

# Savremeni pristup kontroli kvaliteta semena kod pasa i prikaz efekata terapije

**Autori:** Aleksandar Milovanović<sup>1</sup>, Jelena Apić<sup>1</sup>, Tomislav Barna<sup>1</sup>, Igor Stojanov<sup>1</sup>, Miodrag Lazarević<sup>2</sup>

Plodnost pasa je, slično kao i kod ljudi, sve više ugrožena načinom života, ishranom, zagađenjem životne sredine i produženim životnim dobom kućnih ljubimaca. Profesionalni odgajivači pasa i amateri, su ne retko u prilici da kupovinom psa neproverene oplodne sposobnosti nakon izvesnog vremena uvide da je pas ili potpuno neplodan ili da daje manji broj potomaka nakon nekoliko uzastopnih parenja. Kontrola semena je neophodna ukoliko se ono doprema radi upotrebe za veštačko osmenjavanje (ohlađeno ili zamrznuto), kao i prilikom slanja semena iz istih razloga. Iz ovih razloga se preporučuje sprovođenje rutinskog pregleda sperme psa pre kupovine ili prodaje, pre sezone pripusta, pre osemenjavanja ili zamrzavanja ili u slučaju bilo kakve sumnje na oboljenje prostate ili reproduktivnog trakta. Prema našem iskustvu, psi se na preglede uglavnom dovode nakon više neuspješnih uparivanja ili veštačkih osemenjavanja pri čemu je prva pretpostavka da je problematičan mužjak, dok se pre prodaje, plodnost psa retko proverava. Uopšteno govoreći, procenu kvaliteta semena treba vršiti najmanje jednom godišnje za bilo kog priplodnog mužjaka.

Spermu predstavlja višemilionska populacija spermatozoida, ali oplodnja nastaje kao rezultat interakcije samo dve ćelije (jednog spermatozoida i jedne jajne ćelije). Prema tome, muški gameti doprinose uspehu oplodnje sa 50 procenata. Ispitivanje kvaliteta semena samo jednom metodom ili jednim parametrom svakako nije dovoljno. Radi pouzdanog zaključivanja neophodno je kombinovati više metoda i ispitati više parametara.

Laička pa čak i klasična procena broja spermatozoida, pokretljivosti ili morfologije iz nativnog uzorka može lako da prevari. Tako, na primer, spermatozoidi mogu biti voma pokretni, ali su abnormalnog oblika ili promenjenih funkcija i čine psa neplodnim. Osim toga, veoma velika gustina semena može da prikriva morfološke abnormalnosti pa se čini da je većina spermatozoida zapravo pokretna.

Svaka osnovna procena statusa mužjaka treba da uključuje i procenu libida i procesa ejakulacije, određivanje zapremine sperme, procenu pokretljivosti spermatozoida (ukupne i progresivne), određivanje broja ćelija, kao i izradu razmaza radi citomorfološkog pregleda (određivanje procentualnog udela pojedinačnih ćelijskih formi). Zatim se analize dopunjuju bakteriološkim pretragama, antibiogramom, PCR testovima i hormonskim pretragama. Iz svega što je iz-

<sup>1</sup> Naučni institut za veterinarstvo „Novi Sad“, Novi Sad

<sup>2</sup> Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine



Slike 1-4. Psi dovedeni na kontrolu kvaliteta semena u Naučnom institutu za veterinarstvo „Novi Sad“

neto, nameće se potreba da se kvalitet semena sagleda primenom više metoda, od kojih svaka ponaosob pruža informacije o kvalitetu, morfoloiji, pokretljivosti i funkcionalnosti ćelija. Na posletku je neophodno pravilno tumačenje nalaza i postavljanje relevantne prognoze efekata terapije.

### **Kolekcija sperme – *normalan ejakulat psa***

Proizvodnja semena je kontinuiran proces i vrednosti koje se dobiju na dan analize predstavljaju trenutni „presek stanja“. Ove vrednosti se mogu promeniti u bilo kojoj fazi razvoja, delovanjem brojnih faktora kao što su nagle promene temperature, fizički stres ili bolest, putovanja, starost, karcinom, infekcije, dejstvo lekova, mikotoksina i užegle hrane. Kvalitet semena se može značajno poremetiti za 1–2 dana nakon povrede testisa, dok je za ispoljavanje dejstva drugih faktora potrebno duže vreme. Iz ovog razloga je uvek uputno da se izvrši procena semena u trenutku bliskom pripustu, a još bolje neposredno pred vreme pripusta, kako bi se osigurao adekvatan kvalitet semena za postizanje graviditeta. Zbog toga, samo jedan uzorak, odnosno prvi loš nalaz kvaliteta semena ne treba prihvatiti kao konačan i psa zbog toga proglasiti neplodnim.

Svetska zdravstvena organizacija promovise standardizaciju kontrole kvaliteta sperme ljudi i preporučuje kolekciju sperme nakon apstinencije ne kraće od 2, a ne duže od 7 dana i to sa dva odvojena uzorka prikupljena u razmaku od 7–21. dan. Češće kolekcije semena psa (razmaci manji od 48h) mogu dovesti do pada proizvodnje spermatozoida, ali mogu povećati pokretljivost i procenat morfološki normalnih formi. Ustaljeno je mišljenje da ejakulat nakon produžene apstinencije sadrži veći procenat morfološki abnormalnih spermatozoida usled njihovog starenja. Ovo nije potvrđeno kod pasa nakon 6 nedelja apstiniranja.

Naše su preporuke da se uzimanje uzorka ejakulata izvrši u posebnim prostorijama unutar klinike koje ne odvlače psu pažnju ili obližnjim veterinarskim stanicama ili odgajivačnici. Ako je pas uznemiren, sperma se može uzeti i na otvorenom prostoru. Ukoliko se ejakulat donosi u laboratoriju za reprodukciju, od momenta uzimanja ejakulata do momenta analize uzor-

ka ne bi trebalo da prođe više od 60 minuta. Semena treba transportovati na telesnoj temperaturi, još bolje na nižoj (do 15°C). Veća je opasnost od niskih temperatura (zimi) kada je bolje da se uzorkovanje radi pod kontrolom stručnjaka nego što je opasnost od visokih, letnjih temperatura.

Potrebno je da se pre kolekcije sperme najpre izvrši inspekcija i palpacija polnih organa i oce- ni konzistencija, pokretljivost testisa i epididimisa. Meki testisi dominantno ukazuju na odsustvo spermatogeneze (afunkcionalnost), a tvrdi na upalni proces, sa čestom asimetrijom epididimisa, sve do izostanka (urastanja) u testis. Ultrazvučni pregledi testisa i prostate mogu biti od koristi, kako bi se otkrio stepen eventualne kalcifikacije parenhima, postojanje apscesa ili hematoma.

Ukoliko su dlake na prepucijumu previše duge, treba ih ošišati i prepucijum obrisati vlažnim ubrusom. Ako pas ima veliku količinu smegme na kraju prepucijuma, ona se mora prvo obrisati papirnim ubrusom. Ako se u ejakulatu nađe mnogo belih krvnih zrnaca, važno je utvrditi da li su ona došla iz unutrašnjosti urogenitalnog trakta ili je u pitanju zagađenje smegmom. Mnogo je bolje da se uradi ponovna analiza sperme nego da se započne tretman psa na osnovu ovog zagađenja.

Tokom masturbacije se kontroliše libido i proces ejakulacije. Uvek preporučujemo vlasnicima da, po mogućstvu, dovedu kuju u estrusu tokom kolekcije semena, jer će se time obezbediti najrepresentativniji uzorak u pogledu kvaliteta i zapremine ejakulata. Za pse visokog libida, naviknute na manuelnu kolekciju, uzorkovanje sperme u stranom okruženju neće predstavljati problem. Nema sumnje da će broj spermatozoida biti veći ako se mužjak stimuliše kujom u estrusu pre ejakulacije. Ako kuja u estrusu nije dostupna, mogu se koristiti njihovi brisevi ili vaginalni ulošci koji se čuvaju u zamrzivaču do trenutka kolekcije.

Na tržištu postoje specijalne veštačke vagine za pse sa spermosabiračem i konusne najlonske kese, ali ako njih nema, često se praktikuje direktna kolekcija u najlonske zip kese meke konzistencije (slika 5.) ili kivete, posude veće zapremine (50 ml, slike 6. i 7.). Treba imati na umu da postoji spermotoksična plastika i da nisu svi sudovi pogodni za prikupljanje ejakulata.

Sperma psa se ejakulira u tri frakcije: (i) acelularna pre-spermalna frakcija (0,5 do 5,0 ml), koja potiče iz prostate; (ii) frakcija bogata spermom (1,0–4,0 ml) koja potiče iz testisa i epididimisa i (iii) frakcija tečnosti prostate (2,5–80 ml) koja takođe sadrži ćelije, ali je znatno ređa.

Prilikom kolekcije semena se procenjuje: lakoća postizanja erekcije stimulacijom, da li je erekcija bila normalna, konstantna ili opada tokom kolekcije, da li su prikupljene sve tri frakcije ejakulata, da li je makroskopski izgled normalan (bez primesa krvi ili urina). Sve ovo ukazuje na mogućnost prirodnog parenja kuje.

*Prva frakcija* ejakulata se izlučuje dok pas ne postigne punu erekciju i pri prvim trzajima. Ovu frakciju treba ispustiti na pod (odbaciti) jer se radi o proizvodima prostate i bulbouretralnih žlezda koji služe za čišćenje uretre i distalnog dela prepucijuma od urina, ćelijskih ostataka, zaostale sperme i leukocita. Njena opalescentna boja može pogrešno navesti na zaključak da je i ona bogata spermatozoidima. Uz to, ova frakcija obiluje bakterijama, pa treba izbeći kontaminaciju ejakulata.

*Druga frakcija* je bogata spermatozoidima i potiče iz epididimisa. Ona se obično luči sa maksimalnim otokom bulbusa, prestankom trzanja psa i praćena je kontrakcijama prostate. Pas teži da prekorači zadnje noge preko ruke kolekcionara neposredno pre izlučivanja druge frakcije. Ova frakcija je, uglavnom, prilično mala, obično 0,5 do 2 ml. Za potrebe zamrzavanja idealno je razdvojiti prvu, drugu i treću frakciju. Za ovo je

potrebna asistencija pomoćnika radi brze razmene sudova za kolekciju ili odgovarajući stalak u blizini. Prednost frakcionisanja je u tome što se izbegava zagađenje ejakulata urinom ili inflamatornim ćelijama, definiše se poreklo upalnih ćelija i isključuje potreba za centrifugiranjem (manja oštećenja zbog manipulacije) u pripremi za hlađenje (otpremanje semena za v.o.) ili za zamrzavanje semena.

*Treća frakcija* je najveća po obimu i potiče samo iz prostate. Njena svrha je ispiranje uretre od svih spermatozoida koji su ejakulirani, kako bi se obezbedio medijum za kretanje spermatozoida kroz lumen vaginalnog prostora do grlića – prednjeg kraja vaginalnog kanala materice. U toku ejakulacija treće frakcije, mogu se videti aktivne pulsacije oko anusa psa i duž perineuma.

Gubitak erekcije nastaje nakon što kolekcionar otpusti hvat penisa iza bulbusa i može se desiti brzo ili trajati nekoliko minuta. Tipično se treća frakcija luči sve dok traje erekcija. Procena boje frakcija je subjektivna, ali bilo koja abnormalnost boje neke od tri frakcije treba da usmeri kliničara prema drugim testovima radi dalje procene kvaliteta semena. Izvor sveže krvi (intenzivno crvena boja) u ejakulatu se mora razlikovati od oštećenja nastalog povređivanjem prilikom kolekcije, grubih sudova, grube manipulacije, strikture otvora prepucijuma, povrede uretre ili snažne erekcije. Seme boje kafe (mrko-smeđe boje), je indikator stare već razgrađene krvi i njeno prisustvo u trećoj frakciji ukazuje na hronične promene u prostati (slike 6. i 7.). Kod ljudi, ovo može biti povezano i sa mokraćnim kamencima,



**Slika 5.** Kolekcija semena kod jorkširskog terijera u zip kесе (iza nogu), uz prisustvo ženke.



**Slike 6 i 7.** Primer sveže krvi (povreda prilikom prikupljanja ejakulata, 2. frakcija, „gusto“ seme) i ustajale krvi u spermiji (prostate, 3. frakcija, „retko“ seme)

polno prenosivim bolestima, postojanjem spermatokele i hidrokele, kao i sa lečenjem antikoagulansima. Bistar izgled ukazuje da uzorak ne sadrži spermatozoide. Mlečni ili „oblačni“ uzorci verovatno sadrže spermatozoide, ali to uvek treba proveriti mikroskopiranjem. Povremeno, pas sa azoospermijom može dati prekomerni broj masnih kapljica u uzorku, dajući makroskopski izgled semena normalne gustine. Žuta sperma ukazuje na prisustvo urina, ali može biti i posledica žutice, kao i unošenja pojedinih vitamina.

Nakon kolekcije je dobro da se penis psa istušira velikim špricom sa fiziološkim rastvorom radi brže i lakše retrakcije u prepucijum.

Zatim se određuje količina ejakulata, najbolje u sterilnim graduisanim kivetama ili preciznim vagama. Upotreba većih špricewa sa gumenim vrhom na klipnu nije poželjna zbog spermicidnog efekta lateksa koji se nalazi na klipnu.

Zapremine sperme nije pokazatelj kvaliteta semena kod pasa. Međutim, merenje zapremine omogućuje izračunavanje ukupnog broja spermatozoida u uzorku, što je jedan od pokazatelja kvaliteta mužjaka. Zapremine semena nema uticaja na kvalitet ejakulata i važnija je koncentracija spermatozoida u ukupnom ejakulatu. Mogu se očekivati rasponi zapremine semena od 0,5 do 80 ml, pa i više, sve u zavisnosti od dužine kolekcije treće frakcije i veličine psa.

Neki psi nemaju jasno razdvojene frakcije, pa se iz tog razloga može desiti da se kvalitetan uzorak bogat spermom izgubi na samom početku uzorkovanja.

## Analiza sperme

Tačna procena sperme se može izvršiti uz minimalnu opremu: kese za kolekciju, mikroskop sa grejnom pločom, predmetnice i pokrovna stakalca (idealno 22×22 mm), pipete ili slamčice za transfer male količine semena (idealno 10 µl), komorica za određivanje broja spermatozoida, kao i boje za supravitalnu izradu razmaza radi citomorfološke analize. Svo stakleno posuđe treba zagrejati pre upotrebe. Do pregleda, seme je bolje čuvati na sobnoj temperaturi nego na temperaturi tela. Seme se analizira pod uvećanjem od 100–200 ×, gde treba pregledati najmanje pet polja komorice radi procene najmanje 200 spermatozoida. Subjektivno treba proceniti udeo ukupno i progresivno pokretnih spermatozoida.

## Mikroskopski pregled

Prva ocena ejakulata radi se na malom uvećanju (100 ×) radi sticanja opšteg uvida o kvalitetu i gustini semena. Programi CASA očitavaju parametre pokretljivosti upravo na ovom uvećanju.

Ako se ne može jasno uočiti pojedinačna pokretljivost svakog spermatozoida, tada se uzorak mora razrediti odgovarajućim razređivačima (fiziološkim rastvorom ili komercijalnim razređivačem). U našem slučaju, CASA softver toleriše maksimalnu gustinu do 300 ćelija u vidnom polju (idealno od 200–300 ćelija) kako bi se svaka pojedinačna putanja spermatozoida mogla analizirati bez ometanja.

U veterinarskoj medicini je tipičan odgovor da je normalan procenat progresivno pokretnih spermatozoida 70 ili veći. Malo je pasa koji će imati ukupnu pokretljivost preko 80 procenata a progresivnu preko 50. Veoma često se mogu videti nalazi za pokretljivost od 90 procenata, što uglavnom, ukazuje na nedostatak objektivne procene i nedovoljno razređenje semena kako bi se njihove individualne putanje mogle realno oceniti. Uvođenjem u praksu kompjuterskog sistema ocene semena to je postalo jasno vidljivo.

Brzina se takođe može proceniti i običnim mikroskopom kada spermatozoidi sa normalnom pokretljivošću treba da pređu mikroskopsko vidno polje za 2–3 sekunde. Kod pasa je procenat progresivno pokretnih spermatozoida u pozitivnoj korelaciji sa procentom morfološki normalnih ćelija. Morfološki normalni spermatozoidi koji su nepokretni, mogu biti posledica kontaminiranog posuđa, toplotnog šoka, postojanja nezrelih formi ili iz imunoloških razloga.

Prihvatljivi, normalni parametri za spermu psa bi mogli biti sledeći:

- ukupna pokretljivost: veća od 70 procenata (minimalno 40);
- progresivna pokretljivost preko 50 procenata (minimalno 30);
- najmanje 20 miliona spermatozoida po kg telesne mase (pas od 15 kg će imati najmanje 300 miliona spermatozoida). Većina normalnih pasa premašuje ove vrednosti za 2–3 puta, pa i više (minimalno 20 miliona);
- citomorfološki: više od 70 procenata morfološki normalnih spermatozoida (minimalno 40).

## Savremena kontrola analize semena pasa

Kompjuterska analiza semena i protočna citometrija omogućile su standardizaciju kontrole kvaliteta semena, ponovljivost, dokumentovanost i objektivnost ali i ispitivanje same funkcionalnosti i morfologije velikog broja ćelija u kratkom vremenu iz male zapremine uzorka. Danas postoje brojne analize određenih odeljaka ćelija, celine membrana, hromozoma, polarizacije mitohondrija, kapacitacije akrozoma, stepena oksidacije membrana, apoptoze, zrelosti spermatozoida, direktnog određivanja broja i vrsta bakterija i njihove vitalnosti u semenu.

Kod mužjaka koji nemaju reproduktivnih smetnji potrebno je da se uradi bar kompjuterska analiza semena (CASA, engl. *Computer Assisted Sperm Analysis*). Naš predlog je da se ipak uradi takozvana „Komplet analiza“ koja daje potpuniji uvid u oplodnu sposobnost mužjaka. Tako bi se isključila mogućnost da se na osnovnom ispitivanju semena ne uoče problemi u pokretljivosti i morfologiji spermatozoida, a da pri tome i dalje postoje problemi u plodnosti. Ona podrazumeva sledeće laboratorijske testove:

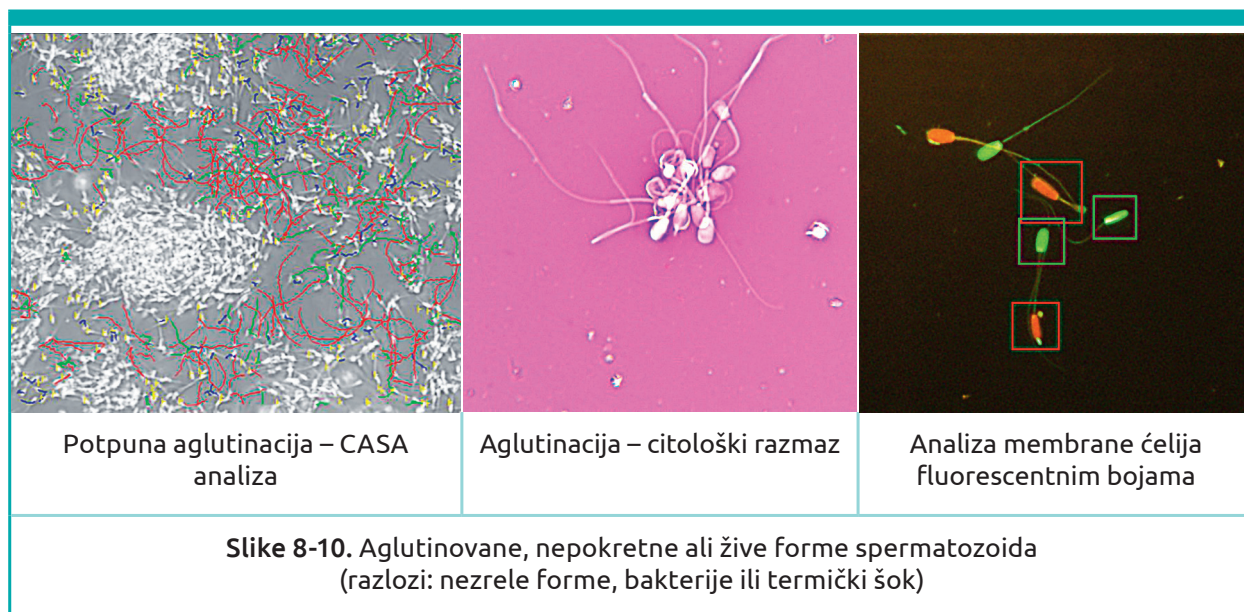
1. kompjutersku analizu semena radi određivanja koncentracije, ukupne i progresivne pokretljivosti, kao i ocenu parametara brzine i načina kretanja spermatozoida – CASA;
2. analizu semena protočnom citometrijom radi određivanja strukture hromatina spermatozoida (SCSA, engl. *Sperm Chromatin Structure Assay*) i test celovitosti membrane i akrozoma;

3. detaljno citomorfološko ispitivanje supra-vitalno obojenog razmaza uzorka semena sa bojama eozin-nigrozín-tripán plavo po Jovićinu (Alfapanon, Novi Sad), uz upotrebu imerzionog ulja i fazno-kontrastnog mikroskopa, na uveličanju od 1000 ×.

Zbog mogućnosti da se izvrši precizna ocena kvaliteta semena savremenim metodama i radi lakšeg praćenja toka oporavka, naša laboratorija praktikuje detaljniju podelu semena na 4 klase (I, II, i III i „van klase“). Normalne vrednosti, dopunjene internom klasifikacijom kvaliteta semena na klase, date su u tabelama 1–3.

Ejakulat se odbacuje (kao ocenjen „van klase“) pri sledećim nalazima: za CASA parameter – ukupno pokretnih spermatozoida <30 procenata, CASA progresivna pokretljivost ispod 20 procenata, ukupno pokretnih ćelija u dozi manje od  $20 \times 10^6$  spermatozoida u dozi. Takođe, seme mora da ima najmanje 40 procenata živih spermatozoida sa intaktnim akrozomom i manje od 40 procenata patoloških formi (na osnovu izvršenog citomorfološkog pregleda nakon supravitalnog bojenja).

Kod mužjaka sa bilo kakvim reproduktivnim smetnjama, pored prethodno navedenih analiza, u ispitivanje kvaliteta semena, mogu biti uključene i dodatne analize, po preporuci stručnjaka Instituta (bakteriološka pretraga uz antibiogram radi sprovođenja terapije, ispitivanje hormonskog statusa i PCR testovi za dokazivanje prisustva određenih uzročnika).



**Tabele 1-3.** Interne referentne vrednosti za kvalitet semena psa za različite metode analize

ISPITIVANA KARAKTERISTIKA (CASA analize)	JEDINICE MERE	REFERENTNA VREDNOST
Broj spermatozoida u ml	10 <sup>6</sup> /ml	100–500
Broj spermatozoida u ejakulatu	10 <sup>6</sup> /ml	300–2000
Ukupna poretljivost	procenat (%)	≥ 70
Progresivna poretljivost	procenat (%)	≥ 50

PROTOČNA CITOMETRIJA	I KLASA	II KLASA	III KLASA	VAN KLASE
Celovitost membrane	≥70%	50–69%	30–49%	<30
Oštećenje akrozoma	≤ 10%	11–20%	21–30%	>30
% oštećenja hromatina	≤ 15%	16–24%	25–30%	>30

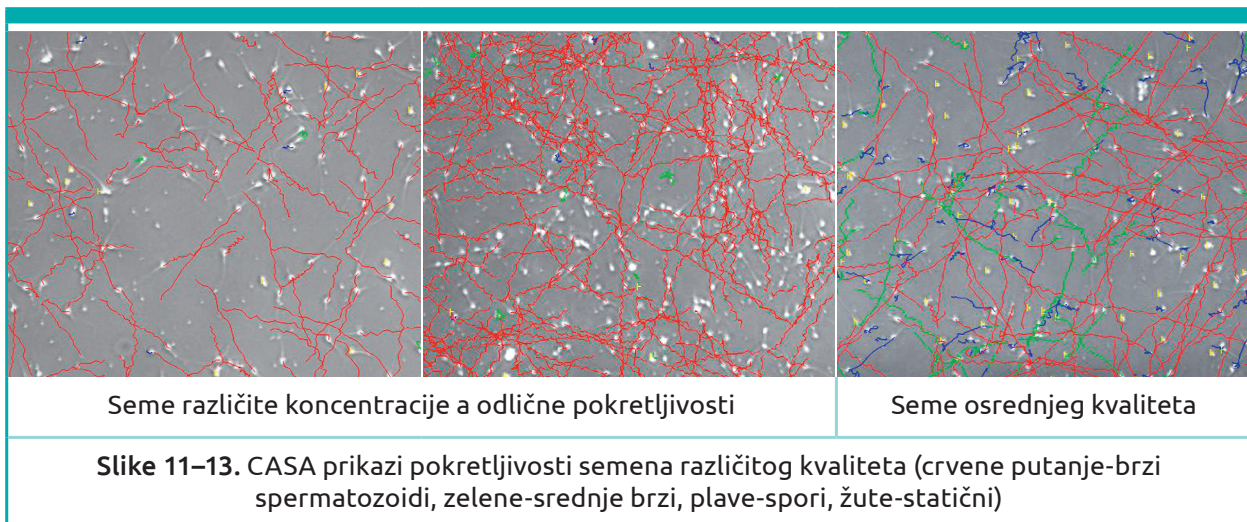
CITO-MORFOLOŠKO ISPITIVANJE (MIKROSKOPIJA RAZMAZA OBOJENE SPERME)				
NALAZ POJEDINIH SUBPOPULACIJA	I KLASA	II KLASA	III KLASA	VAN KLASE
1. Ukupno živi/neobojeni (Σ Ž)	≥90%	80–89%	60–79%	<60
2. Živi sa intaktnim akrozomom (ŽIA)	≥ 60%	46–59%	40–45%	<40
3. Živi sa oštećenim akrozomom (ŽOA)	≤5%	6–9%	10–15%	>15
4. Ukupno oštećenih akrozoma (Σ OA)	≤10%	11–20%	21–30%	>30
5. Ukupno sa prot. kapljicom (Σ% PPK)	≤10%	11–20%	21–30%	>30
6. Primarno abnormalni (I ABN)	≤5%	6–10%	11–15%	>15
7. Sekundarno abnormalni (II ABN)	≤5%	6–10%	11–15%	>15
8. Patološke forme, ukupno (Σ PAT)	≤15%	16–30%	31–40%	>40

### Koncentracija spermatozoida

Ukupan broj spermatozoida zavisi od veličine testisa i kod pasa, normalan ukupan broj spermatozoida treba da bude veći od 300 miliona. Treba napomenuti da i zdravi psi mogu dati oligozoospermičan ili azoospermičan ejakulat usled straha ili bola. U humanoj medicini, uzor-

ci koji su očigledno azoospermični se centrifugiraju na 3000 g tokom 15 minuta i sediment se sistematski ispita pre nego što se taj uzorak oceni kao potpuno aspermičan.

Dva slična ispitivanja su identifikovala starost pasa od 6 godina (kod rasa dalmatinac i rotvajler) kao granicu nakon koje dolazi do pada u koncentraciji i pokretljivosti spermatozoida.

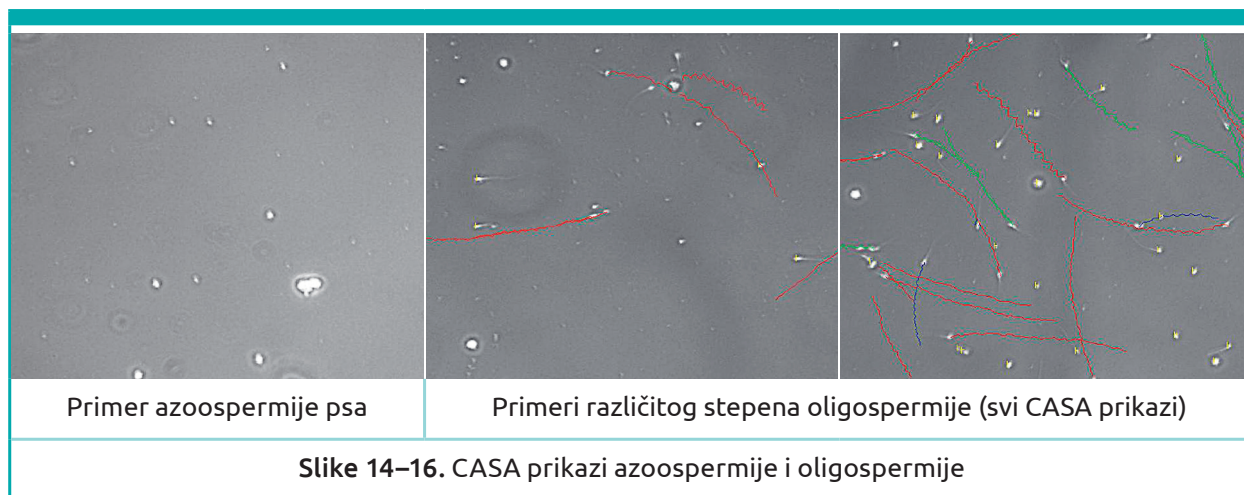


Varijacije u kvalitetu semena mogu biti i urođenog karaktera kao posledica parenja u srodstvu i to u visokom stepenu hereditarnosti za: broj spermatozoida i njihovu pokretljivost, stopu začeća i broj živorođenih mladunaca (0,125–0,558).

### Aspermija, azoospermija i oligospermija (prikazani prema težini nalaza, od težeg ka lakšem)

Ovi nalazi/problemi su slično, kao i kod ljudi, sve češći i kod pasa. Kod ovih slučajeva treba krenuti od starosti pasa. Ako su psi stari do jedne godine, treba odložiti novu analizu za 2–3 meseca, a starije pse treba uputiti na proveru nivoa hormona štitne žlezde. Ako je nivo hormona nizak (ili na donjoj granici normalnih vrednosti), neophodna je suplementacija hormonima T3/T4 što je pre moguće. Ova mana je uglavnom nasledna, pa je uputnije da se takve rodovske linije ne favorizuju. Kada se nivo hormona štitaste žlezde vrati u normalu, treba sačekati 6–8 nedelja pre nove provere broja spermatozoida. Ukoliko je broj spermatozoida još uvek nizak, tre-

ba primeniti specifično hormonsko lečenje. Ovo se odnosi na pse sa niskim brojem spermatozoida i normalnim nivoom hormona štitne žlezde. Hormoni koji se koriste za stimulaciju spermatogeneze su gonadotropni hormoni (nuspajava indirektnog delovanja GnRH kod mužjaka), a on takođe pojačava proizvodnju prirodnog testosterona koji stimuliše libido. Kod oligospermičnih pasa može se pokušati terapija sa 1 mg/kg preparata GnRH, a efekte terapije treba proveriti posle 4 nedelje. U slučaju pozitivnog odgovora, ponavlja se terapija preparatom GnRH i pas se upućuje na parenje. Ukoliko nema pozitivnog odgovora, treba pokušati terapiju humanim horionskim gonadotropinom (hCG), intramuskularno, sa 500 ili 1 000 IU po životinji. Efekti se mogu očekivati za 2–4 nedelje nakon tretmana. Treba znati da su ovi efekti uglavnom kratkotrajni, pa pozitivan skok i kvalitet semena, treba iskoristiti za parenje i/ili zamrzavanje. Ova terapija je retko efikasna kod azoospermičnih pasa. Injekcije testosterona su kontraindikovane za ovu grupu problematičnih pasa i neće stimulirati proizvodnju sperme, a čak mogu dovesti do dodatnog umanjenja broja spermatozoida.



Slike 14–16. CASA prikazi azoospermije i oligospermije

Tabela 4. Primer izveštaja hormonske pretrage psa sa niskim nivoom testosterona, uz referentne vrednosti

IZVEŠTAJ O ISPITIVANJU				
ANALIZA	REZULTAT	JM	REF. VREDNOSTI	METODA
Analize				
<b>ENDOKRINOLOGIJA</b>				
Testosteron	↓ 0,8	ng/mL	1.5–8.5	IMA#

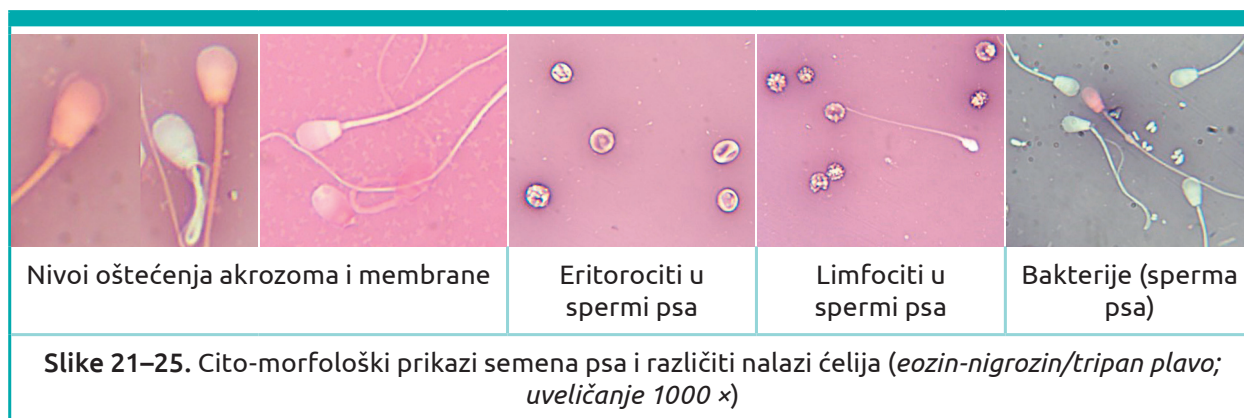
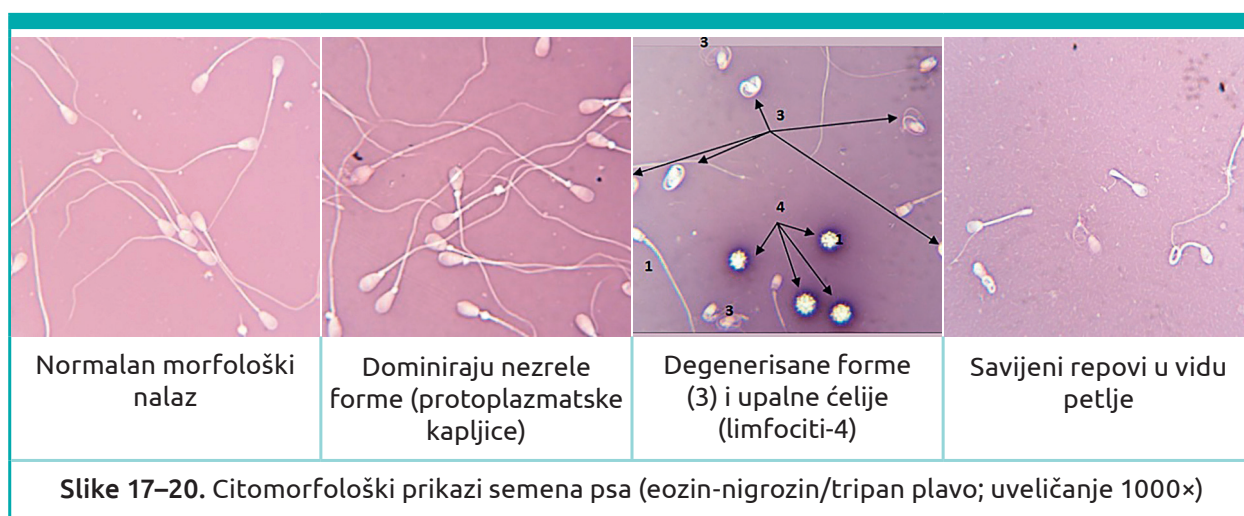
## Citomorfološka pretraga

Upotreba složenijih mikroskopa (sa faznim kontrastom) sa većim uveličanjem (do 1000 ×) i uz upotrebu imerzionih objektivna poboljšava tačnost pregleda. Ovo se posebno odnosi na prepoznavanje oštećenja akrozoma pri morfološkom pregledu. U našim ambulantomama nema ovih mikroskopa i to je razlog za obavljanje složenijih analiza u specijalizovanim laboratorijama.

Postoje brojne supravitalne boje koje se mogu koristiti za ovu namenu, a dve najčešće su eozin-nigrozin i Wright-Giemsa. Naša laboratorija koristi kombinaciju po Jovičinu (eozin-nigrozin i tripan plavo), kojom se nedvosmisleno može razlikovati, ne samo morfologija spermatozoida, već i njihova vitalnost. Živi spermatozoidi ne primaju boju i ostaju beli, dok spermatozoidi sa oštećenom membranom propuštaju boju i boje glave spermatozoida crvenom bojom. Ona se, opet, jasno razlikuje od pozadine (plavičasto-tamne boje). Takođe se jasno uočavaju primarna i sekundarna oštećenja spermatozoida, oštećenja akrozoma (zaključno sa trenutkom

odvajanja akrozoma) ili se oboji samo postakrozomalni region (trenutak uginuća spermatozoida, slike 20. i 21), prisustvo eritrocita, upalnih ćelija i bakterija (slike 22–25).

Morfološke abnormalnosti ukazuju na stepen (težinu promena) i lokalizaciju oštećenja (testis, epididimis), a jednim delom i na dužinu trajanja procesa (time i na dužinu potencijalnog oporavka). Abnormalnosti se klasifikuju kao: primarne, koje se pojavljuju tokom spermatogeneze ili sekundarne koje nastaju tokom sazrevanja ili pripreme uzorka za analizu. Nezrele forme se odlikuju protoplazmatskim kapljicama (PPK). Proksimalne nastaju u ranoj fazi i predstavljaju veći problem, dok distalne nastaju kasnije i taj problem je manji. Uzrok visokog udela PPK može biti višestruk i nespecifičan (intenzivna polna eksploatacija, visoka ambijentalna temperatura, lokalne infekcije ili prisustvo mikotoksina u hrani, eventualno i blago povećan broj leukocita u semenu). Ovaj nalaz može biti sa ili bez urinarne infekcije niskog intenziteta (rezultat nalaza urinokulture). Bitno je da je ukupan broj



patoloških formi minimalan. Uklanjanjem primarnog uzroka oporavak je brz (obično od 2 do 5 nedelja).

Stabilnost membrana se ogleda u vidu stabilnosti akrozoma (celovita ili nabubrela membrana, kljunasti akrozom i akrozom u trenutku odvajanja) ili celovitosti membrane spermatozoida. Akrozom je osetljiviji od membrane i promene na njemu su prvi indikator smetnji. Morfološke abnormalnosti mogu biti nasledne, kao što su kljunasti ili nabubrela akrozomi, okrugle glave, DAG defekat (presavijen rep spermatozoida sa zadržavanjem i bez zadržavanja citoplazmatске kapljice), uski-kruškoliki vratovi i tzv. dijadema defekat. Krajnje faze problema neplodnosti su aspemija ili obilje degenerisanih-abortivnih formi spermatozoida.

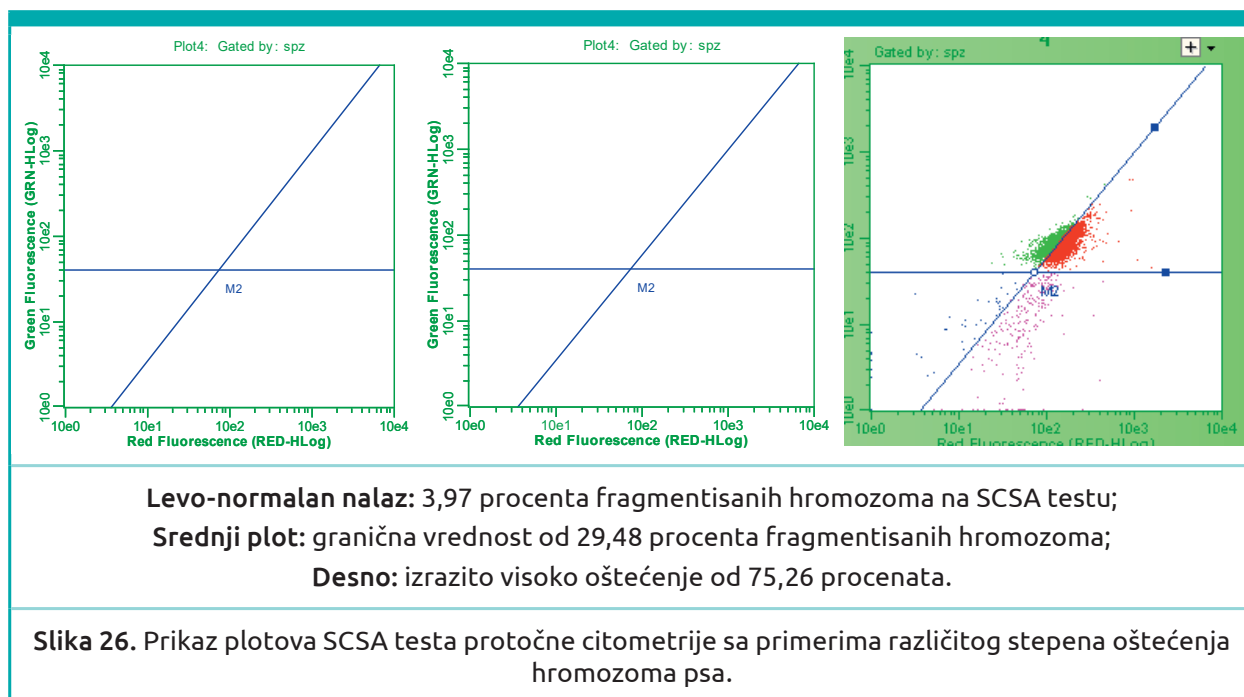
Drugi tipovi ćelija koje se mogu očekivati u ejakulatu su: epitelne ćelije prostate ili uretre, nezrele germinativne ćelije, eritrociti ili ćelije nastale u zapaljenskom procesu, bakterije i gljivice. Ovo je jasno vidljivo na razmazu (slike 21–25). Kvantifikacija leukocita se može izraziti u procentima (na 100 spermatozoida). Kod normalnih muških pasa, može se izbrojati do 2 000 leukocita/ml u prvoj i drugoj frakciji ejakulata. Nalaz upalnih ćelija nije u jasnoj korelaciji sa značajnim porastom bakterija iz semena pasa i kod 44 procenata pasa bez zapaljenskih ćelija u spermi, nalaze se u značajnoj meri aerobne bakterije.

## Određivanja strukture hromatina spermatozoida (SCSA test)

U poslednjoj dekadi, prikupljeni su brojni podaci o rezultatima oplodne sposobnosti semena ljudi i životinja koji ukazuju da stepen fragmentacije (degeneracije) DNK spermatozoida očigledno ima negativan uticaj na plodnost i broj potomaka kod pluriparih životinja (Evenson i sar., 2002). Bitno je naglasiti da ovaj pokazatelj apsolutno *nije povezan sa pokretljivošću spermatozoida* i ne mora biti u korelaciji sa promenama morfologije spermatozoida. U humanoј andrologiji, SCSA se navodi kao jedini metod koji je demonstrirao jasne i klinički korisne granične vrednosti za ocenu oplodne sposobnosti muškaraca. Ovo je standardizovan test i vrši se u skladu sa strogim protokolom koju su ustanovili Evenson i saradnici još 1985. godine.

### Primer uticaja povišenog udela oštećenih hromozoma kod sperme psa rase pit bul

Anamnestički podaci: starost psa – dve godine; pet pripusta sa 5 kuja (starih 2–4 godine); dobijeno 1–3 šteneta po leglu: prosečno 2,4. Sistemom CASA je uočena blaža oligospermija ( $62,8 \times 10^6$  spermatozoida/ml ali je ukupan broj spermatozoida u dozi dovoljan:  $571 \times 10^6$ ). Pokretnih spermatozoida je bilo 84,3 procenata, od čega 42,9 progresivno pokretnih i 32,2 neprogresivno pokretnih. Živih spermatozoida sa intaktnim akrozomom je bilo 84,0 procenata. Uzrok subfertiliteta psa koji se ogledao



u manjem broju štenadi po leglu je bio posledica fragmentacije DNK (čak 75,26 procenata spermatozoida sa oštećenim hromozomom).

## Bakteriološka ispitivanja

Gornja vrednost za ukupan broj bakterija u spermi iznosi 10 000 CFU/ml i u našim uzorcima prisustvo urinarnih infekcija je vrlo često. Ukupan broj bakterija iz nativne sperme uglavnom zavisi od higijene prilikom kolekcije i zdravstvenog statusa genitalnih organa. Izvori mikrobiološke kontaminacije sperme mogu biti životinjskog porekla kao što su opšta ili lokalna infekcija testisa ili drugih tkiva genitalnog trakta. Ona može poticati i od prepucijalne površine i izmeta tokom kolekcije. Kontaminacija neživotinjskog porekla potiče od od lica koje prikuplja spermu. U svakom slučaju, dobra praksa kolekcije semena za bakteriologiju podrazumeva uzimanje poduzorka iz srednjih mlazeva ili iz zbirnog uzorka, ali sa odbacivanjem prve frakcije.

Bakteriološka ispitivanja se vrše kultivacijom na krvnom agaru sa 5 procenata defibrinisane ovčije krvi, McConkey agaru i Sabouraud dekstroza agaru. Test za određivanje ukupnog broja aerobnih mikroorganizama sprovodi se iz serije razređenja ( $10^1$ – $10^5$ ) u puferizovanom peptonskom rastvoru, koji se inokuliše na Petrijeve ploče koje se zalivaju Trypton-Soja agarom. Ploče se inkubiraju tokom 48h, pri temperaturi od 37°C, pod aerobnim uslovima.

Sperma se ispituje i na prisustvo mikoplazmi molekularnom PCR tehnikom ili na specijalizovanim podlogama za mikoplazme. Slika 29 prikazuje karakterističan rast mikoplazmi. Pozitivan nalaz se beleži u oko 40 procenata testiranih

uzoraka sperme pasa koji su analizirani usled reproduktivnih problema. Ova statistička obrada je izvršena na 80 analiziranih uzoraka u NIV-NS.

Značaj prisustva bakterija zavisi od njihovog broja, vrste i osetljivosti na antibiotike. Negativni efekti se su spermicidno delovanje i kompeticija za hranljivim materijama i energijom. Njihovom aktivnošću dolazi do pada pH vrednosti, smanjenja nivoa glukoze i drugih šećera u razređivaču što ima negativan uticaj na kvalitet i održivost semena.

Od bakterijskih izolata se tokom infekcija najčešće nalaze:

- ***Streptococcus canis*** (obično u visokom broju  $\geq 5\ 000$  CFU/ml). Uzročnik je poznat po upalama mokraćnih puteva odraslih pasa, stvaranju apscesa na prostati i ranim pobačajima. Može se prenositi prilikom parenja, a prema antibiogramu je osetljiv na penicilinske preparate i fluorhinolone.
- ***Escherichia coli* (hemolitički soj) i *Ps. aeruginosa*** su uglavnom u visokom broju i različitog su stepena rezistencije, uglavnom, visokog (slike 27. i 28).

## Najčešći tretmani

U zavisnosti od nalaza, daje se odgovarajuća preporuka i to: od antibiotske terapije na osnovu antibiograma, potporne terapije, hormonske terapije, promene hrane, izbegavanja direktnom izalagnju sunca ili boravak u pretoplim/prehladnim psećim kućicama i šišanje psa u letnjem periodu. U zavisnosti od antibiograma, savetuje se uglavnom peroralni antibiotski tretman tokom 14 dana (fluorohinoloni u tabletama, doksiciklin, cefalosporini 4. generacije), ili dugodelujući lekovi (tulatromi-





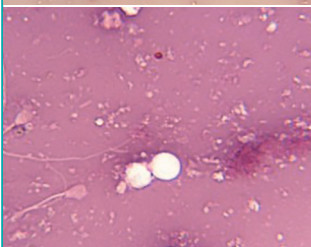
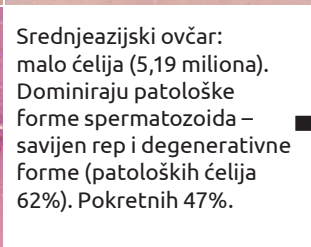

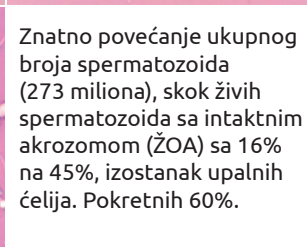

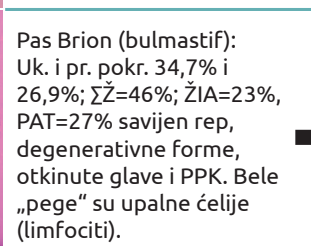

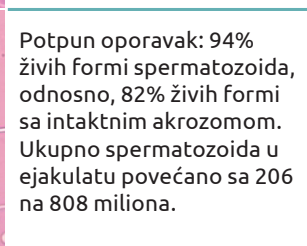


Visok stepen rezistencije na izolate iz semena na *Ps. aeruginosa* i *E. coli* (senzitivnost na 1/13 i 2/13 antibiotika).

Porast mikoplazmi na hranljivoj podlozi

**Slike 27–29.** Dopunska analiza ejakulata semena psa (bakteriološka pretraga, antibiogram, detekcija mikoplazmi – kultivacija na specijalnim podlogama).

## Nekoliko primera uspešne terapije pasa:

Mikrofotografije razmaza PRE TRETMANA	Mikrofotografije razmaza NAKON TRETMANA
<p>Kavkaski ovčar: prisustvo bakterija u semenu (gore levo) Degenerativne i patološke forme vrata i repa, aglutinacije, 30% pokretnih; ŽIA 4%; patoloških 65%.</p>  	<p>Bez aglutinacije. Procenat živih spermatozoida sada 97% (u odnosu na 25%), povećanje % ŽIA sa 4% i 16% na 77%) i pada ukupnog broja patoloških formi (sa 65% i 25% na 5%). Prisustvo protoplazmatskih kapljica je sada 16 % (ranije 36%).</p>  
<p>Srednjeazijski ovčar: malo ćelija (5,19 miliona). Dominiraju patološke forme spermatozoida – savijen rep i degenerativne forme (patoloških ćelija 62%). Pokretnih 47%.</p>  	<p>Znatno povećanje ukupnog broja spermatozoida (273 miliona), skok živih spermatozoida sa intaktnim akrozomom (ŽOA) sa 16% na 45%, izostanak upalnih ćelija. Pokretnih 60%.</p>  
<p>Pas Brion (bulmastif): Uk. i pr. pokr. 34,7% i 26,9%; ΣŽ=46%; ŽIA=23%, PAT=27% savijen rep, degenerativne forme, otkinute glave i PPK. Bele „pege“ su upalne ćelije (limfociti).</p>  	<p>Potpun oporavak: 94% živih formi spermatozoida, odnosno, 82% živih formi sa intaktnim akrozomom. Ukupno spermatozoida u ejakulatu povećano sa 206 na 808 miliona.</p>  

cin 0,2 ml za 7 kg TM, odnosno, 0,3 ml za 13 kg TM, pet puta na 5 dana). Preporučuje se jednokratni tretman vitaminsko-mineralnim preparatima AD<sub>3</sub>E i/m, uz kontinuiranu terapiju različitim komercijalnim preparatima – promotorima spermatogeneze, u vidu raznih mineralno-vitaminskih dodataka, karnitina, esencijalnih masnih kiselina i antioksidanata, takođe peroralno. Nakon antibiotskog tretmana, potrebno je izvršiti po-

novnu kontrolu kvaliteta semena (20 do 40 dana od završetka antibiotskog tretmana).

U zaključku ističemo da sistematska i ponovljena analiza kvaliteta semena, kombinovana sa više savremenih metoda, dopunjena povremenim bakteriološkim, serološkim i hormonskim pregledom, daje mogućnost pouzdane procene oplodne sposobnosti mužjaka, određivanje odgovarajuće terapije i moguću korekciju kvaliteta semena. ■

### Literatura:

- <https://www.akcchf.org/educational-resources/podcasts/podcast-transcripts/Canine-Semen-Evaluation-Dr-Cheryl-Lopate.pdf>
- Kawakami E, Hori T, Tsustui T, 1998, Changes in plasma LH and testosterone levels and semen quality after a single injection of hCG in two dogs with spermatogenic dysfunction, J Vet Med Sci, 60, 6, 765–7.
- Kustritz MVR, 2007, The value of canine semen evaluation for practitioners, Theriogenology, 68, 329–37.
- Milovanović A, Barna T, 2010, Analiza sperme psa sa malim brojem potomaka u leglu – prikaz slučaja, 21. savetovanje veterinarara Srbije sa međunarodnim učešćem, Zlatibor 15–18. septembar godine, Zbornik referata i kratkih sadržaja, Srpsko veterinarsko društvo, Beograd, 2010361–2,
- Milovanović A, Petrović T, Apić J, Lupulović D, Barna T, Lazić G, Lazić S, 2017, Boar Quality Semen Testing and Presence of Mycoplasma Organism. J Vet Sci Res, 2, 3, 000137.
- Morrow AD, 1987, Current therapy in Theriogenology, 2nd edition, published by W. B. Saunders Co, Philadelphia, USA.