

# Utjecaj hranidbe na rasplodnu sposobnost bikova

---

Oršoš Kumerički, Petra

Master's thesis / Diplomski rad

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Veterinary Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Veterinarski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:178:388095>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-30**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Veterinary Medicine -  
Repository of PHD, master's thesis](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
VETERINARSKI FAKULTET

Petra Oršoš Kumerički

UTJECAJ HRANIDBE NA RASPLODNU SPOSOBNOST BIKOVA

Diplomski rad

Zagreb, 2018.

Diplomski rad izrađen je na Klinici za porodništvo i reprodukciju te na Zavodu za prehranu i dijetetiku životinja Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Predstojnik Klinike za porodništvo i reprodukciju:

Prof. dr. sc. Marko Samardžija

Predstojnik Zavoda za prehranu i dijetetiku životinja:

Doc. dr. sc. Hrvoje Valpotić

Mentori rada:

Prof. dr. sc. Marko Samardžija i doc. dr. sc. Hrvoje Valpotić

Povjerenstvo za obranu diplomskog rada:

1. Izv. prof. dr. sc. Martina Lojkić
2. Doc. dr. sc. Hrvoje Valpotić
3. Prof. dr. sc. Marko Samardžija
4. Izv. prof. dr. sc. Nino Maćešić (zamjena)

## **ZAHVALE**

Dužnost mi je i zadovoljstvo zahvaliti se:

Mentorima, prof. dr. sc. Marku Samardžiji i doc. dr. sc. Hrvoju Valpotiću koji su mi svojim znanjem i iskustvom pomogli u izradi ovog rada. Mojim roditeljma koji su mi omogućili studij i bili mi podrška tokom godina studiranja. Mom suprugu koji je bio uz mene u završnim fazama studija. Djelatnicima Veterinarske stanice Križevci koji su mi približili svijet terenskog veterinarstva. Kolegama koji su kroz godine prerasli u prijatelje.

Mama, hvala ti što mi nisi dala da odustanem kad je bilo najteže, ovaj rad posvećujem tebi.

## SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
2. BIOTEHNOLOGIJA RASPLOĐIVANJA.....	2
2.1. Umjetno osjemenjivanje .....	4
3. SJEME.....	6
3.1. Metode polučivanja ejakulata .....	6
3.1.1. Umjetna vagina .....	7
3.1.2. Masaža <i>per rectum</i> ampula sjemenovoda .....	8
3.1.3. Elektroejakulacija .....	8
3.2. Postupak s ejakulatom nakon polučivanja .....	9
3.2.1. Makroskopska pretraga ejakulata .....	9
3.2.2. Sanitarna ocjena ejakulata .....	10
3.2.3. Mikroskopska ocjena ejakulata.....	10
3.2.4. Ocjena integriteta stanične membrane spermija .....	11
3.2.5. Ocjena statusa akrosome.....	12
3.2.6. Morfološke pretrage ejakulata .....	12
3.3. Razrjeđivanje i konzerviranje ejakulata.....	13
3.3.1. Duboko smrzavanje sperme .....	13
4. VANJSKI UTJECAJI NA KVALITETU SJEMENA .....	15
4.1. Utjecaj klimatskih faktora.....	15
4.2. Utjecaj hranidbe.....	16
4.2.1. Intrauterini razvoj .....	19
4.2.2. Infantilni period .....	19
4.2.3. Predpubertetski period .....	20
4.2.4. Pubertetski period .....	21
4.2.5. Povezanost metabolizma hranjivih tvari i reprodukcije .....	21
5. ZAKLJUČCI.....	23
6. SAŽETAK.....	24
7. SUMMARY .....	25
8. POPIS LITERATURE .....	26
9. ŽIVOTOPIS .....	32

## 1. UVOD

Govedarstvo se smatra najvažnijom sastavnicom stočarstva, a kao takvo i jednom od najvažnijih grana poljoprivrede općenito te je temelj razvoja ukupne stočarske proizvodnje i od višestruke je gospodarske važnosti. S milijun i pol hektara pašnjaka i livada u povoljnim klimatskim uvjetima, Republika Hrvatska ima visok potencijal za uzgoj goveda koji se, s obzirom da ne zadovoljavamo ni vlastite potrebe za mlijekom i goveđim mesom, nedovoljno ostvaruje. U Republici Hrvatskoj, prema Državnom zavodu za statistiku, prošle je godine (2017.) bilo 451.000 grla stoke. Premda to predstavlja rast od 1,6% u odnosu na godinu prije, nastavlja se trend pada broja krava i junica. S obzirom na važnost i isplativost govedarstva, Hrvatska poljoprivredna agencija intenzivno radi na razvoju i unaprijeđivanju govedarske proizvodnje u Republici Hrvatskoj. Za unaprijeđenje govedarske proizvodnje važno je provođenje uzgojnih programa čije su glavne aktivnosti ažuriranje matične knjige, odabir najboljih grla (bikovske majke) te odabir teladi za selekciju, izrada plana umjetnog osjemenjivanja (UO) prema modelu planskog križanja, kontrola uzgoja u srodstvu, odabir i ocjena bikova za prirodni pripust, ocjena fenotipskih karakteristika krava te prikupljanje podataka o plodnosti. Osnova govedarske proizvodnje su mliječne krave, ali i telad za proizvodnju goveđeg mesa (KARADJOLE, 2012.). U svakoj proizvodnji pa tako i u govedarskoj, teži se što višoj produktivnosti za što je nužno osigurati što bolje uvjete držanja i managementa. Već je napomenuto da su u Hrvatskoj geografski i klimatski uvjeti povoljni, ali je logično da je temelj uspješnog govedarstva genetika, dakle potrebna su kvalitetna grla.

Poznato je da svaka vrsta odnosno pasmina u uzgoju zahtijeva određene uvjete za postizanje svog biološkog potencijala, pravilna hranidba, odgovarajući smještaj, očuvanje zdravlja kao i stupnja iskorištavanja. No, da bi se moglo govoriti o postizanju biološkog potencijala, a time i optimalnog uzgoja, određeni potencijal mora postojati već po rođenju što upućuje na izuzetnu važnost genetike te sugerira izbor kvalitetnog genetskog materijala. Međutim, do toga je nemoguće doći bez kvalitetne rasplodne životinje i stoga je taj proces poput zatvorenog kruga u kojem je teško odrediti početak, ali i dati odgovor na pitanje što je od navedenog najznačajnije. Sve to govori u prilog činjenici da je uzgoj zahtjevan proces za koji je nužan širok spektar znanja iz područja veterinarske struke, ali i nekih drugih područja, posebice genetike-umjetne selekcije.

## 2. BIOTEHNOLOGIJA RASPLOĐIVANJA

Rasplodivanje domaćih životinja moguće je jedino tijekom tjeranja (gonjenja) ili estrusa, kada na jajnicima dolazi do pucanja Graafovih folikula, tj. ovulacije, a ženka pokazuje želju za parenjem što je vidljivo iz niza vanjskih znakova i promjena u ponašanju rasplodnih krava i junica (TOMAŠKOVIĆ i sur., 2007.). Međutim, u muških životinja, ne postoji određeno razdoblje za rasplod, već su bikovi sposobni za izlučivanje sjemena u bilo kojem trenutku uz odgovarajuće podražaje. Naprotiv, reproduktivna sposobnost rasplodnih krava i junica ograničena je cikličkom aktivnosti jajnika, ali i vremenski s obzirom na trajanje graviditeta i perioda nakon partusa, prije sazrijevanja novog folikula i ponovne ovulacije. Naime, od samo jednog kvalitetnog ejakulata bika nakon razrjeđenja može se dobiti 150 do 200 doza, odnosno potencijalno 150 do 200 potomaka. Iz tih se razloga oduvijek za rasplod držalo znatno više plotkinja od rasplodnjaka, a posjedovanje rasnog rasplodnjaka smatralo se statusnim simbolom i privilegijom uspješnih i bogatih stočara. Prije uspostavljanja postupaka UO-a na suvremenoj razini koje je gotovo u potpunosti zamijenilo prirodni pripust, odabir rasplodnjaka, a time i genetike bio je ograničen dostupnošću rasplodnjaka ovisno o udaljenosti, ali i financijskim mogućnostima s obzirom da se i tada svaki skok naplaćivao ovisno o kvaliteti bika, a slično se i danas cijena doze sjemena mijenja. Osim toga, problema je bilo i s takozvanim „profesionalnim bolestima“ rasplodnih bikova poput impotencije i psihičkih problema uzrokovanih pojačanom seksualnom aktivnošću, ali i spolnim bolestima koje su se na taj način širile među rasplodnim životinjama. Gotovo potpunim prijelazom s prirodnog pripusta na UO, intenziviranjem stočarske proizvodnje i sve višim kriterijima u unaprijeđivanju genetike, veterinarima se otvorio izuzetno širok spektar djelatnosti koje uključuju sam postupak umjetnog osjemenjivanja, ali i suzbijanje steriliteta, manipulaciju sjemenom te brigu o rasplodnjacima s ciljem dobivanja vrhunskog sjemena, koje u svakom slučaju zahtijevaju visoko specijalizirane stručnjake.

UO je prva generacija biotehnologije rasplodivanja, a prvo potvrđeno uspješno UO krava u Hrvatskoj zabilježeno je 1943. godine od strane akademika Božidara Oklješe, tadašnjeg predstojnika Porodiljske klinike, Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. To je stručni zahvat kojim se spermiji unose u određene dijelove spolnih organa ženki na umjetan način, što je ujedno i jedino „umjetno“ u tom postupku. Stoga možda ni nije najbolji izraz „umjetno osjemenjivanje“, ali to je doslovan prijevod s njemačkog koji se nakon godina korištenja uvriježio i kod nas. Druga generacija biotehnologije rasplodivanja je embriotransfer na čijem uvođenju i primjeni se u nas počinje raditi 1992. godine osnivanjem Laboratorija za

asisitiranu reprodukciju na Klinici za porodništvo i reprodukciju Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Prvo tele oteljeno nakon uspješnog embriotransfera evidentirano je u rujnu 1995. godine. Multipla ovulacija i embriotransfer (MOET) je biotehnologijska metoda rasplodivanja koja uključuje postupke superovulacije, UO, ispiranja maternica krava davateljica i transfer svježih ili duboko smrznutih/odmrznutih zametaka u sinkronizirane krave primateljice. Ekonomske prednosti primjene embriotransfera uključuju: ubrzanje genetskog napretka stada proizvodnjom velikog broja potomaka od elitnih plotkinja, mogućnost međunarodnog transporta i trgovine duboko smrznutim zametcima čime se smanjuje potreba dugotrajnog transporta i aklimatizacije živih životinja, očuvanje ugroženih vrsta i pasmina te primjenu drugih metoda biotehnologije rasplodivanja kao što je dijeljenje zametaka te određivanje spola zametaka (TOMAŠKOVIĆ i sur., 2007.). Treća je generacija biotehnologije rasplodivanja proizvodnja goveđih zametaka *in vitro* (IVP) (engl. *in vitro production*), što uključuje dobivanje goveđih jajnih stanica od živih davateljica ili iz klaoničkog materijala te njihovo *in vitro* dozrijevanje (IVM) (engl. *in vitro maturation*) i oplodnju (IVF) (engl. *in vitro fertilization*), uzgoj oplodjenih jajnih stanica u inkubatoru (IVC) (engl. *in vitro culture*) tijekom sedam do osam dana te nekirurški transfer u sinkronizirane krave primateljice. Za dobivanje jajnih stanica krava danas se najviše koristi metoda transvaginalne ultrazvučne aspiracije jajnih stanica (OPU) (engl. *ovum pick up*) koji ima prednost nad MOET protokolima time što se očituje u mogućoj količini proizvedenih zametaka. Naime, kod MOET-a se davateljica može ispirati 3-4 puta godišnje i prosječno dati 5-8 zametaka dok se primjenom OPU tehnike može proizvesti 3-4 puta više zametaka, odnosno do 50 zametaka tijekom 6 mjeseci. Što se Hrvatske tiče, istraživanja oplodnje i uzgoja *in vitro* započela su 1997. godine u Laboratoriju za asistiranu reprodukciju Klinike za porodništvo i reprodukciju Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, a prvo IVP tele oteljeno je u travnju 2001. godine. Kao i u drugih postupaka gdje se čovjek uključuje u procese prirodne reprodukcije i provodi postupke kontrole s ciljem smanjenja rizika prijenosa zaraznih bolesti, tako je i kod IVP tehnike propisan protokol od strane Međunarodnog društva za embriotransfer (IETS) (engl. International Embryo Technology Society). Najznačajnije primjene IVP-a u govedarstvu su zaobilaženje nepredvidivog superovulacijskog odgovora i nekih poremećaja u spolnim organima davateljica, proizvodnja zametaka iz jajnih stanica dobivenih ultrazvučnom punkcijom jajnika ili laparoskopski, kontrola i spriječavanje širenja zaraznih bolesti, skraćivanje generacijskog intervala proizvodnjom zametaka od ženske teladi prije puberteta, dobivanje toвне teladi transferom zametaka u mliječne krave, dijeljenje zametaka u svrhu dobivanja blizanaca, utvrđivanje plodnosti bikova koji se koriste za UO,



ubrzanje postupaka progenog testiranja bikova, proizvodnja transgeničnih životinja, odnosno kloniranje (TOMAŠKOVIĆ i sur., 2007.). U manipulaciju genomom, kao postupak četvrte generacije biotehnologije rasplodivanja, primjenom *in vitro* tehnika, ubraja se i određivanje spola zametaka (seksiranje), dijeljenje zametaka, kloniranje, transgeneza, korištenje seksirane sperme za IVF, proučavanje smrtnosti zametaka, i dr.

## 2.1. Umjetno osjemenjivanje

Kako je već spomenuto, UO je prva generacija biotehnologije rasplodivanja, prva je otkrivena, najduže se izvodi pa je i na neki način postala standard u praksi i redovito se izvodi na terenu. Osobito medicinsko značenje UO je u obveznom ginekološkom pregledu prije samog postupka što omogućuje ranu dijagnostiku mogućih spolnih zaraza (genitalna kampilobakterioza, trihomonijaza, bruceloza i dr.), patoloških stanja organa reproduktivnog sustava, kao i izlučivanje neplodnih životinja radi smanjenja daljnjih ekonomskih troškova. Tri su osnovne pretpostavke na kojima se temelji uspješnost UO: 1.) da spermiji mogu preživjeti izvan tijela, 2.) da se nakon toga mogu aplicirati u spolne organe ženke na način koji će rezultirati prihvatljivim uspjehom koncepcije te 3.) da se može otkriti plodni period ženke (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.). Kod osjemenjivanja važno je odrediti optimalno vrijeme u kojem će se ono izvesti. Najčešće vlasnik telefonski obavijesti veterinarsku stanicu ili ambulantu da je zamijetio znakove gonjenja u životinje i želi da se ona osjemeni u njegovoj štali. Premda je ta metoda organizacije UO najskuplja, ona prevladava i daje najbolje rezultate. Ovulacija se u krava i junica zbiva između 1 i 16 (oko 10-12) sati nakon prestanka vanjskih znakova estrusa, 6 sati je potrebno da jajna stanica prođe trećinu puta kroz jajovod prilikom čega je moguća oplodnja, što ukupno traje oko 30 sati od pojave vanjskih znakova estrusa. Naime, spermiji postaju plodni nekoliko sati nakon boravka u spolnim organima ženke, nakon perioda kapacitacije. Shodno tomu, plotkinje čije se gonjenje otkrije ujutro, osjemenjuju se tog popodneva, a kad se gonjenje primjeti popodne, osjemenjivanje se obavlja drugi dan u jutarnjim satima. Bez obzira na opažanja i tvrdnje vlasnika o vanjskim znakovima gonjenja, plotkinje je prije postupka UO potrebno vaginalno i rektalno pregledati te ovisno o nalazu odlučiti o provođenju UO. Prilikom pregleda važno je obratiti pozornost na prisutnost hiperemije, otvorenost cerviksa, kvalitetu estrusne sluzi te Graafov folikul. Ukoliko se utvrdi da je već došlo do pucanja folikula i ovulacije, UO se može provesti, no uz upozorenje vlasniku da će se plotkinja vrlo vjerojatno pregoniti. Ukoliko do pucanja folikula, odnosno ovulacije dođe prilikom samog pregleda, pregon je također moguć, no manje je vjerojatan nego u slučaju ranijeg puknuća Graafovog folikula. Za uspjeh koncepcije, značajna je i

količina sjemena te mjesto i način aplikacije sjemena. Bik, poput ovna i jarca, kod prirodnog pripusta ejakulira u rodnicu plotkinje što se naziva vaginalnim tipom polaganja sjemena. Kod takvog tipa, ejakulati su malog volumena i velike gustoće i samo 5% ukupne količine ejakulata dopijeva u cerviks dok ostalih 95% propada u rodnici zbog nepovoljnih uvjeta. Iako su u cerviksu uvjeti za preživljavanje bolji nego u rodnici, mnogi spermiji propadnu i na putu od cerviksa do jajovoda čime postotak ejakuliranih spermija s mogućnošću oplodnje pada na svega 2%. Stoga se u postupku UO, sjeme polaže duboko intracervikalno ili u samo tijelo maternice da bi se izbjeglo prosipanje sjemena i propadanje brojnih spermija u rodnici. Što se tehnika osjemenjivanja tiče, primjenjuje se nekoliko tehnika i to: vizualno osjemenjivanje, izvlačenje cerviksa Albrechtsenovim kliještima, manocervikalna tehnika i bimanualna metoda s fiksacijom cerviksa. Provjera uspjeha postupka UO vrši se pregledom krava na gravidnosti rektalno ili ultrazvučno, anketom ili *non-return* metodom, a uspješnost samog osjemenjivača ili ambulante može se procijeniti temeljem indeksa osjemenjivanja (IP) koji se izračunava dijeljenjem ukupnog broja utrošenih doza sjemena s brojem steonih krava. Ukoliko je njegova vrijednost ispod 1,4, smatra ga se vrlo dobrim (TOMAŠKOVIĆ i sur., 2007.).

### 3. SJEME

Proizvodnja kvalitetnog duboko smrznutog sjemena je preduvjet za uspješno umjetno osjemenjivanje. Zdravi bikovi su selekcionirani, kako po svojim genotipskim i fenotipskim karakteristikama, tako i po kvaliteti sjemena koje daju. Uobičajena procjena sjemena koja se provodi prije i nakon krioprezervacije uključuje određivanje koncentracije spermija, njihove pokretljivosti i morfologije. Ovi parametri obično su dovoljni za ocjenu fertiliteta, ali ostaje otvoreno pitanje može li se pomoću njih predvidjeti fertilitet bikova čija je sperma ocjenjena kao dobra (RODRIGUEZ-MARTINEZ, 1998.).

Pod pojmom sperma, podrazumijeva se ejakulat koji se stvara i izlučuje od spolne zrelosti do senilnosti ejakulacijom ili polucijom. To je višekomponentna tekućina koja se sastoji od korpuskularnih elemenata i sjemene plazme te se pod određenim uvjetima na mahove izbacuje kroz vanjski otvor, a iznomno kroz unutarnji otvor uretre u mokraćni mjehur. Koliko je ejakulat složen i zašto spada među najsloženije biološke produkte organizma govori njegov kemijski sastav. Naime, ejakulat sadrži jednostavne i složene aminokiseline, ugljikohidrate, enzime, organske kiseline, soli te vitamine, dakle sve elemente koje nalazimo u živim organizmima. Sjemena plazma bika sadrži pet različitih vrsta šećera: ribozu, fruktozu, glukozu, heksuronsku kiselinu i još jedan neidentificirani ugljikohidrat. Kemijski sastav spermija, sekreta epididimisa i sekreta akcesornih spolnih žlijezda međusobno se razlikuju. Volumen ejakulata bika kreće se od 2 do 12 mL i sadrži od 300 milijuna do 2 milijarde spermija (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.).

#### 3.1. Metode polučivanja ejakulata

Preduvjet za uspješno konzerviranje sjemena je dobivanje kvalitativno i kvantitativno zadovoljavajućeg ejakulata (CERGOLJ, 1989.). Ejakulat se od bika, u nas, najčešće dobiva pomoću umjetne vagine, no moguće je i *per rectum* masažom ampula sjemenovoda te elektroejakulacijom. Prije svega, potrebno je umjetno osigurati uvjete koji i prirodno dovode do ejakulacije - podražaj taktilnih tjelešaca na glansu penisa odgovarajućom temperaturom i pritiskom te skliskost koja omogućuje kopulatorne pokrete kada se koristi umjetna vagina. Kriteriji koji moraju biti zadovoljeni kod polučivanja ejakulata su sljedeći: (1) mora se polučiti cjelokupni ejakulat, (2) ne smije biti onečišćen, (3) postupak ne smije oštetiti spermije i (4) samo polučivanje mora biti neškodljivo po rasplodnjaka i spermioogenezu. Do ejakulacije dolazi nakon podražaja centra za ejakulaciju u kralježničnoj moždini. S obzirom da u prepucijalnom ispirku dobro držanih bikova nema ili ima vrlo malo bakterija i ejakulati se

uglavnom kontaminiraju prilikom postupaka polučivanja, važno je da je sav pribor za polučivanje i manipulaciju s ejakulatom steriliziran da ne dođe do onečišćenja ejakulata, što može rezultirati infekcijom ženskih spolnih organa i oštećenjem spermija te smanjenom plodnošću (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.).

### 3.1.1. Umjetna vagina

Prva umjetna vagina konstruirana je 1914. godine za psa, a imala je kruškolik oblik, gumeno tijelo s dvostrukim stijenkama unutar kojih se ulijevala topla voda za postizanje odgovarajuće temperature. Prototip današnjih umjetnih vagina konstruirao je 1931. ruski znanstvenik Milovanov, a bila je primarno namjenjena ovnovima. Umjetne vagine koje se danas koriste sastoje se od dviju gumenih cijevi – vanjske i unutarnje vagine, gdje je vanjska cijev tvrda, a unutarnja meka. Umjetna vagina za bika duga je 35-55 cm, a široka oko 6 cm i vodom se puni samo do polovice da bi ostalo dovoljno prostora za penis. Da bi došlo do ejakulacije, umjetna vagina mora zadovoljiti potrebne uvjete: temperatura, pritisak i skliskost (MILJKOVIĆ i VESELINOVIĆ, 2005.). Prostor između unutarnje i vanjske vagine koje se fiksiraju prstenovima, puni se vodom temperature 50-55 °C da bi se unutrašnjost zagrijala na temperaturu između 41 °C i 43 °C, a ujedno i ostvario pritisak na taktilna tjelešca glansa penisa od 40-60 mmHg. Temperatura ima najznačajniji utjecaj na glans penisa u bika, kao i u ovna, jarca te pastuha, zbog čega je izuzetno važno odrediti da je ona odgovarajuća prije samog postupka. Naime, ukoliko je temperatura niža od 40 °C refleks ejakulacije će izostat, a ukoliko je viša od 43-44 °C nije pogodna, dok temperatura viša od 45 °C osim što štetno djeluje na spermije može dovesti i do ozlijede penisa. Osim toga, ako se rasplodnjak navikne na previsoku temperaturu, normalna ga više neće podraživati. Kako je uz temperaturu i pritisak, značajna i skliskost, prva trećina unutrašnje vagine premazuje se steriliziranim lubrikantom. Ejakulat se hvata u specijaliziranu posudicu koja se pričvrsti na nepodmazanu stranu umjetne vagine – spermohvatač. Za bikove postoje dvostjenčani spermohvatači kod kojih je prostor između stijenki ispunjen parafinskim uljem pa se prije uporabe zagrije u termostatu da bi se izbjegao temperaturni šok spermija, a ujedno i usporilo hlađenje prije daljnjih postupaka s ejakulatom. Sukladno volumenu ejakulata bika, spermohvatači koji se koriste su volumena 10-15 mL. Da bi se simulirali uvjeti koji prirodno dovode do refleksa ejakulacije, potrebno je rasplodnjaka na neki način potaknuti na skok. Najbolja stimulacija je ženka u estrusu, no da bi se spriječila mogućnost prirodnog opasivanja prilikom čega može doći do infekcije rasplodnjaka nekom spolnom zaraznom bolešću, ali i ozljede krave s obzirom da su rasplodni bikovi najčešće preteški za većinu krava, uglavnom se koriste

fantomi ili drugi bikovi. Važno je biku ošišati sve dlake oko prepucija i sve pripremiti prije nego ga se izvede i ne mu dopustiti skok odmah da bi mu se pojačao libido. Umjetna vagina stavlja se s desne strane životinje, odnosno fantoma koji se koristi za skok te se erigirani penis lijevom rukom usmjerava u otvor vagine s lubricirane strane. Manipulacija penisom mora biti pravilno i pažljivo izvedena pošto svaka grubost i nepravilnost može dovesti do usporavanja ili zaustavljanja spolnih refleksa s posljedičnim dobivanjem nekvalitetnog ejakulata ili rezultirati potpunim izostankom ejakulacije. U pravilnom postupku ejakulacija nastupa nakon malog broja kopulatornih pokreta za svega nekoliko sekundi poslije čega se umjetna vagina skida u smijeru penisa uz naginganje da bi se sav ejakulat slio u spermohvatač. Tako dobivenu spermu potrebno je zaštititi od svjetlosti i hlađenja (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.).

### 3.1.2. Masaža *per rectum* ampula sjemenovoda

Druga metoda kojom se može polučiti sjeme u 75-80% bikova je masaža *per rectum* ampula sjemenovoda. Na taj način dobije se veća količina nešto rjeđeg ejakulata s manjom količinom spermija u mililitru. Iako je ta metoda prikladna za pojedinačne terenske pretrage ejakulata u svrhu dobivanja saznanja ima li rasplodnjak ejakulat i jesu li spermiji živi, njome nije moguće dati konačnu ocjenu volumena i koncentracije ejakulata te pokretljivosti spermija. Što se tiče pripreme prije izvođenja ove metode, potrebno je očistiti ampulu rektuma od fecesa, odstraniti dlake na prepuciju te oprati prepucij vodom i sapunom, dezinficirati ga i osušiti. Nakon toga, u rektum se ubrizga 1-2 litre vode temperature 40 °C i započinje se masaža. Kombinacija tople vode i masaže kroz nekoliko minuta trebale bi rezultirati ejakulacijom (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.).

### 3.1.3. Elektroejakulacija

Ukoliko nijedna od ovih metoda ne rezultira uspjehom, može se primjeniti elektroejakulacija. U tom slučaju se zapravo ne postiže ejakulacija već polucija s obzirom da se električnom strujom podražuje samo centar za ejakulaciju u lumbosakralnom dijelu kralježnične moždine i vegetativni živčani sustav, a ne i centar za erekciju te nisu zastupljeni svi spolni refleksi. Postupak je bolan i nesiguran, a ejakulat je često onečišćen i pomiješan s mokraćom i krvlju. Sperma polučena na taj način je različite kakvoće, a količina ejakulata je mala (CERGOLJ, 1989.). Dva su načina postizanja elektroejakulacije: pomoću dvije elektrode i pomoću jedne bipolarne elektrode. Prema postupku se bik prvo fiksira u stojnici, ošišaju mu se dlake na i oko prepucija, prepucij se ispere s 200 mL fiziološke otopine pa se još 250-500 mL fiziološke otopine irigatorom ulije u rektum zbog bolje električne provodljivosti. Nakon

takve pripreme, u rektum se ugura elektroda i pušta se struja napona 10-20 V, jakosti 0,13-0,15 A kroz 5-6 sekundi s pauzama iste duljine trajanja. Bik reagira savijanjem kralježnice i podrhtavanjem mišića te se nakon nekog vremena opusti i dolazi do istjecanja ejakulata (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.).

### 3.2. Postupak s ejakulatom nakon polučivanja

Za dobivanje što objektivnije ocjene, ejakulat se po polučivanju mora zaštititi od štetnih utjecaja – nagle promjene temperature, izravne svjetlosti, hipotonije, hipertonije, itd., što se postiže stavljanjem začepljenog spermohvatača u vodenu kupelj na 35-37 °C. Neposredno nakon polučivanja, rade se usporedno sanitarna i makroskopska ocjena ejakulata. Osim makroskopske i sanitarne ocjene ejakulata, procjenjuje se i kvaliteta samih spermija. Za ocjenu sperme, najbolje je koristiti ejakulat dobiven umjetnom vaginom, no uzorak se može uzeti i neposredno nakon pripusta iz vagine žive životinje ili masažom ampula sjemenovoda *per rectum*, no u tim slučajevima ocjena neće biti potpuna. Sperma se ocjenjuje radi određivanja svojstava dobivenog ejakulata, kontrole preživljavanja spermija poslije pohrane, konzerviranja i prije osjemenjivanja te da bi se ocjenila plodnost ili ustvrdila neplodnost rasplodnjaka (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.).

Ukoliko je polučeno sjeme namjenjeno dubokom zamrzavanju da bi se kasnije koristilo za UO, najčešće se koristi ejakulat dobiven umjetnom vaginom i ocjenjuje ga se po najstrožim kriterijima. Sperma može biti ocjenjena kao izvrsna, vrlo dobra i dobra. Prvi korak u ocjenjivanju su sanitarna i makroskopska ocjena ejakulata koje se provode usporedno, nakon čega se pristupa mikroskopskoj pretrazi i ocjeni kvalitete spermija (SAMARDŽIJA i CERGOLJ, 2012.).

#### 3.2.1. Makroskopska pretraga ejakulata

Makroskopska pretraga obuhvaća volumen, boju, miris, konzistenciju i pH ejakulata. Svrha joj je ustanoviti prikladnost ejakulata za razrjeđivanje, konzerviranje i UO. Usprkos primjeni niza fizikalnih, kemijskih i biokemijskih ocjena da bi se utvrdio potencijal sperme za daljnje, navedene postupke, objektivna procjena sposobnosti spermija da oplode jajnu stanicu, može se dokazati isključivo biološkim pokusom. Tako primjerice sperma bikova ima fiziološki volumen između 5 i 7 mL, boja joj je slabo žućkasto-bijela do krem nijanse, miris se u literaturi navodi kao miris pečenog kestena, no u praksi se najčešće osjeti miris gume zbog umjetne vagine. Međutim, važno je samo da ejakulat nema miris mokraće, truleži ili

neki drugi neugodan miris, jer ga se u tom slučaju odbacuje. Konzistencija ejakulata odgovara onoj vrhnja dok mu je pH 6,2-6,8. Svako odstupanje od fizioloških vrijednosti upućuju na određena stanja u organizmu kojima se onda pridaje dodatna pažnja kod sanitarne ocjene (SAMARDŽIJA i CERGOLJ, 2012.).

### 3.2.2. Sanitarna ocjena ejakulata

U sanitarnoj ocjeni, osim ejakulatu, pridaje se pažnja i općem stanju rasplodnjaka, tj. obavljaju se kliničke pretrage s obzirom da se za UO može koristiti isključivo sjeme potpuno zdravih rasplodnjaka. Iako nema direktnog kontakta rasplodnjaka i plotkinje, spolne zarazne bolesti mogu se prenijeti i UO ukoliko se sve pripremne radnje ne provedu po pravilima struke. Iz tog su razloga obvezne pretrage rasplodnjaka primarno na zarazne spolne bolesti, poput genitalne kampilobakterioze i trihomonijaze, ali i na brucelozu, tuberkulozu i leukozu (HERAK, 1991.). Makroskopska pretraga ejakulata upućuje na određene promjene unutarnjih spolnih organa, odnosno upalna žarišta u njima, kao što su primjerice upale sjemenih vrećica, prostate ili epididimisa, što također može biti opasno za plotkinje. Takve promjene otkrivaju se androloškim pretragama koje obuhvaćaju inspekciju vanjskih spolnih organa, palpaciju testisa, epididimisa, kože skrotuma, pomičnosti testisa u skrotumu i *funiculusa spermaticusa*, pretragu prepucija, otvora prepucija i njegove sluznice te pomičnost spolnog uda u prepuciju. Također, potrebno je utvrditi odgovara li veličina skrotuma i testisa pasmini i dobi životinje, jesu li lijeva i desna strana skrotuma simetrične i ima li eventualno nekih patoloških promjena na skrotumu. Ejakulat s primjesama krvi, mokraće ili nekih vanjskih onečišćenja nastalih nepravilnim postupkom prilikom polučivanja, nije za uporabu i kao takav se odbacuje (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.).

### 3.2.3. Mikroskopska ocjena ejakulata

Što se mikroskopske ocjene ejakulata tiče, ona obuhvaća ocjenu pokretljivosti, gustoću, postotak živih i patološki oštećenih spermatozoida. Važno je da se kap sperme koju se pretražuje stavlja na unaprijed zagrijano stakalce pošto je metabolizam spermija smanjen na nižim temperaturama. Stakalce se zagrije na 35-40 °C na spermotermu ili biotermu ili, ukoliko to nije dostupno, na direktnom plamenu ili trljanjem rukama. Spermiji se mogu kretati progresivno, manježno ili kružno, retrogradno, ili mogu biti u stanju mirovanja, odnosno postupno bez gibanja. S obzirom da se nepomične i spermije koji se ne pokreću progresivno unaprijed smatra nesposobnima za oplodnju, ocjena pokretljivosti obuhvaća samo spermije koji se pokreću progresivno prema naprijed. Ukoliko takvih spermija nema u uzorku, a

spermiji se kreću na druge načine ili titraju u mjestu, sperma dobiva oznaku K, što predstavlja kolebljivo kretanje, dok se sperma bez pokretnih spermija označava s N, što predstavlja nepokretne spermije. Ocjene kojima se označava sperma s progresivno pokretljivim spermijima su od 1-5 i ovise o postotku istih u uzorku, pri čemu ocjena 5 označava najveći postotak takvih spermija, odnosno više od 90% u uzorku i najpogodnija je za daljnju manipulaciju i korištenje za UO (SAMARDŽIJA i sur., 2003.). U bika se za daljnji postupak obrade i zamrzavanje koristi sperma s minimalnom ocjenom 4 što je 80% progresivno pokretljivih spermija, a samo izuzetno 70%, isključivo u bikova čiji ejakulati dobro podnose zamrzavanje (PRKA, 2010.). S obzirom na visoku koncentraciju spermija, u ejakulatu bika može se ustvrditi tzv. masovno gibanje koje može biti vihorenje, jako valovito, valovito ili slabo valovito. Masovno gibanje može izostati uz ipak zamjetne pokrete ili ejakulat može potpuno mirovati. Osim pokretljivosti, od oka se procjenjuje i gustoća odnosno koncentracija ejakulata te kategorizira kao gusta, srednje gusta i rijetka. Gusta sperma ili sperma densum označava se slovom G i predstavlja ejakulat s više od 800 milijuna spermija u mililitru, a prepoznaje se tako što u vidnom polju ima toliki broj spermija da između njih ne može stati glava spermija po širini. Ukoliko je prostor između spermija dovoljne širine za glavu spermija smatra se da je u takvom ejakulatu između 500 i 800 milijuna spermija i on dobiva oznaku SG – semidensum. Sperma rarum, s oznakom R, ima vidljive veće razmake između spermija i sadrži manje od 500 milijuna spermija po mililitru. Osim od oka, na temelju razmaka među spermijima, gustoću sperme, tj. koncentraciju spermija u ejakulatu, preciznije se može odrediti brojanjem spermija u određenoj koncentraciji ejakulata u komorici po Thoma-i koja inače služi za brojanje eritrocita. Postoji i najjednostavniji način, uporabom elektronskog aparata (CASA) koji automatski razrjeđuje spermu i daje najpreciznije podatke o njenoj gustoći (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.).

#### 3.2.4. Ocjena integriteta stanične membrane spermija

Lipoproteinska ovojnica koju spermiji tijekom spermiogeneze dobivaju u epididimisu, osim što im daje oblik, njezina kvaliteta direktno utječe na vitalnost i sposobnost spermija da oplode jajnu stanicu. Mnogi autori smatraju da se najbolja procjena plodnosti postiže upravo ocjenom integriteta stanične membrane spermija. Osim toga, CERGOLJ i SAMARDŽIJA (2006.) spominju biološke metode – ocjenu rezistencije spermija i otpornost integriteta prema 1% NaCl, naglim temperaturnim promjenama te preživljavanje pri niskim odnosno visokim temperaturama, a od ostalih metoda i supravitalno bojenje po Bloom-u, fluorescentne testove CFDA, Calcein AM (CAM) i SYBR-14 s propidij jodidom za ocjenu strukturalnog identiteta



stanične membrane spermija te test hipoosmotskog bubrenja (HOS test) za ocjenu funkcionalnog integriteta stanične membrane spermija (SAMARDŽIJA i sur., 2006.).

### 3.2.5. Ocjena statusa akrosome

Prednji dio spermija pokriva opna koja je formirana iz Golgijevog aparata, a zove se akrosoma i sadrži nekoliko enzima od kojih su najznačajniji akrozin i hijaluronidaza. Ocjena statusa akrosome predstavlja značajni kriterij za procjenu sposobnosti spermija da oplodi jajnu stanicu. Kod dobro pokretljivih spermija bika, brojni istraživači su uočili na glavi spermija oštar apikalni rub dok su na nepokretnima jasno vidljive promjene akrosomalnog dijela. Opisana je i pojava kod koje su se neki nepokretni spermiji s oštrim akrosomalnim rubom, a bez oštećenja, nakon nekog vremena ponovno počeli gibati, ali su pronađeni i mrtvi spermiji neoštećene akrosome. Neke od metoda koje se koriste za ocjenu akrosome spermija su: 1. test dvostrukog bojanja – tripansko modriilo-Giemsma, 2. Fast green FCF/Eozin B, 3. Eosin B – anilinsko modriilo i 4. testovi lektinskog modrila (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.).

### 3.2.6. Morfološke pretrage ejakulata

Morfološke pretrage ejakulata na prisutnost patoloških spermija vrše se pod povećanjem od 400 do 1000 puta (PRKA, 2010.). Različite su metode pripreme preparata, a najuobičajeniji su tzv. tuš-preparati ili nigrozinski preparati. Kada se ocjenjuju finije promjene u građi spermija, u nas se najčešće koriste metode bojanja po Blumenschein-u i Karras-u. Patološki oblici spermija dijele se na više načina. Patološke promjene mogu biti primarne i sekundarne, ovisno jesu li nastale kao posljedica poremećaja u spermiogenezi ili u epididimisu ili još kasnije. Ovisno o mjestu nastanka dijele se na abnormalnosti glave, akrosome, vrata, spojnog dijela ili repa. Mogući su i teratomni oblici spermija koji se očituju višestrukim glavama i repovima, samo repovima ili repovima poput meduze. Dopusćeni postotak patoloških oblika spermija u ejakulatu bika iznosi 18%. Neke od većih abnormalnosti oblika spermija su nerazvijene stanice, krunasto oštećenje, spiralno oštećenje srednjeg dijela, protoplazmatska kapljica, pseudokapljica, deformacija repa uključujući nabiranje i zavrnuće srednjeg dijela spermija tzv. „dag defect“ i dr., dok u manje spadaju nepravilne veličine glava ili otpale normalne glave, presavijeni ili zavrnuti rep i dr. U pretraženom uzorku mogu se pronaći i ostali stanični elementi kao što su epitelne stanice, eritrociti, zdjelaste stanice, mononuklearne stanice i neutrofilni. Kod morfološke pretrage,

veliku ulogu ima napredak tehnologije pa se u centrima za UO koristi CASA koja daje točan uvid u karakteristike ejakulata (NOAKES i sur., 2009.).

### 3.3. Razrjeđivanje i konzerviranje ejakulata

Ukoliko je ejakulat zadovoljio kvalitetom prilikom ocjenjivanja, pristupa se razrjeđivanju i konzerviranju ejakulata da bi ga se kasnije koristilo za UO i to što prije s obzirom na intenzivne metaboličke procese koji se počinju odvijati odmah po ejakulaciji. Sposobnost oplodnje i preživljavanja spermija ovise o općem zdravstvenom stanju rasplodnjaka, zdravstvenom stanju spolnih organa, pravilnoj i kvalitetnoj prehrani, vrsti, pasmini i starosti, klimi i godišnjem dobu, zoohigijenskim uvjetima te učestalosti spolnog iskorištavanja. Međutim, za očuvanje spermija na životu u trenutku kad je sperma polučena i ocjenjena te će se dalje obrađivati, koriste se razne metode kojima se stvaraju bolji uvjeti za život spermija. U ejakulat se dodaju tvari koje spermiji najviše troše i odstranjuju se ili neutraliziraju štetni produkti metabolizma. Spermije se može očuvati živima i pothlađivanjem ili snižavanjem pH ejakulata čime se intenzitet procesa staničnog disanja i glikolize smanjuje na najmanju mjeru. Spermije se prilikom svih postupaka mora zaštititi od naglih temperaturnih promijena i promjena pH, uključujući i razrjeđivače koji moraju osigurati izotoniju i odgovarajući pH. Svrha razrjeđivača je povećanje volumena ejakulata da bi se mogao podijeliti na više doza te da bi se njime moglo oploditi što veći broj plotkinja s ciljem unaprijeđenja genetike i dobivanja velikog broja kvalitetnog podmlatka. Razrjeđivači su vodene otopine ili emulzije elektrolita, neelektrolita i ostalih aditiva koji poboljšavaju biološke karakteristike spermija, imaju svojstva pufera te osiguravaju izotoniju za spermije. Dijele se na sintetičke i prirodne. Sintetički razrjeđivači mogu biti obični ili distenderi, zaštitni ili protektori, bioaktivni ili implementori te tzv. specijalni razrjeđivači koji se koriste pri specijalnim metodama konzerviranja sperme, kao što je duboko smrzavanje te kiselinska i kemijska inaktivacija (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.). Najpoznatiji prirodni razrjeđivač za spermu je kravlje mlijeko. Ono ima istu depresiju ledišta kao i sperma domaćih životinja. Mlijeko sadrži mliječni šećer i cijeli niz biološki aktivnih tvari koje spermiji mogu koristiti u staničnom metabolizmu (CERGOLJ, 1989.).

#### 3.3.1. Duboko smrzavanje sperme

Spermij, visoko polarizirana i specijalizirana stanica tijekom završne faze spermatogeneze gubi sposobnost biosinteze, oporavka, rasta i diobe stanica (YOSHIDA, 2000.). Konzerviranje podrazumijeva smanjenje ili potpuno zaustavljanje metabolizma

spermija, ali se time produžava njihov životni vijek. Snižavanjem temperature na 4 °C smanjuje se stanični metabolizam i time produžuje životni vijek spermija. Naime, spermiji imaju veoma ograničenu biosintetičku aktivnost i ovisni su uglavnom o kataboličkim procesima, stoga preostala metabolička aktivnost neodloživo dovodi do smrti stanice uslijed unutrašnjih procesa starenja (HAMMERSTEDT i ANDREWS, 1997.). Od tri poznate metode konzerviranja sperme – duboko smrzavanje, kiselinska inaktivacija i kemijska inaktivacija, metoda izbora za bičju spermu je duboko smrzavanje.

Zamrzavanje se definira kao postupak očuvanja biološkog materijala u zamrznutom stanju na temperaturi od oko - 80 °C, no u praksi je materijal zamrznut na temperaturi tekućeg dušika, tj. -196°C. Tehnologija zamrzavanja sjemena, otkrićem glicerola kao krioprotektora prije više od 50 godina, ušla je u široku uporabu nakon što je postignuta zadovoljavajuća plodnost uporabom bičje sperme razrijeđene u žumanjčano-citratnom razrjeđivaču (POLGE i sur., 1949., POLGE i ROWSON, 1952.). Proces krioprezervacije uključuje postepeno smanjivanje temperature, staničnu dehidraciju i zamrzavanje. Oštećenje i oksidativni stres spermija posljedica su temperaturnih promjena tijekom hlađenja, štetnog djelovanja sastavnica razrjeđivača i samog krioprotektora te štetnog djelovanja postupka odmrzavanja (VISHWANATH i SHANNON, 2000.). Razaranja i smrt stanice prilikom zamrzavanja ovisi o veličini, mjestu i brzini stvaranja kristala leda koji mogu razoriti strukturu stanice. Hlađenje treba biti dovoljno sporo da se iz stanice osmozom izvuče što više vode. Zbog toga se klasičnom „sporom“ metodom smrzavanja razrijeđeni ejakulati hlade postupno (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.). No, unatoč optimalnim tehnikama zamrzavanja ovaj postupak ne preživi oko 50% populacije spermija pokretnih prije smrzavanja. Unutar preostale pokretne populacije, subletalna oštećenja narušavaju funkcionalnu aktivnost spermija u usporedbi s nativnim sjemenom (SHANNON i VISHWANATH, 1995.). To su razlozi zbog kojih se za krioprezervaciju koristi samo najkvalitetnija sperma s najvećim postotkom pokretnih spermija.

#### 4. VANJSKI UTJECAJI NA KVALITETU SJEMENA

Nakon što je opisano na koje načine se dolazi do sjemena, kako mu se procjenjuje kvaliteta i koliko je ona važna za kasniju manipulaciju njime, koji su postupci sa sjemenom u svrhu unaprijeđenja genetike i dobivanja visokovrijednog podmlatka s ciljem podizanja stočarske proizvodnje na višu razinu, nameće se povratak na sam početak – kvalitetnu spermu. Jasno je da postoje parametri po kojima sperma ima višu ili nižu ocjenu pa se time smatra boljom ili lošijom, i koristi za UO. Međutim, postavlja se pitanje može li se i kako utjecati na rasplodnjaka da bi ta sperma bila što vrijednija to jest, da bi rasplodna sposobnost bika čije se karakteristike trebaju ispoljiti na potomstvu bila što veća. Sezonske prilagodbe u reprodukciji preživača odgovor su na milijune godina okolišnih čimbenika kojima su životinje izložene već od davno prije domestikacije i agrarne reforme. Usprkos 11000 godina ljudskog utjecaja na okoliš i odabir rasplodnjaka, mnoge su karakteristike stečene evolucijski i dalje prisutne (MARTIN i sur., 2010.).

##### 4.1. Utjecaj klimatskih faktora

TUCKER I OXENDER (1980.) analizirali su sezonske učinke na plodnost mužjaka. U hladnijim klimatskim uvjetima plodnost je niža zimi, i to u bikova starijih od šest godina. No, u bikova mlađih od četiri godine plodnost je najniža ljeti, što upućuje na to da su mlađi bikovi osjetljiviji na visoke temperature, a stariji na hladnoću. Rađeni su pokusi na različitim vanjskim temperaturama pa su tako dobiveni slijedeći rezultati: na temperaturama većim od 29 °C nije uočena promjena u volumenu ejakulata, dok je pokretljivost, postotak živih i ukupan broj spermatozoida opadao s povećanjem vanjske temperature. Spermatogeneza pada s temperaturama većim od 30 °C. *Non-return* vrijednosti bile su najmanje za sjeme uzimano od bikova tijekom kolovoza i rujna, a propadanje spermatozoida koji su prošli zamrzavanje bilo je brže ljeti nego u sjemena koje je uzimano tijekom kasne jeseni do proljeća. Postotak koncepcije bio je niži kada je sjeme uzimano i zamrzavano pri vanjskoj temperaturi većoj od 26 °C i u krava koje su osjemenjivane pri temperaturama većim od 26 °C, u odnosu na sjeme koje je uzimano i zamrzavano kada je vanjska temperatura bila manja od 26 °C, a osjemenjivanja obavljana pri temperaturama manjim od 26 °C. Osim oslabljene spermatogeneze, prilikom izlaganja hipotermiji, niža je i razina testosterona (GWAZDAUSKAS, 1985.).

## 4.2. Utjecaj hranidbe

Uzrast i masa kada nastupa pubertet ovise o pasmini i razini prehrane tijekom razvoja. Utjecaj hranidbe, odnosno osjetljivost organizma na unos hranjivih tvari jedan je od općenito najznačajnijih faktora u razvoju sisavaca, primarno zato što je opskrba hranjivim tvarima esencijalna za laktaciju (MARTIN i sur., 2010.). Postoji puno podataka o utjecaju hranidbe na vrijeme ulaska u pubertet i veličinu testisa u teladi. Opseg testisa jednogodišnjih bikova čije majke su bile prvotelke manji je nego u podmlatka krava koje su se više puta telile. To može biti posljedica niže proizvodnje mlijeka kod prvotelki, intrauterinih uvjeta ili kombinacije ovih faktora (BARTH i sur., 2008.). Također, pretpostavlja se kako razlike u hranidbi bikova prije ulaska u pubertet (BRITO i sur., 2007.a, c, d), pa čak i u hranidbi njihovih majki (SULLIVAN i sur., 2010., JAQUIREY i sur., 2012.) mogu utjecati na njihov razvoj u kasnijim stadijima života. Unos visokoenergetske hrane majki za vrijeme prvog tromjesečja ima negativne posljedice na reproduktivne performanse njihovog podmlatka (BOLLWEIN i sur., 2017.). Poznato je da postoji veza između tjelesne mase i spolnog razvoja (BRITO i sur., 2012.) stoga se na više načina radilo na poboljšanju intenziteta rasta muške teladi, međutim dobiveni su kontradiktorni rezultati koji su ovisili o korištenim dodatcima prehrani (BOLLWEIN i sur., 2017.). Postoje čak i izvješća o negativnom utjecaju visokoenergetske hranibe u periodu puberteta na zdravlje i reproduktivnu sposobnost bikova (COULTER i KOZUB, 1984., COULTER i sur., 1987.). Hranidba ima dvojak utjecaj na fiziologiju reproduktivnog sustava rasplodnjaka; na metaboličke i reproduktivne centre u mozgu i na neovisne mehanizme što posljedično dovodi do promjena u otpuštanju gonadotropin-oslobađajućeg hormona (GnRH) (HÖTZEL i sur., 1995.). Rezultat dovodi do promjena u masi testisa i efikasnosti spermatogeneze. SETCHELL i sur. (1965.) počeli su otkrivati fiziološke procese metabolizma glukoze u testisima i otkrili da pothranjenost smanjuje metaboličku aktivnost i cirkulaciju krvi u samim testisima (SETCHELL i sur., 1965., SETCHELL i HINKS, 1967.).

Jasno je da životinja mora ući u pubertet da bi se moglo govoriti o plodnosti iste. Istraživanja na različitim pasminama pokazala su da je praktični pokazatelj puberteta obujam testisa između 27 i 29 cm (MUKHOPADHYAY i sur., 2011.) odnosno obujam testisa min. 28 cm, a koncentracija spermija 50 milijuna po mililitru ejakulata s minimalno 10% progresivno pokretnih spermija (WOLF i sur., 1965.). No, činjenica da je bik u pubertetu te da proizvodi spermiju ne znači nužno i da je ona visokofertilna (PRKA, 2015.). Kvaliteta i količina sperme nastavljaju rasti kroz nekoliko mjeseci poslije početka proizvodnje. Samo oko 35%, 60% i

95% bikova starosti 12, 14 i 16 mjeseci, reproduktivno sazrije i proizvodi sjeme dobre kvalitete (BARTH, 2000.). COLLINS i sur. (1962.), su u svom istraživanju obuhvatili 90 bikova Holstein i Guernsey pasmine, podijeljene u dvije skupine. U prvoj skupini su imali mlade netestirane bikove, koji su dostizali maksimum s 2 godine pa padali s plodnošću, a u drugoj progno testirane bikove stare 5 do 6 godina. U obje pasmine zamijećen je isti trend nakon postizanja vrhunca plodnosti s 2 godine, a to je vidljiv pad vrijednosti *non-returna* koji se nastavlja sve do isključenja bika.

Koncentracija fruktoze i citrata u sjemenoj plazmi, od najranijih je istraživanja temeljni pokazatelj utjecaja hranidbe na proizvodnju testosterona. Testiranjem jednog bika, MANN i WALTON (1953.) dokazali su kako pothranjenost utječe na smanjenje proizvodnje testosterona, što su potvrdili DAVIES i sur. (1957.) na temelju istraživanja skupine mlađih bikova. Takav utjecaj na bikovima u fazi rasta potvrđen je mjerenjem koncentracije testosterona u samom testisu (MANN i sur., 1967.) i koncentracije testosterona u plazmi (GAUTHIER i BERBIGIER, 1982.).

Na temelju koncentracije gonadotropina i testosterona u krvnoj plazmi, spolni razvoj bikova može se podijeliti na tri razdoblja: infantilno, predpubertetsko i pubertetsko. U infantilnom, koje traje od rođenja do osam tjedana starosti, koncentracije gonadotropina i testosterona su niske (AMANN i sur., 1986., RAWLINGS i sur., 2008.). U predpubertetskom, od osmog tjedna do dvadesetog tjedna starosti istovremeno dolazi do prolaznog porasta koncentracije gonadotropina i povećane sekrecije testosterona (AMANN i WALKER, 1983., BARTH i sur., 2008., RAWLINGS i sur., 2008.). Koncentracija luteinizirajućeg hormona (LH) počinje rasti u bikova starosti 4-5 tjedana i doseže svoj maksimum kada bikovi dosegnu 12-16 tjedana nakon čega pada i doseže osnovicu u 25. tjednu starosti (AMANN i WALKER, 1983., BARTH i sur., 2008.). Rani postnatalni rast sekrecije LH očito je potaknut pojačanom sekrecijom GnRH (RODRIGUEZ i WISE, 1989.). Visoke koncentracije LH u predpubertetskom razdoblju imaju pozitivan utjecaj na spolni razvoj (SECCHIARI i sur., 1976.). Također, telad s višom sekrecijom LH u tom razdoblju, prije ulazi u pubertet (AMANN i WALKER, 1983., EVANS i sur., 1995.). Osim LH, u predpubertetskom razdoblju povišena je i koncentracija folikulstimulirajućeg hormona (FSH), no razlike u koncentracijama FSH manje su izražene. Od teladi s višim koncentracijama FSH tokom razvoja se očekuje da razviju veće testise i prije uđu u pubertet. Dokazano je da je telad iz skupine kojoj je apliciran FSH prije dosegla opseg testisa od 28 cm od teladi iz kontrolne skupine. Kao i kod LH, konačna koncentracija FSH postiže se s otprilike 25 tjedana starosti

životinje (MIYAMOTO i sur., 1989., EVANS i sur., 1996., BAGU i sur., 2006.). Serumske koncentracije testosterona rastu polako do nekih 20 tjedana starosti, nakon čega slijedi ubrzan rast do 35 tjedana (SECCHIARI i sur., 1976., LACROIX i sur., 1977., SUNDBY i VELLE, 1980., MIYAMOTO i sur., 1989., RAWLINGS i EVANS, 1995., EVANS i sur., 1996.). Slijedeći značajan porast koncentracije testosterona u životinja starijih od dvadeset tjedana, događa se u periodu brzog rasta testisa, no što je zanimljivo, također i u razdoblju niske sekrecije gonadotropina (BAGU i sur., 2006.). Spermatogeneza je u bikova najaktivnija na kraju rane postnatalne povišene sekrecije LH i u predpubertetskom razdoblju kad koncentracija FSH počne padati (RAWLINGS i sur., 2008.). BRITO i sur. (2007.b) postavili su hipotezu da endogeni hormoni poput leptina, inzulina, hormona rasta (GH) i inzulinu sličnog čimbenika rasta I (IGF-I), čije se koncentracije izrazito promijene u razdoblju puberteta, mogu utjecati na spolni razvoj bikova. Autori su prikazali karakteristične promjene u koncentracijama leptina, inzulina, GH, IGF-I i testosterona te njihovu korelaciju s tjelesnom masom, debljinom leđne masti, opsegom skrotuma i obujmom testisa. Koncentracije leptina, inzulina, GH i IGF-I zajedno su iznosile 63% varijacije u opsegu skrotuma i 59% varijacije obujma testisa. Pretpostavlja se da bi ovi hormoni mogli imati utjecaj na razvoj testisa i u fazi puberteta.

Većina starije literature opisuje istraživanje na mladim bikovima do 2 godine starosti i u postpubertetskom razdoblju s još uvijek prisutnim ubrzanom rastom (BROWN, 1994.). U takvih životinja, hranidba ima očit utjecaj na razvoj testisa i proizvodnju spermija što je slučaj i u ovnova i jarčeva (DAVIES i sur., 1957., FLIPSE i ALMQUIST, 1961., VAN DEMARK i MAUGER, 1964., VAN DEMARK i sur., 1964., GAUTHIER i BERBIGIER, 1982.). Međutim, nakon razdoblja ubrzanog rasta, hranidba ima slab do nikakav utjecaj (FLIPSE i ALMQUIST, 1961., VAN DEMARK i MAUGER, 1964., VAN DEMARK i sur., 1964., COULTER i sur., 1987.). S obzirom na pristup i dobivene rezultate, potreban je oprez u tumačenju tih starijih istraživanja, naime s jedne strane je dobiveno da niskoenergetska hranidba ima nizak utjecaj na tjelesnu masu, veličinu testisa te dovodi do smanjene produkcije spermija (VAN DEMARK i MAUGER, 1964., VAN DEMARK i sur., 1964.), a s druge, unos visokoenergetske hrane dovodi do niže produkcije spermija u odnosu na unos srednje i niskoenergetske hrane (COULTER i sur., 1987., MWANSA i MAKARECHIAN, 1991.).

#### 4.2.1. Intrauterini razvoj

SULLIVAN i sur. (2010.) potvrdili su hipotezu da na razvoj testisa i osovину hipotalamus-hipofiza te sintezu gonadotropina utječe hranidba majke za vrijeme graviditeta i genotip u korelaciji s koncentracijama IGF-I i leptina. U tu su svrhu gravidne plotkinje u prva tri mjeseca graviditeta podijeljene u dvije skupine. hranjene visoko ili nisko proteinskim i energetske obrocima. Nakon tri mjeseca, svaka je skupina ponovno podijeljena na dvije – visoko i nisko proteinske te po razini energije, tako da su dobivene skupine bile nisko-nisko, nisko-visoko, visoko-visoko i visoko-nisko proteinskim i energetske obrocima. U posljednjoj trećini graviditeta sve su plotkinje hranjene jednakim, standardnim obrocima. Posljedično tome, telad iz visoko-niske skupine imala je manji volumen testisa, ali i višu koncentraciju LH od teladi iz nisko-visoke i imala je nižu koncentraciju FSH od onih iz nisko-niske. Koncentracija testosterona nije povezana s razlikama u hranidbi po skupinama. Niže koncentracije FSH i niža testikularna masa bikova prije puberteta čije su majke hranjene visokoenergetskim obrocima u ranim stadijima gestacije ukazuju na osjetljivost reproduktivne osovine bikova na *in utero* hranidbu (SULLIVAN i sur., 2010.). Dakle, rezultati ovog istraživanja ukazuju na štetan utjecaj visokoenergetske hranidbe plotkinja u prvom tromjesečju gestacije na reproduktivni razvoj muškog potomstva (BOLLWEIN i sur., 2017.).

#### 4.2.2. Infantilni period

U istraživanju BRATTONA i sur. (1956.) restriktivna hranidba muške teladi pasmine Holstein između 1 i 80 tjedana starosti pokazala je negativan utjecaj na nastup puberteta. Prehrana s izuzetno niskim sadržajem energije može odgoditi pubertet i potencijalnu proizvodnju sperme. Osim toga, bikovi koji su izgladnjivani u mladosti nikada se ne mogu adekvatno razviti u usporedbi s bikovima koji su adekvatno hranjeni (RAO i RAO, 1995.). U novijim istraživanjima, ispitan je utjecaj hranidbe u ranoj dobi na reproduktivni razvoj Holstein bikova. Slučajnim odabirom raspoređeno je 26 Holstein bikova starih tjedan dana u 3 skupine i sukladno tome hranjeno nisko, srednje ili visokoenergetskim obrocima kroz 2-31 tjedna starosti. Nakon toga, sve su životinje hranjene srednjeenergetskim obrocima. Srednje vrijednosti koncentracije LH bile su više u bikova hranjenih visokoenergetskim obrocima nego kod bikova iz druge dvije skupine, dok promjene u koncentraciji FSH ovisne o načinu hranidbe nisu uočene. Nadalje, bikovi iz skupine hranjene visokoenergetskim obrokom, imali su i više koncentracije testosterona između 11. i 27. tjedna te su ranije dosegli obujam skrotuma od 28 cm, a i ranije su ušli u pubertet od bikova iz drugih dviju skupina (DANCE i



sur., 2015., 2016.). Slično je istraživanje provedeno i na Holstein-frizijskim i Jersey govedima starosti između 3 i 49 tjedana gdje su potvrđeni prethodno navedeni rezultati (BYRNE i sur., 2017.). DANCE i suradnici (2015., 2016.) u svojim su istraživanjima ustvrdili kako su bikovi hranjeni visokoenergetskim obrocima sa 72 tjedna imali i veću težinu testisa te 9% veći broj spermija od onih iz skupine hranjene srednjeenergetskim obrocima, a čak 30% veći od bikova hranjenih niskoenergetskim obrocima. Što se tiče razlike u kvaliteti sjemena ovisno o načinu hranidbe, ona u ovom istraživanju nije uočena. Iako navedena istraživanja pokazuju da hranidba prije ulaska u pubertet ima značajan utjecaj na spolni razvoj i kasniju reproduktivnu sposobnost, ni jedno od istraživanja nije ograničeno isključivo na infantilni period već obuhvaća i predpubertetski period pa nije u potpunosti razjašnjeno bi li modulacije hranidbe i u kraćem razdoblju bile dovoljne. Što se samog infantilnog perioda tiče, istraživanje je provedeno na 48 teladi Holsteinske pasmine podijeljene u dvije skupine, od kojih je jedna hranjena mlijekom *ad libitum*, a druga restriktivno te su u starosti od 2-3 tjedna smješteni u zajednički obor s jednakim uvjetima držanja i režimom hranidbe. Na raspolaganju su im bile ograničene količine mliječne zamjene, kombiniranog obroka sijena i koncentrata te voda *ad libitum*. Prosječni dnevni prirast teladi koja je prvih tjedana bila restriktivno hranjena iznosio je 380 g, dok je u teladi hranjene *ad libitum* on iznosio čak 1280 g. Posljedično različitim režimima hranidbe, telad hranjena *ad libitum* je do četvrtog tjedna postigla tjelesnu masu od preko 80 kg, dok restriktivno hranjena telad nije dosegla ni 60 kg. U prosjeku, telad hranjena *ad libitum* je s 22 dana starosti bila 20 kg teža od restriktivno hranjene teladi. Također, restriktivno hranjena telad imala je niže koncentracije testosterona u dobi od 10 tjedana, što nas navodi na zaključak da je spolni razvoj u pozitivnoj korelaciji s primjenom pojačane hranidbe u prva tri tjedna života (MACCARI i sur., 2015., PROKOP i sur., 2015.).

#### 4.2.3. Predpubertetski period

U nekoliko je istraživanja dokazano da visokoenergetska hranidba u predpubertetskom periodu rezultira kontinuiranim rastom lučenja LH i većim testisima u odrasloj dobi (BRITO i sur., 2007.a, c, d). Stoga lučenje LH ima glavnu ulogu u razvoju testisa prije puberteta i određuje konačnu veličinu testisa. Hranidba je također utjecala na koncentraciju testosterona, što sugerira utjecaj na broj Leydigovih stanica, njihovu funkciju ili oboje. Zamijećeno je da se koncentracije leptina, inzulina i GH nisu razlikovale među skupinama s različitim režimom hranidbe za vrijeme ranog porasta gonadotropina pa stoga nisu imale utjecaj na različito lučenje LH. Međutim, u nekim istraživanjima vidljiva je umjerena do dobra korelacija između

leptina i inzulina s obujmom testisa, što ukazuje da ti hormoni mogu imati pozitivan utjecaj na njihov razvoj (BARTH i sur., 2008.).

#### 4.2.4. Pubertetski period

Većina istraživanja o utjecaju hranidbe na spolni razvoj provedena su po odbiću muške teladi (PRUITT i sur., 1986., COULTER i sur., 1987., MWANSA i MAKARECHIAN, 1991., OHL i sur., 1996., BRITO i sur., 2012.). Vrijeme odbića bikova je uglavnom sa 7 do 8 mjeseci starosti (BRITO i sur., 2012.), što znači da alteracije u hranidbi nastupaju nakon prolaznog porasta koncentracije gonadotropina. Hranidba visokoenergetskim obrocima za vrijeme puberteta u većini slučajeva je pokazala pozitivan utjecaj na opseg skrotuma i težinu testisa bikova starosti od 12 do 15 mjeseci, no izostao je ili je čak bio negativan utjecaj na proizvodnju sperme i njezinu kvalitetu (WOLF i sur., 1965., SECCHIARI i sur., 1976., AMANN i sur., 1986.). Štetni učinci prekomjernog dnevnog prirasta nakon odbića, posljedica su nakupljanja masnog tkiva oko testisa što uzrokuje temperaturni stres kod spermogeneze (COULTER i sur., 1997.). Nadalje, dokazano je i da pretjerani unos visokoenergetske hrane u mladih bikova može prouzročiti laminitis (GREENOUGH i sur., 1990.), abnormalan rast kostiju i hrskavica s posljedičnom ukočenošću i hromošću (BOLLWEIN i sur., 2017.) što onemogućava skok i time negativno djeluje na spolni nagon. U istraživanju gdje su bikovi između 6 i 16 mjeseci starosti hranjeni različitim režimom – nisko, srednje i visokoenergetskim obrocima, nije utvrđena povezanost dnevnog prirasta i spolnog razvoja (BRITO i sur., 2012.) što je sukladno s hipotezom da je utjecaj visokoenergetske hranidbe, rano nakon porasta koncentracije gonadotropina, neznan (BRITO i sur., 2007.d, RAWLINGS i sur., 2008.).

#### 4.2.5. Povezanost metabolizma hranjivih tvari i reprodukcije

U istraživanju utjecaja hranidbe na reproduktivnu sposobnost, naglasak je oduvijek bio na osovini hipotalamus-hipofiza-gonade, no u novije vrijeme spoznaje se i važnost gušterače, jetre te masnog tkiva. Promjene u shvaćanju uloge masnog tkiva dovele su do zaključka da ono nije samo pasivni rezervoar energije već vitalni endokrini organ koji proizvodi velik broj signala. Što se probavnog sustava tiče, s obzirom na njegov endokrini značaj, njega se smatra dijelom regulatornih procesa kroz koje hranidba utječe na reprodukciju, a prenosi i metaboličke informacije stvarajući energetske metabolite - glukozu, masne kiseline i aminokiseline. Svako tkivo koje sudjeluje u regulaciji metaboličkog statusa, sudjeluje i u regulaciji reproduktivne aktivnosti. Energija iskoristiva za reproduktivne potrebe ovisi o

odnosu energije iskorištene za uzdržne potrebe, dodatne aktivnosti te o ukupnoj količini dostupne energije. Dostupna energija podrazumijeva energiju dobivenu hranom i zalihe energije u tkivima, posebice masnom tkivu, jetri i mišićima. Sustavi koji reguliraju reproduktivnu osovinu moraju biti u mogućnosti odreagirati na promjene metaboličkog statusa što se postiže hranidbom, endokrinološki i neurološki (MARTIN i sur., 2010.). U svijetu postoji sve veća potražnja za proizvodima animalnog podrijetla koji su uzgojeni u etičnim uvjetima proizvodnje, bez rezidua i ekološki prihvatljivi za okoliš. Etični uvjeti podrazumijevaju dobrobit životinja, što uključuje sve sudionike u uzgoju, a ne isključivo farmere. Rezidue se odnose na lijekove te kemijska sredstva i hormone, dok ekološka komponenta predstavlja minimaliziranje negativnog učinka proizvodnje na okoliš. Odnos između hranidbe i reprodukcije na proizvodnju u tom smislu se očituje ciljanom hranidbom, odnosno pojačanim unosom hrane u periodima kada to ima najveće značenje za reproduktivna svojstva (MARTIN i sur., 1994.).

## 5. ZAKLJUČCI

S obzirom na zahtjeve tržišta, konstantno je potrebno raditi na zadovoljavanju istih, odnosno intenziviranju proizvodnje. U govedarskoj proizvodnji, ističu se bikovi kao osnovica kvalitetne proizvodnje. Budući da se od jednog kvalitetnog rasplodnjaka pri jednoj ejakulaciji može dobiti 150-200 doza sjemena za UO, a samim time i potencijalno 150-200 teladi, genetski kvalitetni bikovi vežan su preduvjet dobre i kvalitetne proizvodnje. Upravo zato se velika pažnja pridaje rasplodnjacima i stvaranju optimalnih uvjeta za njihovo iskorištavanje do fiziološkog optimuma. Treba uzeti u obzir i sve veću svijest potrošača o dobrobiti životinja, načinu držanja, ali i eventualnom prisutstvu rezidua u konačnom proizvodu pa se tu javlja jedan paradoks gdje se s jedne strane očekuje držanje životinja u uvjetima što prirodnijima vrsti, pasmini, razni ekološki uzgoji, slobodna držanja sa što manje uplitanja od strane čovjeka dok s druge strane stalno raste potražnja općenito, a očekuje se i profitabilnost uzgoja odnosno minimaliziranje gubitaka. Hranidba u takvom obliku proizvodnje ima izuzetno važnu ulogu, jer se njome na prirodan način može utjecati na rasplodne performanse životinja.

Dosada je već dokazana uloga hranidbe u različitim stadijima razvoja životinja na njihovu reproduktivnu sposobnost, i to od utjecaja hranidbe majke čak prije graviditeta pa sve do utjecaja hranidbe već odraslih rasplodnih životinja na kvalitetu njihova rasplodnog materijala. Ono što je potrebno dodatno razjasniti i precizirati je što kraći period u kojem će intenzivnija hranidba polučiti željene rezultate.

## 6. SAŽETAK

Govedarstvo kao najvažnija sastavnica stočarstva može se smatrati temeljem razvoja ukupne stočarske proizvodnje. Iz tog se razloga ulažu veliki naponi na unaprjeđenje iste kroz stručno djelovanje raznih djelatnosti pa tako i veterinarske. Stručnjaci iz raznih područja rade na otkrivanju novih i poboljšanju postojećih postupaka u uzgoju. Biotehnologija rasplodivanja do te je mjere napredovala da u govedarstvu više gotovo i nema prirodnog pripusta. Poveznica hranidbe i reprodukcije je u utjecaju hranidbe na fiziološke procese već od najranijih faza razvoja rasplodnih bikova pa do same kvalitete sjemena. Naime, na razvoj budućeg rasplodnjaka može se utjecati već hranidbom njegove majke za vrijeme graviditeta, hranidba može imati utjecaj i na vrijeme ulaska u pubertet i postizanja spolne zrelosti, kroz utjecaj na stvaranje i otpuštanje hormona te veličinu testisa, a u odrasloj dobi i na rasplodne pokazatelje.

**Ključne riječi: hranidba, metabolizam, reprodukcija, bik**

## **7. SUMMARY**

### **Influence of nutrition on reproductive efficiency in bulls**

The cattle breeding as the most important component of animal husbandry may be considered the basis for development of a total animal husbandry production. Accordingly, the great efforts have been made in order to further improve such production through professional expertise by different professions, including veterinary profession. The experts belonging to different fields are working on invention of novel and on improvement of existing procedures in animal breeding. Biotechnology of reproduction advanced to such extent that in the cattle breeding natural insemination has been almost banned. The connection between nutrition and reproduction is apparent as the feeding regimes are influencing physiological processes from the earliest stages of breeding bulls development up to the quality of their semen. Namely, the development of a future breeding bull may be already influenced by the nutrition of its mother during gravidity, but also feeding regime may have influence on the time of entering the puberty and reaching of sexual maturity, particularly by influencing the synthesis and releasing of hormones, size of testis as well as the reproductive efficiency in adult breeders.

**Keywords: nutrition, metabolism, reproduction, bull**

## 8. POPIS LITERATURE

1. AMANN, R. P., O. A. WALKER (1983): Changes in the pituitary-gonadal axis associated with puberty in Holstein bulls. *J. Anim. Sci.* 57, 433-442.
2. AMANN, R. P., M. E. WISE, J. D. GLASS, T. M. NETT (1986): Prepubertal changes in the hypothalamic-pituitary axis of Holstein bulls. *Biol. Reprod.* 34, 71-80.
3. BAGU, E. T., S. COOK, C. L. GRATTON, N. C. RAWLINGS (2006): Postnatal changes in testicular gonadotropin receptors, serum gonadotropin, and testosterone concentrations and functional development of the testes in bulls. *Reproduction* 132, 403-411.
4. BARTH, A. D. (2000): Bull breeding soundness evaluation. 2<sup>nd</sup> ed. Western Canadian Association of Bovine Practitioners.
5. BARTH, A. D., L. F. C. BRITO, J. P. KASTELIC (2008): The effect of nutrition on sexual development of bulls. *Theriogenology* 70, 485-494.
6. BOLLWEIN, H., F. JANETT, M. KASKE (2017): Effects of nutrition on sexual development of bulls. *Anim. Reprod.* 14, 607-613.
7. BRATTON, R. W., S. D. MUSGRAVE, H. O. DUNN, R. H. FOOTE, C. R. HENDERSON (1956): Semen production and fertility of young bulls raised on three different energy levels of feed intake. *J. Anim. Sci.* 15, 1296-1297 (abstract).
8. BRITO, L. F., A. D. BARTH, N. C. RAWLINGS, R. E. WILDE, D. H. CREWS Jr., Y. R. BOISCLAIR, R. A. EHRHARDT, J. P. KASTELIC (2007a): Effect of feed restriction during calfhod on serum concentrations of metabolic hormones, gonadotropins, testosterone, and on sexual development in bulls. *Reproduction* 134, 171-181.
9. BRITO, L. F., A. D. BARTH, N. C. RAWLINGS, R. E. WILDE, D. H. CREWS Jr., P. S. MIR, J. P. KASTELIC (2007b): Circulating metabolic hormones during the peripubertal period and their association with testicular development in bulls. *Reprod. Domest. Anim.* 42, 502-508.
10. BRITO, L. F., A. D. BARTH, N. C. RAWLINGS, R. E. WILDE, D. H. CREWS Jr., P. S. MIR, J. P. KASTELIC (2007c): Effect of improved nutrition during calfhod on serum metabolic hormones, gonadotropins, and testosterone concentrations, and on testicular development in bulls. *Domest. Anim. Endocrinol.* 33, 460-469.
11. BRITO, L. F., A. D. BARTH, N. C. RAWLINGS, R. E. WILDE, D. H. CREWS Jr., P. S. MIR, J. P. KASTELIC (2007d): Effect of nutrition during calfhod and peripubertal period on serum metabolic hormones, gonadotropins and testosterone concentrations, and on sexual development in bulls. *Domest. Anim. Endocrinol.* 33, 1-18.
12. BRITO, L. F., A. D. BARTH, R. E. WILDE, J. P. KASTELIC (2012): Effect of growth rate from 6 to 16 months of age on sexual development and reproductive function in beef bulls. *Theriogenology* 77, 1398-1405.

13. BROWN, B. W. (1994): A review of the nutritional influences on reproduction in boars, bulls and rams. *Reprod. Nutr. Dev.* 34, 89-114.
14. BYRNE, C. J., S. FAIR, A. M. ENGLISH, C. URH, H. SAUERWEIN, M. A. CROWE, P. LONERGAN, D. A. KENNY (2017): Effect of breed, plane of nutrition and age on growth, scrotal development, metabolite concentrations and on systemic gonadotropin and testosterone concentrations following a GnRH challenge in young dairy bulls. *Theriogenology* 96, 58-68.
15. CERGOLJ, M. (1989): Prvi pokušaji dubokog smržavanja sperme kunića u nas. Doktorska disertacija. Veterinarski fakultet. Sveučilište u Zagrebu.
16. CERGOLJ, M., M. SAMARDŽIJA (2006): Veterinarska andrologija. Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb.
17. COLLINS, W. E., E. K. INSKEEP, W. H. DREHER, W. J. TYLE, L. E. CASIDA, (1962): Effect of age on fertility of bulls in artificial insemination. *J. Dairy Sci.* 45, 1015-1018.
18. COULTER, G. H., G. C. KOZUB (1984): Testicular development, epididymal sperm reserves and seminal quality in two-year-old Hereford and Angus bulls: effects of two levels of dietary energy. *J. Anim. Sci.* 59, 432-440.
19. COULTER, G. H., T. D. CARRUTHERS, R. P. AMANN, G. C. KOZUB (1987): Testicular development, daily sperm production and epididymal sperm reserves in 15-month-old Angus and Hereford bulls: effects of bull strain plus dietary energy. *J. Anim. Sci.* 64, 254-260.
20. COULTER, G. H., R. B. COOK, J. P. KASTELIC (1997): Effects of dietary energy on scrotal surface temperature, seminal quality, and sperm production in young beef bulls. *J. Anim. Sci.* 75, 1048-1052.
21. DANCE, A., J. THUNDATHIL, R. WILDE, P. BLONDIN, J. KASTELIC (2015): Enhanced early-life nutrition promotes hormone production and reproductive development in Holstein bulls. *J. Dairy Sci.* 98, 987-998.
22. DANCE, A., J. THUNDATHIL, P. BLONDIN, J. KASTELIC (2016): Enhanced early-life nutrition of Holstein bulls increases sperm production potential without decreasing postpubertal semen quality. *Theriogenology* 86, 687-694.
23. DAVIES, D. V., T. MANN, L. E. A. ROWSON (1957): Effect of nutrition on the onset of male sex hormone activity and sperm formation in monozygous bull-calves. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B, Biological Sciences* 147, 332-351.
24. EVANS, A. C., F. J. DAVIES, L. F. NASSER, P. BOWMAN, N. C. RAWLINGS (1995): Differences in early patterns of gonadotropin secretion between early and late maturing bulls, and changes in semen characteristics at puberty. *Theriogenology* 43, 569-578.
25. EVANS, A. C., R. A. PIERSON, A. GARCIA, L. M. McDOUGALL, F. HRUDKA, N. C. RAWLINGS (1996): Changes in circulating hormone concentrations, testes histology and testes ultrasonography during sexual maturation in beef bulls. *Theriogenology* 46, 345-357.



26. FLIPSE, R. J., J. O. ALMQUIST (1961): Effect of total digestible nutrient intake from birth to four years of age on growth and reproductive development and performance of dairy bulls. *J. Dairy Sci.* 44, 905-914.
27. GAUTHIER, D., P. BERBIGIER (1982): The influence of nutritional levels and shade structure on testicular growth and hourly variations of plasma LH and testosterone levels in young Creole bulls in a tropical environment. *Reprod. Nutr. Dev.* 22, 793-801.
28. GREENOUGH, P. R., J. J. VERMUNT, J. J. MCKINNON, F. A. FATHY, P. A. BERG, R. D. COHEN (1990): Laminitis - like changes in the claws of feedlot cattle. *Can. Vet. J.* 31, 202-208.
29. GWAZDAUSKAS, F. C. (1985): Effects of climate on reproduction in cattle. *J. Dairy Sci.* 68, 1568-1578.
30. HAMMERSTEDT, R. H., J. C. ANDREWS (1997): Metabolic support of normothermia. U: *Reproductive tissue banking: Scientific Principles.* (Karow, A. M., Crister, J. K., eds.), Academic press. San Diego. pp. 139-166.
31. HERAK, M. (1991): Umjetno osjemenjivanje domaćih životinja, Reprodukcijska domaćih životinja. U: *Veterinarski priručnik*, str. 181-209.
32. HÖTZEL, M. J., S. W. WALKDEN-BROWN, M. A. BLACKBERRY, G. B. MARTIN (1995): The effect of nutrition on testicular growth in mature Merino rams involves mechanisms that are independent of changes in GnRH pulse frequency. *J. Endocrinol.* 147, 75-85.
33. JAQUIERY, A. L., M. H. OLIVER, M. HONEYFIELD-ROSS, J. E. HARDING, F. H. BLOOMFIELD (2012): Periconceptional under nutrition in sheep affects adult phenotype only in males. *J. Nutr. Metab.*, 2012:123610.
34. KARADJOLE, I. (2012): Uzgoj i proizvodnja goveda u *Veterinarski priručnik*, 6. izdanje str. 416-417, Medicinska naklada, Zagreb.
35. LACROIX, A., D. H. GARNIER, J. PELLETIER, A. CARATY, O. MOULIN (1977): Temporal fluctuations of plasma LH and testosterone in charolais bull calves during the first year of life. *Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys.* 17, 1013-1019.
36. MACCARI, P., S. WIEDEMANN, H. J. KUNZ, M. PIECHOTTA, P. SANFTLEBEN, M. KASKE (2015): Effect of two different rearing protocols for Holstein bull calves in the first 3 weeks of life on health status, metabolism and subsequent performance. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 99, 737-746.
37. MANN, T., L. E. A. ROWSON, R. V. SHORT, J. D. SKINNER (1967): The relationship between nutrition and androgenic activity in pubescent twin calves, and the effect of orchitis. *J. Endocrinol.* 38, 455-468.
38. MANN, T., A. WALTON (1953): The effect of underfeeding on the genital functions of a bull. *J. Agric. Sci.* 43, 343-347.

39. MARTIN, G. B., S. TJONDRONEGORO, M. A. BLACKBERRY (1994): Effects of nutrition on testicular size and the concentrations of gonadotrophins, testosterone and inhibin in plasma of mature male sheep. *J. Reprod. Fertil.* 101, 121-128.
40. MARTIN, G. B., D. BLANCHE, D. W. MILLER, P. E. VERCOE (2010): Interactions between nutrition and reproduction in the management of the mature male ruminant. *Animal* 4, 1214-1226.
41. MILJKOVIĆ, V., S. VESELINOVIĆ (2005): Porodiljstvo, sterilitet i veštačko osemenjivanje domaćih životinja. Fakultet veterinarske medicine. Univerzitet u Beogradu.
42. MIYAMOTO, A., M. UMEZU, S. ISHII, T. FURASAWA, J. MASAKI, Y. HASEGAWA, M. OHTA (1989): Serum inhibin, FSH, LH, and serum concentrations of FSH, LH and testosterone levels and testicular inhibin content in beef bulls from birth to puberty. *Anim. Reprod. Sci.* 20, 165-178.
43. MUKHOPADHYAY, C. S., A. K. GUPTA, B. R. YADAV, A. GUPTA, T. K. MOHANTY, V. S. RAINA (2011): Study on the effect of various uncompensable traits on fertilizing potential in cattle and buffalo bulls. *Livest. Sci.* 136, 114-121.
44. MWANSA, P. B., M. MAKARECHIAN (1991): The effect of postweaning levels of diet energy on sex drive and semen quality of young beef bulls. *Theriogenology* 35, 1169-1178.
45. NOAKES, D. E., T. J. PARKINSON, G. C. W. ENGLAND (2009): The male animal. U: *Veterinary Reproduction and Obstetrics*. 9<sup>th</sup> edition, Saunders, Elsevier.
46. OHL, M. W., R. S. OTT, D. B. FAULKNER, T. HORNBUCKLE, R. A. HESS, G. F. CMARIK, G. M. ZINN (1996): Effect of rate of gain on scrotal circumference and histopathologic features of the testes of half-sibling yearling beef bulls. *Am. J. Vet. Res.* 57, 844-847.
47. POLGE, C., A. SMITH, A. PARKES (1949): Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature Lond.* 164, 166.
48. POLGE, C., L. E. A. ROWSON (1952): Results with bull semen stored at -79°C. *Vet. Rec.* 64, 851-854.
49. PRKA, I. (2010): Poređenje parametara kvaliteta sperme sa rezultatima *non-return* metode u oceni plodnosti bikova u SVC Krnjača. Specijalistički rad. Fakultet veterinarske medicine. Univerzitet u Beogradu.
50. PRKA, I. (2015): Plodnost bikova u stadu. *Hrv. Vet. vjesnik* 23, 68-72.
51. PROKOP, L., M. KASKE, P. MACCARI, R. LUCIUS, H. J. KUNZ, S. WIEDEMANN (2015): Intensive rearing of male calves during the first three weeks of life has long-term effects on number of islets of langerhans and insulin stained area in the pancreas. *J. Anim. Sci.* 93, 988-998.

52. PRUITT, R. J., L. R. CORAH, J. S. STEVENSON, G. H. KIRACOFE (1986): Effect of energy intake after weaning on the sexual development of beef bulls. II. Age at first mating, age at puberty, testosterone and scrotal circumference. *J. Anim. Sci.* 63, 579-585.
53. RAO, C. V., A. V. N. RAO (1995): Puberty and semen production period in breeding bulls. *Indian Vet. J.* 72, 885-886.
54. RAWLINGS, N. C., A. C. EVANS (1995): Androgen negative feedback during the early rise in LH secretion in bull calves. *J. Endocrinol.* 145, 243-249.
55. RAWLINGS, N., A. C. EVANS, R. K. CHANDOLIA, E. T. BAGU (2008): Sexual maturation in the bull. *Reprod. Domest. Anim.* 43 (suppl. 2), 295-301.
56. RODRIGUEZ, R. E., M. E. WISE (1989): Ontogeny of pulsatile secretion of gonadotropin-releasing hormone in the bull calf during infantile and pubertal development. *Endocrinology* 124, 248-256.
57. RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. (1998): Optimization of sperm quality in AI bulls. *Reprod. Dom. Anim.* 33, 235-237.
58. SAMARDŽIJA, M., M. CERGOLJ, A. TOMAŠKOVIĆ, T. DOBRANIĆ (2003): Praktikum iz spermijologije. Veterinarski Fakultet Zagreb, interna skripta.
59. SAMARDŽIJA, M., M. CERGOLJ (2012): Rasplod mužjaka. U: Veterinarskipriručnik.6. izdanje, str. 1911-1930., Medicinska naklada, Zagreb.
60. SAMARDŽIJA, M., M. KARADJOLE, M. MATKOVIĆ, M. CERGOLJ, I. GETZ, T. DOBRANIĆ, A. TOMAŠKOVIĆ, J. PETRIĆ, J. ŠURINA, J. GRIZELJ, T. KARADJOLE (2006): A comparison of BoviPure® and Percoll® on bull sperm separation protocols for IVF. *Anim. Reprod. Sci.* 91, 237-247.
61. SECCHIARI, P., F. MARTORANA, S. PELLEGRINI, M. LUISI (1976): Variation of plasma testosterone in developing Friesian bulls. *J. Anim. Sci.* 42, 405-409.
62. SETCHELL, B. P., N. T. HINKS (1967): The importance of glucose in the oxidative metabolism of the testis of the conscious ram and the role of the pentose cycle. *Biochem. J.* 102, 623-630.
63. SETCHELL, B., G. M. H. WAITES, H. R. LINDNER (1965): Effect of undernutrition on testicular blood flow and metabolism and the output of testosterone in the ram. *J. Reprod. Fertil.* 9, 149-162.
64. SHANNON, P., R. VISHWANATH (1995): The effect of optimal and suboptimal concentrations of sperm on the fertility of fresh and frozen bovine semen and a theoretical model to explain the fertility differences. *Anim. Reprod. Sci.* 39, 1-10.
65. SULLIVAN, T. M., G. C. MICKE, R. M. GREER, V. E. PERRY (2010): Dietary manipulation of *Bos indicus* x heifers during gestation affects the prepubertal reproductive development of their bull calves. *Anim. Reprod. Sci.* 118, 131-139.

66. SUNDBY, A., W. VELLE (1980): Plasma concentration of testosterone in young bulls in relation to age, rate of weight gain and stimulation with human chorionic gonadotropin. *J. Endocrinol.* 86, 465-469.
67. TUCKER, H. A., W. D. OXENDER (1980): Seasonal aspects of reproduction, growth and hormones in cattle and horses. *Prog. Reprod. Biol.* 5, 155-180.
68. TOMAŠKOVIĆ, A., Z. MAKEK, T. DOBRANIĆ, M. SAMARDŽIJA (2007): Rasplodivanje krava i junica. (M. Samardžija, S. Vince, J. Grizelj, ur.). Veterinarski fakultet sveučilišta u Zagrebu
69. VAN DEMARK, N. L., R. E. MAUGER (1964): Effect of energy intake on reproductive performance of dairy bulls. 1. Growth, reproductive organs, and puberty. *J. Dairy Sci.* 47, 798-802
70. VAN DENMARK, N. L., G. R. FRITZ, R. E. MAUGER (1964): Effect of energy intake on reproductive performance of dairy bulls. II. Semen production and replenishment. *J. Dairy Sci.* 47, 898-904.
71. VISHWANATH, R., P. SHANNON (2000): Storage of bovine semen in liquid and frozen state. *Anim. Reprod. Sci.* 62, 23-53.
72. WOLF, F. R., J. O. ALMQUIST, E. B. HALE (1965): Prepuberal behavior and puberal characteristics of beef bulls on high nutrient allowance. *J. Anim. Sci.* 24, 761-765.
73. YOSHIDA, M. (2000): Conservation of sperms: current status and a new trends. *Anim. Reprod. Sci.* 60-61, 349-355.

## 9. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 13. rujna 1990. godine u Koprivnici. Nakon osnovne škole upisala sam Gimnaziju Fran Galović gdje sam maturirala 2009. godine. Iste godine upisujem Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagebu. Tijekom studija bila sam član studentske udruge Equus unutar koje sam sudjelovala u organizaciji edukativne izložbe Reptilomanija+ za što smo 2015. godine nagrađeni Rektorovom nagradom. Za vrijeme studija radila sam u Medical Intertradeu te kao promotor u Unimed Pharmi. Udala sam se 2017. te apsolvirala akademske godine 2017/2018.