



Morfometrijske osobitosti spermija jarčeva francuske alpine

Morphometric characteristics of spermatozoa in French alpine bucks

Rakić, K.^{1*}, S. Vince², I. Žura Žaja³

Sažetak

Cilj ovog istraživanja bio je odrediti morfometrijske osobitosti glave i repa spermija jarčeva francuske alpine i dobivene vrijednosti usporediti s onima u dostupnoj literaturi. Uzorci ejakulata uzimani su pomoću umjetne vagine jednom tjedno u jarčeva (n = 12) starosti 1 – 4 godine tijekom 3 mjeseca. Na obojenim razmazima sjemena Bloomovom metodom (n = 144) provedena je morfometrijska analiza na 7289 spermija. Morfometrija spermija određena je pomoću kompjutorski potpomognutog programa za analizu slika, SFORM (VAMSTEC, Zagreb, Croatia). Vrijednosti morfometrijskih pokazatelja glave i repa spermija jarčeva francuska alpina uglavnom se nisu razlikovale od vrijednosti istih pokazatelja drugih pasmina jarčeva dostupnih u literaturi, osim kod Barbari pasmine jarčeva. Morfometrijska analiza ejakulata jarčeva mogla bi postati pouzdana standardna metoda procjene kakvoće ejakulata, no potrebno je standardizirati morfometrijske vrijednosti pokazatelja glave i repa spermija i povezati ih s kvalitetom ejakulata i plodnošću jarčeva.

Abstract

The aim of this study was to determine the morphometric parameters of the spermatozoa head and tail in ejaculates from French alpine bucks, and to compare the values obtained with those in the available literatures. The samples of ejaculates were taken by artificial vagina from bucks (n = 12) aged 1 - 4 years on a weekly basis over 3 months. Morphometric analyses were performed on 7289 spermatozoa in stained semen smears by Bloom's method (n = 144). Sperm cell morphometry was carried out using a computer-assisted program package for image analysis, SFORM (VAMSTEC, Zagreb, Croatia). The values of the morphometric parameters of the spermatozoa head and tail in French alpine bucks generally did not differ from the values of the same parameters of other breeds of bucks in the available literature, except for Barbari bucks. Morphometric analysis of the bucks' ejaculate could be a reliable standard method for sperm quality assessment, but it is necessary to standardize the morphometric values of the spermatozoa head and tail parameters, and relate them to semen quality, as well as the fertility of the bucks.

Ključne riječi: jarčevi, spermiji, morfometrijska analiza

Key words: bucks, spermatozoa, morphometric analysis

UVOD

Upravljanje rasplodivanjem domaćih životinja ima, među ostalim, tendenciju smanjenja broja rasplodnjaka na farmama i centrima za umjetno osjemenjivanje uz istodobnu potražnju, odnosno selekciju izvrsne kakvoće ejakulata. S obzirom na važnost spermija u reproduktivnom procesu, razvijeno je mnoštvo metoda za analizu kakvoće i funkcije spermija (Hidalgo i sur., 2005.). Procjena kakvoće sjemena način je procjene potencijala plodnosti rasplodnjaka te je sredstvo pomoću kojega se izračunava broj doza spermija za umjetno osjemenjivanje koje se mogu dobiti od jednog ejakulata. Gibljivost spermija jedan je od pokazatelja u standardnoj procjeni ejakulata rasplodnjaka koji se najčešće koristio, dok je morfološka analiza spermija imala sekundarno mjesto u primjeni, jer je za spomenutu analizu potrebno mnogo više vremena zbog složenosti metodologije.

Sustavi računalno potpomognute morfometrijske analize sperme (engl. *computer-assisted sperm morphometry analysis*, ASMA) unaprijedili su procjenu morfologije spermija, s precizno ponavljajućim mjerenjima dimenzija glave spermija u različitim životinjskih vrsta (Gravance i sur., 1996.), uključujući jarčeve (Hidalgo i sur., 2006., Gravance i sur., 1996., Hidalgo i sur., 2005.). Nadalje, morfometrijska mjerenja glave spermija mogu se koristiti u boljim klasifikacijskim tehnikama primjenom postupaka statističkog modeliranja. U tom pogledu ASMA tehnologija i multivarijatne statističke metode, uključujući diskriminacijsku analizu i grupiranje podataka, uspješno su korištene za procjenu morfoloških klasa/podskupina glave spermija u nekoliko životinjskih vrsta (Thurston i sur., 2001., Buendía i sur., 2002., Estes i sur., 2006., Rubio-Guillén i sur., 2007.).

Računalna analiza slike sve se više primjenjuje u različitim dijagnostičkim postupcima u kliničkim laboratorijima, što omogućuje numeričku ocjenu i najsuptilnijih promjena nedostupnih vizualnom pregledu (Nafe, 1991., Russack, 1994.) te time omogućuje objektivnu kvantifikaciju određenih pokazatelja, poput morfometrijskih osobitosti spermija. Sustav za analizu slike sastoji se od mikroskopa, kamere visoke rezolucije, monitora, računala i programa za prihvata i analizu slike. Pomoću videokamere

svjetlosni mikroskop sliku pretvara u analogni električni signal koji se potom u računalu digitalizira u elemente slike nazvane pikseli (Bartels i Thompson, 1994.). Ljudsko oko u stanju je razlučiti 30 – 40 nijansi sivila po slici, dok računalo može razlučiti 256 nijansi po svakom pikselu (Kisner, 1988.). Digitalni signal može se pretvoriti u analogni signal i biti prikazan na monitoru snažne rezolucije koji omogućuje prepoznavanje istraživanih detalja staničnih struktura. Najčešće korištena metoda jest interaktivna računalna analiza slike, gdje se računalnim mišem dijelom automatski, dijelom ručno, ocrtavaju konture struktura koje su od interesa za mjerenje (Kardum, 2016.).

Baak (1985.) definira morfometriju kao kvantitativni opis geometrijskih struktura u svim dimenzijama. Numeričkom objektivizacijom opaženih struktura omogućuje se reproducibilnost metode, a od velikog je značenja što se može koristiti standardno obrađeni materijal, primjerice razmaz sjemena obojen eozin-nigrozinskim metodom. Osim toga, rezultati mjerenja (primarni podaci) mogu se koristiti za izračun novih podataka (sekundarni podaci), koji se tada mogu statistički obraditi (Oberholzer i sur., 1991.). Prednost je u tome što je jeftina i tehnički jednostavna metoda, a mogu se određivati različiti planimetrijski pokazatelji (Baak, 1985., Van Diest i sur., 1991., Kardum, 2016.).

Cilj je ovoga istraživanja odrediti morfometrijske osobitosti glave i repa spermija jarčeva francuske alpine i usporediti dobivene vrijednosti s onima u dostupnoj literaturi.

MATERIJALI I METODE

Polučivanje ejakulata

Jarčevima je ejakulat polučen pomoću umjetne vagine nakon skoka na fantom (koza u estrusu), što je obavljala uvijek ista osoba/veterinar na koju su jarčevi bili naviknuti. Svakom jarcu ejakulat je polučen 4 puta mjesečno, ukupno 12 puta tijekom pokusnog razdoblja od 3 mjeseca.

Postupak bojenja

Postupak supravitalnog bojenja prema Bloomu uključuje primjenu boja eozina i nigrozina.

Pritom se jedna manja kap sjemena, veća kap eozina i dvije kapi nigrozina nakapavaju na jednu stranu čiste, odmašćene i zagrijane predmetnice. Potom se kapljice čistim štapićem pažljivo promiješaju i načini se razmaz koji se suši na toplom mjestu. Mrtvi se spermiji, koji nisu imali cjelovitu staničnu membranu, oboje eozinom (crveno), dok cjelovite stanične membrane živih spermija ne popuštaju boje te ostaju neobojeni. Boja nigrozina odgovorna je za stvaranje tamne pozadine koja olakšava procjenu spermija.

Morfometrijska analiza spermija

Računalna analiza slike napravljena je na osobnom računalu korištenjem programa SFORM (VAMSTEC, Zagreb, Hrvatska). Sustav se sastoji od kamere u boji visoke rezolucije (Donpisha 3CCD) koja sliku svjetlosnog mikro-

skopa Olympus BX 41, vidljivu pod objektivom povećanja 40 x, digitalizira i prenosi u osobno računalo. Morfometrijska analiza spermija jarčeva provedena je na obojenim razmazima sjemena Bloomovom metodom jer je njome vidljiv središnji dio repa spermija. Ukupno je analizirano 144 obojenih razmaza spermija. Na njima je izmjereno približno 50 spermija po svakom obojenom razmazu. Analizirane su samo glave spermija koje se nisu preklapale s drugim spermijima ili nečistoćama i repovi koji nisu bili previjeni. Granice glave, središnjeg djela i repa spermija označavane su interaktivno (najprije glava, zatim središnji dio, a potom rep spermija) uz ručnu korekciju računalnim mišem (slika 1). Za glavu i središnji dio spermija određene su: površina (μm^2), opseg (μm), minimalni i maksimalni polumjer (μm), dužina i širina (μm), a za rep spermija određena je dužina u mikrometri-

Slika 1. Morfometrijska analiza spermija u programu SFORM.



ma. Pokazatelji oblika za glavu spermija izračunati su prema Hidalgo i sur. (2005.) pomoću primarnih pokazatelja, i to: pravilnost (engl. *regularity*; $\pi \times \text{dužina} \times \text{širina} / 4 \times \text{površina}$), naboranost (engl. *rugosity*; $4\pi \times \text{površina} / \text{opseg}^2$), eliptičnost (engl. *ellipticity*; $\text{dužina} / \text{širina}$) i elongacija (engl. *elongation*; $(\text{dužina} - \text{širina}) / (\text{dužina} + \text{širina})$). Izračunata je i duljina spermija (dužina glave + dužina repa spermija) te različiti omjeri primarnih pokazatelja: dužina glave / dužina spermija, dužina glave / dužina repa,

dužina repa / dužina spermija, opseg glave / dužina spermija, površina glave / dužina spermija, dužina glave x širina glave / dužina spermija.

Statistička obrada podataka

Statistička analiza podataka učinjena je pomoću programskog paketa SAS 9.4 (Statistical Analysis Software 2002-2012 by SAS Institute Inc., Cary, SAD). Deskriptivna statistika napravljena je pomoću modula PROC MEANS i PROC FREQ.

Tablica 1. Deskriptivni pokazatelji morfometrijskih osobitosti glave spermija jarčeva.

Pokazatelji glave spermija	Varijacije unutar istih jarčeva				Varijacije između jarčeva (prema datumu uzorkovanja)				Ukupno			
	Interval srednje vrijednosti	Interval medijane vrijednosti	Interval standardne devijacije	Interval koeficijenta varijacije (%)	Interval srednje vrijednosti	Interval medijane vrijednosti	Interval standardne devijacije	Interval koeficijenta varijacije (%)	Srednja vrijednost	Medijan	Standardna devijacija	Koeficijent varijacije (%)
Dužina (μm)	8,79-9,28	8,80-9,29	0,28-0,57	3,18-6,16	8,76-9,74	8,73-9,70	0,35-0,55	4,08-5,98	9,17	9,11	0,52	5,66
Širina (μm)	4,76-4,97	4,80-4,98	0,23-0,33	4,64-6,57	4,74-5,23	4,81-5,21	0,19-0,36	3,95-7,31	4,19	4,87	0,29	5,89
Minimalni polumjer (μm)	2,13-2,24	2,16-2,23	0,13-0,17	5,66-7,55	2,16-2,36	2,16-2,35	0,11-0,18	4,71-8,05	2,21	2,22	0,15	6,87
Maksimalni polumjer (μm)	4,53-4,79	4,51-4,78	0,15-1,29	3,41-6,24	4,53-5,02	4,51-5,01	0,19-0,28	4,17-5,96	4,74	4,72	0,27	5,65
Površina (μm ²)	34,28-38,44	35,08-38,08	2,35-4,21	6,63-10,99	35,72-41,77	34,69-41,77	1,95-4,15	5,47-10,47	37,35	36,83	3,46	9,27
Opseg (μm)	23,37-24,75	23,52-24,68	0,79-1,39	3,37-5,47	23,31-25,79	23,37-25,79	0,79-1,25	3,31-4,94	24,43	24,29	1,19	4,89
Eliptičnost	1,80-1,91	1,85-1,93	0,09-0,12	5,05-6,20	1,85-1,93	1,85-1,93	0,09-0,12	4,62-5,85	1,88	1,87	0,1	5,57
Elongacija	0,30-0,32	0,30-0,32	0,02-0,03	7,51-9,32	0,30-0,32	0,30-0,32	0,02-0,03	7,05-9,89	0,3	0,3	0,03	8,29
Naboranost	0,78-0,79	0,78-0,80	0,02-0,02	2,32-3,07	0,78-0,80	0,78-0,80	0,02-0,03	2,32-3,40	0,79	0,79	0,02	2,81
Pravilnost	0,94-0,96	0,94-0,95	0,02-0,03	2,32-3,00	0,94-0,95	0,94-0,95	0,02-0,03	2,48-3,08	0,95	0,95	0,03	2,69

Eliptičnost = dužina / širina, Elongacija = $[(\text{dužina} - \text{širina}) / (\text{dužina} + \text{širina})]$, Naboranost = $[4\pi \times \text{površina} / \text{opseg}^2]$, Pravilnost = $[\pi \times \text{dužina} \times \text{širina} / 4 \times \text{površina}]$

Dob jarčeva kategorizirana je u tri skupine: skupina 1 (1 – 1,5 godina), skupina 2 (> 1,5 – 2,5 godine), skupina 3 (> 2,5 godine).

REZULTATI

Pojedinačni morfometrijski pokazatelji glave i repa spermija

Morfometrijska mjerenja određena su na ukupno 7289 spermija. Budući da je postojala razlika između morfometrijskih podataka “ži-

vih spermija” (neobojenih) i “mrtvih spermija” (obojeni), koji su bili statistički značajno različiti (veća dužina, širina, površina te opseg glave i spojnog dijela repa), za daljnju su analizu uvršteni morfometrijski pokazatelji samo živih spermija (N = 6567). Zbog toga što se svakom jarcu ejakulat uzimao više puta, deskriptivnim je podacima prikazana varijacija unutar jedinki (jarčeva), između jedinki po svakom datumu uzimanja ejakulata te ukupna varijacija morfometrijskih pokazatelja glave i repa (tablice 1, 2 i 3).

Tablica 2. Deskriptivni pokazatelji morfometrijskih osobitosti repa spermija jarčeva.

Pokazatelji središnjeg dijela repa i dužina repa spermija	Varijacije unutar istih jedinki				Varijacije između jarčeva (prema datumu uzorkovanja)				Ukupno			
	Interval srednje vrijednosti	Interval medijane vrijednosti	Interval standardne devijacije	Interval koeficijenta varijacije (%)	Interval srednje vrijednosti	Interval medijane vrijednosti	Interval standardne devijacije	Interval koeficijenta varijacije (%)	Srednja vrijednost	Medijan	Standardna devijacija	Koeficijent varijacije (%)
Dužina središnjeg dijela (µm)	12,41-13,30	12,35-13,45	0,59-0,89	4,64-6,71	12,56-13,75	12,45-13,62	0,45-0,86	3,51-6,74	12,95	2,89	0,74	5,69
Širina središnjeg dijela (µm)	1,80-2,20	1,74-1,87	0,34-0,80	20,02-36,23	1,69-2,18	1,65-2,03	0,31-0,66	18,60-32,00	1,9	1,8	0,47	24,54
Minimalni polumjer središnjeg dijela (µm)	0,40-0,49	0,37-0,52	0,14-0,22	31,51-46,06	0,41-0,50	0,41-0,52	0,12-0,19	26,36-44,37	0,46	0,52	0,16	35,34
Maksimalni polumjer središnjeg dijela (µm)	6,38-6,84	6,36-6,94	0,32-0,41	4,97-6,08	6,44-7,08	6,39-7,02	0,24-0,44	3,67-6,67	6,65	6,62	0,39	5,89
Opseg središnjeg dijela (µm)	28,51-30,69	28,40-30,69	1,15-1,79	3,97-6,04	28,57-31,49	28,46-31,25	1,05-1,78	3,59-5,69	29,64	29,46	1,65	5,58
Površina središnjeg dijela (µm ²)	17,57-19,95	17,63-19,92	1,23-2,91	7,06-15,22	17,70-21,41	17,56-20,39	1,30-2,43	7,30-12,83	18,87	18,55	2,19	11,62
Dužina repa (µm)	49,12-54,19	49,73-55,12	2,09-2,97	4,16-5,57	49,21-54,73	49,45-55,02	1,18-2,61	2,36-4,88	51,28	50,75	2,75	5,36

Tablica 3. Deskriptivni pokazatelji ostalih morfolometrijskih pokazatelja glave i repa spermija jarčeva.

Različite mjere glave i repa spermija	Varijacije unutar istih jedinki				Varijacije između jarčeva (prema datumu uzorkovanja)				Ukupno			
	Interval srednje vrijednosti	Interval medijane vrijednosti	Interval standardne devijacije	Interval koeficijenta varijacije (%)	Interval srednje vrijednosti	Interval medijane vrijednosti	Interval standardne devijacije	Interval koeficijenta varijacije (%)	Srednja vrijednost	Medijan	Standardna devijacija	Koeficijent varijacije (%)
Dužina spermija (µm)	57,91-63,63	58,25-64,65	2,22-3,83	3,74-6,19	58,00-64,47	58,25-64,88	1,22-2,90	2,08-4,74	60,48	59,85	3,02	4,99
Dužina glave / Dužina spermija	0,15-0,15	0,15-0,15	0,01-0,01	4,13-5,61	0,15-0,16	0,15-0,16	0,01-0,01	4,26-5,33	0,15	0,15	0,01	4,98
Dužina glave / Dužina repa	0,17-0,18	0,17-0,18	0,01-0,01	4,87-6,66	0,18-0,19	0,17-0,19	0,01-0,01	5,02-6,31	0,18	0,18	0,01	5,90
Dužina repa / Dužina spermija	0,85-0,85	0,84-0,85	0,01-0,01	0,72-1,01	0,84-0,85	0,84-0,85	0,01-0,01	0,75-0,91	0,85	0,85	0,01	0,89
Opseg glave / Dužina spermija	0,39-0,41	0,39-0,41	0,01-0,02	3,86-5,93	0,40-0,42	0,39-0,42	0,01-0,02	3,52-5,27	0,41	0,4	0,02	4,65
Površina glave / Dužina spermija	0,59-0,63	0,60-0,63	0,04-0,05	6,03-8,85	0,60-0,65	0,60-0,64	0,03-0,06	6,01-9,66	0,62	0,62	0,05	7,74
Dužina glave x Širina glave / Dužina spermija	0,72-0,76	0,71-0,76	0,05-0,07	6,94-10,26	0,72-0,78	0,72-0,78	0,05-0,08	6,71-10,44	0,75	0,74	0,07	8,7

Dužina spermija = dužina glave + dužina repa

RASPRAVA

Uobičajeno se pretrage ejakulata u spermija jarčeva rade vizualnim metodama, pri čemu se procjenjuje broj normalnih i broj abnormalnih spermija na osnovi izgleda glave i repa spermija, što bi značilo da se populacija spermija u ejakulatu dijelila na udio normalnih spermija i udio abnormalnih spermija. Standardnim procjenama morfologije spermija ne može se temeljito procijeniti rasplodna sposobnost mužjaka, jer ne omogućuje objektivnu analizu

malih, ali značajnih razlika koje postoje između spermija u različitim uzorcima. Upotrebom različitih programa računalne analize slike (spermija) dobile su se mnogo preciznije i detaljnije morfolometrijske mjere, što je uvelike pomoglo u boljoj procjeni morfologije spermija, a čime se smanjuju varijacije u procjeni građe spermija te u detekciji suptilnih razlika među pojedinim spermijima koje se ne mogu detektirati subjektivnim metodama (Sancho i sur., 1998., Hidalgo i Dorado, 2009.). U dostupnoj literaturi postoji tek nekoliko studija u kojima je provedena mor-

fometrijska analiza spermija u jarčeva. Zbog mogućnosti velike varijacije u podacima pokazatelja spermija izmjerenih morfometrijskom analizom između različitih laboratorija (podatak koji se navodi u literaturi) dobiveni rezultati ovog istraživanja uspoređeni su dostupnima iz literature. Tako su Sinha i sur. (2014.) u jarčeva slične dobi kao i u ovom istraživanju (2 do 4 godina), koristeći se također računalno potpomognutom morfometrijskom analizom spermija, istu metodu bojenja razmaza, ali za jarčeve pasmine Barbari, dobili vrijednosti koje su u nekim parametrima odstupale od rezultata ovog istraživanja. Usporedbom podataka našega istraživanja (podebljane vrijednosti) s podacima iz istraživanja Sinha i sur. (2014.) uočljivo je da su se srednje vrijednosti površine glave spermija (**37,35 ± 3,46** prema $29,40 \pm 0,16$ (μm^2)) te površina (**18,87 ± 2,19** prema $8,54 \pm 0,05$ (μm^2)) i širina središnjeg dijela repa spermija (**1,9 ± 0,47** prema $0,66 \pm 0,01$ (μm)) najviše razlikovale, dok je u vrijednostima svih ostalih morfometrijskih pokazatelja spermija bilo minimalnih razlika. Tako su vrijednosti morfometrijskih pokazatelja spermija našeg istraživanja uglavnom bile veće (podebljane vrijednosti) od vrijednosti morfometrijskih pokazatelja spermija Barbari pasmine: površina glave $29,40 \pm 0,16$ prema **37,35 ± 3,46** (μm^2), dužina glave $7,89 \pm 0,06$ prema **9,17 ± 0,52** (μm), širina glave $4,26 \pm 0,04$ prema **4,19 ± 0,29** (μm), opseg glave $24,90 \pm 0,14$ prema **24,43 ± 1,19** (μm), eliptičnost glave $1,86 \pm 0,02$ prema **1,88 ± 0,1**, naboranost glave $0,60 \pm 0,01$ prema **0,79 ± 0,02**, elongacija glave $0,30 \pm 0,01$ prema **0,3 ± 0,03**, pravilnost glave $0,90 \pm 0,01$ prema **0,95 ± 0,03**, površina središnjeg dijela repa $8,54 \pm 0,05$ prema **18,87 ± 2,19** (μm^2), dužina središnjeg dijela repa (μm) $12,48 \pm 0,06$ prema **12,95 ± 0,74**, širina središnjeg dijela repa $0,66 \pm 0,01$ prema **1,9 ± 0,47** (μm), dužina repa $48,14 \pm 0,23$ prema **51,28 ± 2,75** (μm). Nasuprot tome, vrijednosti primarnih morfometrijskih pokazatelja glave i repa spermija jarčeva u ovom istraživanju gotovo su istovjetne s vrijednostima istih pokazatelja dobivenih u istraživanju Wibowoa i sur. (2013.), koji su istraživali razlike u morfometrijskim pokazateljima spermija između četiri lokalno uzgajane pasmine jarčeva. Hidalgo i Dorado (2009.) mjerili su morfometrijske pokazatelje glave spermija Florida jarčeva obojanih Diff-Quik metodom, gdje

su prikazane vrijednosti bile podjednake vrijednostima izmjerenim u ovom istraživanju, jedino se vrijednost površine glave spermija malo više razlikovala.

ZAKLJUČAK

U ovom su radu prvi put izneseni detaljni rezultati morfometrijskih pokazatelja glave i repa spermija u jarčeva pasmine francuska alpina. Morfometrijski pokazatelji spermija pod utjecajem su različitih genetskih i čimbenika okoliša koje dodatno treba istražiti, no dobivene vrijednosti i nove spoznaje ovim istraživanjem pomoći će u budućim istraživanjima. Morfometrijska analiza ejakulata jarčeva mogla bi postati pouzdana standardna metoda procjene kakvoće ejakulata, no potrebno je standardizirati morfometrijske vrijednosti pokazatelja glave i repa spermija i povezati ih s kvalitetom ejakulata i plodnošću jarčeva. Povezivanje tih standarda omogućilo bi kvalitetniju selekciju jarčeva u centrima za umjetno osjemenjivanje te pružilo relevantna saznanja o pravilnosti spermatogeneze i spermiogeneze u jarčeva.

LITERATURA

- BAAK, J. P. A. (1985): The principles and advances of quantitative pathology. *Anal. Quant. Cytol. Histol.* 9, 89-95.
- BARTELS, P. H., D. THOMPSON (1994): The Video Photometer. In: *Image Analysis. A Primer for Pathologists*. Raven Press, Ltd., New York, pp. 29-57.
- BUENDÍA, P., C. SOLER, F. PAOLICCHI, C. GAGO, B. URQUIETA, F. PÉREZ-SÁNCHEZ, E. BUSTOS-OBREGÓN (2002): Morphometric characterization and classification of alpaca sperm heads using the Sperm-Class Analyzer® computer assisted system. *Theriogenology* 57, 1207-1218.
- ESTESO, M. C., A. J. SOLER, M. R. FERNANDEZ-SANTOS, A. A. QUINTERO-MORENO, J. J. GARDE (2006): Functional significance of the sperm head morphometric size and shape for determining freezability in Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) epididymal sperm samples. *J. Androl.* 27, 662-670.
- GRAVANCE, C. G., R. VISHWANATH, C. PITT, P. J.

- CASEY (1996): Computer automated morphometric analysis of bull sperm heads. *Theriogenology* 46, 1205-1215.
- HIDALGO, M., J. DORADO (2009): Objective assessment of goat sperm head size by computer-assisted sperm morphometry analysis (ASMA). *Small Rumin. Res.* 87, 108-110. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.smallrumres.2009.10.006>
 - HIDALGO, M., I. RODRÍGUEZ, J. DORADO (2006): Influence of staining and sampling procedures on goat sperm morphometry using the Sperm Class Analyzer. *Theriogenology* 66, 996-1003.
 - HIDALGO, M., I. RODRÍGUEZ, J. DORADO SANZ, C. SOLER (2005): Effect of sample size and staining methods on stallion sperm morphometry by the Sperm Class Analyzer. *Vet. Med.* 50, 24-32.
 - KARDUM, M. (2016): Biološke osobitosti leukocita i antioksidacijski status u mliječnih krava hranjenih dodatkom lanenog sjemena i organskog selena. Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, Hrvatska.
 - KISNER, H. J. (1988): Principles and clinical application of image analysis. *Clin. Lab. Med.* 8, 723-736.
 - NAFE, R. (1991): Planimetry in pathology-a method in its own right besides stereology in automatic image analysis. *Exp. Pathol.* 43, 239-246.
 - OBERHOLZER, M., H. CHRISTEN, R. ETTLIN, M. BUSER, M. OESTRECHER, R. GSCHWIND (1991): Some fundamental aspects of morphometry in clinical pathology, demonstrated on simple, multipurpose analysis system. *Anal. Quant. Cytol. Histol.* 13, 316-320.
 - RUBIO-GUILLÉN, J., D. GONZÁLEZ, J. J. GARDE, M. C. ESTESO, M. R. FERNÁNDEZ-SANTOS, J. E. RODRÍGUEZ-GIL, N. MADRID-BURY, A. QUINTERO-MORENO (2007): Effects of cryopreservation on bull spermatozoa distribution in morphometrically distinct subpopulations. *Reprod. Dom. Anim.* 42, 354-357.
 - RUSSACK, V. (1994): Image cytometry: current applications and future trends. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 31, 1-34.
 - SINHA, C., S. YADAV, B. YADAV, J. KUMAR, K. D. SINGH (2014): Objective assessment of sperm morphometry of Barbari bucks. *Indian J. Small Rumin.* 20, 129-131.
 - THURSTON, L. M., P. F. WATSON, A. J. MILEHAM, W. V. HOLT (2001): Morphologically distinct sperm subpopulations defined by Fourier shape descriptors in fresh ejaculates correlate with variation in boar semen quality following cryopreservation. *J. Androl.* 22, 382-394.
 - VAN DIEST, P. J., J. P. A. BAAK (1991): Morphometry. In: Bibbo M. *Comprehensive cytopathology*. W. B. Saunders Company, Philadelphia, pp. 946-964.

34th

WORLD VETERINARY ASSOCIATION CONGRESS



Barcelona, Spain | May 5 - 8, 2018