоставља у зависности од телесне масе, узраста и употребе овнова за осемењавање. Свакодневна исхрана за овнове мора бити избалансирана како квалитативно, тако и квантитативно. Храна не сме садржати микотоксине и фитоестрогене који доводе до поремећаја сперматогенезе.

Док траје припрема, од овнова треба чешће узимати сперму ради навикавања на узимање и повремену контролу сперме. За успешну оплодњу неопходна је функционална мембрана сперматозоида, а то зависи од процеса сазревања сперматозоида. Процес сазревања, који укључује низ сложених промена сперматозоида, одвија се у епидидимису. Проласком кроз епидидимис на сперматозоиде могу утицати бројни фактори, као што су сексуални стимулс и учесталост ејакулације. Студија (М. Олгеро et al., 1996.) доказује да се употребом другог и трећег ејакулата повећава фертилност и побољшавају резултати у вештачкој оплодњи.

Интензивно узимање сперме од овнова траје од августа до новембра. У том периоду млади овнови дају сперму једном, док старији овнови два пута дневно.

1.3.1 Прикупљање сперме овна

Узимање сперме утиче на број потребних овнова и доза за осемењавање, степена разређења и начина конзервације сперме. Узимање сперме захтева навикнутост овнова и професионалан рад техничара.

Метод узимања ејакулата, треба да је брз и једноставан, да осигура добијање квалитетног ејакулата и да је нешкодљив за даваоца сперме.

За узимање сперме од овна постоје две основне методе:

- метода вештачке вагине
- метода електроејакулације

1.3.1.1 Метода вештачке вагине

Вештачка вагина је инструмент помоћу којег се може добити цео и неоштећен ејакулат без последица по здравље и полни орган овна. Ова метода захтева увежбаност овнова на скакање и увежбаност технике узимања сперме.

Вештачка вагина треба да обезбеди услове који владају у природној вагини овце, као што су температура, склискост и притисак. За постизање рефлекса скока, користе се овце у еструсу или вештачка макета овце која се назива „фантом“.

1.3.1.2 Метода електроејакулације

Електроејакулација је безвољни акт ејакулације изазван електричном стимулацијом центра за ејакулацију који се налази у лумбосакралном сегменту кичмене мождине. (Мекић и сар. 2007.). Овај метод је доста компликованији од метода вештачке вагине и непријатнији за овна тако да се за његову употребу захтева већа стручност техничара, посебна апаратура и више помоћника (Б. Станчић, 2006.). Њена предност се огледа у томе што она не омета сперматогенезу, ејакулат се може узимати од овнова који нису навикнути да природно скачу или ејакулирају помоћу вештачке вагине, када имају проблема са ногама и други фактори.

Код примене електроејакулације, овна је потребно фиксирати. Препуцијум и унутрашњост препуцијума овна се очисти да не би дошло до контаминације ејакулата и ширења болести. У ректум овна се полако уводи биполарна електрода 10-15 цм дубоко. Кроз електроде се кратко пропушта струја ниског напона (0-15 В) и мале јачине (100-200 мА) у трајању од 5-6 сек. (Мекић и сар., 2007). За постизање ејакулације потребно је 3-5 електростимулација. Добијање ејакулата методом електроејакулације пронађен је већи број функционалних сперматозоида, што подразумева живе сперматозоиде, нетакнуте акрозоме, функционалне ћелијске мембране након криопрезервације него методом вештачке вагине (F.Marco-Jiménez et al., 2005.).



Слика 4. , Слика 5. Електроејакулатор (<https://vetpracticemag.com>)

1.4 Контрола квалитета сперме

Квалитет сперме један је од најважнијих параметара који утичу на оплодњу. Контролом квалитета се показује у ком степену се овнови могу искоришћавати, као и број инсеминационих доза који се може припремити од добијеног ејакулата.

Због тога је важно да се увек врши провера квалитета сваког добијеног ејакулата, као и оцена квалитета сперме.

Пре сваке анализе, узорак сперме треба промешати, из разлога што се мртви сперматозоиди таложе на дну док се живи и покретљиви налазе на врху.

1.4.1. Оцена квалитета сперме

Оцењивање или сперматолошки преглед састоји се из макроскопског (органолептичког) и микроскопског прегледа свежег ејакулата.

Макроскопски се оцењује волумен, боја, конзистенција, концентрација (густина), примесе загађености (крв, гној, урин, делови епитела и друго) и рН вредност.

Микроскопска оцена сперме обухвата одређивање укупног броја сперматозоида у ејакулату, концентрацију сперматозоида у 1 мл ејакулата, степен прогресивно покретљивих сперматозоида, број мртвих и морфолошки промењених сперматозоида (Б. Станчић, 2006.).

1.4.2. Количина ејакулата

Количина ејакулата код овна, просечно, износи 0,8-2,0 мл и она зависи од генотипа, узраста, телесне масе, исхране и вештине узимања ејакулата.

Нормалан узорак сперме треба да је млечно беле боје, до жућкасте, зависно од густине. Ретка сперма има сиво плавкасту боју и указује на недостатак сперматозоида.

Боја се може променити због присуства крви, гноја, урина и слично, и то најчешће ако су приплодњаци оболели. Боја се одређује визуелно у спермосабирачу. (Мекић и сар. 2007.).

1.4.3. Конзистенција сперме

Нормална конзистенција сперме је слична павлаци, густа и тешко капљива. Оцеђује се визуелно и то тако што се спермосабирач искоси и врати у нормалан положај. Повећана или смањена густина утичу на покретљивост сперматозоида, а самим тим на њихову оплодну способност. Због нечистоће и болести мужјака, сперма може бити загађена разним примесима. Уколико узимање сперме није урађено по пропису, у њој се могу наћи разне примесе као што су: прашина, фекалије, длаке, слама и друго.

1.4.4. Концентрација сперме

Одређује се микроскопски и фотоелектрокалориметријском методом. Концентрација у густој сперми овна изражава се у милијардама у 1 мл.

Постоје системи за анализу сперме као што је CASA систем, који омогућава тачну, понављајућу и аутоматску процену параметара сперме у коју спада и концентрација. Употреба CASA система се препоручује као користан механизам за предвиђање потенцијала плодности мужјака у популацији.

Ејакулат овна је слабо кисео $pH=6,6-6,8$. Уколико дође до запаљења тестиса или епидидимиса вредност pH расте до алкалне вредности ($pH 7,2-8,0$). Снижење pH вредности сперме испод нормалне настаје код дужег стајања неразређене сперме. (Мекић и сар. 2007.).



Слика 6. Уређај за одређивање концентрације и покретљивости сперматозоида (CASA) (www.minitube.com)

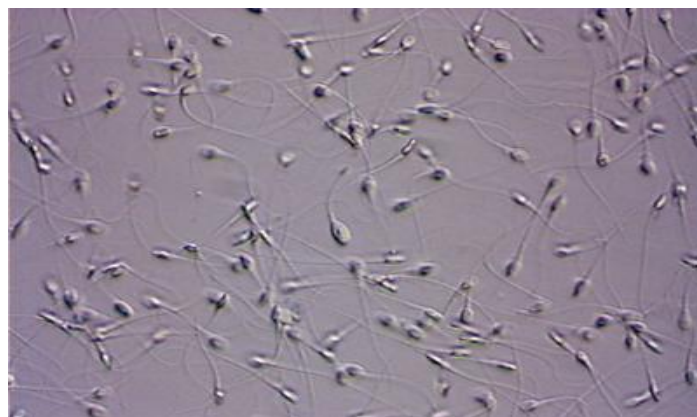
1.4.5. Покретљивост (Motility)

Покретљивост се односи на проценат активно покретних сперматозоида у ејакулату. Према процени покретљивости, сперматозоиди се сврставају у следеће категорије: непокретни, слабо-покретни, споро-покретни и брзо-покретни (прогресивни). Прогресивна покретљивост је директно повезана са оплодном способности сперматозоида и подразумева кретање сперматозоида главом према напред. Прогресивна покретљивост сперматозоида у квалитетном ејакулату би требало да буде већа од 80%. Данас се, помоћу CASA система, одређује покретљивост сперматозоида у узорку коришћењем параметра: Удаљена просечна путања (DAP), Растојање закривљене линије (DCL), Удаљеност равне линије (DSL), Брзина просечне путање (VAP), Брзина закривљене линије (VCL), Брзина равне линије (VSL), Равност (STR), Линеарност (LIN), Колебање (VOB), Амплитуда бочног померања главе (ALH) и Фреквенција укрштања тактова (BCF).

Постоји још врста покретљивости, као што су кретање у круг (циркуларна покретљивост) и кретање у месту (треперење).

Уколико се уочава само понеки покретан сперматозоид, то се назива олигоспермија. Ако се не уочава ниједан покретан сперматозоид, онда се то зове азоспермија и означава мртву сперму. И на крају ако не уочавамо ниједан сперматозоид, то се зове аспермија.

Покретљивост сперматозоида се мора проценити у најкраћем року након узимања узорка, по могућности до 30 минута, али у сваком случају у року од једног сата након ејакулације, како би се смањили ефекти дехидрације, промене рН и температуре.



Слика 7. Покретљивост сперматозоида, извор www.google.rs

1.4.6. Морфологија и виталност сперматозоида

Приликом прегледа сперме овна, могу се наћи и деформисани патолошки облици сперматозоида. Деформације могу бити на глави, средњем делу и репу. У сперми не сме да буде више од 20% патолошких сперматозоида. При прегледу квалитета сперме може се установити и слепљивање сперматозоида и њихово нагомилавање у виду мањих или већих гомила због оштећења ћелијске мембране, губитка електростатичког потенцијала, поремећеног хемијског састава спермалне плазме и други фактори.

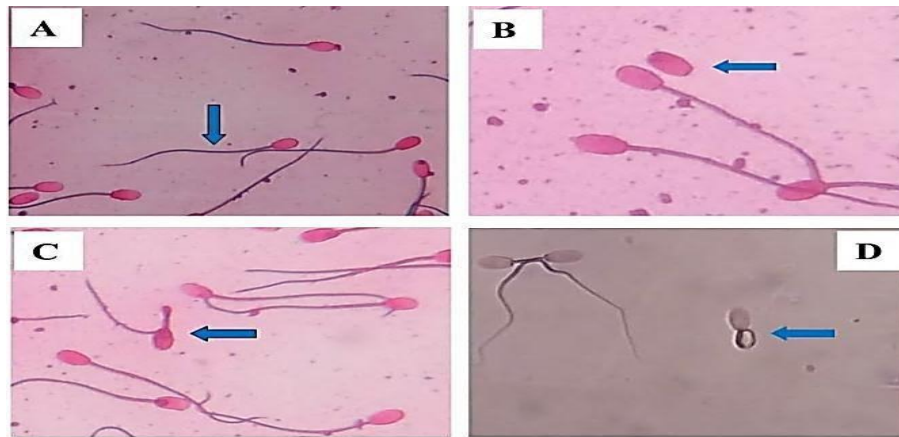
CASA систем омогућава аутоматску анализу морфометрије и морфолошку класификацију узорака сперматозоида обојених на светлосном микроскопу, као и аутоматску анализу виталности, која пружа податке о проценту живих и мртвих сперматозоида у узорку сперме.

Постоје велике варијације у морфологији сперме, које чине процену прилично сложеном, али неколико студија је открило сперматозиде унутар женског репродуктивног тракта, посебно у *endocervical mucus* и са површине зоне пелуциде који су помогли да се дефинише изглед потенцијално плодних сперматозоида одређених врста, који су морфолошки нормални. (Menkveld et al., 1991; Liu & Baker, 1992.).

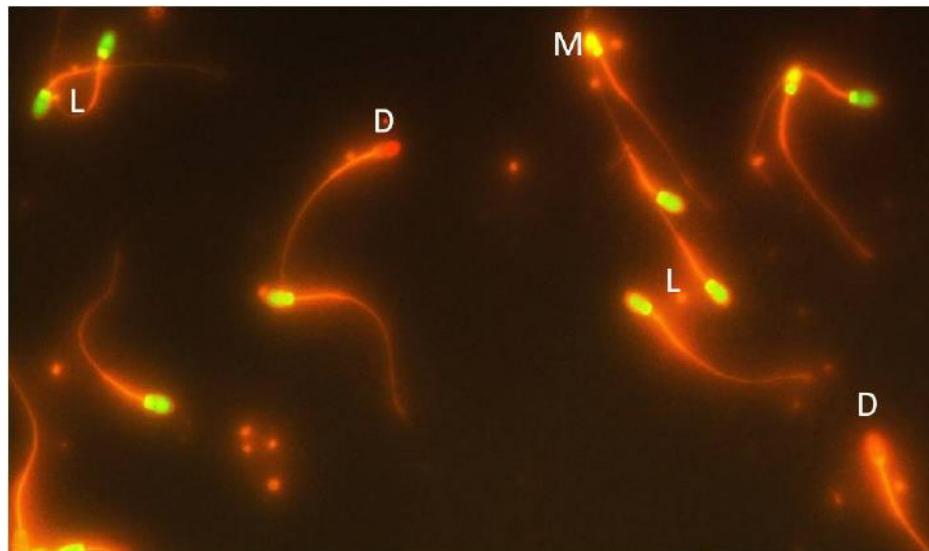
Виталност сперме се оцењује проценом ћелијске мембране, и основа је за узорке који имају мање од 40% прогресивно покретљивих сперматозоида. Оштећени и мртви сперматозоиди имају оштећену ћелијску мембрану која пропушта боју и зато се обоје.

У ејакулатима се обично налазе бактерије, а дозвољен број микроорганизама у 1 мл сперме овна је 500-5 000, што важи као горња граница при вештачком осемењавању и дубоком замрзавању сперме.

Поред свих ових тестирања, која се изводе на сперми, CASA систем омогућава и анализу акрозомске реакције која је једна од битнијих тестова сперме. Овај тест мери проценат нетакнутих акрозома разређених узорака сперме.



Слика 8. Морфологија сперматозоида (А - нормалан сперматозоид, В - одвојена глава, С - савијен реп, D - умотан реп), извор www.researchgate.net



Слика 9. Виталност сперматозоида, (L - живи сперматозоиди, D - мртви сперматозоиди, M - умирући сперматозоиди) извор www.researchgate.net

1.5 Разређивање сперме овна

После добијања ејакулата, било да се ради методом електроејакулације или методом вештачке вагине, он се разређује и на тај начин се повећава волумен нативног ејакулата, од кога се може направити већи број инсеминационих доза одређене запремине, чиме се олакшава његово манипулисање и ојачава виталност сперме (Мекић и сар. 2007.).

Додавањем разређивача, сперматозоиди добијају хранљиве и заштитне материје које им омогућавају преживљавање у условима криопрезервације.

Сперма овна се разређује одмах након узимања и контроле квалитета. За разређивање се користе разређивачи различитог састава. То су хранљиви, заштитни и пуферски раствори, који садрже шећере, протеине, липиде и минерале. Сперма се разређује помоћу млечних разређивача, јер је идеални медијум за сперму преживара. Раније су се разређивачи припремали тако што се свеже млеко (пуномасно или обрано) загревало до температуре 92-95° С, да би се елеминисале фракције албумина и потом охладило на 25° С.

Разређивачи за сперму овна су најчешће на бази жуманцета кокошијег јајета, коме се додају цитрати или фосфати.

Данас на тржишту постоје готови разређивачи, које користимо за разређивање сперме.

Приликом разређивања се мора знати да се не додаје сперма разређивачу, већ се разређивач додаје сперми и то нежно и постепено, јер се сперматозоиди оштећују при наглом разређењу. (Мекић и сар. 2007.). Такође, температура разређивача и сперме мора бити једнака.

Обрада криопрезервацијом излаже ћелије сперматозоида стресу, што доводи до оштећења која угрожавају функцију сперме. Криопротектанти се додају да би се смањио тај температурни стрес током замрзавања и одмрзавања, али су у већим количинама токсични за сперматозоиде.

Разређивачи за сперму садрже соли, пуфере, шећере, протеине и липиде, а типично садрже глицерол као главно криопротективно средство које омогућава интрацелуларну заштиту. Највећи опоравак сперматозоида након одмрзавања, постигнут је са глицеролом (*Tuli и Holtz 1994; Singh et all 1995., Kundu et all 2000.*).

Заштитна средства која делују изван ћелије користе се за повећање волумена и да би се повећала температура разређивача. Термички третирано млеко и жуманце

јајета се додају као средство за модификовање мембране како би се повећала стабилност сперме током замрзавања.



Слика 10. *Ovixcell*, комерцијални разређивач, извор: <https://www.imv-technologies.com>

1.6 Криопрезервација

Криопрезервација је метода којом се ћелије или ткива замрзавају на неки дужи временски период, како би се очувале.

Значај криопрезервације се огледа у томе што се ћелије и ткива успешно могу замрзавати на изузетно ниским температурама, које омогућавају заустављање биолошких процеса, старења и одумирања ћелија и, што је још битније, успешно се одмрзавају, задржавајући своју функционалну способност и након периода од више година до више деценија.

Истраживања везана за термодинамички процес замрзавања се спровode већ дужи низ година. Постоје многи разлози зашто је криопрезервација сперме важна, укључујући:

- Одржавање генетске разноликости у популацијама домаћих и дивљих врста (Wildt, 1992; Critser&Russell, 2000.);
- Олакшавање дистрибуције „генетски супериорнијих“ линија домаћих врста;
- Генетско банкарство, генетско модификованих животињских модела људског здравља и болести (Critser&Russell, 2000.; Knight&Abbott 2002.).

1.6.1 Историјат криопрезервације

У Енглеској (*Polge et al.*, 1949.) је први пут извршено успешно замрзавање сперме петлова, применом глицерола. Глицерол се ускоро показао као користан и за криопрезервацију сперме бика. Многи истраживачи су покушали замрзнути семе бика 1940-их година, али безуспешно. Тада су се истраживања фокусирали на коришћење шећера, као крипротектанта, али то није довело до успешних резултата. Хемијским анализама *Polge* је утврдио да је најбоље користити глицерол и протеин (албумин) за разређење сперме ради замрзавања. Основни медијум који је користио *Polge* био је екстракт жуманца-цитрата (*Salisbury et al.*, 1941.) уз глицерол. *O'Dell* и *Almquist* (1957.) сматрали су да је комбинација млеко-глицерол добар медијум за замрзавање сперме бика. *Tris-buffered egg-yolk-glycerol* такође је обезбедио заштиту како за замрзнуту тако и одмрзнуту сперму. (*Davis et al.*, 1963; *Foote*, 1998.). То је убрзо постало најчешће средство у целом свету за крипрезервацију сперме бикова и појединих других врста животиња. (*Iritani*, 1980.).

Развој технологије вештачког осемењавања и конзервисања код оваца почео је у Русији (*Milovanov* 1938, 1964; *Maule*, 1962.).

Одлагање замрзнутог семена за употребу са чврстим угљен диоксидом или течним азотом, је био технолошки проблем који је требало решити. Стаклене ампуле које су коришћене су се често ломиле током замрзавања или одмрзавања. *Cassou* (1964.) је модификовао систем који је развио *Sørensen* (1940.), са методом запечаћене пластичне цевчице (пајете) и катетер за осемењавање (*Pickett and Berndtson*, 1974.). Оригиналне пајете капацитета 0,5 мл су замењене пајетама капацитета 0,25 мл, због мањег простора потребног за складиштење.

Складишта за течни азот су такође била проблем, због неодговарајуће изолације. Успех криопрезервације сперматозоида и развој контејнера који служе за складиштење течног азота су били темељ развоја целе индустрије криопрезервације.

1.6.2 Криопрезервација сперматозоида овна

Сперма овна, ако се одмах не искористи за вештачко осемењавање, се мора конзервисати. Дубоко замрзавање се примењује уколико је потребно да се разређена сперма очува на неки дужи временски период.

Замрзавају се само најквалитетнији ејакулати у облику пајета или мини туба, запремине 0,25 мл. Пре замрзавања сперму је неопходно разредити неким од синтетичких сперморазређивача.

Сперморазређивачи у себи поред угљених хидрата, електролита, протеина и антибиотика садрже и 1-6% глицерола као криопротектора. Глицерол штити сперматозоиде од ниских температура, штити њихову ћелијску мембрану тако што спречава кристализацију воде са оштрим ивицама кристала. Сперматозоиди без глицерола не би могли да преживе дубоко замрзавање (Мекић и сар., 2007.).

Поступак дубоког замрзавања сперме овнова:

1. Контрола квалитета нативног ејакулата, непосредно после узимања.
2. Разређивање ејакулата.
3. Еквилибрација разређене сперме, на +5 °C, током 1 до 2 h.
4. Додавање криопротектаната.
5. Формирање инсеминационих доза.
6. Замрзавање доза сперме, током 10 минута, са +5 °C на -100 °C.
7. Утапање доза у течни азот. Температура чувања је на -196 °C (Драгин и сар. 2016.).

Расхлађивање сперме се врши у два дела. Прво се, током два сата, сперма расхлади на 5 °C ради еквилибрације (привикавање сперматозоида на глицерол и снижавање температуре). После еквилибрације се додају криопротектанти и дозе се замрзавају током 10 минута док не достигну -100 °C, потом се потапају у течни азот на температури од -196 °C.

Пре осемењавања или испитивања одлеђених сперматозоида, дозе сперме се морају отопити, а то се постиже тако што се дозе стављају у водено купатило загрејано на 35-37 °C током једног минута.

Оплодна способност одлеђених сперматозоида може значајно да варира и зависи од бројних фактора, као што су: квалитет сперме пре замрзавања, поступак припреме замрзавања, услови замрзавања, време чувања сперме и многи други.

Инкубацијом сперматозоида овна на 30 °C у трајању од 60 минута доводи до пада (46%) у укупној стопи зачећа (*Müzeyyen Kutluca Korkmaz 2017.*).

Прогресивна покретљивост сперматозоида треба да буде 50-60%, да би били употребљиви за осемењавање (Мекић и сар., 2007.). Код овнова, после одмрзавања долази до смањене покретљивости која износи 30-40%, а разлог томе је што долази до

оштећења акрозома. Акрозом сперматозоида код овнова је осетљивији на утицаје дубоког замрзавања више него код других врста.

Смањена плодност смрзнутог семена се у великој мери приписује измењеној структури и функцији мембране током хлађења, замрзавања и одмрзавања (J. E. Parks' and J. K. Graham 1992.).



Слика 11. Пајете намењене за криопрезервацију семена. Слика 12. Контејнери течног азота (извор обе слике: приватна архива)

1.7 Одрживост мушких гамета-сперматозоида

1.7.1 Интегритет плазма мембране сперматозоида

Интегритет (одрживост) мембране и покретљивост сперме су два параметра квалитета која се најчешће процењују током рутинске анализе сперме.

Интегритет мембране је у директној вези са оплодном способношћу и због тога се користе технике бојења, како би се проценио њихов квалитет. Студије чији је циљ побољшати и стандардизовати ове широко коришћене тестове су од великог интереса. Плазма мембрана сперме је неопходна за стабилне метаболичке функције, капацитивност, интеракције ћелија јајовода, процеса везивања јајних ћелија и акросомске реакција. Губитак интегритета може бити користан за предвиђање оплодне сперме (Brito LFC et all, 2003; Rodriguez-Martinez 2003; Yaniz JL et all 2008.).

Методe за процену статуса плазма мембране се заснивају на повећаној пропустљивости оштећене сперме различитим супстанцама. За ту сврху се користе флуоресцентне боје са различитом способношћу проласка кроз нетакнуту мембрану сперматозоида. У основи, користе се све методологије засноване на флуоресцентним

непропусним бојама или у комбинацији са пропусним флуоресцентним бојама, тј. двоструко бојење (Yaniz JL et al 2008.).

1.7.2 Апоптоза (*Apoptosis*)

Апоптоза означава програмирану ћелијску смрт која игра кључну улогу у физиолошким процесима током феталног развоја, као и у ткивима одраслих индивидуа. У већини случајева, физиолошка ћелијска смрт настаје апоптозом, за разлику од некрозе. (Warner-Lambert/Parke-Davis, 2000.). Посматрано уз помоћ светлосног и електронског микроскопа апоптотске ћелије карактеришу морфолошке промене на површини ћелије, као што су скупљање ћелије, излагање мембранском фосфатидилсерину (ПС), блебање и промене у језгру фрагментација језгра, хиперкондензација хроматина и деградација ДНК. (E.Martí et al, 2008.).

На крају, ћелије се распадају у мале фрагменте окружене мембраном (апоптотична тела), које се уклањају фагоцитозом без подстицања на упални одговор. Примећено је да се употребом различитих маркера могу открити оштећења ћелија повезаних са апоптозом код зрелих ћелија сперматозоида. Та оштећења се карактеришу недостатком транскрипционе активности, губи се интегритет мембранског потенцијала, долази до фрагментације ДНК и имају малу количину цитоплазме. (Kamla Kant Shukla et al, 2012.).

1.8 Флуоресцентни маркери

Последњих година, откривање оштећења сперматозоида олакшано је напретком флуоресцентних техника бојења уз помоћ флуоресцентног микроскопа, проточне цитометрије и система за рачунарску анализу. Флуоресцентне сонде у комбинацији са проточном цитометријом омогућавају процену великог броја ћелија у врло кратком времену, што обезбеђује статистички поуздана мерења (Graham, 2001).

Флуоресцентне технике бојења укључују употребу флуоресцентних боја, које се директно или индиректно везују са неким састојцима сперме и процењују оштећења структуре или функцију сперматозоида. Плазма мембрана окружује сперматозоид држећи заједно органеле и унутарћелијске компоненте. Својим полупропустљивим својствима одржава хемијски градијент јона и других растворљивих компонената. Ако је плазма мембрана сперматозоида није функционална, сматра се да су сперматозоиди оштећени (мртви) и не могу оплодити јајну ћелију. Класична комбинација боја омогућава дискриминацију две или три субпопулације сперматозоида, живих, мртвих и оштећених, у зависности од степена интегритета мембране (Eriksson & Rodríguez–Martínez, 2000).

Тачна *in vitro* процена квалитета семена је од велике важности када се процењују поступци смрзавања и одмрзавања. Процена мембране сперме је важан показатељ успеха криопрезервације, јер су мембране сперме изузетно подложне повредама током криопрезервацијама (Parks & Graham, 1992; Harrison, 1997; Holt & Medrano, 1997.).

Употреба флуоресцентне боје може открити одрживост сперме. Ове флуоресцентне боје могу се груписати у две категорије. Једна група су мембрански непропусне боје које су способне да прођу кроз оштећену плазма мембрану мртве сперме и да се посматрају директно под флуоресцентним микроскопом, као што су PI и YoPro-1. Друга група су ацилиране мембранске боје које немају флуоресценцију, али се приликом проласка кроз нетакнуту плазма мембрану и уласка у живу сперму могу претворити у флуоресцентне супстанце, као што су SYBR-14 и Annexin V. Међутим, истраживачи користе двоструко бојење са две флуоресцентне боје како би постигли тачније резултате, на пример, SYBR-14/PI, YO-PRO-1/PI, Annexin V/PI. Стога се сперматозоиди групишу на живе, апоптотичне и мртве сперматозоиде.

DAPI је флуоресцентна боја која се снажно везује за регије богате аденином-тиминим у ДНК. У великој мери се користи у флуоресцентној микроскопији. DAPI може проћи кроз нетакнуту ћелијску мембрану и због тога се користи за бојење и живих и фиксираних ћелија, мада мање ефикасно пролази кроз мембрану у живим ћелијама и стога пружа маркер за одрживост мембране. (.....)

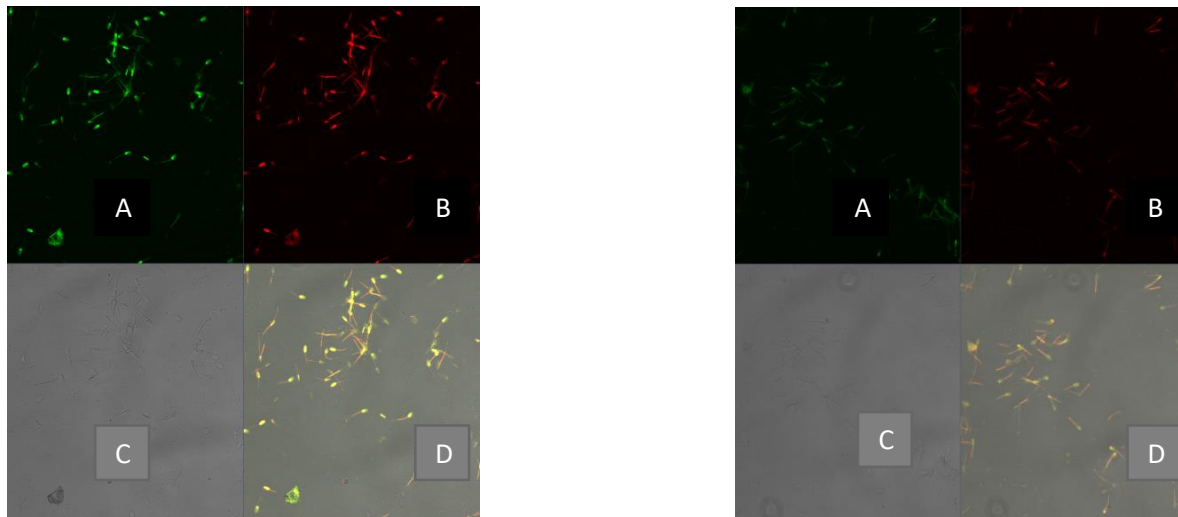
1.8.1 Употреба флуоресцентних маркера у процени квалитета сперматозоида

Одрживост сперме се процењује помоћу LIVE/DEAD комплета за одрживост сперме (Молекуларне пробе), који се састоји од две флуоресцентне боје које везују ДНК: боја која пропушта мембрану, SYBR-14 и конвенционална боја мртвих ћелија, пропидијум јодид (PI). Овај тест је такође опште познат као SYBR/PI тест. Ове боје реагују са истим ћелијским састојком (нуклеинским киселинама) и боје ћелије на различит начин: SYBR-14 идентификује све сперматозоиде у узорку (живе и мртве), показујући сјајне зелене флуоресценције у језгру, док PI боји само мртва језгра сперматозоида која флуоресцирају светло црвено. Анализа SYBR-14/PI разликује популације живих (зелена боја), мртвих (црвена боја) и умирућих (жута, комбинација зелене и црвене боје) сперматозоида са оштећеним мембранама. Дакле, SYBR-14 продире у сперму независно од статуса интегритета мембране, док PI боји ћелије оштећеног интегритета мембране.

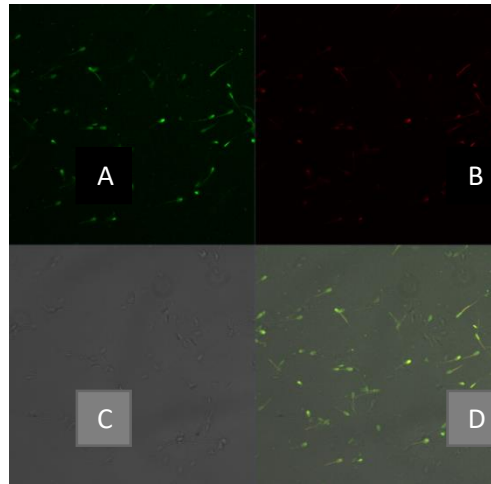
Присуство апоптотичних маркера у ејакулату је од интереса у смислу процене квалитета узорка сперме. Рани знаци апоптозе (ћелијска смрт) укључују излагање медијуму фосфолипид фосфатидитлсерин (PS), који је ограничен на мембрану сперматозоида. Овај процес се може пратити коришћењем флуоресцентног теста који укључује протеин који веже PS за AnnexinV. AnnexinV је протеин везан за фосфолипид, има висок афинитет за PS и може да служи као рани апоптозни маркер. Присуство PS на мембрани сперматозоида откривено је коришћењем AnnexinV.

Још једна од карбоцијанин нуклеинских киселина је зелено-флуоресцентна YO-PRO-1 боја која се такође користи у идентификацији апоптотичних ћелија. Апоптотичке ћелије постају пропустљиве за YO-PRO-1, али остају непропусне за пропидијум јодид (PI), боју мртвих ћелија. Апоптоза означава програмирану ћелијску смрт која се јавља у физиолошким и патолошким процесима у организму. До апоптозе долази и током процеса криопрезервације. Криопрезервација подразумева складиштење живих ћелија на веома ниским температурама, тачније на -196°C у течном азоту. Значај криопрезервације се огледа у томе што се ћелије и ткива успешно

могу замрзавати на изузетно ниским температурама које омогућавају заустављање биолошких процеса, старења и одумирања ћелија и што је још битније успешно се одмрзавају задржавајући своју функционалну способност након периода од више година до више деценија. Познато је да квалитет сперматозоида након криопрезервације директно утиче на фертилитет и оплодну способност. Висока фертилизациона способност сперматозоида након одмрзавања неопходна је да би се могли успешно конзервисати сперматозоиди аутохтоних и ретких раса, и тиме очувао биодиверзитет и генетска варијабилност. Употребом флуоресцентних маркера, као што су SYBR 14, Yo-Pro и Anexin V испитујемо функционалност мембране сперматозоида, односно његову фертилизациону способност као и могућност криопрезервације.



Слика 13, 14. Конфокалне слике сперматозоида овна обојених са SYBR-14 и PI: (A) Само бојење SYBR-14; (B) Само бојење PI; (C) Слика светлог поља; (D) Спојена слика. Извор: приватна архива



Слика 15. Конфокалне слике сперматозоида овна обојених са SYBR-14 и PI: (A) Само бојење SYBR-14; (B) Само бојење PI; (C) Слика светлог поља; (D) Спојена слика. Извор: приватна архива.

На сликама број 13 и 14 приказани су узорци обојени флуоресцентном комбинацијом боја SYBR-14/PI, која показује живе сперматозоиде са нетакнутом мембраном А, затим мртве сперматозоиде који рефлектују црвену боју Б и сперматозоиде који умиру обојени жутом бојом Ц.

На слици број 15 приказан је узорак обојен флуоресцентном комбинацијом DAPI, где се такође живи сперматозоиди са нетакнутом мембраном означени са А, затим мртви сперматозоиди, који рефлектују црвену боју Б и сперматозоиди који умиру обојени жутом бојом Ц.

На основу визуелног прегледа можемо установити да се на првом узорку, тј. слици број 13, види већи проценат сперматозоида који су мртви и апоптотични, док се на слици број 15, види највећи проценат апоптотичних, а мало и мртвих сперматозоида.

2. ЗАДАТАК И ЦИЉ РАДА

Истаживачки рад је реализован у циљу оптимизације метода добијања и оцењивања квалитета репродуктивног биолошког материјала овнова. Помоћу флуоресцентних микроскопа, коришћењем специфичних флуоресцентних маркера-SYBR 14, PI, Yo-Pro и Anexin процењује се квалитет мембране сперматозоида, који директно утиче на фертилитилну способност и квалитет ејакулата. Фертилна способност сперматозоида неопходна је како би могли успешно конзервисати сперматозоиде аутохтоних раса, а самим тим и помогли очувању биодиверзитета. Резултати ће омогућити оптимизацију методе одабира овнова на основу квалитета ејакулата који се користи за замрзавање, чиме ће се олакшати одабир узорака сперме подобних за криопрезервацију у банкама генетичких ресурса животиња, и продаје на тржишту, у сврху куповине директно за узгој.

3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОД РАДА

3.1 Скупљање и обрада сперме

Материјал је прикупљен од одраслих овнова, у раним јутарњим часовима (09:00ч), два пута недељно (понедељак и четвртак). Семе овнова је сакупљено на исти начин и то методом електроејакулације, на следећи начин: ректум је очишћен од фецеса. Коришћена је ректална сонда од три електроде. Прва, за овнове и нерасте пречника 2,54 цм и дужине приближно 16 цм, повезана са извором енергије који омогућава контролу напона и струје (Minitube Electro-ejaculator). Режим ЕЕ (аутоматски начин рада, врста кривуље 2-с, импулса сличног напона, од којих је сваки одвојен 2-с прекидом. Почетни напон је износио 0,5 В, а затим се повећавао у свакој серији импулса, до максималне вредности од 7 В. Након достизања напона од 7 V, импулси су остали на том нивоу до краја ејакулације.

Након сакупљања у спермосабирачу, узорци сперме су транспортовани у лабораторију у воденој купки на 30 °С. У лабораторији су одмах процењени обим, концентрација, покретљивост и други параметри сперме.

Материјал је прикупљен и обрађен у истраживачком центру за анималну производњу CVŽV у Њитри, Република Словачка.

3.2 Анализа квалитета сперме

Запремина је измерена помоћу конусних епрувета од од 15мл (ТПП, Швајцарска) са скалом запремине. Пре даљих анализа, узорци сперме су разблажени физиолошким раствором (1:40, 10:390 микролитара) и одржавани на собној температури до 20°C.

Следеће анализе су извршене након процеса замрзавања/одмрзавања. Концентрација (милијарда/мл) и покретљивост (%) анализирани су системом CASA са светлим микроскопом (AxioScore A1, Zeiss), Маклер комором за бројање (Microptic, Spain) је разређени узорак сперме (10 микролитара) пренесен у софтвер SpermVision (Minitube, Немачка). Усредсредили смо се углавном на укупну и прогресивну покретљивост сперматозоида. Остали мониторирани параметарски били су, Удаљена просечна путања (DAP), Растојање закривљене линије (DCL), Удаљеност равне линије (DSL), Брзина просечне путање (VAP), Брзина закривљене линије (VCL), Брзина равне линије (VSL), Равност (STR), Линеарност (LIN), Колебање (VOB), Амплитуда бочног померања главе (ALH) и Беат унакрсна фреквенција (BCF).

Након CASA анализа, узорци су стављени у фрижидер и остављени до следећег дана (природна ћелијска смрт). Морфолошке абнормалности измерене су истим микроскопом CASA. У овој анализи смо оценили морфолошке абнормалности сперматозоида, одвојени реп од главе, увијени реп, скраћени реп, сломљени реп, цитоплазматска капљица флагеллум, увећана или смањена глава сперматозоида, остале акрозомске промене сперматозоида и друга патолошка стања сперме. Упоредили смо број морфолошких измењених сперматозоида са укупним бројем спреме (400), где смо оценили проценат појединачних абнормалних сперматозоида и то статистички обрадили.

3.3 Припрема разређивача и процеса замрзавања

На дан сакупљања сперме, коначни Triladyl® је припремљен додавањем сировог Triladyl® (прах који садржи глицерол, Трис, лимунску киселину, фруктозу, тилозин, гентамицин, линкомицин и спектиномицин у складу са подацима произвођача) у дејонизованој води у односу 1:3, као и половину запремине жуманца. После мешања жуманца, смеша се филтрира кроз филтер папир. Затим је сваки узорак сперме пребачен у епрувету са припремљеним екстензором за разређивање у коначним концентрацијама 1:10 (сперма: разређивач). Семе је разблажено полако, уз две или три нежне вертикалне ротације на собној температури. Потом се ставља у пајете запремине 0,25 мл, пајета се затим затвара и ставља у фрижидер да се уравнотежи на 4 °C током 6 часова. Пајете са уравнотеженим спермом пребачене су у претходно охлађену аутоматизовану кутију за замрзавање (IceCube, Minitube). Поклопац је одмах затворен, а израчуната количина течног азота (LN) лагано се сипа у складу са програмом замрзавања (+4, -10 (120с), -80 (450с), -120 (100с), -140 (180с)). После предвиђеног времена, ове пајете су уроњене у контејнер са течним азотом (Liquid nitrogen container, KGW-Isotherm) на -196 °C. Након недељу дана, узорци су одмрзнути у воденој купки (42 °C, 15с.), премештени у епрувету 5 минута и подвргнути даљим анализама.

3.4 Флоуресцентни тест за одрживост сперматозоида

Испитивање вијабилности сперме бојењем са SYBR 14/PI употребом комплета за одрживост сперме LIVE/DEAD (Molecular Probes, Lucerne, Switzerland) према упутству. Узорци сперме су разблажени, у односу 1:10, свежим HBS медијумом (pH 7,4) и формиране су дозе сперматозоида по 500 микролитара у свакој групи. Укратко, 1 микролитар основног раствора боје SYBR 14 (1 mM и DMSO) је стављено у 49 микролитара медијума HBS, како би се добило 50 микролитара радног раствора у

концентрацији од 0,02 mM. Затим се додаје 2,5 микролитара радног раствора у сваких 500 микролитара узорка разређеног семена, што резултира коначном концентрацијом SYBR-14 од 100 nM. Узорци сперме су инкубирани на 37 °C током 15 минута, након чега је у сваком узорак додато 2,5 микролитра PI (коначна PI концентрација је 12 μM), а узорци су додатно бојени 5 минута. Након бојења, сперматозоиди (у сперми од 3 микролитра узорке) имобилизовани су 1% раствором глутаралдехида (1 микролитар), стављени на микрослојеве, прекривени Vectashield медијумом за причвршћивање (4 микролитра; H-1000, Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA) и покривени покривачем. Узорци сперме анализирани су под флоуресцентним микроскопом Leica (Leica Microsystems, Wetzlar, Немачка), опремљени специфичним филтерима дужине таласа за FITC и TRITC канале, користећи PlanApo суви објектив при увећању од 40 пута. Сlike сперматозоида снимљене су на DFC 480 камери и обрађене помоћу софтвера IM500 Leica. Када је обојен SYBR 14 и побуђен на 488 нанометара, живи сперматозоиди су показали светло зелену флоуресценцију. Како се интензитет флоуресценције временом мало повећавао, сlike сперматозоида су направљене у року од неколико минута (Makarevich et al., 2010). Укупан број сперматозоида је пребројан на спојеним сликама. Одрживост сперме представља однос ћелија обојених SYBR-14 и укупног броја сперматозоида. У свакој експерименталној групи испитано је најмање 12-15 насумично изабраних видних поља микроскопа, тако да је пребројено 600-800 ћелија сперматозоида по једном експерименту. Експерименти су изведени у пет понављања.

3.5 Флоуресцентни тест за апоптозу сперматозоида

За бојење YO-PRO-1 и Annexin V приближно 1×10^6 сперме испере се налази у фосфат-пуферисаном салину (PBS; бојење YO-PRO-1) или пуферу за везивање (Annexin V); који се испоручује у комплету и центрифугира на $300 g \times$ током 6 мин. Ове палете сперматозоида су ресуспендоване у: и) 50 μL PBS са 100 nM YO-PRO-1) у 50 μL PBS 50 μL радног раствора Annexin V-Fluos (4 μL annexin V и 200 μL везивног пуфера).

После инкубације у мраку, током 15 минута, испрана је сперма у PBS (YO-PRO-1) или пуферу за везивање (Annexin V; испоручује се у комплету) и центрифугирана на $300g \times$ током 6 мин. Узорци сперме анализирани су под флоуресцентним микроскопом Leica (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany), опремљени специфичним филтерима дужине таласа за FITC и TRITC канале, користећи PlanApo суви објектив при увећању од 40 пута.

4. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

Табела бр. 1. Поређење параметара концентрације, покретљивости, прогресивне покретљивости и укупног броја ћелија свеже сперме, као и истих параметара након криопрезервације.

Groups	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference		t	df	p
				Lower	Upper			
1. Fresh SDS Concentration/ Thawed SDS Concentration	1,09684	1,207634	0,540071	-0,4026	2,5963	2,031	4	0,112
2. Fresh SDS Motile/ Thawed SDS Motile	34,28	13,66276	6,110172	17,315	51,244	5,61	4	0,005
3. Fresh SDS Progressive/ Thawed SDS Progressive	44,836	17,84959	7,982579	22,672	66,999	5,617	4	0,005
4. Fresh SDS Total cells/ Thawed SDS Total cells	-529,6	1591,221	711,6156	-2505,3	1446,1	-0,744	4	0,498
5. Fresh I W Concentration/ Thawed I W Concentration	1,31364	2,011542	0,899589	-1,184	3,8112	1,46	4	0,218
6. Fresh I W Motile/ Thawed I W Motile	40,198	19,08476	8,534965	16,501	63,894	4,71	4	0,009
7. Fresh I W Progressive/ Thawed I W Progressive	36,208	19,60306	8,766758	11,867	60,548	4,13	4	0,014
8. Fresh I W Total cells/ Thawed I W Total cells	227,8	1014,296	453,607	-1031,6	1487,2	0,502	4	0,642
9. Fresh N W Concentration/ Thawed N.W Concentration	1,3201	1,579039	0,706168	-0,6405	3,2807	1,869	4	0,135
10. Fresh N W Motile/ Thawed N W Motile	15,962	24,42899	10,92497	-14,37	46,294	1,461	4	0,218
11. Fresh N W Progressive/ Thawed N W Progressive	27,942	33,12532	14,81409	-13,188	69,072	1,886	4	0,132
12. Fresh N W Total cells/ Thawed N W Total cells	98,4	398,2226	178,0905	-396,05	592,85	0,553	4	0,61

p<0,05

SDS- Slovak Dairy Sheep

IW- Improved Wallachian Sheep

NW- Native Walachian Sheep

Анализом табеле број 1 можемо уочити да постоје статистички значајне разлике у укупној и прогресивној покретљивости између свеже и одмрзнуте сперме код овнова расе Словачка млечна овца (Slovak Dairy Sheep).

Такође постоје и статистички значајне разлике у укупној и прогресивној покретљивости између свеже и одмрзнуте сперме код овнова расе Improved Wallachian Sheep.

Остали параметри нису показали статистички значајне разлике.

В. Kulíková et all. (2018.) су у свом раду утврдили да нема разлике у тоталној и прогресивној покретљивости сперматозоида свеже сперме између два тестирана мужјака овна расе Влашка овца (Walachian sheep).

Табела бр. 2. Поређење параметара концентрације, укупне покретљивости и прогресивне покретљивости свеже и истих параметара сперме након криопрезервације узимајући просек свих раса заједно.

Groups	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference		t	df	p
				Lower	Upper			
1. Fresh sve rase Concentration/ Thawed sve rase Concentration	1,24	1,515	0,391	0,404	2,082	3,178	14	0,007
2. Fresh sve rase Motile/ Thawed sve rase Motile	30,1	21,022	5,428	18,5	41,788	5,554	14	0
3. Fresh sve rase Progressive/ Thawed sve rase Progressive	36,3	23,776	6,138	23,16	49,49	5,918	14	0
4. Fresh sve rase Total cells/ Thawed sve rase Total cells	-67,8	1086,237	280,46	-669,3	533,73	0,242	14	0,812

p<0,05

SDS- Slovak Dairy Sheep

IW- Improwed Wallachian Sheep

NW- Native Walachian Sheep

Табела број 2 нам указује да се број ћелија сперматозоида није променио након криопрезервације, тј. имамо исти укупан број ћелија у свежој и у одмзнутој сперми код свих раса овнова.

Исто тако, постоје статистички значајне разлике за параметре концентрације сперматозоида у једном милилитру, укупне покретљивости и прогресивне покретљивости за све расе овнова свеже сперме и након криопрезервације.

Криопрезервација значајно утиче на квалитет одмрзнутих сперматозоида, снижавањем карактеристика покретљивости сперме (*E. Kubovičová et all. 2012*).

Сперматозоиди овна су осетљиви на екстремне промене температуре током процеса замрзавања (*Salamoni Maxwell, 1995*) и доводе до промена сперматозоида (*Watson, 1995*). Штетни фактори као што је и крио-оштећење манифестују се при одржавању (*Holt iNorth, 1994*). Степен крио-оштећења такође зависи од неколико фактора (*Watson, 2000; Naqvi etall, 2001*), који ограничавају преживљавање сперматозоида током инкубације (*Aisen et all, 2000; Bagg et all., 2002*).

Према наводима Jovana Grba et all (2020), квалитет свежег семена је био сличан, али је одмрзнуто семе показало разлику и тиме су потврдили варијабилност осетљивости на поступак криопрезервације код два тестирана овна расе Wallachian sheep, дошло је до промена у прогресивној и укупној покретљивости сперматозоида након
криопрезерва

Табела бр. 3. Поређење параметара концентрације, покретљивости и прогресивне покретљивости свеже сперме и истих параметара након криопрезервације.

Groups	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference		t	df	p
				Lower	Upper			
1. Thawed SDS Concentration/ Fresh sve rase Concentration	1,0968	1,2076	0,5401	-2,596	0,4026	-2,031	4	0,112
2. Thawed SDS Motile/ Fresh sve rase Motile	-34,28	13,662	6,11	-51,24	-17,31	-5,61	4	0,005
3. Thawed SDS Progressive/ Fresh sve rase Progressive	-44,83	17,849	7,9825	-66,99	-22,67	-5,617	4	0,005
4. Thawed SDS Total cells/ Fresh sve rase Total cells	529,6	1591,2	711,61	-1446	2505,3	0,744	4	0,498
5. Thawed I W Concentration/ Fresh sve rase Concentration	1,9894	1,2452	0,5568	-3,535	0,4432	-3,572	4	0,023
6. Thawed I W Motile/ Fresh sve rase Motile	-55,58	21,53	9,628	-82,31	-28,84	-5,772	4	0,004
7. Thawed I W Progressive/ Fresh sve rase Progressive	-51,84	19,195	8,584	-75,67	-28	-6,039	4	0,004
8. Thawed I W Total cells/ Fresh sve rase Total cells	-829,8	1141,2	510,37	-2246	587,22	-1,626	4	0,179
9. Thawed N W Concentration/ Fresh sve rase Concentration	1,9954	1,235	0,5522	-3,528	-0,462	-3,613	4	0,022
10. Thawed N W Motile/ Fresh sve rase Motile	-50,18	15,062	6,735	-68,88	-31,47	-7,45	4	0,002
11. Thawed N W Progressive/ Fresh sve rase Progressive	63,972	21,14	9,454	-90,22	-37,72	-6,766	4	0,002
12. Thawed N W Total cells/ Fresh sve rase Total cells	-663,6	1434	641,28	-2444	1116,8	-1,035	4	0,359

p<0,05

SDS- Slovak Dairy Sheep

IW- Improved Wallachian Sheep

NW- Native Walachian Sheep

Анализом табеле број 3 урадили смо поређења отопљених ејакулата сваке расе понаособ са просечном вредности свежег ејакулата свих раса. Закључили смо да код овна расе Словачка млечна овца (Slovak Dairy Sheep) постоје статистички значајне разлике између свеже сперме и сперме након криопрезервације, за параметре укупна и прогресивна покретљивоат сперматозоида.

Постоје статистички значајне разлике код овна расе Унапређена Влашка овца (Improve Wallachian sheep) између свеже сперме и сперме након криопрезервације, за параметре концентрације, укупне и прогресивне покретљивости сперматозоида.

Такође и код овна расе Изворна Влашка овца (Native Wallachian Sheep) видимо да постоје статистички значајне разлике код свеже и одмрзнуте сперма, за параметре концентрације, укупне и прогресивне покретљивости сперматозоида.

Табела бр. 4. Анализа варијансе за прогресивну покретљивост свеже сперме

<i>Groups</i>	<i>Count</i>	<i>Sum</i>	<i>Average</i>	<i>Variance</i>
Slovak Dairy Sheep % Progressive	5	425,35	85,07	36,14935
Impr. Wallachian % Progressive	5	347,19	69,438	449,1198
Nat. Wallachian % Progressive	5	245,2	49,04	553,8647

<i>Source of Variation</i>	<i>SS</i>	<i>df</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>P-value</i>	<i>F crit</i>
Between Groups	3264,331	2	1632,166	4,7121	0,030879	3,88529 4
Within Groups	4156,535	12	346,378			
Total	7420,867	14				

Count - Узорци

Sum - Укупно

Average - Средња вредност

Variance - Варијанса

Табела број 4. означава резултате анализе варијансе, у којој је анализирана прогресивна покретљивост свежих ејакулата три расе од које свака има по пет узорака. Анализирали смо да ли постоје статистиичке разлике унутар и између група.

Овом анализом смо установили да постоје статистички значајне разлике између раса у прогресивној покретљивости свеже сперме.

Табела бр. 5. Анализа варијансе за прогресивну покретљивост одлеђене сперме.

<i>Groups</i>	<i>Count</i>	<i>Sum</i>	<i>Average</i>	<i>Variance</i>
Slovak Dairy Sheep % Progressive	5	201,17	40,234	203,3679
Improved Wallachian % Progressive	5	166,15	33,23	310,2536
Native Wallachian % Progressive	5	105,49	21,098	273,3657

<i>Source of Variation</i>	<i>SS</i>	<i>df</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>P-value</i>	<i>F crit</i>
Between Groups	937,38	2	468,6899	1,786649	0,209317	3,8853
Within Groups	3147,95	12	262,3291			
Total	4085,33	14				

Табела број 5 означава резултате анализе варијансе, у којој је анализирана прогресивна покретљивост одмрзнутих ејакулата три расе овнова, од којих свака има по пет узорака. Анализирали смо да ли постоје статистиичке разлике унутар и између група.

Овом анализом смо установили да постоје статистички значајне разлике између раса у прогресивној покретљивости одмрзнуте сперме.

Табела бр. 6. Корелациона матрица за свежу сперму.

Groups		Fresh SDS Concentration	Fresh SDS Motile	Fresh SDS Progressive	Fresh SDS Total cells	Fresh I W Concentration	Fresh I W Motile	Fresh I W Progressive	Fresh I W Total cells	Fresh I W Concentration	Fresh I W Motile	Fresh I W Progressive	Fresh I W Total cells
Fresh SDS Concentration	Pearson Correlation	1	0,78	0,591	,909*	0,293	0,714	0,748	0,295	0,191	0,492	0,517	0,071
	Sig. (2-tailed)		0,12	0,294	0,033	0,632	0,175	0,146	0,63	0,758	0,4	0,372	0,91
Fresh SDS Motile	Pearson Correlation		1	,963**	0,878	0,173	0,594	0,642	0,186	0,046	0,764	0,8	-0,055
	Sig. (2-tailed)			0,009	0,05	0,78	0,291	0,243	0,764	0,941	0,133	0,104	0,93
Fresh SDS Progressive	Pearson Correlation			1	0,726	0,123	0,451	0,509	0,143	0,024	0,804	0,837	-0,061
	Sig. (2-tailed)				0,165	0,843	0,445	0,381	0,818	0,969	0,101	0,077	0,922
Fresh SDS Total cells	Pearson Correlation				1	0,105	0,68	0,687	0,097	-0,079	0,484	0,526	-0,177
	Sig. (2-tailed)					0,866	0,207	0,2	0,877	0,9	0,408	0,363	0,776
Fresh I W Concentration	Pearson Correlation					1	0,775	0,791	,998**	,958*	0,669	0,63	,953*
	Sig. (2-tailed)						0,124	0,111	0	0,01	0,217	0,255	0,012
Fresh I W Motile	Pearson Correlation						1	,992**	0,758	0,593	0,701	0,699	0,548
	Sig. (2-tailed)							0,001	0,137	0,292	0,187	0,189	0,338
Fresh I W Progressive	Pearson Correlation							1	0,781	0,632	0,761	0,758	0,576
	Sig. (2-tailed)								0,119	0,253	0,135	0,137	0,309
Fresh I W Total cells	Pearson Correlation								1	,968**	0,688	0,649	,959**
	Sig. (2-tailed)									0,007	0,199	0,236	0,01
Fresh N W Concentration	Pearson Correlation									1	0,597	0,55	,990**
	Sig. (2-tailed)										0,288	0,337	0,001
Fresh N W Motile	Pearson Correlation										1	,998**	0,54
	Sig. (2-tailed)											0	0,348
Fresh N W Progressive	Pearson Correlation											1	0,489
	Sig. (2-tailed)												0,403
Fresh N W Total cells	Pearson Correlation												1
	Sig. (2-tailed)												
* . Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).													
** . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).													

p<0,05

SDS- Slovak Dairy Sheep

IW- Improwed Wallachian Sheep

NW- Native Walachian Sheep

Анализирајући резултате свеже сперме из табеле број 6, добијене помоћу Пирсонових коефицијента корелације ранга, закључујемо да статистички значајна повезаност постоји између следећих варијабли.

Концентрација сперматозоида у ејакулату је у позитивној корелацији са укупним бројем ћелија сперматозоида код овна расе Словачка млечна овца (Slovak Dairy Sheep), растом прве варијабле долази до повећања друге варијабле.

Мотилност је у позитивној корелацији са прогресивном покретљивошћу сперматозоида код овнова расе Словачка млечна овца (Slovak Dairy Sheep), растом прве варијабле долази до повећања друге варијабле.

Мотилност је у позитивној корелацији са укупним бројем ћелија сперматозоида код овнова расе Словачка млечна овца (Slovak Dairy Sheep), растом прве варијабле долази до повећања друге варијабле.

Концентрација сперматозоида у ејакулату је у позитивној корелацији са укупним бројем ћелија сперматозоида код овнова расе Унапређена Влашка овца (Improved Wallachian), растом прве варијабле долази до повећања друге варијабле.

Концентрација сперматозоида у ејакулату је у позитивној корелацији са мотилношћу код овна расе Унапређена Влашка овца (Improved Wallachian), растом прве варијабле долази до повећања друге варијабле.

Концентрација сперматозоида у ејакулату је у позитивној корелацији са укупним бројем ћелија сперматозоида код овна расе Изворна Влашка овца (Native Wallachian), растом прве варијабле долази до повећања друге варијабле.

Мотилност сперматозоида има позитивну корелацију са прогресивном покретљивошћу сперматозоида код овна расе Изворна Влашка овца (Native Wallachian), растом прве варијабле долази до повећања друге варијабле.

Концентрација сперматозоида у ејакулату код овнова расе Унапређена Влашка овца (Improved Wallachian) показује позитивну и јаку корелацију са концентрацијом сперматозоида овнова расе Изворна Влашка овца (Native Wallachian), растом прве варијабле долази до повећања друге варијабле.

Концентрација сперматозоида у ејакулату код овнова расе Унапређена Влашка овца (Improved Wallachian) показује позитивну и јаку корелацију са укупним бројем ћелија сперматозоида код овнова расе Изворна Влашка овца (Native Wallachian), растом прве варијабле долази до повећања друге варијабле.

Параметри мотилитета су важни са становишта њихове повезаности са квалитетом сперме, односно са капацитетом сперме, реакцијом акрозома и везивања зоне пеллуциде (Robertson et al., 1988).

Позитивна корелација између одрживости и покретљивости сперматозоида може постојати. Међутим, постоје неки извештаји да је велик број сперматозоида, који се боје као живи, уствари непокретни (Hong et al. 1988.), или да не губе сви непокретни сперматозоиди интегритет мембране (Bialkowska et al. 2004.).

Ова недоследност података захтева додатне студије разјашњења односа између одрживости сперматозоида и параметара мотилитета.

Табела бр. 7. Корелациона матрица за одлеђену сперму.

Groups		Thawed SDS Concentration	Thawed SDS Motile	Thawed SDS Progressive	Thawed SDS Total cells	Thawed I W Concentration	Thawed I W Motile	Thawed I W Progressive	Thawed I W Total cells	Thawed N W Concentration	Thawed N W Motile	Thawed N W Progressive	Thawed N W Total cells
Thawed SDS Concentration	Pearson Correlation	1	0,322	-0,057	0,644	0,383	0,501	-0,695	0,146	0,53	-0,275	-0,352	0,637
	Sig. (2-tailed)		0,597	0,928	0,241	0,525	0,389	0,193	0,815	0,359	0,654	0,562	0,248
Thawed SDS Motile	Pearson Correlation		1	0,691	0,78	-0,529	0,873	0,39	0,559	0,736	0,635	0,027	0,788
	Sig. (2-tailed)			0,197	0,119	0,36	0,053	0,516	0,327	0,156	0,25	0,966	0,113
Thawed SDS Progressive	Pearson Correlation			1	0,694	-0,431	0,778	0,678	0,597	0,661	,973**	0,725	0,732
	Sig. (2-tailed)				0,193	0,469	0,121	0,208	0,287	0,225	0,005	0,165	0,16
Thawed SDS Total cells	Pearson Correlation				1	0,02	,978**	0	0,707	0,76	0,525	0,199	,977**
	Sig. (2-tailed)					0,975	0,004	1	0,182	0,136	0,364	0,748	0,004
Thawed I W Concentration	Pearson Correlation					1	-0,137	-0,799	0,19	-0,432	-0,553	-0,214	-0,108
	Sig. (2-tailed)						0,826	0,105	0,76	0,468	0,334	0,73	0,863
Thawed I W Motile	Pearson Correlation						1	0,18	0,759	0,747	0,646	0,222	,953'
	Sig. (2-tailed)							0,773	0,137	0,147	0,239	0,719	0,012
Thawed I W Progressive	Pearson Correlation							1	0,159	0,204	0,827	0,592	0,066
	Sig. (2-tailed)								0,798	0,742	0,084	0,293	0,916
Thawed I W Total cells	Pearson Correlation								1	0,145	0,53	0,143	0,563
	Sig. (2-tailed)									0,816	0,358	0,819	0,323
Thawed N W Concentration	Pearson Correlation									1	0,538	0,333	0,878
	Sig. (2-tailed)										0,35	0,585	0,05
Thawed N W Motile	Pearson Correlation										1	0,74	0,566
	Sig. (2-tailed)											0,153	0,32
Thawed N W Progressive	Pearson Correlation											1	0,286
	Sig. (2-tailed)												0,641
Thawed N W Total cells	Pearson Correlation												1
	Sig. (2-tailed)												

** . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

* . Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).

p<0,05

SDS- Slovak Dairy Sheep

IW- Improwed Wallachian Sheep

NW- Native Walachian Sheep

Анализирајући резултате одлеђене сперме из табеле број 7, добијене помоћу Пирсонових коефицијента корелације ранга, закључујемо да статистички значајна повезаност постоји између следећих варијабли.

Прогресивна покретљивост сперматозоида код овна расе Словачка млечна овца (Slovak Dairy Sheep) показује позитивну корелацију са мотилности сперматозоида код овнова расе Изворна Влашка овца (Native Wallachian), растом прве варијабле долази до повећања друге варијабле.

Укупан број ћелија сперматозоида овна расе Словачка млечна овца (Slovak Dairy Sheep) је у позитивној корелацији са мотилности сперматозоида овна расе Унапређена Влашка овца (Improved Wallachian), растом прве варијабле долази до повећања друге варијабле.

Укупан број ћелија сперматозоида овна расе Словачка млечна овца (Slovak Dairy Sheep) је у позитивној корелацији са укупним бројем ћелија сперматозоида код овна расе Изворна Влашка овца (Native Wallachian), растом прве варијабле долази до повећања друге варијабле.

Мотилност сперматозоида овна расе Унапређена Влашка овца (Improved Wallachian) је у позитивној корелацији са укупним бројем ћелија сперматозоида овна расе Изворна Влашка овца (Native Wallachian), растом прве варијабле долази до повећања друге варијабле.

Концентрација сперматозоида у ејакулату показује позитивну корелацију са укупним бројем ћелија сперматозоида код овна расе Изворна Влашка овца (Native Wallachian), растом прве варијабле долази до повећања друге варијабле.

Табела бр. 8. Поређење резултата свеже сперме и сперме након криопрезервације помоћу различитих флуоресцентних маркера

Groups	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference		t	df	p
				Lower	Upper			
1. Fresh SDS PI/ Thawed SDS PI	6,02 4	4,38239	1,9598	0,5826	11,47	3,074	4	0,04
2. Fresh SDS DAPI/ Thawed SDS DAPI	2,87 2	2,76028	1,2344	-0,5553	6,299	2,327	4	0,08
3. Fresh SDS SYBR 14/ Thawed SDS SYBR 14	2,08 4	5,76676	2,5789	-5,076	9,244	0,808	4	0,46
4. Fresh I W PI/ Thawed I W PI	2,78 2	1,81304	0,81082	0,5308	5,033	3,431	4	0,03
5. Fresh I W DAPI/ Thawed I W DAPI	0,92 2	2,92154	1,3065	-2,705	4,55	0,706	4	0,52
6. Fresh I W SYBR 14/ Thawed I W SYBR 14	-1,1	4,20865	1,8821	-6,327	4,124	-0,59	4	0,59
7. Fresh N W PI/ Thawed N W PI	0,61 8	1,7884	0,7998	-1,602	2,839	0,773	4	0,48
8. Fresh N W DAPI/ Thawed N W DAPI	2,62 4	4,74315	2,1212	-3,265	8,513	1,237	4	0,28
9. Fresh N W SYBR 14/ Thawed N W SYBR 14	-1,08	1,95006	0,87209	-3,499	1,343	-1,24	4	0,28

p<0,05

SDS- Slovak Dairy Sheep

IW- Improved Wallachian Sheep

NW- Native Walachian Sheep

Анализом табеле број 8 можемо закључити да постоје статистички значајне разлике између свеже и одмрзнуте сперме код овнова расе Словачка млечна овца (Slovak Dairy Sheep) помоћу PI методе бојења.

Статистички значајне разлике постоје између свеже и одмрзнуте сперме овнова расе Унапређена Влашка овца (Improved Wallachian) помоћу PI методе бојења.

Остали узорци свеже и замрзнуте сперме не показују статистички значајну разлику.

Из наших резултата може се видети да постоје разлике у бојењу мртвих сперматозоида код две расе овнова.

Такође, наши резултати показују да код две расе овна постоје разлике у бојењу свежих и одмрнутих сперматозоида, конкретно, дошло је до разлике у бојењу ПИ

методом, односно, дошло је до значајне разлике у броју мртвих сперматозоида који су обојени црвеном бојом.

Пошто смо ми поредили свежу сперму и сперму након криопрезервације, можемо закључити да криопрезервација у нашем случају утиче на одрживост сперматозоида односно интегритет мембране, те се зато јавља већи број мртвих сперматозоида након криопрезервације.

(Yaniz et all 2013) је закључио да је најефикаснија комбинација боја, за употребу на сперматозоидима овнова, АО/PI и SYBR-14/PI, јер је омогућавала директну процену одрживости сперме, без потребе за инкубацијом узорака и добијањем поузданих резултата.

Механизам којим SYBR-14 боји живе сперматозоиде интензивније од мртвих сперматозоида није још потпуно познат. Међутим, претпоставља се да неколико биохемијских карактеристика, попут мембранског потенцијала, игра улогу у појачавању флуоресценције бојом као што је SYBR-14. (Garner and Johnson, 1995)

Алтернативни тест који може разликовати одрживе и неодрживе сперматозоиде је пропидијум јодид (PI) – непропусна боја, која боји (црвено) само ћелије са оштећеним мембранама (Harrison and Vickers, 1990; Pintado et al., 2000).

Пропидијум јодид (PI) се успешно користи за откривање мртвих ћелија код свиња и сперматозоида код бикова (Pintado et al., 2000).

Истраживања A.V. Makarevich et all (2010.) су показала да је мали број сперматозоида идентификован као одржив (63%) коришћењем технике SYBR-14/PI, у поређењу са DAPI техником, где је идентификован већи број одрживих сперматозоида (73%).

SYBR-14/PI тест се показао ефикасним у тестирању одрживости сперме неколико врста сисара (Garner and Johnson 1995). На основу резултата својих истраживања, Garner and Johnson (1995) (који су користили методу SYBR-14/PI бојења свежих сперматозоида овна), су изјавили да је 49,2% сперме обојено SYBR-14, док је 45,2% обележено са PI.

Неке варијације могу бити последица порекла сперме, неки аутори су приметили извесну варијабилност у одрживости сперме овнова међу расама овнова (A.V. Makarevich et all 2010).

5. ЗАКЉУЧАК

Последњих година долази до тренда опадања броја аутохтоних врста животиња, а неке расе су потпуно нестале. Мали број ових раса још увек постоји у стању добре очуваности. С обзиром на негативан тренд потребно је приступити дугорочном чувању и складиштењу репродуктивног материјала. Како би смо приступили очувању генетског фонда, потребно је користити само квалитетан репродуктивни материјал, који би се складиштио у банкама гена.

Банке гена чине сви облици складиштења генског материјала, који су претходно замрзнути методом криопрезервације и тиме заштићени до момента употребе.

Пре самог поступка криопрезервације потребно је оценити квалитет семена које се замрзава. Поред досадашњих стандарних параметара, при оцени квалитета сперме почињу се користити и флуоресцентни маркери, који пружају могућност дијагностификовања морфолошких и физиолошких промена сперматозоида. Употреба флуоресцентних маркера нам помаже у откривању присуства живих, апоптотичних и мртвих сперматозоида у ејакулату од чије заступљености ће зависити и оплодна способност самог ејакулата који се конзервише. Само живи и неоштећени сперматозоиди имају могућност да оплоде јајну ћелију и зато је од велике важности проверити њихов квалитет пре самог конзервусања. Дугорочно чување и складиштење семена је предмет сталног интереса, и временом се развијају различите методе које олакшавају сам поступак и омогућавају селекцију репродуктивног материјала који ће се користити за складиштење.

Наши резултати су показали да методом криопрезервације, поред смањења осталих параметара сперматозоида (као што су концентрација, виабилност, укупна и прогресивна покретљивост), долази и до повећања броја мртвих сперматозоида у ејакулату; што се открива помоћу ПИ методе, која мртве сперматозоиде боји флуоресцентном црвеном бојом.

Наши резултати су прелиминарног карактера и потребно је још истраживања на ову тему.

6. ЛИТЕРАТУРА

1. A.D. Johnson et W.R Gomes 1977. The Testis Volume IV Advances in Physiology, Biochemistry, and Function, Academic Press New York, San Francisco, London
2. Aisen E.G., Alvarez H.L., Venturino A., Garde J.J. (2000): Effect of trehalose and EDTA on cryosurvive action of ram semen diluents. *Theriogenology*,53(5): 1053-1061.
3. A.V. Makarevich, E. Kubovicova, A.V. Sirotkin, J. Pivko (2010), Demonstration of the effect of epidermal growth factor on ram sperm parameters using two fluorescent assays, Animal Production Research Centre Nitra, Luzianky near Nitra, Slovak Republic
4. Bagg S., Anil Joshi, Naqvi S.M.K., Rawat P.S., Mittal J.P. (2002): Effect of freezing temperature at which straws were plunged into liquid nitrogen on the post-thaw motility and acrosomal status of ram spermatozoa. *Animal Reproduction. Science*, 72:175-183.
5. Bialkowska J, Demianowicz W, Glogowski J (2004): Determining the viability of zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) spermatozoa and changes in the integrity of its plasma membrane using the fluorescence method. *Archives of Polish Fisheries* 12, 23–30.,
6. Blanco-Rodríguez J. A matter of death and life: the significance of germ cell death during spermatogenesis. *Int J Androl*. 1998;21(5):236–48
7. Braden, A. W. H. and Mattner, P.E 1970. The effects of scrotal heating in the ram on semen characteristics fecundity and embrionic mortality. *Aust. J.Agric. Res.* 21, 509
8. Brito LFC, Barth AD, Bilodeau-Goeseels S, Panich PL, Kastelic JP, 2003: Comparison of methods to evaluate the plasmalemma of bovine sperm and their relationship with in vitro fertilization rate. *Theriogenology* 60, 9– 1551.
9. Brown-Woodman P.D.C., Mohri H., Darin-Bennet, A., Shorey, C., and White, I.G.,1975 Metabolic and ultrastructural changes in ejaculated spermatozoa induced by heating the testis of rams. *Proc. 7th Annu. Conf. Aust. Soc. Reprod. Biol.* P.13
10. Б. Станчић 2006, Репродукција оваца, приручник, Нови Сад, стр. 16 до 58.
11. Cassou R. (1964). La me´thode des pailletes en plastique adapte´e a` la ge´ne´ralisation de la conge´lation. In: *Proceedings of the fifth International Congress on Animal Reproduction Trento, Italy.* 4:540–546.
12. Chrenek Peter and collective (2019), Slovak national animal breeds, Nitra.
13. Critser J.K & Russell R.J. (2000): "Genome resource banking of laboratory animal models." *ILAR* 41: 183-186.
14. Davis I.S., Bratton R.W. and Foote R.H. (1963): Livability of bovine spermatozoa at 5, –25 and –85°C in tris-buffered and citratebuffered yolk-glycerol extenders. *Journal of Dairy*

Science, 46:33 Foote Robert H. (1998): Artificial Insemination to Cloning: Tracing 50 Years of Research. Published by the author, Ithaca, New York, 3–336.

15. Drăgănescu C. & Grosu H. (2010): Valachian (Zackel) heritage philetic sheep group – a taxonomic problem. In *Scientific Papers of the Romanian Academy DAGENE*, 1-7.

16. Драгин С., Станчић И., Јотановић С., (2016): Биотехнолигија у репродукцији животиња, Универзитет у Новом Саду, Пољопривредни факултет, стр. 203.

17. E.Martí, R.Pérez-Pé, C.Colás, T.Muiño-Blanco J.A.Cebrián-Pérez, Study of apoptosis-related markers in ram spermatozoa, *Animal Reproduction Science*, Volume 106, Issues 1–2, June 2008, Pages 113-132

18. Eriksson, B. M. & Rodríguez–Martínez, H. (2000) Effect of freezing and thawing rates on the post thaw viability of boar spermatozoa frozen in flat packs and maxi straws. *Animal Reproduction Science* 63, 205– 220.

19. F.Marco-Jiménez S.Puchades J.Gadea J.S.Vicente M.P.Viudes-de-Castro Effect of semen collection method on pre- and post-thaw Guirra ram spermatozoa, *Theriogenology* Volume 64, Issue 8, November 2005, Pages 1756-1765

20. Garner DL, Johnson LA (1995): Viability assessment of mammalian sperm using SYBR-14 and propidium iodide. *Biology of Reproduction* 53, 276–284.

20. Garner DL, Johnson LA (1995): Viability assessment of mammalian sperm using SYBR-14 and propidium iodide. *Biology of Reproduction* 53, 276–284.

20. Graham, L. K. (2001) Assessment of sperm quality: a flow cytometric approach. *Animal Reproduction Science* 68, 239– 247.

21. Harrison RAP, Vickers SE (1990): Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility* 88, 343–352.

22. Harrison, R.A.P. (1997) Sperm plasma membrane characteristics and boar semen fertility. *Journal of Reproduction and Fertility Suppl* 52, 195– 211.

23. Healey P. (1969), Effect of freezing on the ultrastructure of the spermatozoon of some domestic animals, *J Reprod Fertil* 18 (1): 21-7 J

24. Holt, W. V. & Medrano, A. (1997) Assessment of boar sperm function in relation of freezing and storage. *Journal of Reproduction and Fertility* 52, 213– 222.

25. Holt W.V. &North R.D. (1994):Effets of temperature and restoration of osmotic equilibrium duringthawing on the induction of plasma membrane damage in cryosurved ram spermatozoa. *Biology of Reproduction*, 51:414-424

26. Hong CY, Huang JJ, Wu P, Lo SJ, Wei YH (1988): Fluorescence supravital stain of human sperm correlation with sperm motility measured by a transmembrane migration method. *Andrologia* 20, 516–520
27. Howart B., Jr. 1969. Fertility in the ram following exposure to elevated ambient temperature and humidity. *J. Reprod.Fertil* 19, 179
28. Iritani A. (1980): Problems of freezing spermatozoa of different species. In: Proceedings of the ninth International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination., Madrid, Spain. 1:115–131.
29. J. E. Parks' and J. K. Graham (1992), Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes, *Theriogenology* 38:209-222.
30. JL Yaniz¹, I Palacin¹, S Vicente-Fiel¹, J Gosalvez², C.Lopez-Fernandez ² and P Santolaria ¹, (2013) Comparison of Membrane-Permeant Fluorescent Probes for Sperm Viability Assessment in the Ram, *Reprod Domest Anim.*48(4):598-603.
31. Јована Грба, Сава Спиридоновић, Саша Драгин, Barbora Kulikova, Иван Пихлер, Александар Миловановић, Peter Chrenek, Денис Кучевић (2020), Cryopreservation of ram sperm from autohtonous breeds as a method of preserving biodiversity, *Slovak Journal of Animal Science*, Vol. 53, No. 03.
32. Kamla Kant Shukla, Abbas Ali Mahdi, Singh Rajender, (2012) Apoptosis, spermatogenesis and male infertility, *Frontiers in Bioscience* E4,746-754.
33. Knight J. & Abbott A. (2002): "Full House." *Nature* 417: 785-786.
34. Kundu C.N., Chakraborty J., Dutta P., Bhattacharyya D., Ghosh A., Majumder G.C. (2000): Development a simple sperm cryopreservation model using a chemically defined medium and goat cauda epididymal spermatozoa. *Cryobiology*, 40:117-125.
35. Liu D.Y. & Baker H.W.G. (1992) Department Obstetrics & Gynaecology, University of Melbourne, Royal Women's Hospital, Australia, 94(1):71-84.
36. Maule J.P. (1962): *The Semen of Animals and Artificial Insemination*. Commonwealth Agricultural Bureaux, Farnham Royal, U.K.
37. Мекић Ц., Латиновић Д., Грубић Г. (2007): Одгајивање, репродукција, селекција и исхрана оваца, Универзитет у Београду, Пољопривредни факултет, стр. 769.
38. Menkveld R. Franken D.R., Kruger T.F., Dr. Oehninger S., Hodgen G.D. (1991): Sperm selection capacity of the human zona pellucida. *Molecular Reproduction and Development*, 30(4): 346-352.
39. M.Kaabi, P.Paz, M.Alvarez, E.Anel, J.C.Boixo, H.Rouissi, P.Herraez, L.Anel Effect of epididymis handling conditions on the quality of ram spermatozoa recovered post-mortem *Theriogenology*, Volume 60, Issue 7, 15 October 2003, Pages 1249-1259.

40. Milovanov V.K. (1938): *Isskusstvenoye Ossemenebie Selsko-Khoziasvennykh Jivotnykh*, The Artificial Insemination of Farm Animals, Seljhozgiz, Moscow.
41. Milovanov V.K. (1964): *Artificial Insemination of Livestock in the U.S.S.R.* pp 152.
42. M. OLLERO, T. MUIÑO-BLANCO, M. J. LÓPEZ-PÉREZ, J. A. CEBRIÁN-PÉREZ Viability of ram spermatozoa in relation to the abstinence period and successive ejaculations, *international journal of andrology*, 19287-292 (1996).
43. Müzeyyen K. K., Ebru E., Afşin K., Mesih K. (2017): Duration effect of fresh semen kept in vitro on sheep conception rate. *Animal Reproduction*, 14(4): 1147-1150.
44. Naqvi S.M.K., Anil J., Das G.K., Mittal J.P (2001): Development and application of ovine reproductive Technologies: an Indian experience. *Small Ruminant Research*, 39:199-208.
45. O'Dell W.T. & Almquist J.O. (1957): Freezing bovine semen. I. Techniques for freezing bovine spermatozoa in milk diluents. *Journal Dairy Science*, 40:1534–1541.
46. Omar Ibrahim Farah, Li Cuiling, Wang Jiaojiao, and Zhang Huiping Use of Fluorescent Dyes for Readily Recognizing Sperm Damage, *J Reprod Infertil*. 2013 Jul-Sep; 14(3): 120–125.
47. Parks, J. E. & Graham, J. K. (1992) Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology* 38, 209– 222.
48. Pickett B.W. & Berndtson W.E. (1974): Preservation of bovine spermatozoa by freezing in straws: A review. *Journal Dairy Science*, 57(11): 1287–1301.
49. Pintado B, Fuente J, Roldan ERS (2000): Permeability of boar and bull spermatozoa to the nuclei acid stains propidium iodide or Hoechst 33258, or to eosin: accuracy in the assessment of cell viability. *Journal of Reproduction and Fertility* 118, 145–152.
50. Polge C., Smith A.U. and Parkes A.S. (1949): Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature, International journal of science*, 164:666.
51. Robertson L, Wolf DP, Tash JS (1988): Temporal changes in motility parameters related to acrosomal status: identification and characterization of populations of hyperactivated human sperm. *Biology of Reproduction* 39, 797–805.
52. Rodriguez-Martinez H, 2003: Laboratory semen assessment and prediction of fertility: still utopia? *Reprod Domest Anim* 38, 2– 318.
53. Salamon S. & Maxwell W.M.C. (1995): Frozen storage of ram semen I: processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. *Animal Reproduction Science*, 37:185-249.
54. Salisbury G.W., Fuller H.K., Willett E.L. (1941). Preservation of bovine spermatozoa in yolk-citrate diluent and field results from its use. *Journal Dairy Science*, 24(11): 905–910.

55. Singh M.P., Sinha A.K., Singh B.K. (1995): Effect of cryoprotectants on certain seminal attributes and the on fertility of buck spermatozoa. *Theriogenology*, 43(6): 1047-1053.
56. Sørensen, E. (1940): Insemination with gelatinized semen in paraffined cellophane tubes [in Danish]. *Medlernsbl. Danske Dyrlægeforen.* 23:166–169.
57. Tuli R.K, Holtz W. (1994): Effect of glycerolization procedure and removal of seminal plasma on post-thaw survival and goat-release from Boer goat spermatozoa. *Theriogenology*; 42(3): 547-555.
58. University of Wisconsin. *The testes and spermatogenesis*; Wisconsin: Animal Science; 1998. p. 434.
59. Wildt D.E. (1992): "Genetic Resource Banks for Conserving Wildlife Species: Justification, Examples and becoming Organized on a Global Basis". *Animal Reproduction Science* 28(1-4): 247-257.
60. Voglmayr J.K., Hlinks N.T., White I.G., and Setchell, B.P (1970) The effect of heating the testis on the metabolism of testicular spermatozoa and on the rete testis fluid. *J. Reprod. Fertil.* 21,365.
61. Voglmayr J.K., Setchell, B.P., and White, I.G. (1971), The effects of heat on the metabolism and ultrastructure of ram testicular spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 24,71.
62. Warner-Lambert/Parke-Davis Award Lecture Mechanisms of Apoptosis, *The American Journal of Pathology* Volume 157, Issue 5, November 2000, Pages 1415-1430.
63. Watson P.F. (1995): Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing functions. *Reproduction, Fertility and Development*, 7(4): 871-891.
64. Watson P.F. (2000): The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science*, 60-61, 481-492.