



## POREĐENJE RAZLIČITIH PROTOKOLA ZA KRIOPREZERVACIJU SPERME NERASTA

### COMPARISON OF DIFFERENT BOAR SEMEN CRYOPRESRVATION PROTOCOLS

Ljupco Mickov<sup>1</sup>, Branko Atanasov<sup>1</sup>, Martin Nikolovski<sup>1</sup>,  
Igor Esmerov<sup>1</sup>, Toni Dovenski<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Univerzitet „Sv. Ćirilo i Metodije“ u Skoplju, Fakultet veterinarske medicine – Skopje,  
Severna Makedonija

#### Kratak sadržaj

Krioprezervacija sperme nerasta predstavlja ključni proces u reprodukciji svinja, omogućavajući dugotrajno čuvanje i globalnu razmenu genetskog materijala. Međutim, spermatozoidi nerasta su izrazito osetljivi na kriogeni stres, zbog čega je optimizacija protokola neophodna za očuvanje pokretljivosti, vitalnosti i oplodujuće sposobnosti. Ovaj rad upoređuje dva protokola krioprezervacije, sa fokusom na razlike u prikupljanju sperme, vremenu razblaživanja, centrifugiranju, pripremi razređivača i pakovanju sperme. Procenjeni su sledeći kinetički parametri: prosečna putna brzina (VAP), brzina pravolinijskog kretanja (VSL), zakrivljena putna brzina (VCL), amplituda bočnog pomeranja glave (ALH), frekvencija ukrštanja talasa (BCF), ispravljenost (STR) i linearnost (LIN). Takođe, analizirana su dva dodatna morfološka parametra: izduženost i površina glave. Vrednosti su izražene kao srednje vrednosti  $\pm$  standardna devijacija. Nakon veštačkog osemenjavanja upoređeni su osnovni parametri reprodukcije kod svinja: stopa koncepcije i veličina legla. Sveukupno, iako univerzalni protokol još uvek nije utvrđen, napredak u formulaciji krioprotektanata i kontroli temperature nastavlja da poboljšava funkcionalnost sperme nakon odmrzavanja. Potrebna su dalja komparativna istraživanja kako bi se protokoli dodatno usavršili za konzistentno i visokokvalitetno očuvanje sperme nerasta, čime se obezbeđuje efikasno veštačko osemenjavanje i genetska konzervacija u svinjarstvu.

**Ključne reči:** sperma nerasta; koncepcija; krioprezervacija; veličina legla

#### Summary

Cryopreservation of boar semen is a critical process in swine reproduction, enabling long-term storage and global genetic exchange. However, boar sperma-

tozoa are notably sensitive to cryogenic stress, making the optimisation of protocols essential for preserving motility, viability, and fertilising capacity. These abstract compares two cryopreservation protocols, focusing on differences in semen collection, extension time, centrifugation, extender preparation, and semen packaging. The following kinetic parameters were assessed: velocity of average path (VAP), velocity of straight-line path (VSL), velocity of curvilinear path (VCL), amplitude of lateral head displacement (ALH), beat-cross frequency (BCF), straightness (STR) and linearity (LIN). Also, two additional morphological parameters were assessed: elongation and area of the head. Values were expressed as means  $\pm$  standard deviation. After tie insemination, the basic porcine reproductive parameters were compared: conception rate, and litter size. Overall, while no universal protocol has emerged, advances in cryoprotectant formulation and temperature management continue to improve post-thaw functionality. Further comparative research is warranted to refine protocols for consistent, high-quality boar semen preservation, ensuring efficient artificial insemination and genetic conservation in the swine industry.

**Key words:** boar semen; conception rate; cryopreservation; litter size

## UVOD

Veštačko osemenjavanje (V.O.) kod svinja značajno je napredovalo od svoje prve primene 1920-ih godina. Dok je hlađenje sperme nerasta postala standardna praksa sredinom 20. veka, krioprezervacija sperme nerasta – uobičajena kod drugih vrsta domaćih životinja, suočila se sa izazovima zbog visoke osetljivosti spermatozoida na zamrzavanje. Duboko zamrzavanje, odnosno krioprezervacija, izlaže spermatozoide toplotnom, osmotskom i oksidativnom stresu, što može narušiti njihovu vitalnost i sposobnost oplodivanja. Uprkos ovim poteškoćama, kontinuirana istraživanja unapređuju protokole zamrzavanja i razređivače, čime se poboljšava kvalitet sperme nakon odmrzavanja (Pezo et al., 2025). Upotreba krioprezervisane sperme donosi brojne strateške prednosti u uzgoju svinja. Ona omogućava dugotrajno čuvanje i globalnu distribuciju superiornog genetskog materijala bez potrebe za transportom živih životinja, čime se unapređuje biosigurnost i smanjuju logistički troškovi. Takođe, duboko zamrznuto seme nerastova omogućava formiranje genetičkih depoa ili banaka gena, koje imaju ključnu ulogu u očuvanju i selektivnim uzgojnim programima. Ove pogodnosti posebno su značajne u organizovanim uzgojnim sistemima koji teže genetskom unapređenju velikih populacija (Gonzalez-Peña et al., 2015).

Komercijalna upotreba duboko zamrznutog semena kod svinja i dalje je ograničena zbog slabijih reproduktivnih rezultata u poređenju sa rashlađenim semenom. Procenat prašenja sa duboko zamrznutim semenom obično iznosi 50–60%, a veličina legla je manja. Ovi ishodi povezani su sa smanjenom pokretljivošću i vitalnošću spermatozoida nakon odmrzavanja. Pored toga, vreme osemenjavanja u odnosu na ovulaciju je presudno, jer spermatozoidi nakon odmrzavanja imaju kraći životni vek u reproduktivnom traktu, što zahteva preciznu detekciju estrusa i striktno protokole inseminacije (Michael et al., 2000). Da bi se prevazišla

ograničenja, razvijene su napredne metode inseminacije poput intrauterine (IUI) i duboke intrauterine (DUI), koje omogućavaju deponovanje sperme bliže mestu oplodnje, čime se povećava stopa koncepcije čak i pri manjem broju spermatozoida. Studije su pokazale da kombinovanje duboko zamrznutog semena sa optimalnim vremenom i tehnikom osemenjavanja može dati zadovoljavajuće rezultate, što ovu metodu čini održivom opcijom u kontrolisanim uzgojnim programima (Gonzalez-Peña et al., 2014).

Budućnost upotrebe duboko zamrznutog semena u reprodukciji svinja zavisi od daljeg usavršavanja protokola krioprezervacije, razređivača i tehnika inseminacije. Istraživanja su usmerena na poboljšanje stope preživljavanja spermatozoida, smanjenje oštećenja tokom procesa zamrzavanja i odmrzavanja, kao i razvoj efikasnijih tehnika V.O. Očekuje se da će napredak u ovim tehnologijama omogućiti veću integraciju duboko zamrznutog semena u komercijalne programe uzgoja svinja, doprinoseći genetskoj raznovrsnosti, produktivnosti i održivosti svinjarstva (Pezo et al. 2025). Krioprezervacija sperme nerasta je ključna tehnika u savremenoj reprodukciji svinja, koja omogućava dugotrajno čuvanje i globalnu diseminaciju genetskog materijala. Za razliku od sperme bikova, spermatozoidi nerasta su izrazito osetljivi na hladni šok i osmotski stres, što otežava proces zamrzavanja. Protokol krioprezervacije tipično obuhvata: prikupljanje sperme, razblaživanje razređivačima, postepeno hlađenje, dodavanje krioprotektanata, pakovanje u pakete, zamrzavanje i odmrzavanje. Svaka faza mora biti pažljivo optimizovana da bi se očuvala vitalnost i sposobnost oplodjenja nakon odmrzavanja. Savremena istraživanja fokusirana su na unapređenje sastava razređivača i regulaciju brzine hlađenja kako bi se smanjila ćelijska oštećenja (Rath et al., 2009).

Konvencionalna metoda krioprezervacije sperme nerasta podrazumeva sporo zamrzavanje u isparenjima tečnog azota. Sperma se najpre razblažuje razređivačima poput lactose-egg yolk (LEY), koji obezbeđuju hranljive materije i štiti membrane spermatozoida. Dodaju se krioprotektanti, poput glicerola, kako bi se sprečilo formiranje ledenih kristala. Sperma se zatim hladi na 5°C, pakuje u slamčice od 0,5 ml i postavlja iznad tečnog azota radi postepenog zamrzavanja. Iako je ova metoda ekonomična i široko primenjena, često dovodi do smanjenja pokretljivosti i vitalnosti zbog nekontrolisanog formiranja leda i oksidativnog stresa (Hernandez et al., 2007). Protokoli sa kontrolisanom brzinom zamrzavanja koriste programabilne zamrzivače koji precizno upravljaju padom temperature tokom procesa. Tipične stope hlađenja uključuju -40°C/min između -5°C i -80°C, što pomaže u smanjenju formiranja ledenih kristala i oksidativnog oštećenja. Ova metoda čuva integritet membrana i poboljšava pokretljivost spermatozoida nakon odmrzavanja u poređenju sa konvencionalnim tehnikama. Međutim, visoka cena i ograničena dostupnost ovih uređaja sprečavaju njihovu široku komercijalnu primenu (Westendorf et al. 1975).

Postoje dva istaknuta protokola kriokonzervacije nerastovskog semena: Westendorf i Paquignon metoda. Oba uključuju uklanjanje seminalne plazme i upotrebu razređivača koji sadrže žumance i šećere – laktozu kod Westendorf metode i glukozu kod Paquignon metode. Westendorf protokol uključuje fazu hlađenja na 15°C pre uklanjanja plazme i dodavanje Orvus ES paste u razređivač. Kompara-

tivna istraživanja pokazala su da Westendorf metoda daje bolju vitalnost spermatozoida i manje morfoloških abnormalnosti, zbog čega je pogodnija u određenim uzgojnim uslovima (Westendorf et al., 1975; Paquignon et al., 1984). Najnovije inovacije u krioprezervaciji uključuju upotrebu novih krioprotektanata, antioksidanata i razređivača kako bi se poboljšalo preživljavanje spermatozoida. Istražuju se i nove tehnike poput vitrifikacije, dodavanja nanočestica i proteina vezanih za led, radi smanjenja oštećenja tokom zamrzavanja i odmrzavanja. Protokoli prilagođeni specifičnim rasama, kao što su oni razvijeni za autohtone rase poput Windsnyer nerastova, naglašavaju potrebu za individualizovanim pristupom zasnovanim na genetskim i fiziološkim razlikama. Kontinuirana istraživanja i standardizacija protokola ključni su za širenje upotrebe duboko zamrznutog semena u komercijalnoj reprodukciji svinja (Li et al., 2020).

Utvrđeno je da su spermatozoidi iz prvih 10 mL semene frakcije (P1) otporniji na manipulaciju (od razblaživanja do hlađenja) i na krioprezervaciju, u poređenju sa onima iz ostatka ejakulata (Pena et al., 2003; Rodriguez-Martinez et al., 2007; Saravia et al., 2007). Pokazano je da je upravo semena plazma u P1 frakciji ključan zaštitni faktor za spermatozoide, verovatno zbog većeg prisustva tečnosti iz kaudalnog dela epididimisa i specifičnih proteina, ili zbog nižih koncentracija spermadhezina, bikarbonata i cinka u poređenju sa drugim frakcijama. Ova činjenica iskorišćena je za pojednostavljivanje protokola krioprezervacije, korišćenjem samo P1 frakcije u koncentrisanom obliku, za potencijalnu upotrebu u dubokoj intrauterinoj inseminaciji (Rodriguez-Martinez i Wallgren, 2011).

Spermatozoidi su najpre inkubirani u sopstvenoj plazmi semena 30 minuta nakon sakupljanja, a zatim, bez centrifugiranja (tj. bez uklanjanja semene plazme), razblaženi su lactose egg yolk (LEY) razređivačem i ohlađeni na +5°C tokom 1h 30 min pre nego što su dodatno tretirani LEY+glicerolom (3%) i razređivačem sa surfaktantom, pakovani u MiniFlatPack i rutinski krioprezervisani, sa brzinom hlađenja od 50°C/min.

Ovaj pristup pojednostavljuje i skraćuje ceo postupak – traje 3h i 30 min u poređenju sa konvencionalnih 8 sati. Preživljavanje ćelija ovim metodom bilo je jednako dobro (preko 60%) (Saravia, et al., 2010). Pokazano je da nema značajnih razlika u krioprezervaciji P1 spermatozoida u poređenju sa ostatkom ejakulata, što ukazuje da se pojednostavljen postupak može rutinski primenjivati.

Ovaj protokol ima više prednosti: eliminiše uobičajeno početno razblaživanje i centrifugiranje, čime se zadržava korisna semena plazma. Takođe, varijacije između nerasta se smanjuju upotrebom P1 frakcije, koja sadrži spermatozoide podobne za krioprezervaciju i proteine povezane sa plodnošću (Rodriguez-Martinez, et al., 2009). Ova procedura omogućava da se preostali deo ejakulata (oko 75% ukupne količine) preradi u tečnu spermiju za veštačko osemenjavanje. Time se jedan ejakulat može istovremeno iskoristiti za kriokonzervaciju P1 frakcije – namenjene genetskim bankama, repopulaciji ili komercijalnoj distribuciji – i za rutinsku proizvodnju ohlađenog semena za V.O. Na taj način, protokol ne ometa uobičajeno rukovanje nerastima i ejakulatima (Rodriguez-Martinez i Wallgren, 2011).

Cilj ove studije bio je da se odredi *in vivo* fertiliteta duboko zamrznutih spermatozoida, kriokonzervisanih konvencionalnim i eksperimentalnim metodama, tj. da se utvrdi procenat koncepcije i veličina legla dobijenih korišćenjem semena zamrznutog na oba načina, i da se ti rezultati uporede sa onima dobijenim upotrebom ohlađenog semena, kao kontrole.

## MATERIJALI I METODE

### Prikupljanje semena

Ejakulati su prikupljeni tehnikom masturbacije, pri čemu je ruka tehničara koji izvodi postupak zaštićena duplom plastičnom rukavicom, napravljenom od nespermicidnog materijala. Nakon evakuacije prve frakcije ejakulata, gornja rukavica se odbacuje, a prikupljanje se nastavlja drugom rukavicom. Prvih nekoliko mlazova ejakulata (frakcija bogata bakterijama) se ispušta, a prvih 15–20 ml frakcije bogate spermatozoidima (deo 1; P1) korišćeno je za istraživanje. Ejakulati su sakupljeni u sterilnu, termički izolovanu, graduisanu posudu, prethodno zagrejanu na 37°C, u koju je ubačena plastična vrećica sa ugrađenim filterom (USBag®, Minitub, Tiefenbach, Nemačka). Rutinski mikroskopski pregled je rađen na fazno-kontrastnom mikroskopu sa grejanom pločom, prethodno zagrejanom na 39°C, radi određivanja pokretljivosti spermatozoida. Korišćeni su samo ejakulati sa više od 70% pokretnih spermatozoida.

### Ekstenderi

#### *Primarni ekstender*

Primarni ekstender se koristi za suspendovanje ejakulata nakon prikupljanja, u razmeri 1:1. U našem istraživanju korišćeni su Androhep®, Androhep® EnduraGuard™ i Androhep® Plus (Minitub, Tiefenbach, Nemačka), pripremljeni prema uputstvu proizvođača. Za pripremu 1 L ekstendera, 47 g praha se rastvara u 1 L destilovane, dejonizovane vode zagrejene na +37°C. Nakon 60 minuta pH rastvora se stabilizuje, uz konstantnu homogenizaciju pomoću magnetne mešalice, pre suspendovanja spermatozoida.

#### *Ekstender za hlađenje*

Ekstender za hlađenje koristi se za resuspenziju spermatozoida nakon centrifugiranja i dekantovanja ejakulata suspendovanog u primarnom ekstenderu. Za hlađenje je korišćen CrioGuard™-CF (Minitub, Tiefenbach, Nemačka), pripremljen prema uputstvu proizvođača: za 0,5 L ekstendera, 44 g CrioGuard-a rastvoreno je u 400 ml destilovane vode na +37°C, dodato je 100 g (ml) svežeg žumanca, a suspenzija je ohlađena na +17°C.

### *Ekstender za krioprezervaciju*

Za dovođenje ohlađenog semena na +5°C do finalne koncentracije spermatozoida, pre pakovanja i krioprezervacije, korišćen je CrioGuard™-CF ekstender za krioprezervaciju (Minitub, Tiefenbach, Nemačka). Za pripremu 0,5 L ekstendera, 40,7 g CrioGuard-a rastvoreno je u 370 ml destilovane vode na +37°C, dodato je 100 g (ml) svežeg žumanca i 5 ml Equex STM paste (Minitub, Tiefenbach, Nemačka). U ekstendere je dodato 15 ml i 40 ml glicerola, za grupe krioprezervisane sa 3% i 8% krioprotektanta. Ekstenderi su zatim ohlađeni na +5°C.

## **OBRADA SEMENA I KRIOPREZERVACIJA**

### **Konvencionalna procedura (TCP)**

Ejakulati dostavljeni u laboratoriju inkubirani su ~24 sata na 17°C (Portable Semen Storage Unit, Minitub, Tiefenbach, Nemačka). Nakon inkubacije, izvršeni su mikroskopski pregled i CASA analiza. Zatim su ejakulati centrifugirani na 800 rpm tokom 12 minuta, nakon čega je supernatant dekantovan i zamenjen hladnim ekstenderom jednakog volumena.

Spermatozoidi dobijeni centrifugiranjem suspendovane frakcije bogate spermatozoidima krioprezervisani su prema proceduri Westendorf et al. (1975), modifikovanoj od Thurston et al. (2001). Uzorci su ohlađeni na 5°C tokom 2h i 30 min, zatim razblaženi do finalne koncentracije 1 x /ml sa ekstenderom za zamrzavanje ohlađenim na 5°C. Doze za veštačko osemenjavanje pakovane su u 8 pajeta od po 0,5 ml, svaka sa približno 5 x spermatozoida.

### **Eksperimentalna procedura (XCP)**

Za krioprezervaciju eksperimentalnom procedurom korišćeni su samo ejakulati sa >90% pokretnih spermatozoida u CASA analizi. Deo 1 (P1, prvih 20 ml frakcije bogate spermatozoidima) inkubiran je u vodenom kupatilu na 33°C ~30 minuta, a zatim razblažen komercijalnim hladnim ekstenderom (Androhep®, Androhep® EnduraGuard™, Androhep® Plus) u razmeri 1:1. Doze su pakovane u 25 pajeta, svaka sa približno 16 x spermatozoida.

Razblaženi ejakulati, bez centrifugiranja, ohlađeni su na 5°C u roku od 1h i 30 min. i dovedeni na finalnu koncentraciju sa izotermalnim (5°C) ekstenderom za krioprezervaciju (CryoGuard™-CF, Minitub, Tiefenbach, Nemačka). Pakovani su u 0,5 ml providne PVC pajete (Minitub, Tiefenbach, Nemačka), pomoću kompjuterizovanog uređaja za punjenje, zatvaranje i etiketiranje (MPR 133 Combo). Zamrzavanje je sprovedeno kompjuterizovanim zamrzivačem (IceCube 15 M, Minitub) sledećim protokolom: hlađenje do -6°C brzinom 6°C/min, stabilizacija na -6°C 1 minut radi inicijacije kristalizacije, hlađenje od -6°C do -20°C tokom 15 sekundi, dalje do -80°C brzinom 40°C/min, zadržavanje 30 sekundi na -80°C, zatim hlađenje do -150°C brzinom 70°C/min, a potom uranjanje i čuvanje u tečnom azotu.

## Ohlađeno seme

Kontrolne doze tečnog semena pripremljene su prema rutinskoj proceduri na farmi.

## Odmrzavanje i restitucija doza za osemenjavanje

Pajete su odmrzavane uranjanjem u vodeno kupatilo na 39°C duže od 30 sekundi. Nakon sušenja, sadržaj je prebačen u PVC epruvete (8 pajeta za TCP doze, 25 pajeta za XCP doze). Dodavan je izotermalni ekstender za nerastovsko seme (Androhep®, Androhep® EnduraGuard™, Androhep® Plus) do ukupno 70 mL. Epruvete su zatvorene i čuvane u frižideru za nerastovsko seme na 17°C.

## Veštačko osemenjavanje

Osemenjavanje je obavljeno nakon detekcije estrusa kod krmača i nazimica u reproduktivnom programu farme, od strane osoblja farme. Doze su aplikovane jednokratnim kateterima za osemenjavanje (FoamTip, Minitub, Tiefenbach, Nemačka) prema rutinskoj proceduri.

Krmače su praćene zbog pojave estrusa od 17. do 24. dana posle osemenjavanja, a graviditet je potvrđivan ultrazvučno 28–35 dana nakon osemenjavanja. Beleženi su podaci o procentu prašenja (FR) i veličini legla (ukupan broj prasadi – TNP; živorođena prasadi – LP; mrtvorodena prasadi – SB).

**Tabela 1.** Prosečne vrednosti kinetičkih parametara spermatozoida u odmrznutom semenu korišćenom za veštačko osemenjavanje.

	Ukupni	Spori	Srednji	Brzi	Jedinica
VCL	113,1	16,6	33,6	158,5	mm/s
VSL	35,6	3,3	6,7	51,2	mm/s
VAP	55,2	7,0	14,2	78,1	mm/s
LIN	31,4	19,6	20,0	32,3	%
STR	64,4	46,3	47,2	65,6	%
WOB	48,8	42,3	42,3	49,3	%

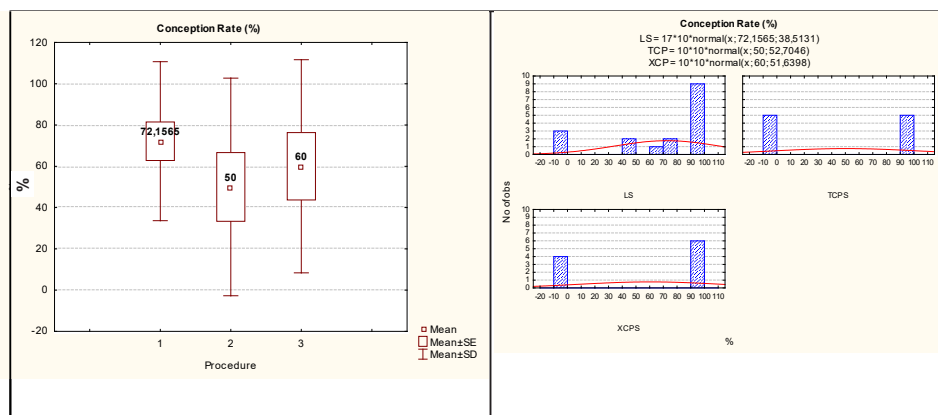
## Statistička analiza

Deskriptivni statistički testovi i razlike između varijabli analizirani su pomoću ANOVA testa (Unequal N° High Sensitivity Distribution) u programu Statistica 9.0 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, SAD).

## REZULTATI

Da bi se ispitala oplodna sposobnost spermatozoida krioprezervisanih prema obe testirane procedure, 10 krmača je osemenjeno semenom krioprezervisanim konvencionalnom metodom (TCP), a 10 krmača spermatozoidima krioprezervisanim skraćenom (eksperimentalnom) procedurom (XCP). Kao kontrola korišćeni su podaci iz evidencije (procenat koncepcije i veličina legla) prethodnih osemenjavanja istih majki ohlađenim semenom.

**Figura 1.** Stopa koncepcije (CR)



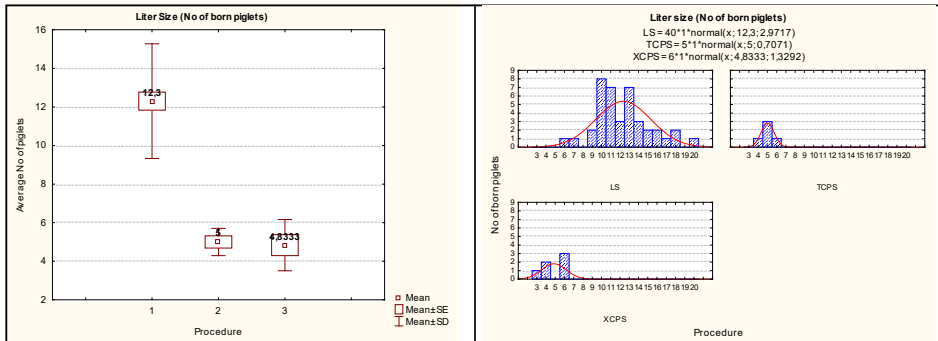
	Conception rate after insemination with chilled, TCP and XCP semen						
	Means	N	Std.Dev.	Variance	Std. Err.	Minimum	Maximum
LS	72,16	40	38,51	1483,26	9,34	0,00	100,00
TCP	50,00	10	52,70	2777,78	16,67	0,00	100,00
XCP	60,00	10	51,64	2666,67	16,33	0,00	100,00
All Grps	62,88	37	45,93	2109,36	7,55	0,00	100,00

Analysis of variance. The selected values are significant on level $p < ,05000$							
SS Effect	df Effect	MS Effect	SS Error	df Error	MS Error	F	p
3204,787	2	1602,394	72732,10	34	2139,179	0,749069	0,480448

Stopa koncepcije kod krmača osemenjenih ohlađenim tečnim semenom iznosila je  $72,15 \pm 9,34\%$ , kod onih osemenjenih TSR-semenom  $50,00 \pm 16,66\%$ ,

a u grupi osemenjenoj XCP-semenom stopa koncepcije je bila  $60,00 \pm 16,32\%$ . Nisu utvrđene značajne razlike u stopi koncepcije između grupa krmača osemenjenih ohlađenim semenom i onih osemenjenih krioprezerviranim semenom. Takođe, nisu zabeležene značajne razlike u stopi koncepcije između grupa osemenjenih semenom krioprezerviranim prema ispitivanim krioprotokolima. Analiza varijanse takođe nije pokazala značajnost.

**Figura 2.** Veličina legla (LS).



	Litter size after insemination with liquid, TCP and XCP– semen						
	Means	N	Std.Dev.	Variance	Std. Err.	Minimum	Maximum
LS	12,30	40	2,97	8,83	0,47	6,00	20,00
TCPS	5,00	5	0,71	0,50	0,32	4,00	6,00
XCPS	4,83	6	1,33	1,77	0,54	3,00	6,00
All Grps	10,71	51	4,07	16,53	0,57	3,00	20,00

Analysis of variance. The selected values are significant on level $p < ,05000$							
SS Effect	df Effect	MS Effect	SS Error	df Error	MS Error	F	p
471,3549	2	235,6775	355,2333	48	7,400694	31,84532	0,000000

Prosečna veličina legla kod krmača osemenjenih ohlađenim tečnim semenom bila je  $12,30 \pm 0,46$  prasadi, kod krmača osemenjenih TSP-semenom  $5,00 \pm 0,31$  prasadi, a kod onih osemenjenih XSP-semenom prosečna veličina legla iznosila je  $4,83 \pm 0,54$  %, sa  $sD = 4,06$  i  $cV = 16,53$  %. Postojala je visoko značajna razlika u veličini legla između grupa krmača osemenjenih tečnim semenom i onih osemenjenih krioprezerviranim semenom ( $p < 0,0005$ ), dok razlike u veličini legla dobijene pri osemenjavanju spermom krioprezerviranim različitim postup-

cima krioprezervacije nisu bile značajne. Analiza varijanse je takođe pokazala visoku značajnost.

## DISKUSIJA

Originalna metoda Pursel i Johnson (1971) dala je zadovoljavajuću plodnost. Međutim, korišćene su doze za osemenjavanje sa 20 x spermatozoida, a kada je broj spermatozoida smanjen na polovinu, plodnost je bila značajno smanjena u poređenju sa rezultatima dobijenim spermatozoidima krioprezerviranim u Tris-glucoce-egg yolk ekstenderu (Pursel i Johnson, 1972). Slično tome, Hillman i Bader (1973) dobili su samo 14% prašenja sa izuzetno malim leglima.

Rezultati iz literature o krioprezervaciji nerastovskog semena u različitim ekstenderima, prema konvencionalnom protokolu zamrzavanja, u skladu su sa onima dobijenim u našem istraživanju (Graham i sar., 1971a; Graham i sar., 1971b; Crabo i Einarsson, 1971).

Stopa koncepcije kod krmača osemenjenih ohlađenim tečnim semenom u kliničkom ispitivanju iznosila je  $72,15 \pm 9,34\%$ , kod onih osemenjenih TCP-semenom  $50,00 \pm 16,66\%$ , a kod onih osemenjenih XCP-semenom  $60,00 \pm 16,32\%$ , bez značajnih razlika u stopi koncepcije između grupa osemenjenih ohlađenim i krioprezerviranim semenom. Takođe, nisu uočene značajne razlike u procentu koncepcije dobijenom osemenjavanjem spermatozoidima krioprezerviranim različitim procedurama krioprezervacije. Analiza varijanse takođe nije pokazala značajnost.

Stopa koncepcije krioprezerviranog semena nerastova neretko je značajno niža od one kod ohlađenog semena (Johnson 1985, Almlid i Hofmo 1996). Smatra se da je to posledica manje održivosti spermatozoida nakon odmrzavanja i subletalne disfunkcije velikog procenta ćelijske populacije koja preživi proces krioprezervacije (Watson 2000). Posledično, sposobnost koncepcije krioprezerviranih spermatozoida u genitalnom traktu ženke kraća je od one kod ohlađenih (Waberski i sar., 1994), što vreme osemenjavanja u odnosu na ovulaciju čini kritičnim faktorom u mnogo većoj meri nego kod osemenjavanja ohlađenim semenom. Ovo je posebno važno kod veštačkog osemenjavanja svinja, gde postoji velika varijacija u intervalu od početka estrusa do ovulacije, što se ne može unapred predvideti (Weitze i sar., 1994; Kemp i Soede 1996).

Najbolje poređenje stopa koncepcije između ohlađenog i krioprezerviranog semena nerasta smatra se kada se eksperimentalno osemenjavanje vrši tečnim i krioprezerviranim semenom istog nerasta, koristeći iste primaoce za osemenjavanje, što je teško izvesti. Kao praktična alternativa ovom eksperimentu, Erickson (2000) je naveo da se analiza na nivou majki može sprovesti korišćenjem podataka sa tečnim i krioprezerviranim semenom različitih nerastova, što je bio slučaj u našem kliničkom ispitivanju. U jednoj studiji IVF-a sa krioprezerviranim semenom, ukupan broj prasadi bio je za 1,5 prase manji nego kod IVF-a sa tečno konzerviranim semenom (Almlid i sar., 1987). Rezultati našeg istraživanja pokazali

su mnogo veće razlike, što se verovatno može pripisati činjenici da je izvedeno samo jedno osemenjavanje.

Prosečna veličina legla nakon osemenjavanja tečnim semenom iznosila je  $12,30 \pm 0,46$  prasadi, kod onih osemenjenih TCP-semenom  $5,00 \pm 0,31$ , a kod onih osemenjenih XCP-semenom  $4,83 \pm 0,54$  %, sa  $sD = 4,06$  i  $cV = 16,53$  %. Utvrđena je visoka značajnost u razlikama u veličini legla između grupa osemenjenih tečnim i krioprezerviranim semenom ( $p < 0,0005$ ), dok razlike u veličini legla između različitih procedura krioprezervacije nisu bile značajne. Analiza varijanse takođe je pokazala visoku značajnost. Ovi podaci u potpunosti su u skladu sa ranije pomenutim istraživanjima (Einarsson et al.1973; Richter 1973; Richter i Liedicke 1972; Richter i Liedicke, 1973).

Smatra se da su relativno niže stope koncepcije, kao i značajno manja veličina legla, posledica činjenice da je izvedeno samo jedno osemenjavanje, za razliku od autora koji su vršili duplo ili trostruko osemenjavanje, gde su stope koncepcije i veličine legla bile značajno veće (Frangezet al.,2005). Takođe, ovi parametri bi se značajno poboljšali korišćenjem metode duboke intrakornualne inseminacije.

## **ZAKLJUČAK**

U poređenju sa ohlađenim semenom nerasta, metode krioprezervacije semena za komercijalnu upotrebu pokazale su se kao neefikasne. Broj doza za osemenjavanje proizvedenih iz jednog ejakulata značajno je manji nego kod proizvodnje doza iz tečnog semena. U zaključku se može rezimirati da je fertilitet krioprezerviranog semena nerasta, kao i kod drugih sisara, niži od fertiliteta svežeg ili ohlađenog semena. Međutim, upotreba optimizovanih protokola krioprezervacije, u kombinaciji sa odgovarajućim tehnikama detekcije estrusa i osemenjavanja, u budućnosti može dovesti do stopa koncepcije koje neće biti mnogo niže od onih dobijenih korišćenjem tečnog semena.

## **LITERATURA**

1. Almid, T., Johnson, L. 1988. Effects of glycerol concentration, equilibration time and temperature of glycerol addition on post-thaw viability of boar spermatozoa frozen in straws. *J. Anim. Sci.*, 66: 2899-2905.
2. Almid, T., Stavne, S.E., Johnson, L.A., 1987. Fertility evaluation of the straw freezing technique for boar semen under practical artificial insemination conditions. *Zuchthygiene (Berl.)*;22:193–202
3. Crabo, B., Einarsson, S. 1971. Fertility of deep frozen boar spermatozoa. *Acta. Vet. Scand.* 12:125
4. Eriksson, B.M., Rodriguez-Martinez, H. 2000. Effect of freezing and thawing rates on the post-thaw viability of boar spermatozoa frozen in large 5 ml packages (FlatPack). *Animal Reproduction Science* 63: 205–220.
5. Gonzalez-Peña D, R. V. Knox, J. Pettigrew, S. L. Rodriguez-Zas (2014). Evaluation of two different boar semen freezing protocols and their effects on semen quality after thawing. *Anim. Reprod.*, v.12, n.4, p.871-875.
6. Graham, E.F., Crabo, B.G. 1972. Some factors influencing the freezing of boar spermatozoa, *Proc. VIIth Int. Congr. Anim. Reprod.*, Munich II, 1627.

7. Graham, E.F., Rajamannan, A.I.I., Schmehl M.K.L., Maki-Laurila, M., Bower. R.E. 1971. Preliminary report on procedure and rationale for freezing boar semen. *A.I. Digest* 19:12.
8. Hernandez, M., Roca, J., Gil, M.A., Vázquez, J.M., & Martínez, E.A. 2007. Adjustments on the cryopreservation conditions reduce the incidence of boar ejaculates with poor sperm freezability. *Theriogenology* 67: 1436–1445.
9. Hillman K H. and Bader H. 1973. Untersuchungen zur Tiefgefrierkonservierung von Ebersperma mit dem Beltsville F3-Verdunner. *Zuchthyg.* 8:15.
10. Johnson, L.A. 1985. Fertility results using frozen boar spermatozoa: 1970 to 1985. In: Larsson, K. (Ed). *Deep Freezing of Boar Semen*, vol. 1. Uppsala, Sweden: Swedish University of Agricultural Sciences, pp. 199–222.
11. Li, J., et al. (2020). Advances in cryopreservation of porcine semen: A review. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 11(1), 1-12.
12. Martin M, Edgerton S, Wiseman B. Frozen semen: A breeding protocol that results in high fecundity. *Swine Health Prod.* 2000;8(6):275–277.
13. Paquignon M. 1984. Semen technology in the pig. *Curr. Top. Vet. Med. Anim. Sci.*, 30: 202-218.
14. Peña, F.J., Johannisson, A., Wallgren, M., & Rodriguez-Martinez, H. 2003. Antioxidant supplementation in vitro improves boar sperm motility and mitochondrial membrane potential after cryopreservation of different fractions of the ejaculate. *Animal Reproduction Science* 78: 85–98
15. Pezo, F., Sanchez, R., Pedrosa, A.C., de Andrade, A.F.C. (2025). Stored and Frozen Semen in Swine. In: Gardón, J.C., Satué Ambrojo, K. (eds) *Assisted Reproductive Technologies in Animals Volume 2*. Springer, Cham.
16. Pezo, F.; Zambrano, F.; Uribe, P.; de Andrade, A.F.C.; Sánchez, R. (2023). Slow Freezing of Preserved Boar Sperm: Comparison of Conventional and Automated Techniques on Post-Thaw Functional Quality by a New Combination of Sperm Function Tests. *Animals*, 13, 2826.
17. Pursel, V.G. Johnson, L.A. 1971. Fertility with frozen boar spermatozoa. *J. Anim. Sci.* 33:265.
18. Pursel, V.G. Johnson, L.A. 1972. Fertility comparison of boar semen frozen in two extenders. *J. Anim. Sci.* 35:1123.
19. Rodriguez-Martinez, H., & Barth, A.D. 2007. In vitro evaluation of sperm quality related to in vivo function and fertility. In: Juengel, J.I., Murray, J.F., Smith, M.F. (Eds.) *Reproduction in Domestic Ruminants VI*. Nottingham, UK: Nottingham University Press, pp. 39–54.
20. Saravia, F., Hernandez, M., Wallgren, M.K., Johannisson, A., & Rodriguez-Martinez, H. 2007. Controlled cooling during semen cryopreservation does not induce capacitation of boar spermatozoa. *International Journal of Andrology*.
21. Thema MA, Mphaphathi ML, Ledwaba MR, Nedambale TL. Sperm cryopreservation in Windsnyer boars; principles, technique, and updated outcomes. *Anim Reprod.* 2023;20(3):e20220100. <https://doi.org/10.1590/1984-3143-AR2022-0100>.
22. Watson, P.F. 2000. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science* 60–61: 481–492.
23. Weitze, K.F., Rath, D., Baron, G. 1987. New aspects of preservation of boar sperm by deep freezing in plastic tubes. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift* 94: 485–488.
24. Westendorf, P., Richter, L., Treu, H. 1975. Zur Tiergefrierung von Ebersperma: Labor – und Besamungsergebnisse mit dem Hülsenberger Pailleten Verfahren (Deep freezing of boar sperm. Laboratory and insemination results using the Hülsenberger paillette method). *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift* 82: 261–267.