

**UTICAJ NERASTA I GODIŠNJE SEZONE NA POJEDINE PARAMETRE
FERTILIZACIONOG POTENCIJALA SPERMATOZOIDA***
**BOAR AND SEASON EFFECTS ON SOME PARAMETERS OF SEMEN
FERTILIZING POTENTIAL**

Apić Jelena, Radović Ivan, Stančić Ivan, Vakanjac Slobodanka**

U cilju određivanja što tačnijeg fertilizacionog potencijala spermatozoida, čini se da konvencionalni parametri kvaliteta semena nerastova (volumen ejakulata, koncentracija spermatozoida, progresivna pokretljivost, procenat živih spermatozoida, kao i onih sa intaktnom akrozomalnom morfologijom) nisu dovoljni. Od nedavno, postoje brojna istraživanja koja dokazuju da koncentracija proteina u spermalnoj plazmi ima visoku pozitivnu korelaciju sa fertilizacionim potencijalom nerastova. Cilj ovog istraživanja bio je da se utvrdi efekt nerasta kao i uticaj godišnje sezone na varijaciju sadržaja proteina u spermalnoj plazmi nerastova. Za ispitivanja su korištene spermalne frakcije 2 nerasta sa visokim (V-nerast) i 2 narasta sa niskim (N-nerast) sadržajem proteina u spermalnoj plazmi. Ejakulati su od nerastova uzimani jednom nedeljno, u okviru jednog meseca, tokom godinu dana (4×12=48 ejakulata po nerastu). Za analizu proteina u spermalnoj plazmi, uzorci su pripremljeni centrifugiranjem. Volumen ejakulata, koncentracija spermatozoida kao i progresivna pokretljivost su značajno varirali ($p < 0,05$ ili $p < 0,01$) između nerastova kao i kod jednog te istog nerasta. Varijacije istih parametara utvrđene su i tokom tople odnosno hladne sezone godine. Sa druge strane, koncentracija proteina je bila prilično konstantna, i kod V-nerastova (kretala se od 4 do 4,5%) i kod N-nerastova (kretala se od 2,3 do 2,6%). Sezona nije značajno uticala ($p > 0,01$) na sadržaj proteina u spermalnoj plazmi (V-nerastovi: 4 do 4,5% u toploj i hladnoj sezoni godine; N-nerastovi: 2,3 do 2,6% u toploj i 2,3 do 2,5% u hladnoj sezoni godine). Dobijeni

* Rad primljen za štampu 05.10.2016.

** dr sc. vet. med. Jelena Apić, naučni saradnik, Odeljenje za reprodukciju, Naučni institut za veterinarstvo "Novi Sad", Novi Sad; dr sc. vet. med. Ivan Radović van. prof., Departman za stočarstvo, Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Novom Sadu; dr sc. vet. med. Ivan Stančić, van. prof., Departman za veterinarsku medicinu, Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Novom Sadu; dr sc. vet. med. Slobodanka Vakanjac, red. prof., Katedra za porodiljstvo, sterilitet i veštačku oplodnju, Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu, Beograd, Srbija

rezultati pokazuju da bi merenje sadržaja proteina u spermalnoj plazmi nerastova mogao biti koristan metod za njihovo rangiranje, a na osnovu fertilizacionog potencijala svežeg semena.

Ključne reči: sadržaj proteina, fertilitet spermatozoida, nerast, sezona.

Uvod / Introduction

Tehnika veštačkog osemenjavanja (VO) je metoda koja je u upotrebi na farmama intenzivne proizvodnje svinja širom sveta (Maes i sar., 2011). Više od 99% inseminacija izvrši se sveže razređenim semenom, koje se čuva 0-5 dana, na 15-20°C (Stančić i Dragin, 2011; Rodríguez, 2012; Khalifa i sar., 2014). Korišćenje skupih genetski superiornih nerastova za veštačko osemenjavanje ima velikog ekonomskog uticaja na savremenu, intenzivnu proizvodnju svinja (Gadea i sar., 2004). Pod ovim se podrazumeva da se od takvih nerastova treba dobiti maksimalan broj inseminacionih doza po ejakulatu (ili po nerastu godišnje) što i jeste glavni razlog uspešne reproduktivne eksploatacije nerastova. Fertilizacioni potencijal VO doza za inseminaciju uglavnom zavisi od samog kvaliteta semena (Tsakmakidis i sar., 2010). Stoga, tačna procena fertilizacionog potencijala spermatozoida u cilju selekcije visoko fertilnih nerastova je od velikog značaja da bi se taj cilj i postigao (Gadea, 2005). Nažalost, klasični parametri za ocenu kvaliteta semena, kao što su volumen ejakulata, koncentracija spermatozoida, progresivna pokretljivost, procenat živih spermatozoida, kao i onih sa intaktnom akrozomalnom morfologijom nisu dovoljni pokazatelji fertiliteta nerastova i njihovih reproduktivnih performansi (Gadea i sar., 2004; Rodríguez-Martínez, 2013).

Sa druge strane, od skoro, povećana pažnja pridaje se uticaju spermalne plazme nerastova (Gadea, 2005; Maxwell i sar., 2007; Juyena i Calogero, 2012). Utvrđeno je da proteini spermalne plazme mogu biti u pozitivnoj sprezi sa fertilitetom nerastova (Flowers, 2001; Rodríguez-Martínez i sar., 2011; Rodríguez, 2012; Stančić i sar., 2012). Na osnovu tih istraživanja, može se zaključiti da određivanje sadržaja proteina u spermalnoj plazmi može biti korisna „alatka“ za utvrđivanje stepena fertilizacionog potencijala nerastova. Međutim, mi predpostavljamo da ovaj metod može imati uticaja samo ukoliko ne postoji značajna varijacija sadržaja proteina u spermalnoj plazmi svakog nerasta ponaosob, a zavisno o genetskih faktora i faktora spoljašnje sredine.

Stoga, cilj ovog istraživanja je da se uporede varijacije pojedinih klasičnih parametara kvaliteta svežeg semena i sadržaja proteina, zavisno od nerasta (kao individue) i godišnjeg doba.

Materijal i metode rada / *Material and methods*

Odabir nerastova i prikupljanje ejakulata. Nerastovi za eksperiment su odabrani na osnovu prethodno određenog sadržaja proteina u njihovoj spermalnoj plazmi, sa komercijalne farme intenzivne proizvodnje svinja, na severu Srbije (AP Vojvodina). Odabrana su dva nerasta rase Švedski landras čiji su ejakulati imali visok nivo proteina (prosečno 4,08%) u semenoj plazmi i dva nerasta iste rase sa niskim sadržajem proteina u spermalnoj plazmi (prosečno 2,11%). Na početku oglada starost nerastova je bila od 18 do 24 meseca. Koristeći tehniku dvostruke rukavice, prikupljena je spermalna frakcija ejakulata svakog nerasta, i to po četiri ejakulata mesečno, tokom godinu dana ($4 \times 12 = 48$ ejakulata po nerastu). Odmah nakon prikupljanja, nativna sperma je filtrirana kroz gazu i zagrevana na 35°C u vodenom kupatilu tokom 30 minuta, u farmskoj laboratoriji. Nakon zagrevanja, određeni su sledeći parametri kvaliteta native sperme: volumen ejakulata (ml), koncentracija spermatozoida ($\times 10^6/\text{ml}$) i progresivna pokretljivost (%). Koncentracija spermatozoida određena je fotometrom (SDM5, Minitüb, Germany). Progresivna pokretljivost određena je vizuelnom, mikroskopskom metodom, koriseći fazno-kontrastni mikroskop sa uveličanjem $\times 100$ i grejnim postoljem na 35°C. Pokretljivost spermatozoida su uvek određivala dva nezavisna, iskusna operatera, istovremeno. Pregledana su po tri različita polja Bürker-Türk-ove komorice, u dve kapi svakog uzorka (6 komorica po operateru). Prosečne vrednosti svih merenja po uzorku su korišćene za analizu podataka (prema Kommisrud i sar. 2002).

Priprema spermalne plazme i hemijske analize. Priprema spermalne plazme izvršena je u laboratoriji za hemijske analize na Departmanu za stočarstvo Poljoprivrednog fakulteta, Univerziteta u Novom Sadu, Novi Sad, Srbija. Posle ocene kvaliteta nativnog semena na farmi, 50 ml svakog uzorka je stavljeno u sterilnu bočicu sa zavrtnjem i dopremljeno do laboratorije (Poljoprivrednog fakulteta), u termo-boksu na 17°C, unutar 2 h do 3 h. Svaki dopremljeni uzorak svežeg ejakulata je podeljen u poduzorke od 20 ml i sipan u plastične epruvete za zavrtnjem (zapremine 25 ml), a potom centrifugiran na $1000 \times g$ tokom 10 minuta na 4°C, da bi se spermatozoidi istaložili na dnu epruvete. Dobijeni supernatant je ponovo odliven u nove, čiste epruvete i re-centrifugiran (na $3000 \times g$ tokom 15 minutes na 4°C) da bi se spermalna plazma prečistila od mogućih zaostalih spermatozoida i drugih organskih partikula. Tako pripremljeni uzorci su skladišteni u frižider na 4°C do početka analize. Određivanje ukupnih proteina u seminalnoj plazmi rađeno je AOAC hemijskom metodom (Official Method 2001.11). Analize uzoraka su završene unutar 24h od momenta prikupljanja ejakulata na farmi.

Statistička obrada. Svi dobijeni podaci su analizirani softverski programom "Statistika 15". Korišćena je deskriptivna statistika. Homogenost varijanse utvrđena je Levinovim testom. Razlike između dobijenih rezultata pod uticajem nerasta i godišnje sezone testirani su Studentovim testom. Srednja vrednost, \pm

standardna devijacija, kao i minimalne i maksimalne vrednosti eksperimentalnih podataka prikazani su u tabelama 1 i 2.

Tabela 1. Uticaj nerasta na parametre ejakulata (srednja vrednost \pm SD)

Table 1. The influence of a boar on ejaculate parameters (mean value \pm SD)

	Nerastovi (n=4) / Boars (n=4)			
	V1 ¹	V2 ¹	N1 ²	N2 ²
Broj analiziranih ejakulata (n) ³ Number of tested ejaculates (n) ³	48	48	48	48
Parametri ejakulata: Ejaculate parameters:				
Volumen (ml) Volume (ml)	308 \pm 35,95 ^A (245-400)	290 \pm 18,33 ^B (255-375)	275 \pm 8,93 ^C (255-380)	183 \pm 17,55 ^D (165-265)
Koncentracija spermatozoida ($\times 10^6$ /ml) Sperm concentration ($\times 10^6$ /ml)	303 \pm 23,11 ^a (245-350)	296 \pm 41,79 ^a (250-378)	280 \pm 17,69 ^b (228-330)	293 \pm 27,53 ^a (235-350)
Progresivna pokretljivost (%) Progressive motility (%)	78 \pm 4,81 ^A (60-85)	72 \pm 4,37 ^B (55-80)	71 \pm 5,05 ^C (50-85)	81 \pm 6,24 ^A (65-90)
Sadržaj proteina u spermalnoj plazmi (%) Protein content in sperm plasma (%)	4,27 \pm 0,12 ^A (4-4,55)	4,4 \pm 0,08 ^A (4-4,48)	2,48 \pm 0,07 ^B (2,32-2,56)	2,44 \pm 0,08 ^B (2,27-2,56)

¹V1 i V2 – nerastovi sa visokim sadrž. proteina; ²N1 i N2 – nerastovi sa niskim sadrž. proteina; ³Jedan ejakulat nedeljno \times 12 meseci. Min. i maks. Vrednosti u parentezi; Vrednosti sa različitim superskriptima, unutar istog reda se razlikuju (^ABp < 0.01; ^{ab}p < 0.05) / 1V1 and V2 – boars with high protein content; 2 N1 i N2 – boars with low protein content; 3 One ejaculate a week \times 12 month. Min and max values in parenthesis; Values with different superscripts, differ within the same order (ABp < 0.01; abp < 0.05).

Tabela 2. Uticaj sezone na parametre ejakulata nerastova (srednja vrednost \pm SD)

Table 2. The influence of a season on a boar ejaculate parameters (mean value \pm SD)

Parametri ejakulata / Ejaculate parameters:		Sezona (n=192) / Season (n=192)	
		Topla / Warm n = 40 ¹ + 40 ²	Hladna / Cold n = 56 ¹ + 5 ²
Volumen (ml) Volume (ml)	V1	270 \pm 26,84 ^A (225-324)	287 \pm 30,77 ^B (235-353)
	N2	234 \pm 45,84 ^A (165-300)	263 \pm 14,63 ^B (225-360)
Koncentracija spermatozoida ($\times 10^6$ /ml) Sperm concentration ($\times 10^6$ /ml)	V1	308 \pm 44,95 ^A (222-422)	332 \pm 30,63 ^B (285-421)
	N2	279 \pm 22,67 ^a (225-345)	289 \pm 22,75 ^b (248-359)
Progresivna pokretljivost (%) Progressive motility (%)	V1	76 \pm 6,99 ^A (55-90)	78 \pm 7,00 ^A (60-90)
	N2	72 \pm 6,38 ^a (50-85)	76 \pm 7,45 ^b (60-95)
Sadržaj proteina u spermalnoj plazmi (%) Protein content in sperm plasma (%)	V1	4,29 \pm 0,17 ^A (4-4,55)	4,33 \pm 0,12 ^A (4-4,48)
	N2	2,44 \pm 0,06 ^A (2,32-2,56)	2,41 \pm 0,06 ^A (2,27-2,55)

Topla sezona = Maj - Septembar; Hladna sezona = Oktobar - April.; ¹Nerastovi sa visokim sadrž. proteina (n=2); ²Nerastovi sa niskim sadrž. proteina (n=2); Vrednosti sa različitim superskriptima, unutar istog reda se razlikuju (^{AB}p < 0,01; ^{ab}p < 0.05) / *Warm season = May - September; Cold season = October - April; ¹Boars with high protein content (n=2); ²Boars with low protein content (n=2); Values with different superscripts, differ within the same order (^{AB}p < 0.01; ^{ab}p < 0.05)*

Rezultati / Results

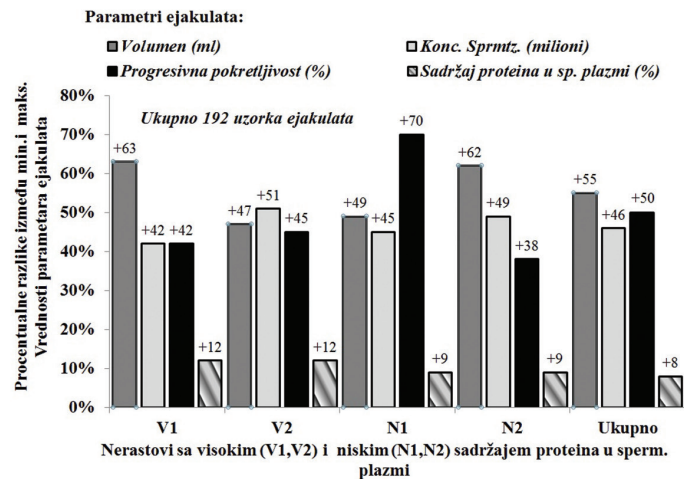
Prosečne vrednosti volumena ejakulata, koncentracije spermatozoida, progresivne pokretljivosti i sadržaja proteina u spermalnoj plazmi, kod nerastova sa visokim (V1 i V2) i niskim (N1 i N2) sadržajem proteina u spermalnoj plazmi, prikazani su u Tabeli 1. Prosečan volumen ejakulata (V1=308 ml, V2=290 ml, N1=275 ml i N2=183 ml) i progresivne pokretljivosti (V1=78%, V2=72%, N1=71% i N2=81%) su bili značajno različiti (p<0,01). Značajno nižu (p<0,05) koncentraciju spermatozoida imao je samo N1 nerast ($280 \times 10^6/\text{ml}$), u poređenju sa ostala tri nerasta (V1= $303 \times 10^6/\text{ml}$, V2= $296 \times 10^6/\text{ml}$ i N2= $293 \times 10^6/\text{ml}$). Sadržaj proteina nije značajno različit (p>0,01) kod nerastova sa visokim (V1=4,3 i V2=4,4) ili niskim (N1=2,5 i N2=2,4) procentom proteina u spermalnoj plazmi.

Bitno je naglasiti da nije bilo značajnih varijacija sadržaja proteina u seminalnoj plazmi između testiranih ejakulata, kako u grupi nerastova sa visokim tako i u grupi nerastova sa niskim sadržajem proteina u spermalnoj plazmi. Naime, procentualne razlike između minimalnog sadržaja proteina (koji je uzet kao 100%) je bio u opsegu između 9% (N1 i N2 nerastovi) i 12% (V1 i V2 nerastovi). Sa druge strane, klasični parametri kvaliteta semena (volumen ejakulata, koncentracija spermatozoida i progresivna pokretljivost) značajno su varirali između testiranih ejakulata svakog pojedinačnog nerasta. Procentualne razlike između minimalnih i maksimalnih vrednosti su bile u opsegu između +38% (progresivna pokretljivost - N2 nerast) i +70% (progresivna pokretljivost - N1 nerast) (Grafikon 1).

Prosečne vrednosti sadržaja proteina u spermalnoj plazmi bile su identične tokom tople i hladne sezone godine, kod obe grupe nerastova. Kod nerastova sa visokim sadržajem proteina u spermalnoj plazmi, nivo proteina je bio 4,3% tokom tople i hladne sezone, a kod nerastova sa niskim sadržajem proteina 2,5% u toploj sezoni i 2,4% u hladnoj sezoni godine (Tabela 2). Međutim, značajno veće vrednosti (p<0,05 ili p<0,01) volumena ejakulata (V=287 ml, N=263 ml), koncentracije spermatozoida (V= $332 \times 10^6/\text{ml}$, N= $289 \times 10^6/\text{ml}$) i progresivne pokretljivosti (V=78%, N=76%), su dobijene u grupi nerastova sa visokim sadržajem proteina (V) tokom hladne sezone u odnosu na iste parametre tokom tople sezone godine: volumen ejakulata (V=270 ml, N=234 ml), koncentracija spermatozoida (V= $308 \times 10^6/\text{ml}$, N= $279 \times 10^6/\text{ml}$) i progresivna pokretljivost (V=76%, N=72%) (Tabela 2).

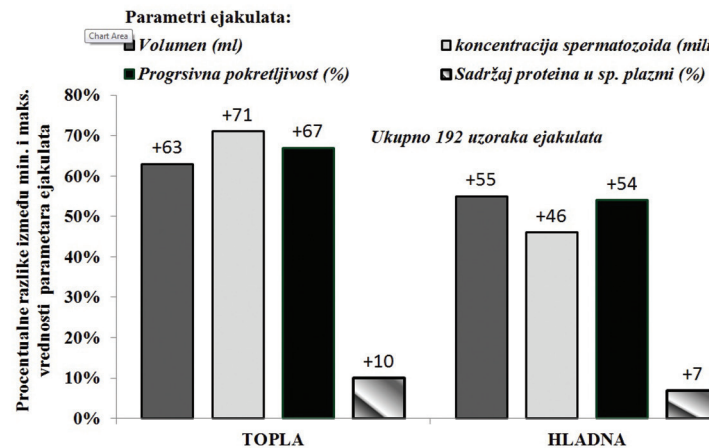
Procentualna razlika između minimalnog (uzetog kao 100%) i maksimalnog sadržaja proteina je bila +10% u toploj i +7% u hladnoj sezoni godine, bez statistički značajne razlike (p > 0,01). Sa druge strane, značajne varijacije (p<0,05 ili p<0,01) su ustanovljene kod klasičnih parametara kvaliteta semena (volumen

ejakulata, koncentracija spermatozoida i progresina pokretljivost) između tople i hladne sezone godine. Naime, procentualne razlike između minimalnih i maksimalnih vrednosti su bile veće u toploj sezoni (opseg između +63% i +71%) nego u hladnoj sezoni (opseg između +46% i 55%) (Grafikon 2.)



Graf. 1. Procentualna razlika između minimalnih i maksimalnih vrednosti parametara ejakulata kod testiranih nerastova tokom godinu dana

Graph 1. Percentage differences between minimal and maximal values of ejaculate parameters in the tested boars during a year



Grafikon 2. Procentualne razlike između minimalnih i maksimalnih vrednosti parametara kvaliteta semena u toploj i hladnoj sezoni godine (minimalne vrednosti uzete kao 100%)

Graph 2. Percentage differences between minimal and maximal values of the semen quality parameters in warm and cold season of a year (minimal values considered as 100%)

Diskusija / Discussion

Rezultati u ovom radu jasno dokazuju značajne varijacije klasičnih parametara kvaliteta (volumen ejakulata, koncentracija spermatozoida i progresivna pokretljivost), pod individualnim uticajem nerasta kao i godišnje sezone. Sa druge strane, sadržaj proteina u spermalnoj plazmi nije značajno varirao između testiranih rezultata unutar jednog nerasta kao ni unutar grupe nerastova sa visokim i niskim sadržajem proteina spermalne plazme. Takođe, nije bilo ni značajnih variranja sadržaja proteina u spermalnoj plazmi ispitivanih nerastova pod uticajem tople i hladne sezone godine.

Dokazano je da su klasični parametri kvaliteta semena, kao što su volumen ejakulata, koncentracija spermatozoida, progresivna pokretljivost, morfologija, procenat živih spermatozoida sa očuvanim akrozomalnim integritetom (Knox, 2004; Maes i sar., 2011; Apić i sar., 2015) pod uticajem brojnih faktora (Smital, 2009, Stančić i sar., 2015). Faktori vezani za samog nerasta (Smital, 2009; Rodríguez, 2012) i sezona godine (Lapuste i sar., 2011; Apić i sar., 2015) imaju najveći uticaj na varijacije gore pomenutih parametara kvaliteta ejakulata. Najvažniji uticaj svakako ima starosna dob nerastova (Jankevičiūtė i Žilinskas, 2002; Smital, 2009; Rodríguez, 2012), rasa nerastova (Ciereszko i sar., 2000; Smital i sar., 2004; Smital, 2009; Savić i sar., 2013) kao i frekvencija uzimanja ejakulata (Singleton i Flowers, 2001; Wolf i Smital, 2009). Povišena ambijentalna temperatura kao i produženi dnevni fotoperiod su glavni činioci uticaja sezone za varijacije klasičnih parametara kvaliteta ejakulata (Okere i sar., 2005; Lapuste i sar., 2011; Apić i sar., 2015; Petrocelli i sar., 2015). Upravo te značajne varijacije klasičnih parametara kvaliteta ejakulata, pod uticajem nerasta i godišnje sezone, i jesu razlozi zašto navedeni parametri kvaliteta nisu dovoljni da predvide oplodnu sposobnost spermatozoida (Gadea i sar., 2004). Naime, klasični parametri kvaliteta ejakulata, daju samo približnu ocenu fertilizacionog potencijala svakog pojedinačnog ejakulata (Waberski i sar., 2011), i samo oni nerastovi sa jako lošim kvalitetom ejakulata mogu biti ustanovljeni (Gadea i sar., 1998). Iz ovih razloga, da bi se preciznije objasnio kvalitet semena među nerastovima sa dobrim kvalitetom semena, trebalo bi koristiti parametre ejakulata sa mnogo konstantnijim vrednostima, a unutar značajnih varijacija koje zavise od starosti i rase nerastova, frekvencije uzimanja ejakulata, kao i godišnje sezone.

Od skoro, postoji sve više navoda da proteini spermalne plazme mogu biti u korelaciji sa fertilitetom nerastova i mogu služiti kao još jedan od parametara ocene kvaliteta semena (Dyck i sar., 2011; Rodriguez-Martinez i sar., 2011; Rodriguez-Martinez, 2013). Takođe, dokazano je da nerastovi sa višim sadržajem proteina u spermalnoj plazmi imaju znatno bolji fertilizacioni potencijal u odnosu na nerastove sa niskim sadržajem proteina spermalne plazme (Flowers, 1998; Novak i sar., 2010; Mogielnicka-Brzozowska i Kordan, 2011; Stančić i sar., 2012). Naše prethodno istraživanje (Apić i sar., 2015), pokazalo je da je

progresivna pokretljivost i procenat dobrih uzoraka (uzorci sa $\geq 65\%$ progresivne pokretljivosti) nakon čuvanja posle 72h u razređenju 1:4, bila znatno viša (82% i 41%) kod nerastova sa znatno višim sadržajem proteina spermalne plazme (4%), u poređenju sa istim parametrima (76% i 12%) kod nerastova sa nižim sadržajem proteina u spermalnoj plazmi (2%). Takođe smo utvrdili (Apić i sar., 2016) da je ukupan broj spermatozoida sa oštećenim akrozomom značajno niži (29%) u ejakulatima sa višim sadržajem proteina, poredeći ih sa ejakulatima sa nižim sadržajem proteina (45%). I drugi autori su utvrdili (Maxwell i Johnson, 1999; Ashrafzadeh i sar., 2013; González-Cadavid i sar., 2014) da redukcija koncentracije proteina spermalne plazme u razređenom semenu nerastova vodi ka postepenom smanjenju progresivne pokretljivosti, vremenu preživljavanja, akrozomalnog integriteta i mitohondrijalne aktivnosti.

Rezultati naših istraživanja pokazuju da je sadržaj proteina prilično konstantan u svakom ejakulatu jednog istog nerasta (4 do 4,5% kod nerastova sa visokim sadržajem proteina i 2,3 do 2,6% kod nerastova sa niskim sadržajem proteina u spermalnoj plazmi). Takođe je utvrđeno da nivo proteina u spermalnoj plazmi nije u visokoj korelaciji sa rasom ili starošću nerasta (Gerfen i sar., 1994; Maxwell i Johnson, 1999; Apić, 2015; Stančić i sar., 2015). Sadržaj proteina u spermalnoj plazmi je prilično konstantan kod jednog istog nerasta, međutim dokazane su velike varijacije između nerastova (Flowers, 2001; Novak i sar., 2010). Dobijeni rezultati naših trenutnih istraživanja, takođe, dokazuju da godišnja sezona nema značajnog uticaja na sadržaj proteina spermalne plazme (topla sezona: $V = 4-4,5\%$ i $N = 2,3-2,6\%$; hladna sezona: $V = 4-4,5\%$ i $N = 2,3-2,5\%$). Pored rezultata do kojih smo mi došli, i drugi autori navode (Murase i sar., 2007; Apić, 2015; Stančić i sar., 2015) da sezona godine nema bitnijeg uticaja na nivo proteina u spermalnoj plazmi individualnog nerasta. Podaci do kojih je došao Zhu (2000) predočavaju da bi merenje proteina spermalne plazme moglo biti od velikog značaja za evaluaciju kvaliteta nerastovskog semena. Štaviše, Flowers (2001) je pronašao da nerastovi sa višim sadržajem proteina u spermalnoj plazmi pokazuju znatno veći indeks prašenja (86,7%) kao i veći broj živo rođene prasadi po leglu (11,2), u poređenju sa nerastovima čiji je sadržaj proteina u spermalnoj plazmi nizak (indeks prašenja = 78,4; živo rođena prasad/leglo = 10,4). Na osnovu naših istraživanja, kao i rezultata do kojih su došli drugi autori, može se zaključiti da sadržaj proteina u spermalnoj plazmi može imati velikog uticaja pri detekciji ejakulata sa smanjenim fertilizacionim potencijalom i tako pomoći pri selekciji visoko fertilnih nerastova, radi njihove upotrebe za veštačko osemenjavanje. Međutim, naše mišljenje je, da je trenutna procedura za detekciju proteina spermalne plazme prilično komplikovana tj. nepraktična za izvođenje u farmskim uslovima. Stoga, potrebno je razviti jednostavne, jeftine i precizne procedure, koje bi bile praktične za primenu u uslovima intenzivne proizvodnje svinja.

Zaključak / Conclusion

Rezultati u ovom radu pokazuju da je sadržaj proteina u spermalnoj plazmi svakog pojedinačnog ejakulata, jednog istog nerasta, prilično konstantan i da ne varira značajno pod uticajem godišnje sezone. Takođe, drugi autori su pronašli da ovaj parametar ejakulata ne varira značajno ni u zavisnosti od starosti ili rase nerasta. Ova istraživanja daju dobru potporu pretpostavci da merenjem sadržaja proteina u spermalnoj plazmi može biti korisna „alatka“ za precizniju evaluaciju fertilizacionog potencijala nerastova. Ove procedure, mogle bi obezbediti mnogo efikasniju selekciju nerastova sa višim oplodnim sposobnostima. Upotrebom nerastova sa visokim fertilizacionom potencijalom obezbedio bi značajno povećanje efikasnosti na farmama intenzivne proizvodnje svinja.

Literatura / References

1. Apić J, Milovanović A, Barna T, Jovičin M. Sperm pathological forms and acrosomal membrane integrity in boar AI dose on pig farms in AP Vojvodina (Serbia). Proc. 1st International Symposium "One health – new challenges", Vrdnik, Serbia 21 – 23. 05. 2015: 87-91.
2. Apić J, Vakanjac S, Radović I, Jotanović S, Stanković B, Kanački Z. Effect of season on boar semen quality. Cont Agri (Novi Sad, Srb.) 2015, 64(1-2)9–13.
3. Apić J, Vakanjac S, Radović I, Kučević D, Jotanović S, Kanački Z, Stanković B.: Proteingehalt im Samenplasma von Zuchtebern auf den Betrieben für intensive Schweineproduktion in Serbien. (Protein content in boar seminal plasma on the intensive pig production farms in Serbia). Züchtungskunde 2015, 87(5)S.361–8.
4. Apić J. Effect of protein content in the boar seminal plasma on the diluted semen parameters and fertility of artificially inseminated sows (PhD Thesis). Faculty of Agriculture, Department of Veterinary Medicine, University of Novi Sad, Serbia, 2015.
5. Ashrafzadeh A, Karsani AS, Nathan S. Mammalian sperm fertility related *proteins*. *Int J Med Sci* 2013, 10:1649-57.
6. Ciereszko A, Ottobre JS, Glogowski J. Effects of season and breed on sperm acrosin activity and semen quality of boars. *Anim Reprod Sci* 2000, 64:89-96.
7. Dyck MK, Foxcroft GR, Novak S, Ruiz-Sanchez A, Patterson J, Dixon WT. Biological markers of boar fertility. *Reprod Domest Anim* 2011, 46 55-8.
8. Flowers, W.L. Boar fertility and artificial insemination. Proceedings of 15th International Pig Veterinary Society Congress, Birmingham, England 1998, volume 1:45-52.
9. Flowers WL. Relationship between seminal plasma proteins and boar fertility. *Swine News (USA)* 2001, 6:1-4.
10. Gadea J, Mata´S C, Lucas X. Prediction of porcine semen fertility by homologous in vitro penetration (hIVP) assay. *Anim Reprod Sci* 1998, 54:95–108.
11. Gadea J. Sperm factors related to in vitro and in vivo porcine fertility. 5th International Conference on Boar Semen Preservation, Doorwerth, The Netherlands, August 24 – 27, 2003: 277-8.
12. Gadea J, Selle´S E, Marco A. The Predictive Value of Porcine Seminal Parameters on Fertility Outcome under Commercial Conditions. *Reprod Domestic Anim* 2004, 39:303-8.
13. Gadea, J. Sperm factors related to in vitro and in vivo porcine fertility. *Theriogenology* 2005, 63:431–444.
14. González-Cadavid V, Martins MAJ, Moreno BF, Andrade ST, Santos LCA, Cristina A, Monteiro-Moreira O, Moreira AR, Moura AA. Seminal plasma proteins of adult boars and correlations with sperm parameters. *Theriogenology* 2014, 82:697-707.

15. Gerfen WR, White BR, Cotta AM, Wheelerl MB. Comparison of the semen characteristics of feng-jing, meishan and yorkshire boars. *Theriogenology* 1994, 41:461-9.
16. Jankevičiute N, Žilinskas H. Influence of some factors on semen quality of different breed of boars. *Vet Zootec* 2002, T.19:41.
17. Juyena SA, Calogero S.. Seminal Plasma: An Essential Attribute to Spermatozoa (A Review). *J Androl* 2012, 33(4):536-51.
18. Khalifa T, Rekkas C, Samartzi F, Lymberopoulos A, Kousenidis K, Dovenski T. Highlights on artificial insemination (AI) technology in the pigs. *Mac Vet Rev* 2014, 37:5–34.
19. Kommisrud E, Paulenz H, Sehested E, Grevle IS. Influence of Boar and Semen Parameters on motility and acrosome integrity in liquid boar semen stored for five days. *Acta Vet Scand* 2002, 43:49-55.
20. Knox V R. Practicalities and Pitfalls of Semen Evaluation. *Advances in Pork Production* 2004, 15:315-22.
21. Lapuste C, Diaconescu S, Hincu M, Pascoveanu G. Influence of Season on the Quantity and Quality of Boar Semen. *Animal Science and Biotechnologies* 2011, 4:270-2.
22. Maes D, Rodriguez LA, Rijsselaere T, Vyt P, Van Soom A. Artificial Insemination in Farm Animals Artificial. In: *Insemination in Pigs, Dr. Milad Manafi (Ed.)* 2011, pp. 81-94. ISBN: 978-953-307-312-5. <http://www.intechopen.com/books/artificial-insemination-in-farm-animals/artificialinsemination-in-pigs>.
23. Maxwell WMC, Johnson AL. Physiology of spermatozoa at high dilution rates: the influence of seminal plasma. *Theriogenology* 1999, 52:1353-62.
24. Maxwell WMC, De Graaf PS, Ghaoui E-HR, Evans G. Seminal plasma effects on sperm handling and female fertility. *Soc Reprod Fertil* 2007, Suppl, 64:13–38.
25. Mogielnicka-Brzozowska M, Kordan W. Characteristics of selected seminal plasma proteins and their application in the improvement of the reproductive processes in mammals. *Pol J Vet Sci* 2011, 14(3):489-99.
26. Murase T, Imaeda N, Yamada H, Miyazawa K. Seasonal changes in semen characteristics, composition of seminal plasma and frequency of acrosome reaction induced by calcium and calcium ionophore A23187 in large white boars. *J Reprod Develop* 2007, 53(4):853-65.
27. Novak S, Ruiz-Sanchez A, Dixon TW, Foxcroft RG, Michael GR, Dyck K. Seminal Plasma Proteins as Potential Markers of Relative Fertility in Boars. *J Androl* 2010, 31(2):188-200.
28. Okere C, Joseph A, Ezekwe M. Seasonal and genotype variations in libido, semen production and quality in artificial insemination boars. *J Anim Vet Adv* 2005, 4(10):885-8.
29. Petrocelli H, Batista C, Gosálvez J. Seasonal variation in sperm characteristics of boars in southern Uruguay. *Rev Bras Zootec* 2015, 44(1):1-7
30. Rodríguez LA. Fresh boar semen: quality control and production (PhD Thesis). Faculty of Veterinary Medicine 2012, Ghent University.
31. Rodríguez-Martínez H, Kvist U, Ernerudh J, Sanz L, Calvete JJ. Seminal plasma proteins: what role do they play? *Am J Reprod Immunol* 2011, 66:11-22.
32. Rodríguez-Martínez H. Semen evaluation techniques and their relationship with fertility. *Anim Reprod* 2013, 10(3):148-59.
33. Savić R, Petrović M, Radojković D, Radović Č, Parunović N. The effect of breed, boar and season on some properties of sperm. *Biotechnology in Animal Husbandry (Bgd., Srb.)* 2013, 329(2):299-310.
34. Singleton LW, Flowers B. Managing Boars in Artificial Insemination Centers. *Pork Information Gateway, Purdue University & North Carolina State University* 2001, 1-7.
35. Smital J, De Sousa LL, Mohsen A. Differences among breeds and manifestation of heterosis in AI boar sperm output. *Anim Reprod Sci* 2004, 80:121–30.
36. Smital J. Effects influencing boar semen. *Anim Reprod Sci* 2009, 110:335–46.

37. Stančić I, Dragin S. Modern technology of artificial insemination in domestic animals. *Cont Agri* (Novi Sad, Srb.) 2011, 60:204–14.
38. Stančić B, Božić A, Stančić I, Dragin S, Radović I, Petrović M. Effect of season on native boar sperm quality parameters. *Proc. 1st International Symposium on Animal Science*, November 8 – 10, 2012., Belgrade, Serbia, pp.65-70.
39. Stančić I, Dragin S, Stanković B, Jotanović S. Effect of protein contents in seminal plasma on sperm motility in diluted boar semen. *Proc. 1st International Symposium on Animal Science*, November 8 – 10, 2012., Belgrade, Serbia, pp.149-54.
40. Stančić I, Apić J, Radović I, Dragin S, Božić A, Žarković I, Stančić B. Influence of season, boars breed and age on protein content variation in seminal plasma. *Cont Agri* (Novi Sad, Srb.) 2015, 64(3-4)120-6.
41. Tsakmakidis IA, Lymberopoulos AG, Khalifa TA. Relationship between sperm quality traits and field-fertility of porcine semen. *J Vet Sci* 2010, 11:151-154.
42. Zhu J. Boar Seminal Plasma Components and Fertilization (Master of Science Thesis). University of Alberta, Department of Agriculture, Food and Nutritional Science, 2000.
43. Waberski D, Henning H, Petrunkina AM. Assessment of storage effects in liquid preserved boar semen. *Reprod Domest Anim* 2011, 46:45-8.
44. Wolf J, Smital J. Quantification of factors affecting semen traits in artificial insemination boars from animal model analyses. *J Anim Sci* 2009, 87:1620-7.

ENGLISH

THE INFLUENCE OF A BOAR AND THE SEASON ON CERTAIN PARAMETERS OF SPERM FERTILE POTENTIAL

Apić Jelena, Radovic Ivan, Stancic Ivan, Vakanjac Slobodanka

In order to determine the more accurate fertile potential of sperm, it seems that the conventional parameters of boar semen quality (the ejaculate volume, sperm concentration, progressive motility, percentage of live sperm and of those with intact acrosomal morphology) are insufficient. Since recently, there have been numerous studies proving that protein concentration in sperm plasma has high positive correlation with boar fertile potential. The research objective was to determine the effect of boars as well as the season on the variation of protein content in the sperm plasma. For the research there were used spermal fractions of 2 boars with high (V-boar) and 2 boars with low (N-boar) protein content in spermal plasma. The ejaculates of boars were taken once a week, for a month, during one year ($4 \times 12 = 48$ ejaculates per boar). For protein analysis in the spermal plasma, the samples were prepared by centrifugation. The ejaculate volume, protein concentration and progressive motility varied considerably ($p < 0.05$ or $p < 0.01$) among the boars as well as in one and the same boar. The variations of the same parameters were determined also during both warm and cold season. On the other hand, protein concentration was rather constant, and in V-boars (ranged from 4 to 4.5%) while in N-boars (ranged from 2.3 to 2.6%). The season did not significantly affect ($p > 0.01$) protein content in sperm plasma (V-boars: 4 to 4.5% in warm and cold season; N-boars: 2.3 do 2.6% in warm and 2.3 to 2.5% in cold season). The obtained results showed that measurement of protein content in boar sperm plasma could be a useful method for their ranking, based on fertile potential of fresh semen.

Key words: protein content, fertility of sperm, boar, season.

ВЛИЯНИЕ ХРЯКА И ВРЕМЕНИ ГОДА НА ОТДЕЛЬНЫЕ ПАРАМЕТРЫ ФЕРТИЛИЗАЦИОННОГО ПОТЕНЦИАЛА СПЕРМАТОЗОИДОВ

Апич Елена, Радович Иван, Станчич Иван, Ваканяц Слободанка

В целях максимально точного определения фертилизационного потенциала сперматозоидов стандартные параметры качества семени хряков (объем эякулята, концентрация сперматозоидов, прогрессивная подвижность, процент живых сперматозоидов, а также сперматозоидов с интактной акросомальной морфологией) являются недостаточными. С недавних пор существуют многочисленные исследования, доказывающие, что концентрация белка в спермальной плазме имеет высокую положительную корреляцию с фертилизационным потенциалом хряков. Целью данного исследования было установление влияния хряка, а также влияния времени года на вариативность содержания белка в спермальной плазме хряков. При проведении исследования использовались спермальные фракции 2 хряков с высоким (В-хряк) и 2 хряков с низким (Н-хряк) содержанием белка в спермальной плазме. Сбор эякулята у хряков проводился один раз в неделю в течение месяца на протяжении года ($4 \times 12 = 48$ порций эякулята от хряка). Для анализа белка в спермальной плазме образцы были подготовлены путем центрифугирования. Объем эякулята, концентрация сперматозоидов и прогрессивная подвижность значительно варьировались ($p < 0,05$ от $p < 0,01$) среди хряков, а также у одного и того же хряка. Изменчивость параметров установлена в теплое и в холодное время года. С другой стороны, концентрация белка было достаточно постоянной, как у В-хряков (колебалась от 4 до 4,5%), так и у Н-хряков (колебалась от 2,3 до 2,6%). Время года не оказывало достаточного влияния ($p > 0,01$) на содержание белка в спермальной плазме (В-хряки: от 4 до 4,5% в теплое и в холодное время года; Н-хряки: от 2,3 до 2,6% в теплое, и от 2,3 до 2,5% в холодное время года). Полученные результаты показывают, что измерение содержания белка в спермальной плазме хряков может быть эффективным методом их ранжирования на основе фертилизационного потенциала свежего семени.

Ключевые слова: содержание белка, фертильность сперматозоидов, хряк, время года.