



УНИВЕРЗИТЕТ У НОВОМ САДУ
ПОЉОПРИВРЕДНИ ФАКУЛТЕТ



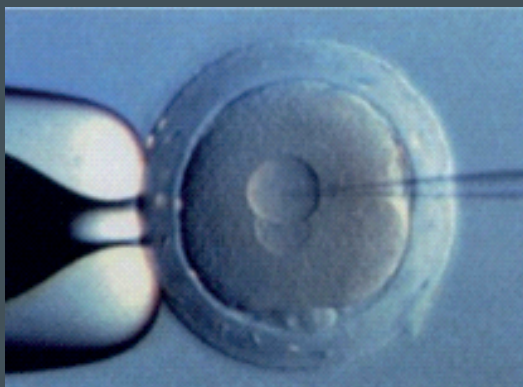
BIOTEHNOLOGIJA U REPRODUKCIJI ŽIVOTINJA

za studente stočarstva i veterinarske
medicine

Saša Dragin

Ivan Stančić

Stoja Jotanović





Saša Dragin, PhD, vanr. prof.
Ivan Stančić, DVM, PhD, vanr. prof.
Stoja Jotanović, PhD, vanr. prof.

BIOTEHNOLOGIJA U REPRODUKCIJI ŽIVOTINJA



UNIVERZITET U NOVOM SADU
POLJOPRIVREDNI FAKULTET

NOVI SAD, 2016



UNIVERZITET U NOVOM SADU
POLJOPRIVREDNI FAKULTET
*Departman za stočarstvo i
Departman za veterinarsku medicinu*



Saša Dragin

Ivan Stančić

Stoja Jotanović

BIOTEHNOLOGIJA U REPRODUKCIJI ŽIVOTINJA

Osnovni udžbenik

Novi Sad, 2016.

ISBN: 978-86-7520-374-2

EDICIJA OSNOVNI UDŽBENIK

Osnivač i izdavač edicije

*Poljoprivredni fakultet, Novi Sad,
Trg Dositeja Obradovića 8, 2100 Novi Sad*

Glavni i odgovorni urednik edicije

*Dr Nedeljko Tica, redovni profesor,
Dekan poljoprivrednog fakulteta.*

Članovi komisije za izdavačku delatnost

*Dr Ljiljana Nešić, red.i profesor.
Dr Milenko Jovanović, red. profesor.
Dr Anđelka Belić, red. profesor.*

CIP - Каталогизација у публикацији
Библиотека Матице српске, Нови Сад

636.082:606(075.8)

ДРАГИН, Саша

Biotehnologija u reprodukciji životinja / Saša Dragin, Ivan Stančić, Stoja Jotanović. - Novi Sad : Poljoprivredni fakultet, 2016 (Novi Sad : Feljton). - 205 str. : ilustr. ; 30 cm. - (Edicija Osnovni udžbenik / Poljoprivredni fakultet, Novi Sad)

Tiraž 20. - Bibliografija.

ISBN 978-86-7520-374-2

1. Станчић, Иван [аутор] 2. Јотановић, Стоја [аутор]

а) Сточарство - Биотехнологија

COBISS.SR-ID 309643271

Autori

Saša Dragin, PhD, vanr. prof., za u.n.o. Oplemenjivanje, reprodukcija i biotehnologija
životinja.

Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet, Dept. za stočarstvo.

Ivan Stančić, DVM, PhD, vanr. prof., za u.n.o. Reprodukcijska životinja.
Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet, Dept. za veterinarsku medicinu.

Stoja Jotanović, PhD, vanr. prof., za u.n.o. Reprodukcijska i sterilitet životinja.
Univerzitet u Banjoj Luci, Poljoprivredni fakultet, Katedra za veterinarstvo.

Glavni i odgovorni urednik

Nedeljko Tica, PhD, red. profesor,
Dekan poljoprivrednog fakulteta u Novom Sadu.

Urednik

Snežana Trivunović, PhD, vanr. profesor.
Direktor departmana za stočarstvo, Poljoprivredni fakultet u Novom Sadu.

Lektor

Radinka Mihajlović
Profesor srpskog jezika i književnosti

Recenzenti

Blagoje Stačić, PhD, red. profesor, za u.n.o. Reprodukcijska životinja.
Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet, Dept. za stočarstvo.

Dragutin Matarugić, DVM, PhD, red. profesor,
za u.n.o. Anatomija i fiziologija životinja.
Univerzitet u Banjoj Luci, Poljoprivredni fakultet

Izdavač

Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet, Novi Sad.

Štampanje odobrio: Komisija za izdavačku delatnost, Poljoprivredni fakultet, Novi Sad.
Mesto i godina štampanja: Novi Sad, 2016.

PREDGOVOR

Globalnim povećanjem ljudske populacije, kao nikada ranije, javlja se potreba za povećanjem proizvodnje mesa i drugih namirnica životinjskog porekla. Dalji rast proizvodnje mesa se može postići samo povećanjem parametara reproduktivne efikasnosti. U ovom pogledu, od primarne važnosti je povećanje iskorištavanja genetski superiornih individua, kao i postizanje visokih vrednosti fertiliteta veštački osemenjenih ženki. Osim toga, daljem rastu proizvodnje mesa, značajno može doprineti i povećanje otpornost životinja na različite stresogene faktore i zarazne bolesti, kao i poboljšanje uslova smeštaja, ishrane i zdravstvene zaštite životinja (FAO, 2014).

Međutim, u savremenoj tehnologiji proizvodnje deluje veliki broj akutnih i hroničnih stresogenih faktora, zbog kojih životinje nisu sposobne da fenotipski maksimalno ispolje svoje visoke genetske potencijale za produktivna i reproduktivna svojstva. Među ovim stresogenima, naročito se ističu: (a) smeštaj velikog broja životinja u relativno malom, često zatvorenom ili poluzatvorenom prostoru, u kome su kretanje i dobrobit životinja vrlo ograničeni, (b) u takvim prostorima je teško kontrolisati optimalnu temperaturu i vlažnost vazduha, kao i sadržaj štetnih gasova u vazduhu, (c) često premeštanje životinja iz jedne u drugu grupu ili iz jednog u drugi objekt, (d) transport i premeštanje raznih kategorija životinja iz jednog u drugi zapat, često iz vrlo različitih klimatskih područja i (e) neadekvatni higijenski uslovi. Navedeni stresogeni faktori snižavaju i nivo prirodnog imuniteta životinja, odnosno povećavaju stepen oboljevanja od raznih zaraznih bolesti, što ima za posledicu smanjenu produktivnu i reproduktivnu efikasnost životinja.

Zbog navedenih činjenica, savremena stočarska proizvodnja zahteva primenu raznih biotehnoloških metoda, sa kojima je moguće kontrolisati i/ili stimulisati pojedine fiziološke funkcije, odgovorne za maksimalnu fenotipsku ekspresiju pojedinih produktivnih i reproduktivnih osobina. Ovo se, naročito, odnosi na reproduktivna svojstva, jer su ona nisko genetski nasledna (stepen heritabiliteta se kreće između 10 i 30%). To znači da spoljašnji (paragenetski) faktori vrlo značajno utiču na fenotipsku manifestaciju genetskog potencijala za reproduktivna svojstva. Primena ovih metoda se naziva **biotehnologija reprodukcije** ili tzv. asistirana (kontrolisana) reprodukcija.

Osnovni cilj ovog udžbenika je da se prikažu savremena naučna saznanja o principima fiziološkog delovanja, praktičnoj primeni, kao i efektima koji se postižu posle tretmana životinja različitim biotehnološkim metodama. Stim u vezi, tekst udžbenika je podeljen na tri osnovna poglavlja: (1) Fiziologija reprodukcije domaćih vrsta sisara i ptica, (2) Biotehnologije koje se koriste za kontrolu i/ili stimulaciju reproduktivnih funkcija i (3) Biotehnologije koje se koriste za *in vitro* manipulaciju sa gametima i ranim embrionima. Kao osnovni udžbenik, prvenstveno je namenjen studentima osnovnih akademskih studija stočarstva, za izborni predmet *Biotehnologija u reprodukciji životinja*. Korisno će poslužiti kao pomoćni udžbenik za savladavanje većeg dela gradiva iz predmeta Reprodukcijska domaćih životinja, studentima veterinarske medicine na Poljoprivrednom fakultetu u Novom Sadu. Takođe je predviđen i kao osnovni udžbenik za predmet Biotehnologija 2016. studentima osnovnih akademskih studija stočarstva, na Poljoprivrednom fakultetu u Banjoj Luci.

Novi Sad, 2016. godine.

A u t o r i

S. Dragin, I. Stančić i S. Jotanović

SADRŽAJ

| | |
|--|------------|
| 1. FIZIOLOGIJA REPRODUKCIJE DOMAĆIH SISARA | 1 |
| 1.1. REPRODUKCIJA ŽENKE (<i>Stančić, I., Dragin, S.</i>) | 1 |
| 1.1.1. POLNO SAZREVANJE | 1 |
| 1.1.2. ESTRUSNI CIKLUS | 4 |
| 1.1.3. PROCES OPLODNJE | 8 |
| 1.1.4. BREMENITOST (GRAVIDITET) | 9 |
| 1.1.5. POROĐAJ (PARTUS) | 14 |
| 1.1.6. LAKTACIJA | 18 |
| 1.2. REPRODUKCIJA MUŽJAKA (<i>Dragin, S., Stančić, I.</i>) | 20 |
| 1.2.1. POLNO SAZREVANJE | 20 |
| 1.2.2. PRODUKCIJA SPERME | 21 |
| 1.2.3. POLNO PONAŠANJE | 23 |
| 2. FIZIOLOGIJA REPRODUKCIJE DOMAĆIH PTICA | 25 |
| 2.1. FIZIOLOGIJA ŽENKE (<i>Stančić, I., Dragin, S.</i>) | 25 |
| 2.2. FIZIOLOGIJA MUŽJAKA (<i>Stančić, I., Dragin, S.</i>) | 28 |
| 3. BIOTEHNOLOGIJA REPRODUKCIJE | 30 |
| 3.1. BIOTEHNOLOGIJE ZA KONTROLU I STIMULACIJU REPRODUKTIVNIH FUNKCIJA (<i>Stančić, I., Jotanović, S.</i>) | 31 |
| 3.1.1. SINHRONIZACIJA ESTRUSA I OVULACIJE | 31 |
| 3.1.2. DIJAGNOZA RANE GRAVIDNOSTI | 56 |
| 3.1.3. INDUKCIJA I SINHRONIZACIJA PARTUSA | 69 |
| 3.1.4. KONTROLA PERIODA POSLE PARTUSA | 73 |
| 3.1.5. POVEĆANJE VELIČINE LEGLA | 77 |
| 3.1.6. VEŠTAČKO OSEMENJAVANJE | 89 |
| 3.1.7. TRANSPLANTACIJA EMBRIONA | 146 |
| 3.2. BIOTEHNOLOGIJE ZA IN VITRO MANIPULACIJU SA GAMETIMA I EMBRIONIMA (<i>Dragin, S., Jotanović, S., Stančić, I.</i>) | 171 |
| 3.2.1. DOBIJANJE GAMETA | 171 |
| 3.2.2. PROIZVODNJA RANIH EMBRIONA IN VITRO | 174 |
| 3.2.3. REPRODUKTIVNO KLONIRANJE EMBRIONA | 184 |
| 3.2.4. TRANSGENEZA | 183 |
| 3.2.5. FORMIRANJE HIMERA | 189 |
| 3.2.6. ODREĐIVANJE POLA GAMETA I EMBRIONA (Sexing) | 190 |
| 3.2.7. ČUVANJE GAMETA I EMBRIONA IN VITRO | 193 |
| 3.2.8. FORMIRANJE BANKE GENA | 196 |
| 4. ODABRANA LITERATURA | 203 |



Saša Dragin, BS, MSc, PhD, vanredni profesor, rođen je 10.06.1972. godine u Somboru. Poljoprivredni fakultet u Novom Sadu (smer stočarstvo), završio je 1999. godine. Na ovom fakultetu je, neposredno posle završetka studija, počeo da radi. Završio je posle diplomanske studije, smer Genetika i oplemenjivanje domaćih životinja na Poljoprivrednom fakultetu u Novom Sadu i odbranio magistarsku tezu, 2003. godine. Doktorirao je na Poljoprivrednom fakultetu u Novom Sadu, 2007. godine, gde i danas radi u zvanju vanrednog profesora, na katedri za stočarstvo. Izvodi nastavu na osnovnim akademskim, master i doktorskim studijama, iz oblasti Fiziologije i Biotehnologije reprodukcije životinja. Autor je 59 naučnih radova, pet monografija i jednog praktikuma. Obučen je za rad u laboratoriji za molekularnu genetiku (*Winter School of Molecular Genetic - Domžale 2001.*). Boravio je na Univerzitetu države Illinois - Urbana u Sjedinjenim Američkim Državama 2002. godine, gde je radio u laboratoriji za dizajniranje transgenih životinja i u laboratoriji za molekularnu genetiku domaćih životinja. Obavio je više studijskih boravaka u "Istraživačkom institutu za animalnu proizvodnju" u Nitri, R. Slovačka, gde je, na Departmanu za Genetiku i reprodukciju domaćih životinja, izveo oglede za magistarsku tezu i doktorsku disertaciju.



Ivan Stančić, DVM, MSc, PhD, vanredni profesor, završio je Fakultet veterinarske medicine u Beogradu 2006. godine. Do kraja 2009. godine, radio je, kao veterinar, u ambulanti za male životinje u Novom Sadu. Godinu dana je bio profesor Visoke poljoprivredne škole strukovnih studija vetricine u Šapcu. U zvanje docenta, za užu naučnu oblast Reprodukcijska životinja, na Poljoprivrednom fakultetu u Novom Sadu, Departman za veterinarsku medicinu, izabran je 2010., a u zvanje vanrednog profesora 2015. godine. Izvodi nastavu na studijskom programu osnovnih integrisanih studija, za predmete *Reprodukcija domaćih životinja* i *Patologija reprodukcije i porodiljstvo domaćih životinja*. Izvodi i nastavu na master i doktorskim studijama. Mentor je dve doktorske disertacije. Objavio je 85 naučnih radova, jedan osnovni udžbenik, jedan pomoćni udžbenik, jedan praktikum za studente veterinarske medicine i jednu monografiju. Obavio je više studijskih boravaka u Istraživačkom institutu za animalnu proizvodnju i u Departmanu za fiziologiju reprodukcije, Slovačkog nacionalnog univerziteta u Nitri, Republika Slovačka.



Stoja Jotanović, BS, MSc, PhD, vanredni profesor, rođena je 22.05.1969. godine, u Čečavi, Republika Srpska. Osnovne studije je završila 1994. godine, a magistarske studije 2000. godine na Poljoprivrednom fakultetu u Novom Sadu. Doktorsku disertaciju je odbranila 2006. godine, na Poljoprivrednom fakultetu u Banjoj Luci. Magistarska teza i doktorska disertacija su bile iz oblasti reprodukcije svinja. Jedno vreme je radila kao tehnolog i šef službe za reprodukciju, na svinjogojskoj farmi u Novoj Topoli, zatim kao Profesor, Srednja poljoprivredna škola, Gradiška i Loan officer, World Vision. U zvanje višeg asistenta, na Poljoprivrednom fakultetu u Banjoj Luci, za predmete Reprodukcijska domaćih životinja i Biotehnologija reprodukcije domaćih životinja, izabrana je 2003. godine. Danas je, na istom fakultetu, vanredni profesor za ove predmete, na osnovnim akademskim studijama stočarskog smera. Objavila je 51 naučni rad i jednu monografiju. Bila je mentor ili član komisije 7 magistarskih teza i doktorskih disertacija. Učestvovala je na više naučno-istraživačkih projekata.

IZ RECENZIJA

Dr Dragutin Matarugić, DVM, red. prof.

Na osnovu detaljnog pregleda teksta udžbenika *Biotehnologija u reprodukciji životinja*, autora prof. dr Saše Dragina, prof. dr Ivana Stančića i prof. dr Stojke Jotanović, smatram da je, u potpunosti, napisan prema važećem nastavnom planu i programu Poljoprivrednog fakulteta u Novom Sadu, za studente osnovnih akademskih studija stočarstva. Tekst je zasnovan na savremenim naučnim i stručnim dostignućima iz oblasti Biotehnologije reprodukcije životinja. Obim teksta je primeren planiranom nedeljnom fondu časova (2+2) za ovaj izborni predmet. Ovaj tekst obuhvata i značajan deo gradiva iz predmeta *Reprodukcija i VO domaćih životinja*, za studente integrisanih osnovnih i master-akademskih studija veterinarske medicine, Departmana za veterinarsku medicinu, Poljoprivrednog fakulteta u Novom Sadu. Takođe, tekst ovog udžbenika, u potpunosti, obuhvata i gradivo iz predmeta *Biotehnologija u reprodukciji životinja*, za studente osnovnih akademskih studija stočarstva, Poljoprivrednog fakulteta u Banjoj Luci.

Na osnovu svega navedenog, pozitivno ocenjujem ovaj rukopis i predlažem Nastavno-naučnom veću Poljoprivrednog fakulteta u Novom Sadu da ga prihvati i odobri izdavanje ovog teksta, i to: (1) kao *osnovnog udžbenika* za izborni predmet *Biotehnologija u reprodukciji životinja*, za studente osnovnih akademskih studija stočarstva i (2) kao *pomoćnog udžbenika* iz predmeta *Reprodukcija i VO domaćih životinja*, za studente integrisanih osnovnih i master-akademskih studija veterinarske medicine. Osim toga, predlažem i Nastavno-naučnom veću Poljoprivrednog fakulteta u Banja Luci, da prihvati ovaj tekst, kao *osnovni udžbenik* za obavezni predmet *Biotehnologija u reprodukciji domaćih životinja*, za studente stočarstva.

Banja Luka, 2016. god.

Recenzent,
Dr Dragutin Matarugić, DVM, red. prof.
u.n.o. Anatomija i fiziologija životinja
Poljoprivredni fakultet, Banja Luka.

Dr Blagoje Stančić, red. prof.

Tekst je napisan koncizno i lako razumljivim jezikom, ali na visokom naučno-stručnom nivou, što pokazuje veliko naučno i stručno znanje, kao i pedagošku sposobnost autora. Svaki od autora je napisao, otprilike, sličan obim teksta udžbenika. U prvom poglavlju je vrlo detaljno opisana morfologija muških i ženskih polnih organa pojedinih vrsta sisara, sa brojnim kolor ilustracijama (fotografije i sheme). Zatim su detaljno opisane sve reproduktivne funkcije ženke (polno sazrevanja, estrusni ciklus, estrus, ovulacija, oplodnja, gravidnost, partus, puerperium, laktacija) i mužjaka (endokrini kontrola reproduktivnih funkcija, polno sazrevanje, produkcija i osobine sperme i polno ponašanje). Zatim je, u poglavlju 2 detaljno opisana morfologija ženskih i muških polnih organa domaćih vrsta živine (kokoš, guska, patka, ćurka). Dat je i detaljan opis fiziologije pojedinih reproduktivnih funkcija ženke (polno sazrevanja, ovulacija, ciklus formiranja jajeta, ovipozicija, inkubacija, embrionalni razvoj i ležanje) i mužjaka (polno sazrevanje, produkcija i osobine sperme). U poglavlju 3 su, veoma detaljno i na osnovu savremenih naučnih rezultata, opisani biotehnoške metode, koji se koriste za asistiranu kontrolu i stimulaciju pojedinih reproduktivnih funkcija (veštačko osemenjavanje, transplantacija embriona, kontrola-sinhronizacija estrusa i ovulacije, rana dijagnoza gravidnosti, kontrola-sinhronizacija partusa i postpartalnog prioda, mogućnosti povećanja veličine legla), kao i metode za *in vitro* manipulaciju sa gametima i embrionima (čuvanje gameta i embriona dubokim zamrzavanje, sexin gameta i embriona, dobijanje oocita i ranih embriona, reproduktivno kloniranje embriona, *in vitro* sazrevanje i *in vitro* oplodnja oocita, transgeneza i formiranje himera, formiranje banke gena). Celokupna problematika je detaljno opisana sa specifičnostima pojedinih vrsta domaćih sisara (svinje, goveda, ovce, koze, konji, pasji, mačke) i domaćih vrsta ptica (kokoši, guske patke i ćurke). Uzimajući u u obzir sve navedeno, pozitivno ocenjujem ovaj rukopis i predlažem Nastavno-naučnom veću Poljoprivrednog fakulteta u Novom Sadu da ga prihvati u ovakvom obliku i štampa kao *osnovni udžbenik* za izborni predmet *Biotehnologija u reprodukciji životinja*, za studente osnovnih akademskih studija stočarstva, kao i *pomoćni udžbenik* iz predmeta *Reprodukcija i VO domaćih životinja*, za studente integrisanih osnovnih i master-akademskih studija veterinarske medicine, Departmana za veterinarsku medicinu, Poljoprivrednog fakulteta u Novom Sadu. Takođe, predlažem i Nastavno-naučnom veću Poljoprivrednog fakulteta u Banjoj Luci, da prihvati ovaj tekst, kao *osnovni udžbenik* za osnovni predmet *Biotehnologija u reprodukciji domaćih životinja*, za studente stočarstva.

Konačno, mislim da bi ovaj tekst mogao vrlo korisno poslužiti i svim stručnjacima, agronomima, veterinarima i biolozima, koji se bave ovom problematikom.

Novi Sad, 2016. god.

Recenzent,
Dr Blagoje Stančić, red. prof.
u.n.o. Reprodukcija životinja
Departman za stočarstvo,
Poljoprivredni fakultet, Novi Sad

1. FIZIOLOGIJA REPRODUKCIJE DOMAĆIH SISARA

1.1. REPRODUKCIJA ŽENKE (*Stančić, I., Dragin, S.*)

Osnovne reproduktivne funkcije ženke su: (1) polno sazrevanje, (2) estrusni ciklus, (3) proces oplodnje (*fertilizacije*), (4) bremenitost (*graviditet*), (5) porođaj (*partus*), (6) sinteza i izlučivanje mleka (*laktacija*) i (7) uspostavljanje estrusnog ciklusa posle partusa, odnosno zalučnja legla kod krmača. Odvijanje ovih funkcija je podvrgnuto snažnom uticaju interakcije brojnih paragenetskih faktora. Priplodne ženske životinje su osnovna kategorija reproduktivnog zapata, pa je dobro poznavanje fiziologije njihovih reproduktivnih funkcija, osnova za pravilno definisanje tehnologije njihovog odgoja i efikasnog reproduktivnog iskorištavanja.

Fiziologija reproduktivnih funkcija je, u osnovi, genetski determinisana, ali su fenotipske vrednosti svih parametara reproduktivne performanse, podvrgnute snažnom uticaju paragenetskih (spoljašnjih) faktora. Sve reproduktivne funkcije su kontrolisane složenim neuro-endokrinim mehanizmima, na osovini centralni nervni sistem (CNS)-hipotalamus-hipofiza-jajnik.

1.1.1. POLNO SAZREVANJE

Diferencijacija pola i razvoj ženskih polnih organa započinje u vrlo ranom periodu embrionalnog razvoja. Od tog momenta, ženski polni organi podležu brojnim morfološkim, histološkim i fiziološkim promenama, koje se završavaju postizanjem polne zrelosti, tj. pubertetom. Fiziološka polna zrelost se manifestuje pojavom prve ovulacije na jajnicima mlade ženke, čime se stvaraju uslovi za uspostavljanje ciklične ovarijalne aktivnosti i pojavu spoljašnjih znakova estrusa. Međutim, prva ovulacija, ponekad, nije praćena manifestacijom spoljašnjih znakova estrusa (tzv. tihi estrus), pa prolazi nezapaženo, a prvi pubertetski estrusni ciklusi mogu biti neregularnog trajanja. Ova pojava je naročiti zapažena kod šilježica i junica, a manje kod nazimica i omica.

Razvoj polnih organa, tokom perioda prenatalnog razvoja i tokom prvih nedelja ili meseci postnatalnog života (zavisno od vrste), nije kontrolisan delovanjem neurohormonalnih mehanizama na osovini CNS-hipotalamus-hipofiza-jajnik. Činjenica je, međutim, da se hipofizarni gonadotropini (folikulostimulirajući hormon-FSH i luteinizirajući hormon-LH) sintetišu u adenohipofizi znatno pre puberteta, ali se ritam i količina njihovog izlučivanja u telesnu cirkulaciju, znatno razlikuju od onih tokom estrusnog ciklusa polno zrele ženke. Izvesne količine estrogena se, takođe, izlučuju iz antralnih (tercijalnih ili De Graf-ovih) folikula jajnika, znatno pre puberteta, ali se povratna sprega, na osovini jajnik-hipotalamus-hipofiza, ipak, ne uspostavlja. Naime, za konačno sazrevanje i ovulaciju folikula je potrebno da se, iz adenohipofize, izluči tzv. *ovulatorni talas LH*. Ovaj talas predstavlja neprekidno povećanje sekrecije LH iz adenohipofize, tako da se njegova koncentracija u telesnoj cirkulaciji stalno povećava, tokom 30 do 40h pre ovulacije, kada naglo opada na bazalni nivo. Ovo tonično oslobađanje LH je posledica negativnog povratnog delovanja visokih koncentracija estrogena na hipotalamus i adenohipofizu. Sposobnost da uspostavi ovu povratnu spregu, na osovini jajnik-hipotalamus-adenohipofiza, mlada ženka postiže

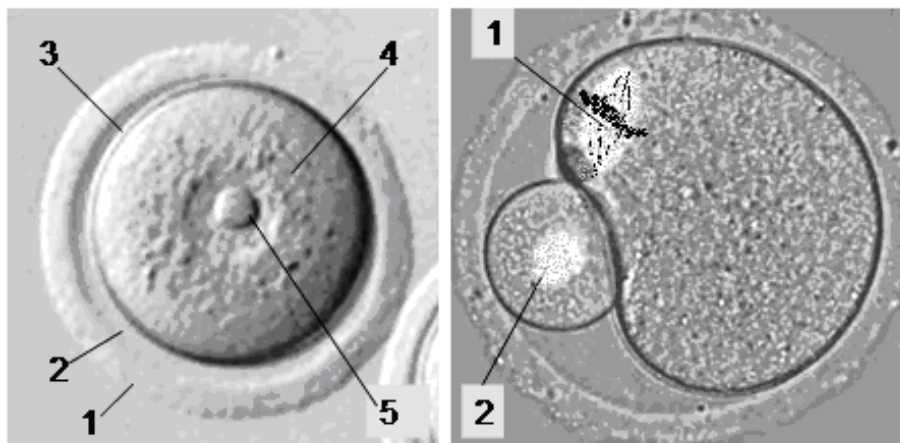
postepeno i u funkciji je njene starosti, a znatno manje telesne mase. Precizni fiziološki mehanizmi ovog fenomena nisu sasvim razjašnjeni. Poznato je, međutim, da oslobađanje ovulatornog talasa LH iz adenohipofize stimuliše negativno povratno delovanje visokih koncentracija estrogena. Međutim, potrebno je da mlada ženka dostigne određenu starost, da bi se na membranama neurosekretornih ćelija hipotalamičnih nukleusa razvili receptori za estrogen. Tek tada su ove ćelije sposobne da, na delovanje estrogena, odgovore izlučivanjem oslobađajućeg hormona za LH (gonadotropin releasing hormon – GnRh). Zbog toga, tretman suviše mladih životinja, na primer, nazimica mlađih od 3 meseca, preparatima placentalnih gonadotropina (eCG i hCG), ne izaziva pojavu ovulacije, estrusa i uspostavljanje estrusnog ciklusa.

Na osnovu navedenih činjenica, jasno je da mlada ženka mora postići određenu minimalnu starost (što je genetski determinisano za svaku vrstu, ali i jedinku), kako bi se stvorili uslovi za pokretanje i održavanje neuro-endokrinih mehanizama, koji dovode do pojave prve ovulacije i uspostavljanja prvog estrusnog ciklusa, odnosno do postizanja polne zrelosti. Kada se jednom stvore uslovi za uspostavljanje negativnog povratnog delovanja estrogena, koga sintetišu ćelije teke interne zida antralnih folikula, dolazi do inhibicije izlučivanja FSH, a stimuliše se izlučivanje LH iz adenohipofize. Ovulatorni talas LH stimuliše konačno sazrevanje predovulatornih folikula (i jajnih ćelija u njima) i dovodi do ovulacije. U šupljinama ovuliranih folikula se formiraju, prvo hemoragična tela (*corpora hemorrhagica, CH*), a 2-3 dana kasnije funkcionalna žuta tela (*corpora lutea, CL*). Luteane ćelije sintetišu i, u krv, izlučuju progesteron. Time se uspostavlja prvi pubertetski estrusni ciklus. U fiziološkom pogledu, moment postizanja polne zrelosti (puberteta) se definiše pojavom prve ovulacije na jajniku i uspostavljanjem prvog estrusnog ciklusa, normalnog trajanja, prosečno 21 dan (u normalnim granicama 18 do 24 dana), izuzev kod ovce, kod koje estrusni ciklus traje prosečno 17 dana (u normalnim granicama 15 do 19 dana), odnosno sposobnošću mlade ženke da uspostavi i održi normalnu gravidnost, posle osemenjavanja u ovom estrusu.

Kako je već istaknuto, proces polnog sazrevanja je kontrolisan složenim neurohormonalnim mehanizmima, na osovini CNS-hipotalamus-hipofiza-jajnik. Za konačno uspostavljanje povratnog delovanja ovih mehanizama, koje će dovesti do prve pubertetske ovulacije, tj. postizanja puberteta, potrebno je da ženka dostigne određenu starost. Međutim, iako je starost ženke svake vrste, kod pojave puberteta, u osnovi, genetski determinisana, fenotipska vrednost ove osobine ispoljava vrlo veliku varijabilnost. Široko variranje starosti ženki kod postizanja puberteta je posledica uticaja interakcije većeg broja genetskih i paragenetskih faktora. Među genetskim faktorima se ističu vrsta, rasa, individua, stepen inbreedinga i kombinacija meleženja, a među paragenetskim ishrana, kontakt sa polno zrelim mužjakom, godišnja sezona (posebno temperatura i trajanje dnevnog fotoperioda), razni stresogeni (kao što je transport i premeštanje grla iz grupe u grupu), socijalni faktori (broj grla u grupi), način smeštaja (u otvorenom ili zatvorenom prostoru), opšta telesna kondicija, zdravstveno stanje i tretman egzogenim hormonskim preparatima (gonadotropini i polni hormoni).

U praksi je dosta teško kontrolisati delovanje ovih faktora, posebno kada je potrebno da se postigne optimalna proporcija između starosti i telesne mase mladih ženki kod pojave puberteta. Ovaj problem se naročito ističe u savremenoj intenzivnoj proizvodnji. Naime, visok genetski potencijal za intenzivan porast i kvalitetna ishrana, omogućavaju da mlade ženke, relativno lako postignu veliku telesnu masu, kada su suviše mlade za postizanje fiziološke, a još manje zootehnoške polne zrelosti. Zbog toga je veoma važno poznavati sve genetske i paragenetske faktore, koji utiču na starost ženki pojedinih vrsta, odnosno rasa unutar jedne vrste, kod postizanja polne zrelosti, kako bi se mogla definisati optimalna tehnologija odgoja i reproduktivne eksploatacije mladih ženki.

Oogeneza je proces formiranja oocita (jajne ćelije) u različitim formama ovarijalnih folikula (primarni, sekundarni i tercijalni). Ženska jedinka se rađa sa određenim brojem primarnih folikula, a u svakom folikulu se nalazi po jedna jajna ćelija. Smatra se da, kod sisara, ima nekoliko stotina hiljada oocita u primarnim folikulima na oba jajnika, prilikom rođenja ženske jedinke. Oocit nastaje u procesu mejotičkih i mitotičkih (redukcionih) deoba. Svi oociti u jajniku se nalaze u diplotenu prve mejotičke deobe svog nukleusa. Takav nukleus se naziva germinativni vezikul (GV) i, još uvek, zbog toga što nije završena redukciona deoba, ima $2n$ (diploidan) broj hromozoma. U ovom stadijumu, oocit ostaje sve do neposredno pred ovulaciju, kada na predovulturni antralni (Tercijalni, De Grafov) folikul, deluje ovulacioni talas LH. Veliki broj oocita ne ovulira, nego uginjava, tokom tzv. procesa atrezije folikula u kojima se nalaze. Dakle, samo oociti koji se nalaze u predovulturnim folikulima, koji mogu da reaguju na delovanje LH, nastavljaju prvu mejotičku deobu, redukuju diploidan na haploidan (n) broj hromozoma i ulaze u drugu mejozu, koja se, neposredno pred ovulaciju, zaustavlja u metafazi druge mejoze. To su tzv. MfII-oociti ili zreli oociti.



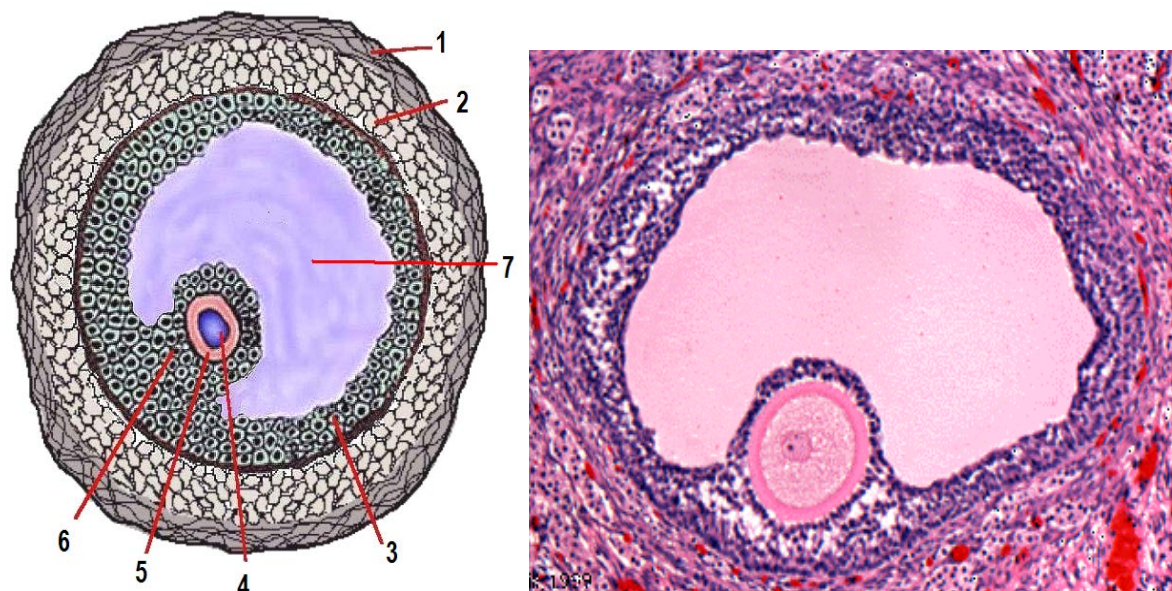
Slika 1. Građa oocita (jajne ćelije) sisara

Na levoj strani su prikazani osnovni delovi nezrelog oocita: 1-Zona pelucida, 2-Perivitellusni prostor; 3-Vitelusna membrana; 4-Vitelus, 5-Nukleus. Ovakav oocit se nalazi u svom folikulima na jajniku. Njegov nukleus je u fazi germinativnog vezikula (diploten prve mejotičke deobe). Tek tokom ovulacije, pod dejstvom LH, dolazi do nastavka i završetka prve mejoze, tzv. raspad germinativnog vezikula. Nastavlja se i druga (redukciona) mejotička deoba, ali se zaustavlja u metafzi (MfII), slika desno. Takva jajna ćelija ovulira i dospeva u jajovod. Ona je sposobna za oplodnju. U vitelusu se vidi deobno vreteno druge mejoze i hromozomi postavljeni u ekvatorijalnoj ravni (1). U perivitellusnom prostoru se nalazi prvo polarno telešće (2). To je višak hromatinskog materijala, izbačenog iz vitelusa, posle završetka prve mejoze.

Ovaj proces nastavka deobe nukleusa, naziva se i *raspad germinativnog vezikula* (postepeno nestaje nukleusna membrana, dolazi do kondenzacije hromozoma i do završetka prve mejoze).

Zrela jajna ćelija sisara ima prečnik 120 do 180 μ m i potpuno je sferičnog (loptastog) oblika. Obavijena je jednom zaštitnom, mukopolisagaridnom ovojnicom (*zona pelucida*), koja je debljine oko 20 μ m. Ispod ove ovojnice, nalazi se tanak sloj citoplazme (*perivitellusni prostor*). Vitelus je granulisan, obavijen *vitelusnom membranom* i njemu se nalazi *nukleus* jajne ćelije. U perivitellusnom prostoru zrele jajne ćelije, nalazi se tzv. prvo polarno telešće, nastalo izbacivanjem viška hromatinskog materijala, nastalog završetkom prve mejotičke deobe.

Folikulogeneza je proces formiranja folikula, u kojima raste i sazreva jajna ćelija. Postoji tri osnovne forme ovarijalnih folikula: primarni, sekundarni i tercijalni. Primarni folikul nije vidljiv golim okom, i predstavlja oocit, obavijen jednim slojem granuloza ćelije, preko koje se nalazi vezivna ovojnica (zid folikula). Sekundarni oocit je, takođe, mikroskopske građe, ali je jajna ćelija, u sekundarnim folikulima, obavijena sa nekoliko slojeva granuloza ćelija. Kada broj ovih slojeva dostigne 5-6, tada se, između njih formira jedna šupljina (*antrum folliculi*), pa nastaje tercijalni (*antralni ili De Grafov*) folikul.



Slika 2. Poprečni presek tercijalnog (De Grafovog, antralnog) folikula

1. Teca externa; 2. Teca interna; 3. Granuloza ćelije; 4. Oocit; 5. Zona pelucida; 6. Cumulus oophorus; 7. Antrum (šupljna) folikula. Desno je histološki presek tercijalnog folikula. Vide se ćelije zida folikula (tamno ljubičasto), veliki antrum folikula (svetlo roze), cumulus oophorus i jajna ćelija, oocit (prsten tamnije roze boje je zona pelucida, svjetlije roze tačkasta masa je vitelus, a tamnije roze okruglasta masa, sa crnom tačicom, je nukleus).

Ovi, antralni ili vezikularni folikuli se mogu videti na površini jajnika, kada dostignu prečnik oko 1mm. Ukupna populacija folikula u jajnicima je definisana već kod rođenja, tako da se, u kasnijem životu, njihov broj ne uvećava, već se smanjuje i to tako što ogroman broj folikula podleže procesu atrezije (propadanja), a samo mali broj folikula dostigne predovulatornu veličinu i ovulira. Antralni folikul ima svoj beličasto-providan zid, sastavljen od spoljašnje ovojnice (*teca externa folliculi*), srednjeg sloja (*membrana Slaviansky*) i unutrašnjeg sloja (*teca interna folliculi*). Na unutrašnjoj ovojnici zida folikula, nalazi se sloj tzv. *granuloza ćelija*. Ove ćelije, na jednom delu zida folikula, grade kuboidalnu nakupinu (*cumulus oophorus*), u kojoj se napazi oocit. Šupljina folikula (*antrum folliculi*) je ispunjena sluzavom tečnošću (*liquor folliculi*).

1.1.2. ESTRUSNI CIKLUS

Estrusni ciklus je period između pojave dva estrusa (polna žara) i prosečno traje 21 dan, sem kod ovce (17 dana). Granice normalnog trajanja estrusnog ciklusa se kreću između 18 i 24 dana, kod krave, krmače, kobile i koze, a 15 do 19 dana kod ovce. Prva, a često i druga ovulacija, kod određenog broja ženki (koji varira u zavisnosti od vrste i nekih paragenetskih

faktora), nije praćena manifestacijom spoljašnjih znakova estrusa, prvi pubertetski estrusni ciklusi su, često, neregularnog trajanja, a prvi estrusni period (estrus) je znatno kraći od trećeg estrusa.

Prema morfološkim i fiziološkim promenama na polnim organima, posebno na jajnicima, estrusni ciklus se može podeliti na dve osnovne faze: (a) *folikularna* ili *estrogena* i (b) *lutealna* ili *progesteronska* faza.

Folikularna faza traje 4 do 5 dana i karakteriše se rastom i razvojem ovarijalnih folikula, kao i visokom koncentracijom estrogena u krvnoj plazmi. Estrogen sintetišu ćelije teke interne zida antralnog (tercijalnog ili De Grafovog) folikula. Tokom ove faze, ženka manifestuje i karakteristične spoljašnje znake estrusa: otok (edem) i crvenilo (hiperemija) vulve, uznemirenost, smanjen apetit, zaskakivanje na druge životinje i dozvoljavanje da budu zaskočene, kao i manifestacija tzv. refleksa stajanja (refleks imobilizacije). Refleks stajanja je najsigurniji znak estrusa, a posebno se dobro ispoljava u prisustvu polno zrelog mužjaka i pritiskom na lumbo-sakralni deo kičmenog stuba. Sve ove promene su posledica delovanja estrogena. Moment početka refleksa stajanja je u vrlo visokoj korelaciji sa momentom početka ovulacije. Tako se ovulacija kod kobile događa pri kraju perioda refleksa stajanja, kod krave oko 10 do 12h posle prestanka znakova estrusa, kod ovce i koze krajem druge polovine estrusa, a kod krmače na početku zadnje trećine perioda refleksa stajanja.

Lutealna faza. Posle ovulacije, započinje druga faza estrusnog ciklusa, tzv. lutealna ili progesteronska faza. Naime, u šupljinama ovuliranih folikula se formiraju žuta tela (*corpora lutea*). Lutealne ćelije nastaju umnožavanjem granuloza ćelija teke interne zida ovuliranih folikula. Ove, tzv. lutealne ćelije, sintetišu i izlučuju u krv drugi ženski polni hormon – progesteron. Ovaj hormon deluje povratnom spregom na hipotalamus, tako što inhibira izlučivanje GnRh. To ima za posledicu inhibiciju izlučivanja gonadotropina (FSH i LH) iz adenohipofize. Zbog toga se lutealna faza estrusnog ciklusa, koja traje 15 do 16 dana (kod ovce 12 dana), karakteriše izostankom folikularnog rasta i ovulacije, padom koncentracije estrogena i povećanjem koncentracije progesterona u telesnoj cirkulaciji, kao i izostankom manifestacije spoljašnjih znakova estrusa. U slučaju da, tokom estrusnog perioda, nije došlo do oplodnje i uspostavljanja gravidnosti, 18. – 19. dana ciklusa (kod ovce 15. – 16. dana), dolazi do morfološke i funkcionalne regresije cikličnih žutih tela. To je posledica luteolitičkog delovanja prostaglandina $F_{2\alpha}$ (PG $F_{2\alpha}$), koji sintetišu specijalne žlezde u endometriumu negravidnog uterusa, a preko utero-ovarijalne arterije dospeva do jajnika, tj. žutog tela. Regresijom žutih tela dolazi do pada koncentracije progesterona u krvnoj plazmi na bazalni nivo i prestanka inhibicije izlučivanja gonadotropina iz adenohipofize. Time su stvoreni uslovi za ponovni rast i funkcionalnu aktivnost folikula, čime se uspostavlja novi estrusni ciklus.

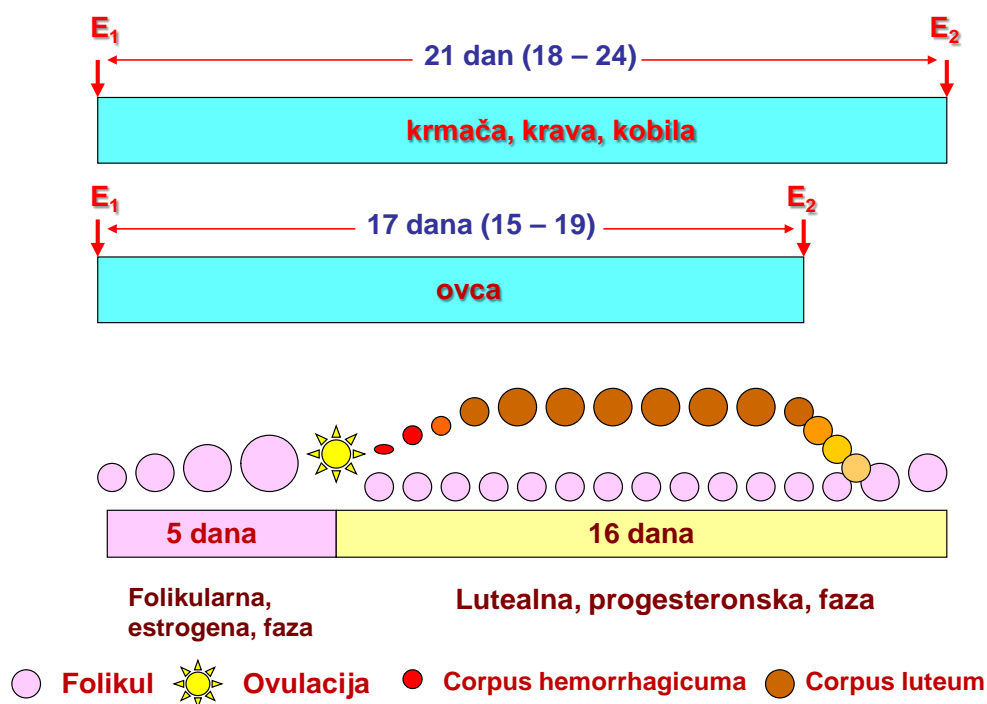
Estrus (polni žar) je period estrusnog ciklusa, u kome ženka ispoljava vrlo markantne spoljašnje (morfološke i psihičke) znake. Spoljašnji polni organi su otečeni (edematozni) i crveni (hiperemični), životinja ispoljava karakterističan refleks stajanja, u prisustvu mužjaka i/ili pritiskom na leđa (lumbo-sakralni region), skače na druge životinje i dozvoljava da bude zaskočena. Kod nekih životinja (krava) postoji dosta obilan, providan sluzavi iscedak iz vulve (tzv. estralna sluz). Ženka gubi apetit, nemirna je, ispravlja uši, ženke u laktaciji smnjuju dnevnu produkciju mleka. Estrus traje najduže kod kobile, 3 do 11 dana (prosečno 6 dana). Kod krmače traje 1 do 3 dana, kod ovce i koze oko 1 dan, dok estrus traje najkraće kod krave, 12 do 18 sati. U ovom periodu je ženka prijemčiva za mužjaka, dozvoljava mu da izvede kompletan akt koitusa, i sposobna je da bude uspešno oplodena.

Ovulacija je, kod svih domaćih životinja, spontana (izuzev mačke, kod koje je provocirana aktom parenja) i predstavlja razgradnju zida ovulatornog folikula, iz kojeg izlazi folikularna tečnost i jajna ćelija u infundibulum jajovoda. Početak manifestacije refleksa stajanja i početak ovulacije su u dobroj međusobnoj povezanosti. Ovulaciona vrednost predstavlja broj ovuliranih jajnih ćelija u jednom estrusu. Ovulaciju izaziva luteinizirajući hormon (LH) iz adenohipofize.

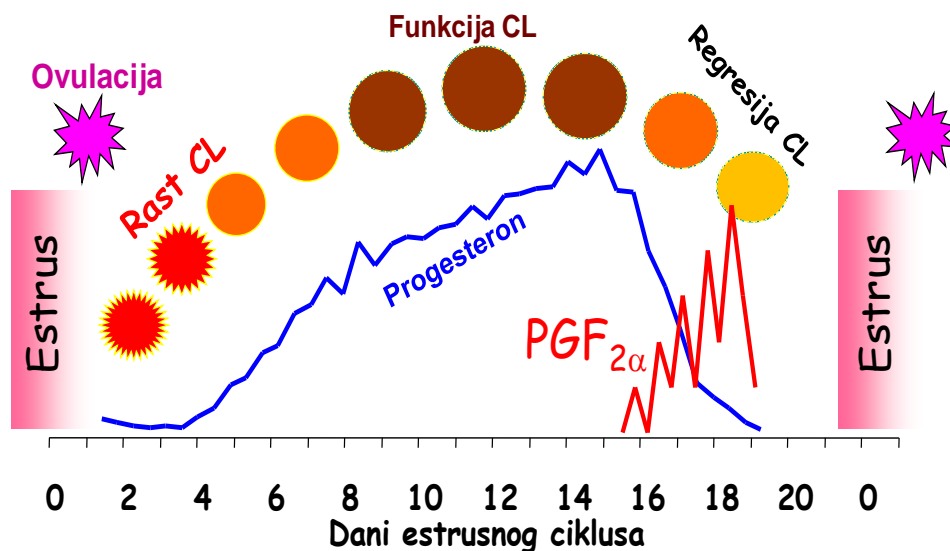
Tabela 1. Estrusni ciklus, estrus i ovulacija u domaćih sisara

| V r s t a | Trajanje estrusnog ciklusa (dani) | Trajanje estrusa (sati) | Vreme pojave ovulacije |
|-----------|-----------------------------------|-------------------------|----------------------------------|
| Ovca | 17 (15 – 19) | 24 - 36 | 24-30h posle početka estrusa |
| Koza | 21 (18 – 24) | 32 - 40 | 26 do 34h posle početka estrusa |
| Krmača | 21 (18 – 24) | 24 - 72 | 16 do 48h posle početka estrusa* |
| Krava | 21 (18 – 24) | 12 - 24 | 10 do 12h posle kraja estrusa |
| Kobila | 21 (18 – 24) | 4 - 11 | 1 do 2 dana pre kraja estrusa |

* Ovulacija se događa na početku zadnje trećine estrusa, bez obzira na njegovo trajanje.

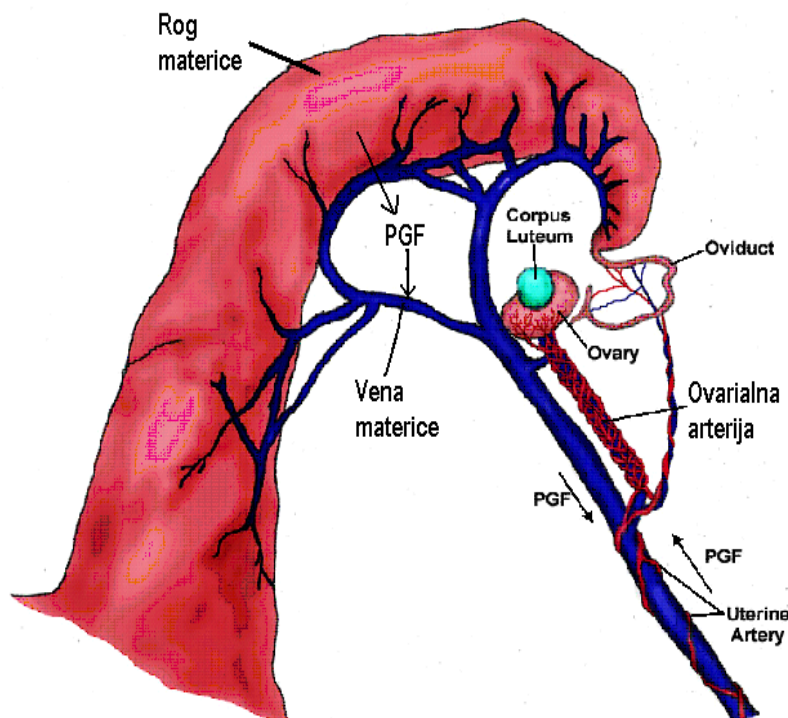


Slika 3. Faze estrusnog ciklusa



Slika 4. Formiranje, funkcija i regresija cikličnog corpus luteum-a (CL)

Pri kraju estrusnog ciklusa, endometrium izlučuje $\text{PGF}_{2\alpha}$, koji izaziva regresiju cikličnog žutog (CL). Time se stvara uslov da životinja uspostavi novi estrusni ciklus.



Slika 5. Mehanizam luteolize

Oko 16. dana estrusnog ciklusa, ako nije došlo do uspešne oplodnje (nema živih embriona), endometrium materice izlučuje hormon Prostaglandin $\text{F}_{2\alpha}$ ($\text{PGF}_{2\alpha}$), koji se ubacuje u vensku krv. Iz uterusne vene, ovaj hormon prelazi u arteriju koja snabdeva krvlju jajnik (*arteria ovarica*). Tako ovaj luteolitik dospeva do žutog tela i vrši njegovu morfološku i funkcionalnu regresiju (luteolizu).

Reuspostavljanje estrusnog ciklusa post partum. Karakteristično je da svinja ne reuspostavlja estrusni ciklus tokom prvih 4 do 5 nedelja laktacije. To je posledica snažnog

inhibitornog delovanja stimulusa sisanja, u pogledu izlučivanja ovulatornog talasa LH. Međutim, relativno često se mogu zapaziti znaci estrusa kod krmača, 2 do 5 dana posle prašenja, ali ovi znaci nikada nisu praćeni pojavom ovulacije (tzv. *anovulatorni estrus post partum*). Kako se u ovom, vrlo ranom, periodu *post partum*, ne uspostavlja ciklična ovarijalna funkcija, izgleda da su ovi znaci anovulatornog estrusa posledica delovanja povećanih koncentracija estrogena poreklom iz fetusa, a ne iz jajnika. Posle laktacije, koja traje 4 do 5 nedelja, većina krmača manifestuje znake estrusa unutar 7 dana po zalučanju legla, mada na trajanje ovog intervala utiče veliki broj paragenetskih faktora.

Krava reuspostavlja estrusni ciklus 15 do 30 dana posle telenja. Međutim, prva ovulacija *post partum* nije praćena pojavom spoljašnjih znakova estrusa kod oko 75% krava. Druga ovulacija je praćena spoljašnjim znacima estrusa kod oko 50% krava, dok je tek treća ovulacija *post partum*, praćena manifestacijom spoljašnjih znakova estrusa kod većine krava.

Ovca i koza su sezonski polno aktivne i ne uspostavljaju estrusni ciklus posle partusa, sve do početka nove sezone parenja (jesen do početka zime).

Kobila je, takođe, sezonski polno aktivna (kraj zime do kraja leta). Za kobilu je karakteristična pojava tzv. ždrebećeg estrusa, koji se, obično, javlja 9. dana posle ždrebljenja.

1.1.3. PROCES OPLODNJE

Oplodnja (*fertilizacija*) je jedan od centralnih reproduktivnih procesa, tokom koga dolazi do spajanja muškog i ženskog gameta (spermatozoida i jajne ćelije). Pri tome, dolazi do kombinacije genetskih informacija majke i oca, odnosno do formiranja *zigota*, tj. prve ćelije novog organizma.

Procesu oplodnje prethodi akt osemenjavanja, koji može biti izveden prirodnim putem (aktom kopulacije) ili na veštački način (veštačko osemenjavanje – VO). Prilikom akta kopulacije, ejakulat (količina sperme izlučena u jdnom aktu) se deponuje u okolinu kaudalnog otvora cerviksa (fornif vaginae), kod krave, ovce i koze, u početni deo cervikalnog kanala, kod kobile ili u kranijalni deo cervikalnog kanala, kod krmače. Naizmeničnim antiperistaltičkim kontrakcijama rogova materice, vrši se pasivan transport spermatozoida, od mesta ejakulacije do utero-tubalnih spojeva (mesto spajanja vrha roga materice sa završnim krajem istmusa jajovoda). Pasivan transport spermatozoida, kroz rogove materice, je dosta brz. Naime, prvi spermatozoidi se mogu naći u ampulama jajovoda već 15 minuta posle osemenjavanja, dok se kompletan broj spermatozoida u ampulama jajovoda, kao i penetracija zone pelucide oocita, može ustanoviti oko 2 sata posle osemenjavanja. Iz utero-tubalnih spojeva, spermatozoidi ulaze u kaudalni istmus. Kaudalni istmus služi kao fiziološki rezervoar spermatozoida, iz kojeg se formira fertilizaciona populacija u ampulama jajovoda. Naime, kada dospeju u kaudalni istmus, spermatozoidi prestaju da se pokreću i, svojim akrozomima, se fiksiraju za ćelije sluzokože. Spermatozoidi koji ne izvrše fiksiranje za sluzokožu, ili uginjavaju ili gube fertilizacionu sposobnost. Ovako fiksirani, spermatozoidi ostaju nekoliko sati, za koje vreme započnu prvu fazu procesa kapacitacije: tzv. *denudaciju* (skidanje mukopolisaharidnog omotača, koji dobijaju kada se, tokom ejakulacije, pomešaju sa spermalnom plazmom). Neposredno pred početak ovulacije, spermatozoidi započinju drugu fazu procesa kapacitacije, tzv. akrozomalnu reakciju. Ovo je proces spajanja ćelijske membrane spermatozoida i spoljašnje membrane akrozoma. Na mestima spajanja, dolazi do formiranja sitnih perforacija, kroz koje mogu da izađu fermenti iz matriksa akrozoma, koji će imati ulogu u penetraciji i aktivaciji jajne ćelije, tokom procesa oplodnje. Akrozomalna reakcija se završava kad spermatozoidi stupe u kontakt sa jajnom ćelijom, u ampuli jajovoda.

Neposredno pred ovulaciju, spermatozoidi se odvajaju od ćelija sluzokože kaudalnog istmusa i započinju vrlo brzo pokretanje (*hiperaktivacija*) prema ampulama jajovoda. Dakle, spermatozoidi se, posle ejakulacije, aktivno kreću samo od kaudalnog istmusa do ampula jajovoda.

Proces oplodnje započinje u ampulama jajovoda, tako što veći broj spermatozoida počinje da probija zaštitne slojeve oko jajne ćelije: prvo prodiru kroz 4 do 5 slojeva kumulusnih ćelija (*cumulus oophorus*), zatim kroz zonu pelucidu i, konačno, kroz perivitelusnu membranu oocita. Ovaj prodor se vrši razlaganjem ovih slojeva delovanjem fermenta iz akrozoma spermatozoida sa potpuno završenom akrozomalnom reakcijom. Ferment *hialouronidaza* razlaže hialouronsku kiselinu, kojom su povezane ćelije kumulusa, *akrozin* odvaja ćelije korone radijate, koje su direktno povezane sa zonom pelucidom, *CPE* (*cell penetration enzyme* = enzim koji prodire u jajnu ćeliju) razlaže zonu pelucidu (mada je prodor spermatozoida kroz ovu membranu, debelu oko 20µm, pomognut i snažnim udarima repa, kao i spiralnim uvrtnjem samog spermatozoida), dok ferment *neuroamidaza* razlaže perivitelusnu membranu i aktivira jajnu ćeliju.

Posle prodiranja u perivitelusni prostor, rep spermatozoida se postepeno odvajaju, a od nukleusa u njegovoj glavi, formira se tzv. *muški pronukleus*. Istovremeno dolazi do aktivacije jajne ćelije, koja se odvija u dva pravca: (1) nastavlja se i završava druga mejoza i, kao posledica, formira se *ženski pronukleus* sa haploidnim brojem hromozoma, a višak hromatinskog materijala se izbacuje, kao drugo polarno telašće, u perivitelusni prostor oocita i (2) dolazi do formiranja tzv. *bloka zone pelucide*. Blok zone pelucide se izaziva raspadom tzv. kortikalnih granula, smeštenih na unutrašnjoj strani perivitelusne membrane. Sadržaj ovih granula oblaže unutrašnju stranu zone pelucide, pa ona postaje nepropusna za druge spermatozoide. Time se obezbeđuje monospermična penetracija oocita, potrebna za normalnu oplodnju. Formirani pronukleusi se pokreću prema centru vitelusa, gde se izvrši njihovo spajanje, odnosno spajanje homolognih hromozoma oca i majke. Ovo spajanje se naziva *singamija*. Time je formiran jednoćelijski zigot, odnosno embrion u fazi prvog jedra, čime je i završen proces oplodnje.

1.1.4. BREMENITOST (Graviditet)

Oko 17 do 19 sati posle završetka procesa oplodnje, započinje proces brazdanja embriona (zigota). Naime, prvo dolazi do deobe nukleusa, a zatim i citoplazme blastomera (ćelija embriona). Tako se formira embrion sa dve ćelije (*blastomere*). Ovaj dvoćelijski stadijum traje 6 do 8 sati, a zatim dolazi do nove deobe, pa nastaju embrioni sa 4 blastomere. Embrion prelazi iz jajovoda u vrh roga materice, oko 44 do 48 sati posle ovulacije, u stadijumu oko 8 blastomera. Oko 4. dana posle ovulacije, u vrhovima rogova uterusa se nalaze embrioni u stadijumu *rane morule*, sa 12 do 16 blastomera, a dan kasnije se formira *kompaktna morula*, sa 18 do 32 blastomere. Sledeći razvojni stadijum se naziva *blastocist*, koji se, kod svinje, nalazi 5 do 6 dana, a kod krave i kobile oko 7 do 8 dana posle ovulacije. Blastocist ima izdvojenu nakupinu unutrašnje ćelijske mase i šupljinu (*blastocel*), koja je ograničena ćelijama spoljašnje ćelijske mase (tzv. *trophoderm*). Cela ova konstrukcija blastocista se, još uvek, nalazi unutar zone pelucide prvobitne jajne ćelije. Do ovog momenta, embrioni se nalaze u samim vrhovima rogova uterusa, a zatim počinju migraciju i postepeno se raspoređuju duž sluzokože rogova materice. To je fenomen poznat pod nazivom *transuterina migracija embriona*, koja je vrlo izražena kod svinja, a manje kod ovce i koze.

Kod krave i kobile, embrion ostaje u rogu sa iste strane na kojoj se nalazi jajnik sa ovulacijom.

Između 6. i 7. dana nakon ovulacije, dolazi do istanjivanja i lize zone pelucide, a blastocist izlazi iz ove opne. To su tzv. izvaljeni blastocisti, koji su tada sferičnog oblika i prečnika 0,5 do 1,0 mm. Dalji rast blastocista je vrlo intenzivan, da bi 11. do 12. dana dobio izdužen oblik, dužine 9 do 10 mm. Od tog momenta započinje vrlo intenzivna elongacija trofektoderma, koji se, sada, naziva *trofoblast*. Trofoblast dobija izgled vrlo izduženog i vrlo tankog, beličastog končića, koji može biti dugačak i do 1.000 mm, oko 16. dana posle ovulacije. Ovaj organ ranog embriona služi za histotrofnu ishranu. Naime, preko trofoblasta, preimplantacioni embrion apsorbuje hranljive materije iz sekreta endometrijuma.

Kod svinje se ne događa tipična implantacija, nego se mikroresice (*mikrovili*) na ćelijama trofoblasta, postepeno, povezuju sa mikrovilima na ćelijama epitela endometriuma. Ovo povezivanje se kompletira posle 18. dana gestacije. Formiranjem placente, embrioni prelaze sa histotrofne na *hemotrofnu* ishranu, odnosno razmenu materija između krvi majke i krvi embriona, preko placentalnog krvotoka. Ima, međutim, nalaza da se histotrofna ishrana, kod plodova svinje, nastavlja i posle završene placencije, sve do kraja gravidnosti. Ovo se, verovatno, događa zbog toga što se, na taj način, iz sekreta uterusa, preko placente, u embrion ili fetus, transportuje *uteroferin*, koji se akumulira u alantoičnoj tečnosti. Uteroferin je glikoprotein za koga je vezano gvožđe, a sintetišu ga i, u lumen uterusa, izlučuju žlezde endometriuma svinje. Na ovaj način se, verovatno, obezbeđuju potrebe gvožđa za rastuće embrione, odnosno fetuse. Embrionalna faza razvoja ploda svinje se završava između 30. i 35. dana gestacije, a nastavlja se fetalna faza. Kod kobile se, kao i kod svinje, razvija epiteliohorialna placenta, sa manjim resicama, obraslim po celoj površini horiona (*placenta difusa*).

Kod preživara, resice su duže i nalaze se po horionu samo na mestima gde on naleže na karunkule materice. Ta mesta sa resicama se nazivaju *kotiledoni*, a spoj karunkula i kotiledona se naziva *placantom*. Prema kontaktu tkiva resice i kripte endometriuma, placenta preživara je *syndesmohorialna*. Fetus je plod sa završenom organogenezom i može se prepoznati kojoj vrsti životinja pripada.

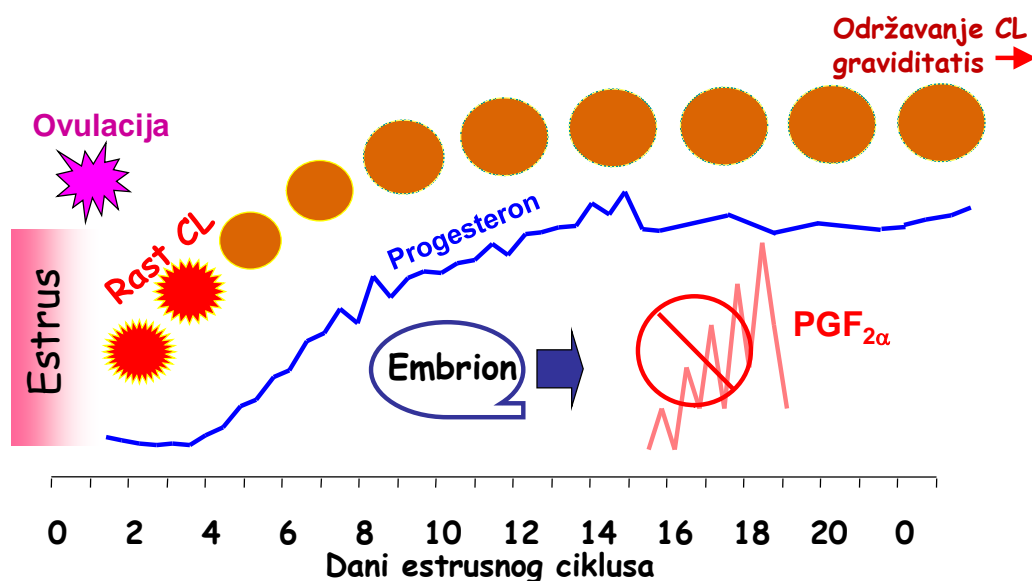
Iako je do oplodnje i razvoja ranih embriona došlo, do 15.-16. dana posle ovulacije (kod ovce 12. do 13. dana), životinja fiziološki ne prepoznaje gravidnost. Naime, do tog perioda, funkcionišu ciklična žuta tela, koja bi regresirala da nije došlo do oplodnje i razvoja embriona, što je posledica luteolitičkog delovanja prostaglandina $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$). Međutim, za održavanje dalje gravidnosti, potrebno je da se održi lutealna funkcija, odnosno visok nivo progesterona u telesnoj cirkulaciji. Kako se sprečava regresija cikličnih žutih tela, posle 15. dana gravidnosti? Kod domaćih vrsta životinja, sprečavanje regresije cikličnih žutih tela se događa putem dva različita modela.

Kod svinje, elongirani embrioni, stari 11 do 13 dana, izlučuju u lumen uterusa estrstradiol- 17β . Estrogeni su, sa jedne strane, kod svinje, luteotropni (pospešuju lutealnu funkciju), a sa druge strane, na neki način sprečavaju prelaz $PGF_{2\alpha}$ iz endometriuma u utero-ovarijalnu arteriju, nego njegovu sekreciju preusmeravaju u lumen uterusa. Tako ovaj luteolitik ne dospeva do jajnika, na koji način se produžava funkcionalna aktivnost žutih tela i gravidnost se nastavlja. Ovaj fenomen je poznat kao *materinsko prepoznavanje gravidnosti*. Da bi došlo do prepoznavanja gravidnosti, potrebno je da se, do 14. dana gravidnosti, u materici nalazi barem 5 živih embriona i minimalno 6 ng progesterona po 1 ml krvne plazme (*Martin i sar. 1977*). Ako, u ovom periodu, ima manje od 5 embriona ili dođe do uginuća embriona, lutealna regresija neće biti sprečena, a životinja će uspostaviti novi estrus, odnosno

manifestovaće sledeći estrus posle tzv. regularnog trajanja ciklusa, između 18 i 24 dana. Međutim, ako se uginuća embriona dogodi posle prepoznavanja gravidnosti (tj. 15 do 17 dana posle oplodnje), životinja će povadati 25 do 35 dana posle osemenjavanja. To je tzv. neregularno povadaње. Mortalitet embriona između 18. i 35. dana ima za posledicu odloženu regresiju graviditetnih žutih tela, pa životinja povada oko 63. dana, dok kasnija uginuća fetusa imaju za rezultat vrlo prolongiranu lutealnu aktivnost (skoro do termina prašenja). Takve životinje su pseudogravidne, u praksi poznate kao “ćutalice”. Navedene, kao i činjenica da ovariektomija, u bilo kojoj fazi gravidnosti, ili delovanje bilo kojih faktora koji inhibiraju lutealnu funkciju i prekid sekrecije progesterona, dovodi do njenog prekida unutar sledećih 24 do 48 časova, navode na zaključak da je žuto telo svinje jedini izvor progesterona, tokom celog perioda gravidnosti. Hipofizektomija, takođe, dovodi do abortusa. Ovo pokazuje da je, po svoj prilici, za održavanje funkcije graviditetnih CL, za razliku od cikličnih, potrebna podrška hipofizarnog luteotropina, verovatno LTH (prolaktin).

Sličan model sprečavanja luteolize se događa i kod kobile, samo što kod kobile postoji (obično) samo jedan embrion, koji svojim čestim prolaskom kroz rog materice, rasprskava estradiol po njenoj površini. Za kobilu je karakteristično da primarno žuto telo, nastalo posle ovulacije u fertilnom estrusu, regresira (smanjuje produkciju progesterona), oko 2 meseca posle oplodnje. Da bi se gravidnost i dalje održala, specifične tvorevine gravidnog endometriuma (tzv. *endometrijalne kupe*), sintetišu PMSG, koji izaziva rast nekoliko folikula na jajnicima. Ovi folikuli ne ovuliraju, ali njihov unutrašnji zid luteinizira. Na taj način se formiraju tzv. akcesorna ili sekundarna žuta tela, koja proizvode progesteron, čime se gravidnost održava do normalnog završetka (partusa).

Kod preživara (krava, ovca, koza), sprečavanje luteolize se vrši tako što trofoblast ploda sintetiše i izlučuje jednu proteinsku supstancu, nazvanu *trofoblastin*. Ova supstanca inhibira sintezu $PGF_{2\alpha}$, u ćelijama endometriuma. Na taj način nema luteolitika, a ciklična žuta tela nastavljaju svoju funkciju (sintezu progesterona), kao graviditetna žuta tela (*corpora lutea graviditatis*). U drugoj polovini gravidnosti, oko 60% ukupne produkcije progesterona je poreklom iz placente, a ostatak (40%) iz graviditetnog žutog tela.



Slika 6. Prepoznavanje gravidnosti, održavanje funkcionalne aktivnosti žutog tela
Prisustvo živog embriona sprečava luteolitičku aktivnost $PGF_{2\alpha}$. Na taj način se produžava funkcionalna aktivnost cikličnog žutog tela (CL).

Razvoj ploda i plodovih ovojnica

Posle izlaska blastocista iz zone pelucide i početka njegove elongacije, ćelije unutrašnje ćelijske mase (embrionalni pol), koje su, do tada bile nediferentovane (tzv. stem ćelije), počinju sa diferencijacijom i formiranjem *tri embrionalna lista*: spoljašnji (*ectoderm*), srednji (*mesoderm*) i unutrašnji (*endoderm*).

Iz ćelija ova tri primarna embrionalna lista, tokom daljeg embrionalnog i fetalnog razvoja, formiraće se sva tkiva i organi ploda.

Ektoderm: epidermis, dlaka i rožina i nervni sistem.

Mesoderm: somiti (telesni segmenti), svi tipovi mišićnog tkiva, krvni sudovi, srce i krv, limfni sudovi i vezivno tkivo (kosti, hrskavica, ligamenti, tetive).

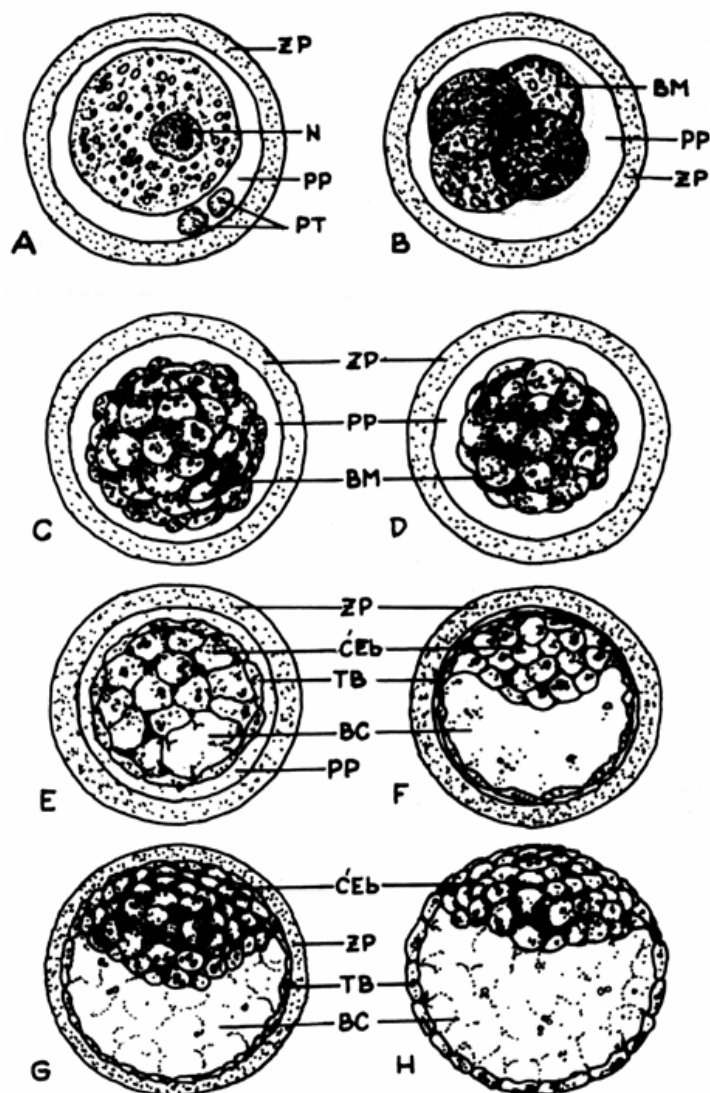
Endoderm: sve žlezde i unutrašnji slojevi zida digestivnog trakta.

Ćelije primarnih polnih organa se formiraju iz mesoderma i ektoderma ranog embriona. Razvoj pojedinih organa i organskih sistema se vrši tačno određenim redom, odnosno u tačno određenom periodu gestacije. Zbog toga se, na osnovu prisustva pojedinih organa i tkiva, ka i na osnovu veličine samog ploda i njegovih ovojnica, može odrediti starost ploda. Prenatalni razvoj ploda, odnosno njegova dužina i težina, zavise od uticaja brojnih faktora, među kojima se posebno ističu: naslednost, vrsta i rasa plotkinje, veličina i starost plotkinje, odnos veličine plotkinje i priplodnjaka, ishrana plotkinje tokom gestacije, broj plodova, razvijenost placente i neki ambijentalni faktori (temperatura).

Posle uspostavljene gravidnosti, dolazi do procesa placentacije, tokom koga se razvijaju plodove ovojnice, i formiranja placente, preko koje dolazi do uspostavljanja veze između krvotoka majke i fetusa. Na taj način, plod prelazi sa tzv. histotrofne ishrane (apsorpcija hranljivih materija iz zadržaja sekreta uterusa) na tzv. hemotrofnu ishranu (preuzimanje hranljivih materija iz krvi majke). Preko placente, vrši se razmena i drugih materija (kiseonik, ugljendioksid, produkti metabolizma i td.) između krvi majke i fetusa. Tokom fetalnog razvoja, potrebe fetusa u ugljenim hidratima, proteinima, vitaminima i mineralima, u potpunosti se obezbeđuju iz krvotoka majke.

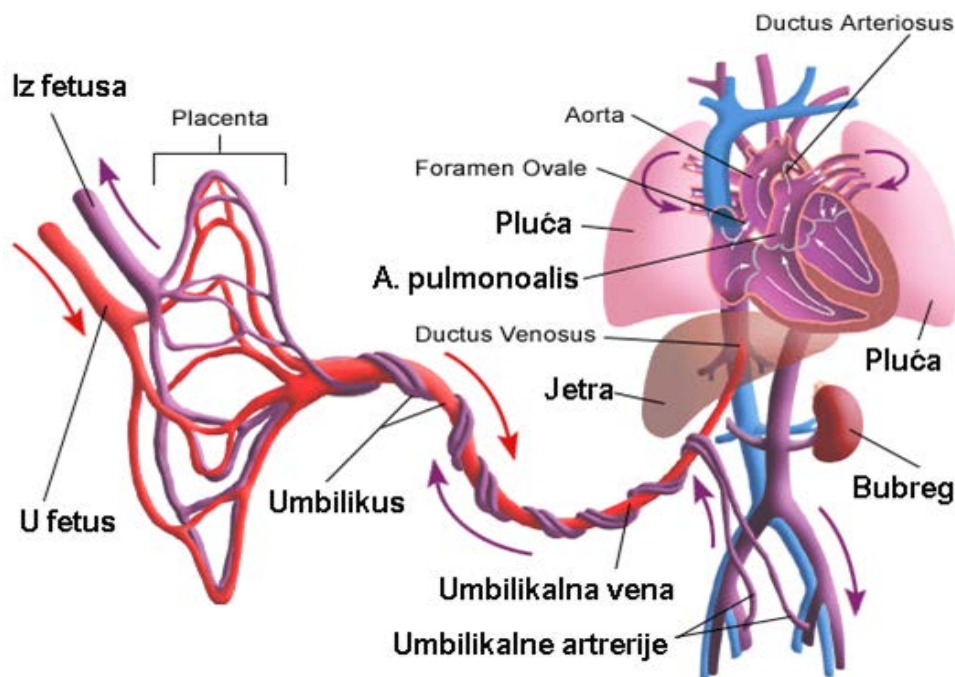
Plodove ovojnice su: *amnion*, *alantois* i *horion*. Amnion direktno obavija plod, koji pliva u amnionskoj tečnosti. Alantois je vrećasta tvorevina, u kojoj se nalazi alantoisna tečnost, a obe ove ovojnice su smeštene u jednoj zajedničkoj vreći – horionu. U horionu se nalaze placentalni krvni sudovi, koji su grane pupčanih arterija i vena ploda. Kapilari ovih krvnih sudova se nalaze u resicama, sa kojima horion kontaktira sa kriptama endometriuma, u kojima se nalaze kapilari krvotoka majke. Dakle, jedna funkcionalna jedinica placente je resica horiona, koja ulazi u kriptu (udubinu) endometriuma.

Fetalni krvotok. Kardiovaskularni sistem fetusa se odlikuje određenim razlikama u građi, u odnosu na građu organizma posle porođaja. Ove razlike u anatomske građi su posledica specifične razmene materija između krvotoka fetusa i majke, koja se odvija preko placente. Specifičnost građi fetalnog krvotoka se sastoje u sledećem: (1) postoje pupčane arterije i vene (*arteriae et venae umbilicales*), (2) postoji venski kanal (*ductus venosus Arantii*), kojim se premoštava jetra, tako što se pupčana vena spaja sa kaudalnom šupljom venom, (3) postoji arterijski kanal (*ductus arteriosus Botalli*), kojim se spaja arterija pulmonalis sa lukom aorte, (4) postoji ovalni otvor (*foramen ovalis*), u zidu, koji odvaja desnu od leve srčane pretkomore i (5) postoji placentalni krvotok, preko koga krvotok fetusa komunicira sa krvotokom majke.



Slika 7. Stadijumi ranih (preimplantacionih) embriona krave

A-dve blastomere (1 do 2 dana), B-četiri blastomere (2 do 3 dana, istmus), C- rana morula, više od 32 blastomera, (5 do 6 dana, vrh roga uterusa), D- kasna morula (6 do 7, uterus), E- rani blastocist (7 do 8 dana, uterus), F- kasni blastocist (8 do 9 dana, uterus), G- ekspanovani blastocisti (9 do 10 dana, uterus) i H- „izležen“ blastocisti, bez zone pelucide (10 do 11 dana).

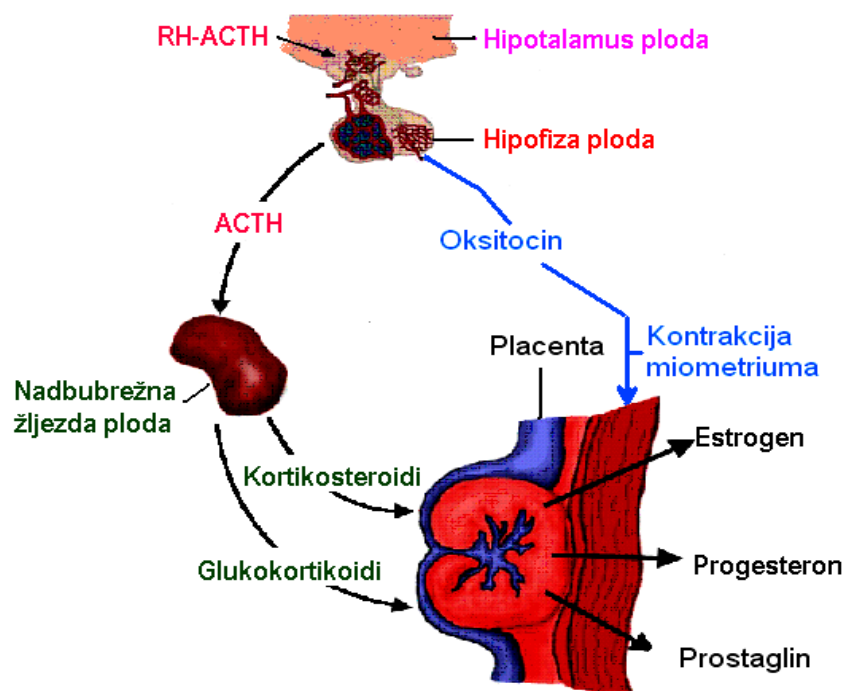


Slika 8. Fetalni krvotok

1.1.5. PORODAJ (Partus)

Porodaj (*partus*) je fiziološki proces završetka gravidnosti. Tom prilikom dolazi do istiskivanja plodova, plodovih ovojnica i tečnosti iz materice, kroz organe porođajnog kanala, u spoljašnju sredinu. Tako se završava prenatalni (intrauterini) i započinje postnatalni život novorođenog organizma.

Početak porođaja prethode specifične sekvence hormonskih promena, kako na strani majke, tako i na strani fetusa. Kod majke se povećava koncentracija estrogena, a opada koncentracija progesterona u krvnoj plazmi. Proces porođaja je složen i kontrolisan interakcijom neurohormonalnih mehanizama, na relaciji majka – fetus. Za početak porođaja je, od primarnog značaja, funkcija osovine CNS – hipotalamus - hipofiza – kora nadbubrega fetusa. Pokazano je, naime, da hipofizektomija ili dekapitacija fetusa, značajno produžavaju trajanje gestacije. Suprotno, tretman kortikosteroidima (hormoni kore nadbubrega) izaziva prerani porođaj.



Slika 9. Endokrini regulacija početka porođaja

Prvi signal za početak porođaja je sekrecija ACTH-RH (adrenokortikotropni hormon-oslobađajući hormon) iz hipotalamusa fetusa, iako nije sasvim jasna priroda i mehanizam stimulusa koji izazivaju ovu sekreciju. Verovatno je da materica više nije sposobna da obezbedi dovoljnu količinu kiseonika, kao i da evakuise sve veće količine CO₂, kao posledicu vrlo intenzivnog rasta i metabolizma ploda pred porođaj. Ovo ima za posledicu sve veću koncentraciju CO₂ u krvi fetusa, što stimuliše neurosekretorne ćelije hipotalamusa na oslobađanje ACTH-Rh. Ovaj hormon stimuliše oslobađanje ACTH (adrenokortikotropni hormon) iz adenohipofize fetusa, koji stimuliše produkciju i izlučivanje glukokortikoida (kortizola) iz kore nadbubrega fetusa. Ovi kortikoidi, izgleda, stimulišu produkciju prostaglandina F_{2α} i estrogena iz sluzokože materice (endometrium), koji izaziva luteolizu (morfološku i funkcionalnu regresiju graviditetnih CL), što dovodi do rapidnog pada koncentracije progesterona u krvnoj plazmi majke i, konačno, do početka porođaja. Prostaglandin stimuliše i sekreciju hormona relaksina iz jajnika majke. Koncentracija oksitocina se povećava iznad bazalnog nivoa, u momentu kada koncentracija progesterona značajno opadne, a zatim se dalje, značajno, povećava tokom faze istiskivanja ploda. Visoke koncentracije oksitocina i estrogena u telesnoj cirkulaciji majke izazivaju kontrakcije miometrijuma, čime započinje faza istiskivanja plodova.

Znaci skorog porođaja. Kako se približava kraj gravidnosti, odnosno porođaj, kod gravidne životinje se, postepeno, događaju specifične hormonske, fiziološke, morfološke i promene ponašanja. Neke od ovih promena su vrlo slične kod svih vrsta životinja, a neke su, manje ili više, specifične za svaku vrstu. Osnovni znak skorog porođaja, kod svake vrste životinja, je smanjivanje koncentracije progesterona, a povećavanje koncentracije estrogena i relaksina u krvnoj plazmi gravidne životinje. Kao posledica povećanja koncentracije estrogena i relaksina, dolazi do prokvašavanja (serozne infiltracije) mekih delova karlice, pa se vide udubljena sa leve i desne strane korena repa, omekšava simfiza pelvis, dolazi do

otoka i hiperemije vulve, životinja postaje nemirnija, češće ustaje i leže, češće se oglašava, smanjuje apetit, traži mirnije i pogodno mesto za porođaj.

Neki specifični znaci skorog porođaja, kod pojedinih vrsta životinja

Kobila. Intenzivno uvećanje vimena (3-4 nedelje pre partusa), otok sisa, sa voštanom kapljicom na vrhu (oko 48h pre partusa), ponekad isticanje kolostruma iz sisa (oko 4h pre partusa). Otok ventralnog zida abdomena (ventralni edem). Dobar indikator početka prvog stadijuma porođaja je tačkasto znojenje na bedrima i između zadnjih nogu, oko 4h pre rođenja ždrebeta. Kobila je sposobna da odloži početak porođaja. Preko 80% kobila se ždrebi tokom noći.

Krava. Intenzivna relaksacija ligamenata svoda karlice (zapažaju se jame sa obe strane korena repa). Promena konzistencije i boje sekreta iz vimena, od relativno prozirne tečnosti, do neprozirnog, žućkastog i gušćeg kolostruma. Iscedak iz vulve. Otok vulve i vimena. Životinja se odvaja od drugih, nervozna je i ima smanjen apetit.

Kрмаča. Nervozna, smanjen apetit, pravi gnezdo. Otok vimena i vulve. Na sisama se mogu videti beličasto-guste kapljice kolostruma. Isticanje kolostruma iz vimena se javlja 6 do 24h pre istiskivanja prvog praseta.

Ovca. Uvećanje vimena, nervozna, izdvaja se od drugih životinja, iscedak iz vulve.

Tok porođaja

Tok porođaja se može podeliti na tri osnovna stadijuma: (1) *pripremni stadijum*, (2) *stadijum istiskivanja ploda* i (3) *stadijum istiskivanja plodovih ovojnica i tečnosti*. U zavisnosti od vrste životinja, pojedini ovi stadijumi imaju karakterističan tok i trajanje. U normalnim, fiziološkim, uslovima, to zavisi od više faktora, kao što su: anatomija porođajnog kanala, anatomija plodovih ovojnica, broj i veličina plodova, starost i kondicaja plotkinje i slično.

Pripremni stadijum. U ovom stadijumu se događaju specifične fiziološke, hormonske i promene ponašanja životinje, koje imaju za svrhu stvaranje neophodnih uslova za utiskivanje konceptusa u porođajni kanal i njegovo istiskivanje u spoljašnju sredinu. U materici započinje pojačana akumulacija energetskih materija, a značajno se povećava i količina aktinomiota, proteina koji omogućava kontraktilnost glatkomišićnih vlakana miometriuma. Ovaj stadijum se naziva i *stadijum otvaranja*, jer dolazi do proširivanja mekih delova i koštane osnove porođajnog kanala (otvaranje cerviksa, prokvašavanje i isticanje sluzavog čepa iz cervikalnog kanala, prokvašavanje i rastezanje vezivne hrskavice u sinfizi pelvis i opuštanje ligamenata svoda karlice). Započinju koordinirane kontrakcije uterusa, čime se utiskuju plodove ovojnice, sa plodovom tečnošću, u cervikalni kanal, koji se, pod ovim hidrauličkim pritiskom, otvara i proširuje. Plod se pomera i zauzima pravilan položaj za utiskivanje u porođajni kanal. Normalan položaj ploda, prilikom istiskivanja kroz porođajni kanal je: (a) *prednji ili zadnji uzdužni situs* (napred su: prednje noge i glava ili zadnje noge i karlica), (b) *dorzalna pozicija* (leđa ploda okrenuta leđima majke) i (c) *ispružen habitus* (ispružene prednje noge, ispružena glava i vrat, ispružene zadnje noge). Svi drugi položaji nisu pravilni i, manje ili više, otežavaju porođaj.

Stadijum istiskivanja ploda nastaje kada plod, obavijen plodovim ovojnicama i tečnošću, bude pripremljen i utisnut u porođajni kanal. Ovo ima za posledicu formiranje refleksa za kontrakciju dijafragme i muskulature zida abdomena (*tzv. trbušna presa*). Ove kontrakcije pomažu kontrakcijama materice, pri potiskivanju ploda kroz porođajni kanal. Tokom ovog stadijuma, kontrakcije materice su najučestalije i najsnažnije. Normalno, ovaj stadijum traje

kraće od pripremnog i zadnjeg stadijuma porođaja. U kobile, traje vrlo kratko, zbog anatomske građe karlice i snažne trbušne prese. Suprotno, kod krave, ovaj stadijum traje dugo i, često, može biti otežan, zbog specifičnosti građe karlice, slabe trbušne prese (slaba kondicija krave) ili velikog fetusa.

Stadijum istiskivanja placente je zadnji stadijum i nastaje neposredno posle momenta kada je plod potpuno istisnut u spoljašnju sredinu. U ovom stadijumu, kontrakcije abdominalne muskulature slabe, a kontrakcije materice su još dosta snažne, kako bi mogle istisnuti plodove ovojnice i plodove vode. Peristaltičke kontrakcije rogova materice, koje započinju od vrhova rogova, istiskuju placentu u izvrnutom položaju, polako odlepljujući resice horiona iz kripte sluzokože materice. Kod krmače, redosled istiskivanja plodova i plodovih ovojnica može biti vrlo različit. Naime, mogu biti, prvo, istisnuti svi plodovi, pa sve placente. Ali, mogu biti i sve druge kombinacije, što nije nenormalno.

Puerperium je period od završetka istiskivanja placente, do momenta kada majčin organizam, u histološkom, morfološkom, fiziološkom i psihičkom pogledu, uspostavi stanje u kome se nalazio pre uspostavljanja gravidnosti. Najvažnije promene, koje se događaju tokom puerperiuma su involucija uterusa (u histološkom, morfološkom, topografsko-anatomskom i fiziološkom pogledu) i reuspostavljanje ciklične ovarijalne aktivnosti, odnosno manifestacije estrusa.

Tokom puerperiuma, iz uterusa se izbacuju veće (krava, ovca) ili manje (kobila, krmača) količine lohijalne tečnosti. Lohije su sastavljene od mukozne tečnosti, krvi, krpica placente i karunkularnog tkiva. Prvih dana su lohije sukrevičave, a kasnije poprimaju smeđu boju. Tokom puerperiuma, dolazi do smanjivanja veličine karunkula (kod preživara), tako da oni, u normalnim uslovima, dostignu veličinu koju su imali pre uspostavljanja gravidnosti, za oko 20 do 30 dana post partum. Regeneracija endometriuma se događa za oko 13 do 25 dana kod kobile i za oko 3 do 4 nedelje post partum, kod krave, krmače, ovce i koze. Kompletna involucija uterusa se, kod krave završava za 30 do 40 dana, kod kobile za oko 15 do 20 dana, kod ovce za oko 24, a kod krmače za oko 28 dana post partum. U određenom periodu posle porođaja, što zavisi od vrste životinja, kao i od većeg broja drugih faktora (kondicija, zdravstveno stanje, godišnja sezona, nivo produkcije mleka, frekvencija sisanja i td.), životinja uspostavlja novu cikličnu aktivnost jajnika, odnosno uspostavlja folikularni rast, ovulaciju i manifestaciju estrusne cikličnosti.

Krava, pod normalnim uslovima, uspostavlja prvu ovulaciju unutar 15 do 30 dana post partum.

Ovca i **koza** ne uspostavljaju ovarijalnu aktivnost i pojavu estrusa post partum, sve dok traje laktacija.

Kobila manifestuje ovulaciju i znake estrusa, dosta brzo (obično 5 do 15 dana, prosečno 9. dana) posle ždrebljenja. Zbog toga se ovaj estrus naziva "žrebeći" ili "estrus 9. dana".

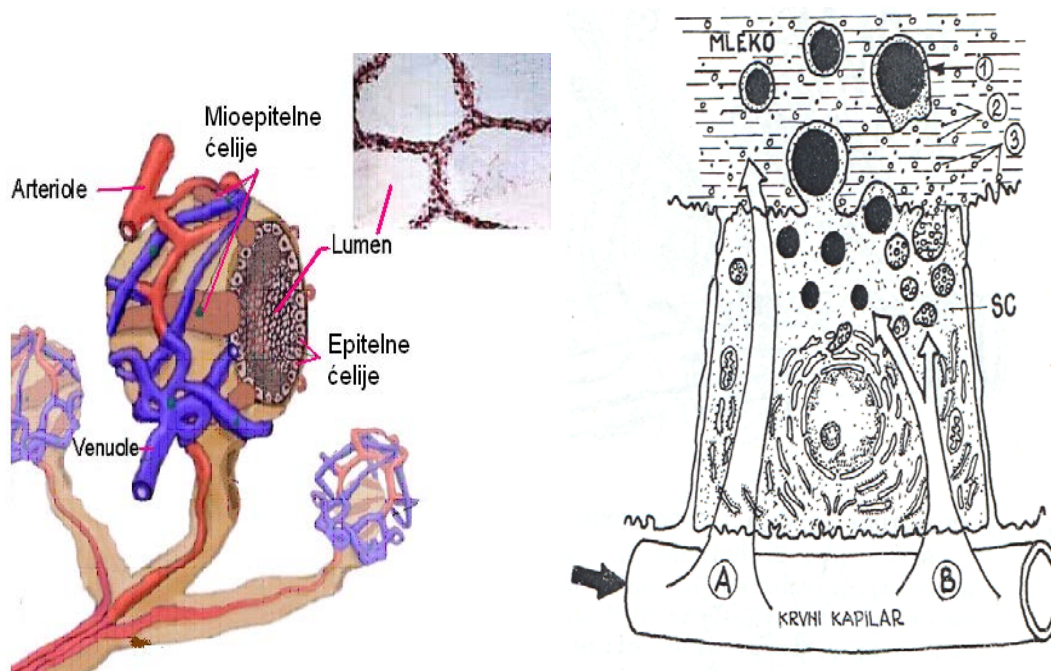
Krmača ne uspostavlja cikličnu ovarijalnu aktivnost i ne manifestuje spoljašnje znake estrusa, tokom prvih 4 do 6 nedelja laktacije. To je tzv. *laktacioni anestrus*. Kod jednog, manjeg broja krmača, mogu se zapaziti spoljašnji znaci estrusa (hiperemija i edem vulve, uznemirenost i sl.), oko 1 do 3 dana posle prašenja. Međutim, ovaj estrus je uvek anovulatoran, tj. nije praćen rastom folikula i ovulacijom na jajnicima. Pojava ovog anovulatornog estrusa post partum, verovatno je posledica delovanja velikih količina estradiola, koga izlučuju placente, neposredno pred prašenje.

1.1.6. LAKTACIJA

Laktacija je fiziološki proces sinteze i izlučivanja mleka, koji se obavlja u vimenu (mlečna žlezda). Mleko je specifičan produkt procesa laktacije i predstavlja nezamenljivo hranivo za mladu jedinku posle rođenja, sve dok se njen digestivni trakt ne razvije u dovoljnoj meri, da može samostalno uzimati i variti druge hranljive materije. Pored specifičnih hranljivih i drugih bioaktivnih materija (vitamini, minerali), u mleku se, tokom prvih nekoliko dana post partum, nalaze i neophodna antitela (imunoglobulini). Ova antitela služe za pasivnu imunu zaštitu novorođenog organizma (*pasivni imunitet*), sve dok se ne razvije njegova sposobnost da samostalno proizvodi sopstvena antitela (*aktivni imunitet*). Ovo prvo mleko, koje sadrži antitela, naziva se *kolostrum*. Pored toga što sadrži antitela, kolostrum ima i nešto drugačiji sadržaj pojedinih hranljivih i bioaktivnih materija, u odnosu na mleko, koje se izlučuje u kasnijoj laktaciji. Kolostrum ima i laksativno delovanje, tako da omaže izbacivanje mekog sadržaja creva (*mekonium*), neposredno po rođenju mladunčeta. Generalno posmatrajući, u kolostrumu se nalazi veća količina mlečne masti, proteina i minerala, što je potrebno za intenzivan rast i razvoj novorođenog organizma, u prvim danima njegovog života.

Početak i održavanje laktacije. Brojni eksperimenti su pokazali da su prolaktin (LTH), kortisol i insulin primarni pokretači procesa laktacije, te da je, pored ovih hormona, za održavanje laktacije potreban i somatotropni hormon. Sekretiju mleka kontroliše prolaktin, a njegovo istiskivanje iz alveola i potiskivanje kroz kanalikularni sistem je posledica delovanja oksitocina. Za normalno održavanje laktacije, posebno u pogledu količine i kvaliteta proizvedenog mleka, potrebno je da se vrši pravovremeno pražnjenje vimena (sisanjem ili mužom), kao i da postoje ostali značajni uslovi, kao što su: pravilna ishrana, dobra kondicija životinje, dobro opšte zdravstveno stanje, a posebno apsolutno zdravo i funkcionalno vime.

Sekretija mleka se vrši u ćelijama sekretornog epitela, koji oblaže unutrašnji zid alveole vimena. Mleko sadrži najviše vode, u kojoj se čvrste materije nalaze u obliku rastvora ili suspenzije. Osnovne čvrste materije mleka su proteini, mlečna mast, mlečni šećer (laktoza), minerali, vitamini i neke organske kiseline. Osnovni sastojci mleka (proteini, mlečna mast i laktoza) se sintetišu *de novo* u ćelijama mlečne alveole, iz osnovnih sastojaka (prekursor), koji se dopremaju iz krvi. Minerali, vitamini i imunoglobulini, dospevaju u mleko iz krvi, u nepromenjenom obliku. Kazein je glavni deo proteina mleka. Laktoalbumini i laktoglobulini su prisutni u rastvorljivoj formi.



Slika 10. Građa mlečne alveole (levo) i Sekretorne ćelije epitela alveoli (desno)

1-kapljice mlečne masti; 2-laktoza; 3-kazein; SC-sekretorna ćelija.

A – Neki sastojci dospevaju u mleko direktno iz krvi, prostom filtracijom ili koncentracijom (*voda, minerali, vitamini i imunoglobulini*).

B – Ostali sastojci se sintetišu “de novo” u sekretornoj ćeliji, od osnovnih hemijskih supstanci, koje dospevaju iz krvi (*laktoza iz glukoze, kazein iz aminokiselina, mlečne masti iz masnih kiselina*).

U sintezi mleka učestvuju: *Goldžijev aparat, endoplazamski retikulum i mitohondrije*.

PROVERA ZNANJA

1. Navedite osnovne reproduktivne funkcije ženke.
2. Definišite pojam polne zrelosti (puberteta) ženke.
3. Koje morfološke, fiziološke i psihičke promene ukazuju da je ženka postigla polnu zrelost?
4. Šta je estrusni ciklus i koliko traje (prosečno i normalne granice), kod pojedinih vrsta domaćih životinja?
5. Šta je estrus, koliko traje i koje su osnovne morfološke, fiziološke i psihičke karakteristike životinje u estrusu?
6. Šta je ovulacija, a šta ovulatorna vrednost?
7. Opišite osnovne faze procesa oplodnje.
8. Koji su osnovni stadijumi razvoja preimplantacionih embriona?
9. Navedite fetalne membrane i njihovu osnovnu funkciju?

10. Koliko traje bremenitist (graviditet) kod pojedinih vrsta domaćih životinja?
11. Opišite osnovni mehanizam materinskog prepoznavanja gravidnosti.
12. Navedite osnovne mehanizme neuroendokrine regulacije početka i toka porođaja.
13. Koje su osnovne kliničke faze porođaja?
14. Kada je završen proces porođaja?
15. Šta je to involucija uterusa i zbog čega je važna?
16. Definišite pojam puerperiuma?
17. Navedite razlike u vremenu reuspostavljanja estrusnog ciklusa post partum, kod pojedinih vrsta domaćih životinja.
18. Navedite osnovne karakteristike procesa laktacije kod pojedinih vrsta domaćih životinja.

1.2. REPRODUKCIJA MUŽJAKA (*Dragin, S., Stančić, I.*)

Priplodni mužjaci imaju vrlo velik uticaj na reproduktivnu efikasnost zapata, kao i na formiranje genetskih osobina potomaka, čak i znatno veći u odnosu na ženska priplodna grla. Ovo proizilazi iz činjenice da prosečna plotkinja, u intenzivnim i optimalnim uslovima reprodukcije, godišnje može dati znatno manji broj potomaka od mužjaka, posebno ako se mužjaci koriste za veštačko osemenjavanje. Zbog toga je veoma važno dobro poznavati fiziologiju reproduktivnih funkcija mužjaka. Osnovne reproduktivne funkcije polno zrelog mužjaka su: (1) polno sazrevanje, (2) proizvodnja sperme i (3) polno ponašanje. Reproductivne funkcije mužjaka su, u osnovi, genetski determinisane, ali su njihove fenotipske vrednosti podvrgnute značajnom uticaju paragenetskih faktora.

1.2.1. POLNO SAZREVANJE

Proces polnog sazrevanja je kontrolisan neurohormonalnim mehanizmima, na osovini centralni nervni sistem-hipotalamus-hipofiza-testis i obrnuto. Centralno mesto u procesu polnog sazrevanja imaju razvoj i funkcija testisa. Tako se razvoj testisa može podeliti u tri faze. Prva faza je diferencijacija, koja započinje u ranom embrionalnom i fetalnom periodu razvoja. Druga faza se poklapa sa periodom neposredno pre i posle rođenja, kada se zapaža znatno povećanje mase testisa i razvoj Leydig-ovih ćelija (endokrini deo testisa). Treća faza razvoja testisa je u periodu puberteta, kada započinje spermatogeneza. Pojava spermatacita u semenim kanalićima testisa se može ustanoviti kod mladih nerastića starih 84 do 135 dana, bikčića starih 104 do 120 dana i ovnića kada su stari oko 60 dana. Potpuno formirani spermatozoidi, sposobni za oplodnju, mogu se naći u semenim kanalićima testisa kod nerastića starih oko 4 meseca, a bikčića starih 7 meseci. Pojava spermatozoida u ejakulatu i mogućnost postizanja erekcije, događa se kod nerastića starih oko 5,5 meseci, a bikova strih 7,5 do 9 meseci. Iako su starost i telesna masa mladih mužjaka kod postizanja polne zrelosti, u osnovi, genetski determinisani za svaku vrstu, fenotipska vrednosti ovih parametara značajno zavise od uticaja interakcije genetskih (rasa, kombinacija meleženja, linija, individua) i paragenetskih faktora (ishrana, ambijentalna temperatura, način smeštaja, zdravstveno stanje).

Mlade mužjake treba početi reproduktivno iskorištavati kada oni dostignu oko 2/3 telesne mase karakteristične za potpuno odrasle mužjake date vrste ili rase, odnosno kada počnu davati ejakulate, čiji su parametri oko 80% od vrednosti istih parametara kod potpuno odraslih mužjaka. Među ovim parametrima fertilizacionog kapaciteta sperme su osnovni: volumen ejakulata, ukupan broj spermatozoida u ejakulatu, koncentracija spermatozoida u 1ml ejakulata, % progresivno pokretnih spermatozoida, broj morfološki abnormalnih i mrtvih spermatozoida.

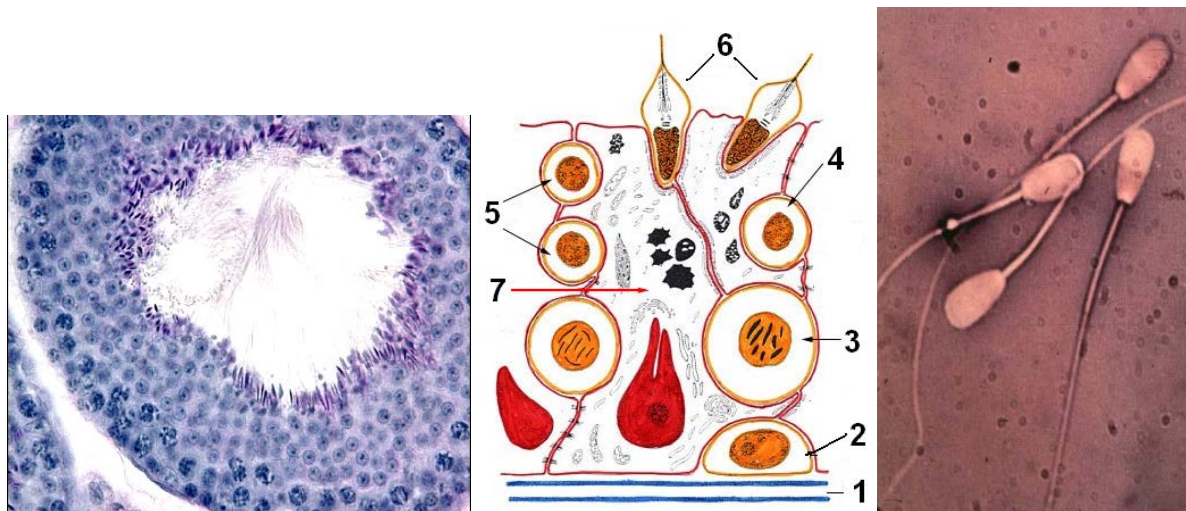
1.2.2. PRODUKCIJA SPERME

Sperma je vrlo specifična telesna tečnost, koja je sastoji iz dve osnovne frakcije: *spermalne tečnosti* ili *spermalne plazme* i *spermatozoida* (muških polnih ćelija), koji su raspršeni u semennoj tečnosti.

Spermalna tečnost ili semena plazma je, najvećim delom (preko 85% ukupnog volumena), proizvod pomoćnih polnih žlezda. Ostatok semene tečnosti potiče iz testisa, epididimisa i semevoda. Semena tečnost obezbeđuje tečnu sredinu, hranljive i zaštitne materije, pufere, osmotski pritisak, kao i druge uslove za život i održavanje oplodne sposobnosti spermatozoida izvan organizma mužjaka (u polnim organima ženke). Ova tečnost olakšava i transport spermatozoida kroz ženske polne organe. Spermatozoidi se mešaju sa semenom tečnošću, prilikom akta ejakulacije. Zapremina sperme, koja se izbacuje u jednom skoku, naziva se ejakulat. Zapremina ejakulata varira u zavisnosti od vrste i rase životinja, ali postoji i značajno variranje između pojedinih individua unutar iste vrste ili rase, što zavisi od brojnih genetskih i paragenetskih faktora. Bik, ovan i jarac imaju ejakulate male zapremine, a velike koncentracije spermatozoida, dok su ejakulati nerasta i pastuva velike zapremine, ali male koncentracije spermatozoida. Osnovne hranljive (energetske) supstance sperme su: fruktoza, sorbitol, inozitol, glicerilfosforil holin (GPC) i plasmalogen. Mikro i makro elementi (elektroliti) održavaju izoelektrični potencijal sperme. Puferni sistemi održavaju potreban pH sperme. U spermi se nalaze i druge zaštitne i aktivne supstance, kao što su hormoni (oksitocin, prostaglandin), fermenti i biostatici.

Spermatozoidi su muške polne ćelije, preko kojih mužjak prenosi svoje genetske osobine na svoje potomstvo. Spermatozoid je visoko specijalizovana ćelija, kako po svojoj građi, tako i po svojoj funkciji. Sastoji se od glave i repa, a ukupna dužina spermatozoida malo varira između pojedinih vrsta domaćih životinja, 45 μm (pastuv) do 70 μm (bik). Glava je ovalna i spljoštena, dugačka oko 8 μm, široka oko 4 μm, debela oko 2 μm. Na vrhu glave se nalazi jedno kiflasto telašće (organela), koje se naziva *akrozom*. Ova organela ima veoma važnu ulogu u procesu oplodnje. Spermatozoidi sa poremećenim akrozomom ili bez njega, nisu sposobni da oplode jajnu ćeliju. Najveći deo zapremine glave spermatozoida, zauzima veliko jedro (nukleus), u kome se nalaze hromozomi, koji nose nasledne osobine. Rep je dugačak i tanak, a ima ulogu da aktivno pokreće spermatozoid. U njemu su smešteni tanki kontraktilni končići (mikrofilamenti).

Spermatozoidi se proizvode u semenim kanalicima testisa, u procesu mitotičkih i mejotičkih deoba germinativnih ćelija, kao i uobličavanja spermatida u spermatozoid. Proces produkcije spermatozoida u semenim kanalicima traje oko 4 nedelje. Zatim se spermatozoidi transportuju iz testisa u epididimis, kroz koji prolaze tokom 2 nedelje, i čuvaju se u repu epididimisa. Tako, od momenta početka spermatogeneze, do dospevanja spermatozoida u ejakulat, mora da prođe minimalno oko 6 do 8 nedelja.



Slika 11. Poprečni presek semenih kanalića, u kojima se vrši spermatogeneza (levo i sredina) i izgled normalnih spermatozoida nerasta (desno)

1- Bazalna membrana semenog kanalića; 2- Spermatogonija (2n); 3- Spermatocit prvog reda (2n); 4- Spermatocit drugog reda (2n); 5- Spermatide (n); 6- Formiranje spermatozoida (n); 7- Sertolieva ćelija.

Postoje brojni faktori, koji utiču na vrednosti parametara kvaliteta sperme mušjaka: vrsta, rasa i linija kojoj pripada, veličina testisa, starost i različiti faktori spoljašnje sredine, kao što su temperatura, način smeštaja, trajanje dnevne svetlosti, godišnja sezona, različita obolenja i td. Povišena temperatura (spoljašnja ili telesna) je faktor koji vrlo snažno smanjuje kvalitet sperme.

Tabela 2. Vrednosti važnijih parametara sperme domaćih priplodnjaka

| Osobina | Bik | Ovan | Nerast | Pastuv |
|--|-------------|-------------|---------------------|------------------|
| Volumen ejakulata (ml) | 4 – 8 (15) | 1 – 2 (3,5) | 150 – 500 (1000) | 50 – 120 (300) |
| Broj spermatozoida u 1ml ejakulata ($\times 10^9$) | 1 – 2 (6) | 2 – 5 (8) | 0,1 – 0,2 (1,5) | 0,08 – 0,2 (0,8) |
| Ukupan br. spermatozoida u ejakulatu ($\times 10^9$) | 4 – 10 (30) | 2 – 10 (18) | 20 – 80 (100) | 4 – 20 (60) |

Brojevi u zagradama predstavljaju maksimalne vrednosti.

Spoljašnje temperature viša od 28°C smanjuju volumen ejakulata, ukupan broj i progresivnu pokretljivost spermatozoida, a povećavaju broj mrtvih i morfološki abnormalnih spermatozoida u ejakulatu. Ove promene se, u ejakulatu, javljaju oko 2 meseca posle prestanka temperaturnog stresa. U spermi nerastova izlaganih visokim temperaturama se povećava i sadržaj proteina. Ovo ima za posledicu smanjenu sposobnost preživljavanja spermatozoida u razređenoj spermi, tokom njenog čuvanja na nižim temperaturama. Ishrana mušjaka, takođe, ima značajnog uticaja na obim i kvalitet produkcije sperme.

Faktori koji utiču na preživljavanje spermatozoida u spoljašnjoj sredini (*in vitro*)

Tehnologija veštačkog osemenjavanja, zahteva manipulaciju sa spermom u različitim uslovima spoljašnje sredine i to u svim fazama, od dobijanja sperme od priplodnjaka, preko

kontrole, razređivanja i čuvanja inseminacionih doza, do momenta ubacivanja doze u ženski reproduktivni trakt. Zbog toga je važno poznavati faktore koji utiču na preživljavanje spermatozoida i što duže zadržavanje njihove oplodne sposobnosti u spoljašnjim (*in vitro*) uslovima.

Postoji veliki broj faktora spoljašnje sredine, koji utiču na preživljavanje spermatozoida *in vitro*, među kojima se ističu: fizičke i hemijske osobine razređivača za spermu, stepen razređenja nativnog ejakulata, period čuvanja razređene sperme, od momenta formiranja inseminacionih doza, do momenta njihove upotrebe, uslovi čuvanja nativne i razređene sperme (posebno temperatura na kojoj se čuva nativna sperma pre razređivanja i temperatura na kojoj se čuvaju razređene, tj. formirane inseminacione doze), faktori ambijenta (temperatura i vlažnost vazduha, intenzitet svetlosti i td.), prisustvo različitih mikroorganizama, jakih organskih i neorganskih kiselina i baza, toksičnih materija (nikotin, alkohol, deterdženti), radioaktivnih supstanci i td.

1.2.3. POLNO PONAŠANJE

Polno ponašanje podrazumeva specifično ponašanje mužjaka neposredno pre, tokom i posle akta parenja sa ženkom. Akt parenja ili kopulacija je složena polna funkcija, čija je osnovna uloga da se sperma ubaci u reproduktivni trakt plotkinje. Ovaj akt se sastoji iz nekoliko faza: (1) pripremna, ili udvaranje, (2) skok sa erekcijom penisa, (3) uvođenje penisa u ženski polni trakt, (4) ejakulacija i (5) završetak skoka sa relaksacijom penisa. Ceo akt parenja, kod svinja, traje 3 do 20 minuta, obično 5 do 10 minuta, što zavisi od uticaja brojnih faktora okolne sredine, kao i od svakog pojedinačnog nerasta. Akt parenja, kod konja traje kraće (nekoliko minuta), a kod preživara (govedo, ovca i koza) traje vrlo kratko (svega nekoliko sekundi). Nerast i pastuv ejakuliraju u tri odvojene frakcije: 1. prespermalna (bistra tečnost bez spermatozoida), 2. spermlna (gusta, beličasto-žućkasta tečnost, bogata spermatozoidima) i 3. postspermalna (retka, prozirna tečnost, sa vrlo malo spermatozoida). Na kraju ejakulacije, nerast izbacuje 30 do 40 grama želatinoznih čepića, tzv. gel frakcija, koja je sekret bulbouretralnih žlezda.

Uticaj spoljašnjih faktora na muške polne funkcije

Postoje brojni spoljašnji (paragentski) faktori, koji značajno utiču na razvoj i odvijanje muških polnih funkcija (proces polnog sazrevanja, produkciju sperme i polno ponašanje).

Na starost i telesnu masu mužjaka, kod postizanja polne zrelosti, pored genetskih (vrsta, rasa, soj, individua, ukrštanje, stepen inbreedinga i neke gentske anomalije), utiče i veći broj pragenetskih faktora, među kojima se ističu: ishrana, godišnja sezona (temperatura i trajanje dnevnog fotoperioda), način smeštaja, kontakt sa polno zrelim mužjacima ili estričnim ženkama, razna obolenja. Na proces spermatogeneze i produkciju androgena, značajan uticaj imaju: temperatura ambijenta (ili telesna temperatura), trajanje dnevnog fotoperioda, način ishrane, različiti stresogeni, štetne, otrovne i radioaktivne supstance.

Jedan od najčešćih faktora, koji značajno modifikuje proces spermatogeneze, sve do njegovog potpunog (reverzibilnog ili ireverzibilnog) prekida, je povišena ambijentalna ili telesna (zbog nekih obolenja, na primer) temperatura. Kod većine vrsta, ambijentalna temperatura preko 28°C, posebno ako dugo traje, dovodi do značajnih poremećaja spermatogeneze. Ovo je direktna posledica poremećene sinteze testosterona, koji kontroliše odvijanje procesa spermatogeneze. Na delovanje visokih temperatura su posebno osetljive

prve faze procesa spermatogeneze, što ima za posledicu da se, u ejakulatu, javlja veći broj mrtvih i morfološki promenjenih spermatozoida. Zbog toga se nekvalitetni ejakulati (manjeg volumena, sa manjim brojem progresivno pokretnih i povećanim brojem mrtvih i morfološki abnormalnih spermatozoida), mogu očekivati oko 45 do 60 dana posle početka delovanja toplotnog stresa. Nije se pokazalo da niske temperature (sem kada su ekstremno niske i dugotrajne) imaju značajnog uticaja na proces spermatogeneze i produkciju androgena.

PROVERA ZNANJA

1. Navedite osnovne reproduktivne funkcije ženke.
2. Definišite pojam polne zrelosti (puberteta) ženke.
3. Koje morfološke, fiziološke i psihičke promene ukazuju da je ženka postigla polnu zrelost?
4. Šta je estrusni ciklus i koliko traje (prosečno i normalne granice), kod pojedinih vrsta domaćih životinja?
5. Šta je estrus, koliko traje i koje su osnovne morfološke, fiziološke i psihičke karakteristike životinje u estrusu?
6. Šta je ovulacija, a šta ovulatorna vrednost?
7. Opišite osnovne faze procesa oplodnje.
8. Koji su osnovni stadijumi razvoja preimplantacionih embriona?
9. Navedite fetalne membrane i njihovu osnovnu funkciju?
10. Koliko traje bremenitost (graviditet) kod pojedinih vrsta domaćih životinja?
11. Opišite osnovni mehanizam materinskog prepoznavanja gravidnosti.
12. Navedite osnovne mehanizme neuroendokrine regulacije početka i toka porođaja.
13. Koje su osnovne kliničke faze porođaja?
14. Kada je završen proces porođaja?
15. Šta je to involucija uterusu i zbog čega je važna?
16. Definišite pojam puerperiuma?
17. Navedite razlike u vremenu reuspostavljanja estrusnog ciklusa post partum, kod pojedinih vrsta domaćih životinja.
18. Navedite osnovne karakteristike procesa laktacije kod pojedinih vrsta domaćih životinja.
19. Navedite osnovni sastav i funkcije spermalne tečnosti.
20. Opišite građu spermatozoide.
21. Navedite osnovne parametre ejakulata nerasta, bika, ovna i pastuva.

2. FIZIOLOGIJA REPRODUKCIJE DOMAĆIH PTICA

Fiziologija reprodukcije ptica se značajno razlikuje od fiziologije reprodukcije sisara. Neke od ovih razlika su sledeće: (1) ptice ne rađaju žive mladunce kao sisari, nego se plod razvija izvan organizma ženke, u jajetu, tokom procesa inkubacije, (2) nemaju izdiferencirane faze estrusnog ciklusa i gravidnosti, (3) na jajniku ptica se, posle ovulacije, ne formira žuto telo, nego sintezu i sekreciju progesterona vrše ćelije teke interne ostatka zida ovuliranog folikula, (4) testisesi odraslih mužjaka ptica su smešteni u abdominalnoj šupljini, (5) epididimis je veoma kratak i (6) sem ptica iz reda plovuša, ostale vrste nemaju razvijen kopulacioni organ (penis).

2.1. REPRODUKCIJA ŽENKE (Stančić, I., Dragin, S.)

U reproduktivne funkcije ženke spadaju: proces polnog sazrevanja, ovulacija, formiranje jajeta, ovipozicija i inkubacija (leženje na jajima).

Pubertet (polna zrelost). Postizanje polne zrelosti ženske ptice je definisano momentom kada mlada jedinka snese prvo jaje. Starost ženke kod pojave puberteta zavisi od vrste, rase, linije i individue, kao i od različitih kombinacija meležnja. Osim toga, na starost kod puberteta mogu uticati i paragenetski faktori, kao što su ishrana, dnevni fotoperiod, klimatski uslovi i td. Trajanje dnevnog fotoperioda je najuticajni faktor. Produžavanje dnevnog fotoperioda smanjuje starost ženke kod pojave puberteta. Proces polnog sazrevanja je kontrolisan neuro-endokrinim mehanizmima, na osovini CNS – hipotalamus – hipofiza, a prva ovulacija je kontrolisana delovanjem hipofizarnih gonadotropina FSH i LH.

Ovulacija. Proces oslobađanja jajne ćelije iz ovarijalnog folikula, pod uticajem LH, naziva se ovulacija. Kod kokoške se ovulacija događa 15 do 75 minuta posle nošenja prethodnog jajeta. Neposredno pre ovulacije, zid stigme se istanjuje, zbog procesa autolize proteolitičkim fermentima. Ovulaciju kontroliše izlučivanje hipofizarnog LH, koji se događa samo tokom tamnog dela dana. Naime, tokom tamnog dela dana, stimuliše se oslobađanje Gn-RH iz hipotalamusa, što izaziva oslobađanje prvog talasa LH iz adenohipofize. Ovaj talas LH stimuliše sekreciju estrogena i testosterona iz nezrelih folikula, kao i progesterona iz zida zrelog folikula. Progesteron deluje povratnom spregom na adenohipofizu, što izaziva oslobađanje drugog talasa LH, oko 10 časova posle prvog. Ovaj talas LH izaziva ovulaciju.

Ciklus ovulacije i ovipozicije. Period između dve uzastopne ovulacije se naziva *ciklus ovulacije*, dok se period između nošenja dva uzastopna jajeta, naziva *ciklus ovipozicije*. Neprekidan ciklus nošenja jednog jajeta svakog dana, naziva se *sekvencija nošenja*. Broj snesenih jaja u jednoj sekvenci može varirati od 1 do 40 (nosilja je sve bolja, što nosi veći broj jaja u jednoj sekvenci). Broj dana između pojedinih sekvenci, takođe, može varirati (najbolje da ovaj broj iznosi 1 do 2 dana). Prvo jaje u sekvenci, pod optimalnim trajanjem dnevnog fotoperioda (14h svetlo, a 10h tama), kokoška snese vrlo ranim jutarnjim časovima. Ovo je zbog toga što se LH oslobađa početkom prethodne noći. Kako period između nošenja dva uzastopna jajeta traje više od 24h, to će se, nakon nekoliko dana nošenja, dogoditi da folikul sazri u toku svetlog dela dana. Kako se u svetlom delu dana ne izlučuje LH, to neće

doći do ovulacije ovog folikula toga dana. On će ovulirati tek onda kada izlučivanje LH padne na početak tamnog dela dana. Vreme između nošenja dva uzastopna jajeta minus 24h, naziva se lag faza, Ova faza je najkraća između nošenja prvog i drugog jajeta u sekvenci, a zatim se stalno produžava, dok, konačno, ne dođe do pauze u nošenju. Dakle kokoši sa kraćim lag fazama imaju veći broj jaja u sekvenci i obrnuto.

Proces ovipozicije obuhvata kontrakcije mišića uterusa, koje potiskuju jaje kroz relaksirani mišić sfinktera u vaginu. Ulaskom u vaginu, jaje rasteže njen zida, što stimuliše tzv. stimulus konačnog istiskivanja jajeta, kroz kloaku, u spoljašnju sredinu. Ovaj refleks, naime, izaziva snažne kontrakcije mišića abdominalnog zida, što povećava intraabdominalni pritisak, čime se pomaže istiskivanje jajeta iz kloake.

Formiranje jajeta. Posle ovulacije, jajna ćelija dospeva u jajovod i, tokom prolaska kroz pojedine delove jajovoda, dobija svoje ovojnice: albumin (belace), unutrašnju i spoljašnju ljuskinu membranu i tvrdu ljusku. Ovakvu strukturu ima potpuno formirano jaje, koje se izbacuje iz ženskog polnog trakta u spoljašnju sredinu, tokom procesa ovipozicije.

Albumin (belance) se formira u magnumu, ljuskinne tanke membrane u istmusu, a tvrda ljuska u uterusu. Pri tome se jaje najduže zadržava u uterusu (oko 21h), zbog obimnog i dugotrajnog procesa formiranja kalcifikovane tvrde ljuske. Belance čini oko dve trećine ukupne mase jajeta i sadrži oko 40% proteina. Osnovna uloga belanceta je da čini fluidnu ovojnicu oko jajne ćelije (žumanceta), koja sprečava dehidraciju. Takođe, služi i kao izvor hranljivih materija za razvoj embriona, u kasnoj fazi inkubacije (kada se potroše hranljive materije iz vitelusa – žumanceta). Belance ima i određena biostatička i enzimska svojstva. Sintezu belanceta, u tkivu magnuma, kontrolišu steroidni hormoni. Belance sadrži supstancu avidin, koja inaktiviše delovanje vitamina biotina u organizmu životinja, ako se hrane svežim jajima.

Postoje dve tanke ljuske jajeta, koje obavijaju belance i prisno naležu jedna na drugu, sem na širem polu jajeta, gde su razdvojene i formiraju vazdušnu komoru jajeta.

Tvrda ljuska jajeta, je sa unutrašnje strane, prekrivena spoljašnjom tankom ljuskom (membranom). Osnovnu strukturu ljuske jajeta čini tzv. sunderasti sloj, građen od mreže kalcijumskih vlakana. Međuprostore u ovoj kalcijumskoj mreži, popunjava organski matriks. Spolja je ljuska obavijena organskom kutikulom, koja sprečava dehidraciju i prodor mikroorganizama u unutrašnjost jajeta. Kutikula sadrži karakterističan pigment. Osnovni izvor kalcijuma, za formiranje tvrde ljuske, predstavlja uneta hrana, kao i rezerva kalcijuma u kostima. Deponovanje i izuzimanje kalcijuma iz kostiju, kontroliše složen hormonski mehanizam, u kome vodeću ulogu ima estrogen.

Period nošenja jaja se sastoji od tri usnovne faze. Prva faza je *početak ponošenja* i traje 1 do 2 nedelje. U ovom periodu, kokoška može da nosi dnevno i po dva jajeta, od kojih je jedno ili oba jajeta sa mekom ljuskom. Jaja su sitnija, a interval između nošenja pojedinih jaja može biti nenormalno dug. To je posledica neusklađenosti funkcije jajnika i jajovoda. *Druga faza predstavlja* glavni period nošenja, kada se uspostavlja regularni režim nošenja i kada se postiže maksimalna nosivost. U ovom periodu se snese najveći broj, od ukupnog broja snesenih jaja u jednom periodu nošenja. Jaja su veća i potpuno formirana. Sekvence nošenja su duže, a pauze između sekvenci su kraće. U *trećoj fazi* dolazi do naglog pada broja snesenih jaja, zbog smanjene ovulacione vrednosti, kao i zbog smanjenog kapaciteta jajovoda za formiranje normalnog jajeta. Ova faza je dosta kratka i završava se prekidom nošenja. Tada kokoška ulazi u fazu mitarenja, tj. promene perja i pripreme organizma sa sledeći period nošenja.

Reproduktivne funkcije ženke su regulisane neurohormonalnim sistemom. Estrogen reguliše mobilizaciju kalcijuma iz kostiju. Zajedno sa progesteronom i androgenim hormonima, estrogen kontroliše proces ovulacije, formiranja jajeta u jajovodu, kao i proces

ovipozicije. Progesteron kontroliše oslobađanje LH iz adenohipofize, koji je odgovoran za ovulaciju. Oksitocin izaziva kontrakcije glatke muskulature zida jajovoda. Na taj način se jaje transportuje kroz jajovoda i istiskuje, kroz kloaku, u spoljašnju sredinu.

2.1.1. OPLODNJA, INKUBACIJA I RAZVOJ EMBRIONA

Oplođnja se događa u infundibulumu jajovoda. Ovo zbog toga što, u kaudalnim partijama jajovoda, oocit dobija svoje ovojnice (belance, tanke membrane i tvrdu ljusku), koje spermatozoidi nisu sposobni da penetriraju. Sperma se deponuje u kloaku, pasivan transport spermatozoida do infundibuluma je vrlo brz (spermatozoidi se nalaze u infundibulumu već oko 15 minuta posle ejakulacije). Prisustvo jajeta u jajovodu, značajno otežava ili potpuno sprečava transport spermatozoida do mesta oplodnje. Oplodnja se može dogoditi već unutar nekoliko minuta po prispeću spermatozoida u infundibulum. Ovo ukazuje na činjenicu da kapacitacija spermatozoida, u ptica, ne postoji, ili se ovaj proces odvija za nekoliko minuta. Ovo potvrđuje i činjenica da, za *in vitro* oplodnju, nije potrebno izvršiti *in vitro* kapacitaciju spermatozoida, kao kod sisara. Spermatozoidi se deponuju u tzv. tubularne žlezde, koje se nalaze u zidu jajovoda, na spoju između magnuma i infundibuluma. Verovatno je da specifičan sekret ovih žlezda pomaže održavanju oplodne sposobnosti spermatozoida i preko 30 dana, kod kokoške i oko 70 dana kod ćurke.

Kod normalne oplodnje, samo jedan spermatozoid ulazi u vitelusni prostor oocita, a od nuklesusa tog spermatozoida (sa haploidnim brojem hromozoma), formira se muški pronukleus. Vrednost uspešno oplodjenih jaja, izražena u procentima od ukupnog broja snesenih, zavisi od većeg broja faktora. U ovom pogledu su najuticajni odnos broja mužjaka i ženki u jatu, kao i godišnja sezona, u kojoj se parenje izvodi. Maksimalan broj oplodjenih jaja se dobija kada na jednog petla ima 4 do 5 kokošaka. Najveći broj oplodjenih jaja kokošaka (preko 90%) se dobija tokom kasne zime i proleća, dok u letnjim mesecima, ova vrednost opada i za 20%.

Inkubacija je period prirodnog ili veštačkog zagrevanja jaja, posle nošenja, u toku kog se razvija embrion, sve do izvaljivanja potpuno formiranog i, za samostalan život, sposobnog pileta. Broj izvaljenih od broja jaja stavljenih na inkubaciju (tzv. procent izvaljivanja), zavisi od različitih uslova čuvanja jaja pre inkubacije, kao i od uslova tokom inkubacije. Osnovni od ovih uslova su: temperatura, starost jaja, tehnika mehaničkog rukovanja sa jajima, čistoća ljuske jajeta, vlažnost i pritisak vazduha, iradijacija, intoksikacija i td. Optimalna temperatura čuvanja kokošijih jaja iznosi 27 do 28°C. Naime jaja čuvana na ovoj temperaturi, i više od 20 dana, imaju sličan procent izvaljivosti kao i jaja stara do 7 dana. Optimalna temperatura inkubacije kokošijih jaja, tokom prve nedelje inkubacije, iznosi 34,3°C, tokom druge nedelje 34,7°C i 35,0°C tokom treće (zadnje) nedelje inkubacije. Veoma je važno da, tokom zadnje nedelje inkubacije, temperatura ne pređe 35°C. Za uspeh inkubacije su važni i neki drugi faktori, kao što su: optimalna relativna vlažnost (60 do 63%), frekvencija okretanja jaja, kojom se postiže ravnomerno zagrevanje celokupne površine ljuske jajeta, optimalan odnos koncentracije kiseonika i ugljen-dioksida ($O_2 : CO_2 = 21 : 0,4\%$).

Razvoj embriona se odvija unutar jajeta, tokom procesa inkubacije. Tokom ovog procesa, embrion se snabdeva hranljivim materijama iz žumanceta i belanceta, a kiseonikom iz vazdušne komore jajeta, kao i razmenom gasova između jajeta i spoljašnje sredine, koja se vrši kroz pore u ljuski jajeta. Osnovni embrionalni organi su amnion, alantois i žumančana kesa.

Postoje 4 kritične faze u razvoju embriona. Prva faza traje prvih 48h inkubacije. Tokom ovog perioda, rani embrion se privikava na uslove inkubacije. Ovu fazu karakteriše intenzivna

deoba ćelija (brazdanje), praćena brojnim i brzim histomorfološkim i fiziološkim promenama. Druga kritična faza u razvoju embriona je oko 15. dana inkubacije, kada započinje funkcionisanje embrionalnih bubrega. Treća faza je između 18. i 20. dana inkubacije, kada embrion počinje disati sopstvenim plućima, koristeći rezervu vazduha iz vazdušne komore jajeta. Četvrta kritična faza je period samog izvaljivanja pileteta iz jajeta. U ovoj fazi dolazi do najvećih gubitaka pilića, jer oni mogu biti slabo vitalni i nisu sposobni da probiju ljusku jajeta, kao i da se prilagode uslovima spoljašnje sredine, neposredno posle izvaljivanja.

Tabela 3. Važnije reproduktivne osobine nekih vrsta ptica

| Vrsta | Starost kod puberteta (meseci) | Period inkubacije (dani) | Broj snesenih jaja po ženki godišnje | Oplodjenost* (%) | Izvaljivost (% od broja oplodjenih) |
|-----------|--------------------------------|--------------------------|--------------------------------------|------------------|-------------------------------------|
| Kokoška | 5 – 6 | 21 | 230 – 270 | 90 | 90 |
| Ćurka | 7 – 8 | 28 | 90 | 80 – 85 | 80 |
| Patka | 6 – 7 | 28 | 180 | 95 | 70 |
| Guska | laki tip | 9 – 10 | 60 | 70 | 80 |
| | teški tip | 10 – 12 | 50 | 65 | 75 |
| Fazan | 10 – 12 | 24 – 26 | 60 | 95 | 85 |
| Prepelica | 2 – 3 | 15 – 16 | 300 | 90 | 75 – 85 |

* Oplodjenost = Broj oplodjenih / Broj ovuliranih oocita x 100.

2.2. REPRODUKCIJA MUŽJAKA (*Stančić, I., Dragin, S.*)

Mušjaci postaju reproduktivno sposobni sa postizanjem polne zrelosti. Reproductive funkcije mužjaka su produkcija spermatozoida i polno ponašanje (udvaranje i akt parenja). Ove funkcije su kontrolisane neurohormonalnim mehanizmima.

Polna zrelost se definiše momentom kada mladi mužjaci počnu davati ejakulata sličnih parametara kod ejakulata odraslih mužjaka. Trajanje dnevnog fotoperioda je vrlo uticajan faktor na starost mužjaka kod postizanja polne zrelosti. Duže trajanje dnevnog fotoperioda ubrzava proces polnog sazrevanja. Temperatura ambijenta, takođe, ima značajnog uticaja na ritam polnog sazrevanja. Niske temperature (ispod 8°C), mogu značajno produžiti proces polnog sazrevanja. Međutim, suviše visoke temperature smanjuju produkciju kvalitetne sperme. Neadekvatna ishrana mladih mužjaka pre puberteta, može značajno povećati njihovu starost kod pojave puberteta i smanjiti nivo produkcije kvalitetne sperme.

Produkcija sperme započinje kod petlića starih 12 do 18 nedelja, ali se zadovoljavajući kvalitet ejakulata postiže kada su stari 24 do 26 nedelja. Zreli spermatozoidi ptica se karakterišu vrlo izduženom glavom (zbog izduženog, šiljatog akrozoma), kratkim srednjim i dugaškim glavnim delom repa. Dnevna produkcija sperme se meri brojem proizvedenih spermatozoida po gramu testikularnog tkiva. Ova vrednost kod petla iznosi 80 do 120 x 10⁶. Petao, u toku maksimalne produkcije, dnevno ejakulira oko 2 do 3x10⁹ spermatozoida. Volumen spermalne plazme u ejakulatu ptica je relativno mali, u poređenju sa sisarima, što je posledica nedostatka akcesornih polnih žlezda u ptica. Zbog toga su ejakulati ptica vrlo malog volumena, ali visoke koncentracije spermatozoida i 1ml sperme. Najveći deo semene tečnosti

potiče iz semenih kanalića, a znatno manji deo iz epididimisa i semevoda. Prilikom ejakulacije, spermiji se dodaje manja količina sekreta kloake (tzv. transparentni fluid).

Broj parenja, odnosno ejakulacija na dan, zavisi od volumena ejakulata i koncentracije spermatozoida. Vrednosti oba parametra se smanjuju, sa povećanjem broja dnevnih ejakulacija. Pored frekvencije ejakulacije, produkcija sperme i oplodna sposobnost spermatozoida zavise i od rase, tipa, godišnje sezone, načina ishrane, starosti i zdravstvenog stanja mužjaka.

Tabela 4. Osnovne osobine ejakulata domaćih vrsta ptica

| Vrsta ptica | | Volumen ejakulata (ml) | Ukupan broj spermatozoida u ejakulatu ($\times 10^9/\text{ml}$) | Boja sperme | Dužina spermatozoida (μm) |
|-------------|------------|------------------------|---|---------------|--|
| Petao | teške rase | 0,2 – 0,8 | 1 – 4 | mlečno-bela | glava: 12 rep: 95 ceo: 107 |
| | lake rase | 0,3 – 1,5 | 3 – 10 | mlečno-bela | - |
| Ćuran | | 0,2 – 1,0 | 6 – 12 | mlečno-bela | - |
| Patak | domaći | 0,2 – 1,2 | 1 – 4 | žuta i bistra | - |
| | divlji | 0,05 – 1,5 | 1 – 4,5 | - | - |
| Gusan | | 0,1 – 0,5 | 0,2 – 1,0 | žuta i bistra | - |

Broj parenja, odnosno ejakulacija na dan, zavisi od volumena ejakulata i koncentracije spermatozoida. Vrednosti oba parametra se smanjuju, sa povećanjem broja dnevnih ejakulacija. Pored frekvencije ejakulacije, produkcija sperme i oplodna sposobnost spermatozoida zavise i od rase, tipa, godišnje sezone, načina ishrane, starosti i zdravstvenog stanja mužjaka.

PROVERA ZNANJA

1. Nabrojte reproduktivne organe ženke ptica?
2. Nabrojte reproduktivne organe mužjaka ptica?
3. Kod kojih vrste domaćih ptica, mužjaci imaju razvijen penis?
4. Opišite osnovni mehanizam ovulacije kod ptica.
5. U kom delu ženskog polnog trakta se dešava oplodnja?
6. Opišite proces formiranja jajeta, u ženskom polnom traktu.
7. Opišite osnovnu građu formiranog jajeta.
8. Definišite pojam ovipozicije.
9. Koliko jaja, za godinu dana, snesu pojedine vrste domaćih ptica?
10. Koliko traje inkubacija jaja kod pojedinih vrsta domaćih ptica?
11. Navedite vrednosti osnovnih parametara ejakulata mužjaka domaćih vrsta ptica?

3. BIOTEHNOLOGIJA REPRODUKCIJE

(Stančić, I., Jotanović, S.)

Visok nivo reproduktivne efikasnosti domaćih životinja je jedan od osnovnih preduslova uspešne animalne proizvodnje, kako u naturalnom, tako i u ekonomskom pogledu. Reproductivna efikasnost se, u principu, meri brojem živih, zdravih i genetski kvalitetnih potomaka po plotkinji godišnje. Međutim, u sadašnjim uslovima intenzivne (industrijske) animalne proizvodnje, skoro da nije moguće ostvariti maksimalnu reproduktivnu efikasnost, primenom konvencionalnih (tradicionalnih, ekstenzivnih) metoda ishrane, držanja i eksploatacije životinja. Naime, savremena tehnologija intenzivne proizvodnje, obiluje brojnim stresogenim faktorima, koji negativno deluju na zdravstveno stanje i produktivnost životinja. Odnosno, životinje nisu u stanju da, pod takvim uslovima, maksimalno ispolje svoje genetske potencijale. Nepovoljni faktori spoljašnje sredine, negativno utiču na parametre reproduktivne performase, kao što su: tarost i telesna masa kod postizanja puberteta, sposobnost uspostavljanja redovnih estrusnih ciklusa i ovulacije, sposobnost produkcije kvalitetne sperme, sposobnost uspostavljanja i održavanja normalne gravidnosti, sposobnost normalnog porođaja i puerperiuma, sposobnost normalne laktacije, uspostavljanje postpartalnih estrusnih ciklusa, ovulaciona vrednost, intrauterino (embrionalno i fetalno) preživljavanje, broj mladunaca u leglu i sposobnost njihovog preživljavanja, dugovečnost reproduktivnog iskorištavanja, otpornost na različite bolesti, posebno reproduktivnog sistema i td.

Zbog toga se, poslednjih decenija, sve više razvijaju razne moderne biotehnoške metode, kojima se kontrolišu i stimulišu pojedine reproduktivne funkcije, sa ciljem da se dobije što veći broj potomaka po plotkinji godišnje, odnosno u toku ukupnog perioda njenog reproduktivnog iskorištavanja. Osim toga, razvijaju se i koriste metode *in vitro* manipulacije sa gametima i ranim embrionima, sa ciljem da se dobije što veći broj jedinki sa visokim genetskim potencijalom za poželjna produktivna i reproduktivna svojstva. U poslednje vreme se naročito razvijaju metode dugotrajnog čuvanja gameta i embriona, sa ciljem da se formiraju tzv. banke genetskih resursa. Primena ovih metoda se naziva još i asistirana reprodukcija životinja.

Principi biotehnoških metoda se, u osnovi, zasnivaju na savremenim saznanjima o uticaju raznih spoljašnjih faktora (ambijentalna temperatura i trajanje dnevnog fotoperioda, ishrana, efekt polno zrelog mužjaka i primena raznih hormonskih preparata) na fiziološke mehanizme pojedinih reproduktivnih funkcija (ritam postizanja puberteta, estrusni ciklus i ovulacija, graviditet, partus i puerperium, veličina legla, laktacija). Povećanje reproduktivne efikasnosti se postiže i biotehnoškim metodama kao što su veštačko osemenjavanje, dijagnoza rane gravidnosti, transplantacija ranih embriona i manipulacija sa gametima i ranim embrionima *in vitro*.

Ove metode se razvijaju na osnovu naučnih saznanja u oblasti fiziologije, endokrinologije i embriologije, uz primenu moderne opreme: elektronski mikroskop, ultrasonografi, endoskopi, oprema za duboko zamrzavanje, kompjuterski sistemi.

Neke od ovih biotehnologija se koriste u eksperimentalnim istraživanjima, a neke se već koriste u širokoj proizvodnji, dok se primena nekih biotehnologija može očekivati u bližoj ili daljoj budućnosti. Tako se, na primer, tehnologija veštačkog osemenjavanja praktično koristi već nekoliko decenija, dok se tehnologija transplantacije ranih embriona (tzv. embriotransfer - ET), u praksi koristi poslednjih dvadesetak godina. Sa druge strane, tehnologije *in vitro*

fertilizacije, kloniranje embriona, proizvodnja himera i transgenih životinja, još uvek imaju samo naučno-istraživački značaj.

Prema svojoj nameni, savremene biotehnologije u reprodukciji se mogu podeliti u dve osnovne grupe: (a) one koje se koriste u kontroli i stimulaciji reproduktivnih funkcija i (b) one koje se koriste za *in vitro* manipulaciju sa gametima i embrionima.

3.1. BIOTEHNOLOGIJE ZA KONTROLU I STIMULACIJU REPRODUKTIVNIH FUNKCIJA

Jedan od zahteva intenzivne animalne proizvodnje je istovremena manipulacija sa većim brojem životinja određene kategorije u grupi. Ovaj zahtev je izražen i kod reproduktivnog iskorištavanja domaćih životinja. Sa druge strane, potrebno je postići maksimalnu reproduktivnu efikasnost priplodnih grla. Oba ova zahteva, u industrijskim uslovima proizvodnje, nije moguće zadovoljiti bez primene tzv. asistirane reprodukcije. Naime, potrebno je primeniti različite biotehnološke metode, kojima se mogu kontrolisati i stimulisati pojedine reproduktivne funkcije, istovremeno kod većeg broja životinja, kako bi se postigla maksimalna fenotipska ispoljenost njihovih genetskih predispozicija za pojedine reproduktivne osobine.

U savremenoj proizvodnoj praksi se koriste sledeće biotehnološke metode kontrole i stimulacije reproduktivnih funkcija:

1. sinhronizacija estrus i ovulacije,
2. dijagnoza rane gravidnosti,
3. indukcija i sinhronizacija partusa,
4. kontrola perioda posle partusa
5. povećanje veličine legla
6. veštačko osemenjavanje i
7. transplantacija ranih embriona.

3.1.1. SINHRONIZACIJA ESTRUSA I OVULACIJE

Tehnologija intenzivne i planirane reprodukcije, četo zahteva da se izvrši osemenjavanje većeg broja ženki u istom, vrlo kratkom periodu. Zbog toga je potrebno primeniti metode izazivanja sinhronizovane pojave estrusa i ovulacije. Ovo se može izvesti kod prepubertetskih (acikličnih) ženki, kada se radi o indukciji sinhronizovane pojave prvog pubertetskog estrusa. Može se raditi i o grupi polno zrelih (cikličnih) ženki, koje se nalaze u različitim fazama estrusnog ciklusa (spontano asinhrono ciklične ženke) i, konačno, može se raditi o indukciji pojave sinhronizovanog estrusa, kod polno zrelih ženki izvan prirodne sezone parenja (ovce, koze, kobile).

Za indukciju sinronizovanog estrusa, koriste se sledeće metode: (1) hormonska, (2) metoda efekta polno zrelog mužjaka, (3) kontrola trajanja dnevnog fotoperioda i (4) metoda pojačane (tzv. flushing) ishrane. Izbor metode, koja će se koristiti u datoj situaciji, zavisi od

više faktora: vrsta životinja, reproduktivni status (prepubertetska, polno zrela, sezona parenja), ekonomičnost primene, znaje i iskustvo stručnjaka i td.

3.1.1.1. INDUKCIJA PUBERTETSKOG ESTRUSA

Indukcija sinhronizovane pojave pubertetske ovulacije i estrusa, može se postići primenom hormonske metode, metode kontrolisanog dnevnog fotoperioda, pojačane ishrane, metodom efekta mužjaka i međurasnim ukrštanjem.

Hormonska metoda

Indukciju sinhronizovane pojave pubertetskog estrusa i ovulacije, može se izvesti primenom progestagenih, estrogenih, gonadotropnih i luteolitičkih preparata. Tako se, kod junica, indukcija puberteta može izvršiti tretmanom junica sa kombinacijom progestagena i estrogena, u vidu podkožnih implantata, tokom 9 dana. Ovaj tretman rezultira sa oko 90% pojave estrusa i sa oko 50% uspešnih gravidnosti, posle osemenjavanja u indukovanom estrusu. Uspeh indukcije zavisi od starosti junica kod tretmana. Tretman samo sa progesteronom, može dati uspešnu stimulaciju ranije pojave puberteta kod junica. Međutim, posle ovakovog tretmana, određen broj junica ponovo ulazi u prepubertetski anestrus, posle indukovnog estrusnog ciklusa. Stimulisanje bržeg polnog sazrevanja, moguće je izvesti primenom kratkotrajnog tretmana junica kombinacijom progesterona i prostaglandina. Tako su neki autori tretirali prepubertetske junice sa 0,5 mg MGA (sintetički progestagen – Melangestron Acetat) dnevno, tokom 14 dana, a 17 dana posle prestanka tretmana sa MGA, jednokratnom dozom 25 mg PGF_{2α}. Pojava puberteta je ustanovljena kod 49% tretiranih i 14% netretiranih junica. Izgleda da progestageni stimulišu folikularni rast kod prepubertetskih junica, bez uticaja na sekreciju LH. Indukcija bržeg polnog sazrevanja se može postići i jednokratnom i/m injekcijom 500 μm estradiola -17β. Prosečna starost kod pojave puberteta je bila znatno niža (249 dana), kod tako tretiranih junica, u poređenju sa junicama koje nisu bile tretirane (271 dana).

Kod prepubertetskih nazimica, estrus i ovulacija se, mogu izazvati tretmanom egzogenim gonadotropinima, posle 3. meseca starosti. Međutim, broj nazimica, koje uspostavljaju spontanu estrusnu cikličnost, posle izazvanog pubertetskog estrusa, kao i fertilitet nazimica osemenjenih u izazvanom estrusu, značajno zavise od starosti tretiranih nazimica. Za izazivanje pojave sinhronizovanog estrusa i ovulacije kod prepubertetskih nazimica, koriste se različiti preparati gonadotropina (eCG, hCG, FSH, LH), progestagena, prostaglandina, estrogena i melatonina ili kombinacije ovih preparata.

Najčešće se koristi tretman injekcijom kombinacije eCG/hCG. Ovi hormoni se mogu dati u vidu jednokratne injekcije, ali je bolje da se hCG daje oko 72 h posle eCG. Doza preparata zavisi od starosti i telesne mase tretiranih nazimica, kao i od toga koja se vrednost ovulacije želi postići. Obično se doza eCG kreće između 400ij i 800ij, a hCG između 200ij i 400ij po nazimici. Estrus se, kod većine nazimica, javlja između 3. i 5. dana posle prestanka tretmana. Povećanje vrednosti fertiliteta, posle osemenjavanja nazimica u indukovanom estrusu, kao i uspešno održavanje naredne spontane ciklične aktivnosti, moguće je postići pretretmanom nazimica sa progesteronom ili progestagenim sintetičkim supstancama. Jednokratna injekcija progesterona, data 3 dana pre injekcije gonadotropina (eCG/hCG), značajno povećava % prašenja i veličinu legla tretiranih nazimica. Međutim, ako se progesteron da samo 1 dana pre eCG, moguća je pojava infekcije uterusa posle osemenjavanja. To može imati za rezultat

smanjenu vrednost uspešne koncepcije i/ili povećanje embrionalnog mortaliteta. Tretman mladih prepubertetskih nazimica (satarih 142 dana) sa 15mg progestagenog preparata Regumate, dodavanog u dnevni obrok tokom 18 dana, i sa injekcijom preparata PG600 (400/200 ij eCG/hCG), datom 24 h po prestanku progestagenog tretmana, izaziva pojavu estrusa kod 95% nazimica, unutar 7 dana po prestanku tretmana. Estrusno reagovanje kontrolnih nazimica, koje nisu pretretirane sa Regumate, bilo je nešto niže (88,9%) i ovulaciona vrednost je bila nešto veća kod tretiranih (16,6 CL), u odnosu na kontrolne nazimice (14,4 CL).

Kombinacija gonadotropina i $PGF_{2\alpha}$. Stepen sinhronizacije indukovano pubertetskog estrusa se može poboljšati, ako se nazimice tretiraju kombinacijom eCG/hCG i $PHF_{2\alpha}$. Zbog toga, nazimice stare 165 do 195 dana, prvo treba tretirati injekcijom gonadotropina (PG600), a 18 dana kasnije injekcijom $PGF_{2\alpha}$ (tj. u kasnoj lutealnoj fazi indukovano estrusa). Sledeći estrus se može očekivati 3 do 4 dana posle injekcije prostaglandina. Ovulacija se događa 38 h do 42 h posle hCG. Sinhronizacija i vrednost ovulacije u ovom estrusu se mogu poboljšati injekcijom eCG i hCG, posle injekcije prostaglandina.

Tretman estrogenima. Estrus se može izazvati i tretmanom prepubertetskih nazimica tretmanom preparatima estrogena, ali je stepen estrusnog reagovanja vrlo varijabilan, ovulaciona vrednost je dosta niska, a spontanu estrusnu cikličnost uspostavlja vrlo mali broj tretiranih nazimica. Pri tome, ova varijabilnost ne zavisi od primenjene doze estrogenih preparata, niti od starosti tretiranih nazimica.

Tretman melatoninom. Ranija pojava pubertetskog estrusa se može izazvati i tretmanom nazimica preparatom melatonina, koji se može aplikovati per os ili u vidu subkutanih implantata. Dnevna konzumacija 3mg melatonina smanjuje starost tretiranih nazimica kod pojave puberteta za 30 dana, u odnosu na kontrolne nazimice (198 prema 228 dana). Rezultati do kojih su došli neki autori, pokazuju da konzumacija melatonina, svakog dana posle podne, prevenira sezonsko variranje starosti nazimica kod pojave puberteta.

Za praksu je izazivanje ranije i sinhronizovane pojave estrusa interesantno zbog toga što je moguće da se veliki broj nazimica uvede u pubertet istovremeno, a da se fertilno osemenjavanje izvede u sledećem ili drugom spontanom estrusu. Tada je fertilitet tretiranih nazimica znatno veći, a tretman nema negativnog uticaja na njihovu životnu reproduktivnu performansu.

Polno nezrele (prepubertetske) ženke ovaca i kozam, stare 8 do 10 meseci, koje su postigle oko 75% telesne mase odraslih ženki rase kojoj pripadaju, mogu se tretirati progestagenim intravaginalnim sunderima i injekcijom eCG, kako bi se indukovala sinhronizovana pojava pubertetskog estrusa i ovulacije. Ipak, prosečan broj rođene jagnjadi ili jaradi, po tretiranom

grlu, je manji od onog kod odraslih ovaca ili koza. To je posledica: (a) manjeg broja sjagnjenih mladih ženki, (b) manje ovulacione vrednosti i (c) povećane embrionalne smrtnosti.

Postavljanje sundera mora biti izvedeno vrlo pažljivo i stručno. Sunderi mostaju u vagini ženke 12 dana. Na dan vađenja sundera, svako grlo treba tretirati jednokratnom i/m injekcijom 300 do 400 ij eCG. Nikako se ova doza ne sme povećavati, kako se ne bi izazvao veći broj ovulacija, tj. dobili blizanci, koje mlada ženka nije sposobna da othrani. Bolji rezultati, u pogledu broja (%) ojagnjenih ženki i broja rođene jagnjadi ili jaradi, postižu se ako se parenje ili veštačko osemenjavanje ne izvrši u prvom (izazvanom) estrusu, posle vađenja sundera, nego ako se izvrši u sledećem (spontanom) estrusu. Tada su mlade ženke, ipak, bolje telesno razvijena, bolje su razvijeni i pripremljeni njihovi polni organi za održavanje gravidnosti. Za parenje treba obezbediti 7 do 8 ovnova ili jaraca na 10 tretiranih ženskih grla. Ovnovi ili jarčevi treba da su nešto manji (lakši), polno zreli i iskusni za parenje.

U praksi ne postije tehnološki razlozi za indukciju seinhronizovane pojave estrusa kod prepubertetskih omica.

Kontrola dnevnog fotoperioda

Godišnja sezona ima značajnog uticaja na starost ženki kod pojave puberteta. Ovaj fenomen se povezuje sa uticajem različitog trajanja sezonskog dnevnog fotoperioda, na ritam polnog sazrevanja. Tako se pokazalo da produženo trajanje dnevnog fotoperioda (18 h svetlo : 6 h tama) smanjuje starost nazimica kod pojave puberteta za oko 40 dana, u odnosu na nazimice odgajane pod obrnutim režimom trajanja svetlog i tamnog dela dana. Sa 210 dana starosti, pubertet postiže 61,4% nazimica u periodu proleće-leto i 45,6% nazimica u periodu jesen-zima. Zbog toga je potrebno da se priplodnim nazimicama, tokom peripubertetskog razvoja, obezbedi minimalno 12 h trajanja dnevnog fotoperioda. Sličan efekt kontrole dnevnog fotoperioda je uočen i kod junica, kao i kod prepubertetskih ovaca, koza i omica.

Ishrana

Ishrana u kasnom pubertetskom razvoju (oko 2 meseca pre fiziološke polne zrelosti), ima značajan uticaj na starost nazimica kod pojave prvog pubertetskog edstrusa. Pokazalo se, naime, da nazimice treba hraniti restriktivnim obrocima u periodu ranog predpuberteta (oko 150. do 180. dana starosti), a pojačanim obrocima *ad libidum* tokom perioda kasnog predpubertetskog razvoja (od 180. dana do pojave pubertetskog estrusa). Posle pojave ovog estrusa, nazimice treba i dalje hraniti *ad libidum*, s tim da se koncentracija energije u obrocima značajnije poveća oko 7 do 10 dana pred očekivanju narednog estrusa, koji se koristi za fertilno osemenjavanje, ako je nazimica postigla željenu starost, telesnu masu i debljinu leđne slanine. U suprotnom, treba sačekati sledeći (treći) pubertetski estrus i tada izvršiti osemenjavanje. Za to vreme, nazimice se i dalje, hrane *ad libidum*, sa povećanjem sadržaja energije u obroku, 7 do 10 dana pred pojavu trećeg estrusa.

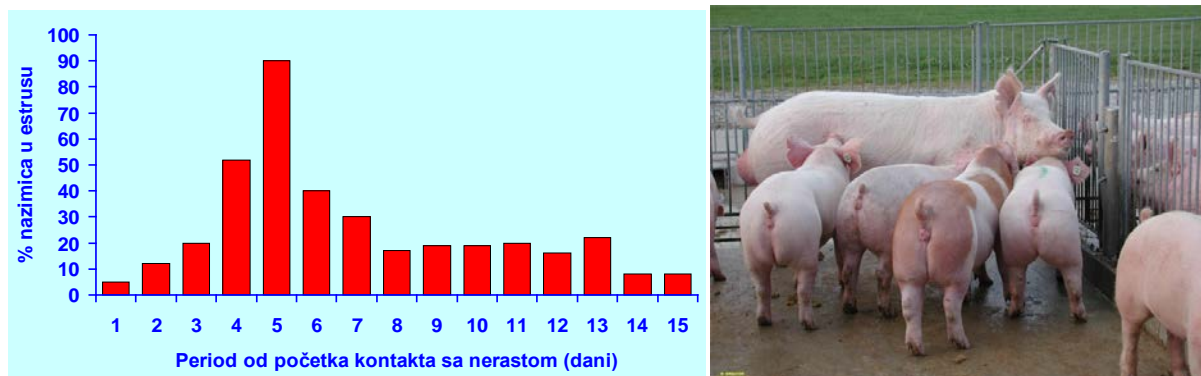
Sličan efekt ishrane na ritam polnog sazrevanja je ustanovljen i kod ženki drugih vrsta domaćih životinja. Neadekvatna ishrana, u pogledu male količine i/ili obroka lošeg kvaliteta, posebno u sadržaju proteina, vitamina i mineralnih materija, mogu uticati na značajno produženje procesa polnog sazrevanja, odnosno povećanje starosti ženki kod pojave puberteta.

Efekt mužjaka

Prisutvo polno zrelih mužjaka, u stadu prepubertetskih ženki, značajno sinhronizuje i ubrzava njihovo polno sazrevanje. Ovaj fenomen se pripisuje uticaju specifičnih mirisnih materija (feromona), na stimulaciju bržeg uspostavljanja fizioloških mehanizama na osovini hipotalamus-hipofiza-ovarium, što dovodi do bržeg polnog sazrevanja. Ove mirisne materije se nalaze u salivi (pljuvački) nerasta, urinu bika i pastuva, sierini (produktu lojnih žlezda) ovna i u urinu i sekretu specijalnih žlezda u osnovi rogova jarca.

Tako se pokazalo da se efekt nerasta najsnažnije ispoljava ako se nazimice stimulišu svakodnevnim punim kontaktom sa polno zrelim nerastom između 165 i 180 dana starosti, što zavisi od rase nazimica, odnosno kombinacije meleženja. Nazimice meleze treba početi stimulisati ranije, a nazimice čistih rasa kasnije za oko 15 do 20 dana. Kontak sa nerastom treba da traje 30 do 45 minuta dnevno. Pri tome, treba voditi računa o broju nazimica u grupi

(10 do 15). Prisustvo polno zrelih bikova, u grupi prepubertetskih junica, značajno ubrzava i sinhronizuje pojavu pubereteta.



Slika 12. Distribucija pojave pubertetskog estrusa u nazimica starih 140 – 170 dana na početku stimulacije sa nerastom (Foxcroft, 2002)

Međurasno ukrštanje

Postoje značajne međurasne razlike u prosečnoj starosti nazimica kod postizanja polne zrelosti. Opšte je prihvaćeno mišljenje da nazimice melezi postižu pubertet znatno ranije od nazimica čistih rasa, čijim su ukrštanjem nastale. U poređenju sa evropskim rasama, nazimice kineskih rasa polno sazrevaju skoro duplo brže. Tako, na primer, nazimice rase Meishan postižu pubertet sa prosečno 115 dana, a nazimice rase Large White sa 235 dana starosti. Sličan efekt međurasnog ukrštanja, na ubrzano polno sazrevanje je primećen i kod junica, i šilježica.

3.1.1.2. SINHRONIZACIJA ESTRUSA KOD POLNO ZRELIH ŽENKI

U tehnologiji intenzivne reprodukcije domaćih životinja, postoji nekoliko razloga za sinhronizaciju pojave estrusa i ovulacije kod polno zrelih (cikličnih) ženki: (1) istovremeno osemenjavanje, radi dobijanja većeg broja ženki u istoj fazi gravidnosti (tako se može izvršiti njihova istovremena prodaja, ili planirati optimalno iskorištavanje objekata za gravidne ženke, odnosno objekata za smeštaj ženki i legla posle porođaja i tokom laktacije), (2) sinhronizacija estrusa *post partum*, radi skraćivanja intervala partus-prvi, odnosno fertilni estrus i (3) sinhronizacija estrusa radi skraćivanja i kontrole trajanja sezone parenja.

Sinhronizaciju estrusa spontano asinhrono cikličnih ženki je, u principu, moguće izvršiti hormonskim metodama kontrole trajanja estrusnog ciklusa, pri čemu je cilj da se sve ženke, posle završetka tretmana, dovedu u istu fazu estrusnog ciklusa, tj. u poestrus. U tom slučaju, sve ženke će manifestovati estrus unutar 2 do 5 dana, koliko je potrebno vremena da prođe do pojave estrusa, odnosno ovulacije. Kako trajanje estrusnog ciklusa određuje trajanje lutealne faze, to je trajanje celog ciklusa moguće postići kontrolom trajanja ove faze ciklusa. S tim u vezi, sinhronizacija estrusa kod spontano asinhrono cikličnih (polno zrelih) ženki, moguće je izvesti primenom: (a) metode produžavanja (tretmanom progestagenim preparatima) i (b) metode skraćivanja folikularne faze (tretmanom luteolitičkim preparatima). U oba slučaja, po prestanku tretmana, ženke se sinhronizovano dovode u fazu proestrusa. Po završetku tretmana

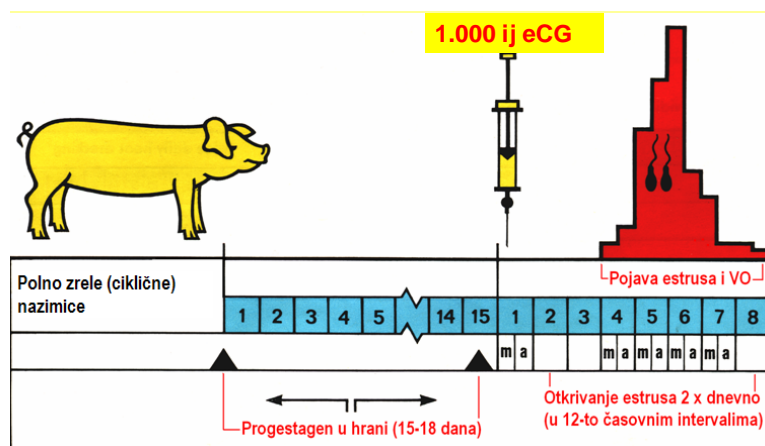
progestinima ili luteoliticima, može se izvršiti i tretman jednokratnom injekcijom gonadotropnih preparata (eCG + hCG), radi povećanja ovulacione vrednosti (ili izazivanja superovulacije) i radi bolje sinhronizacije pojave estrusa i ovulacije.

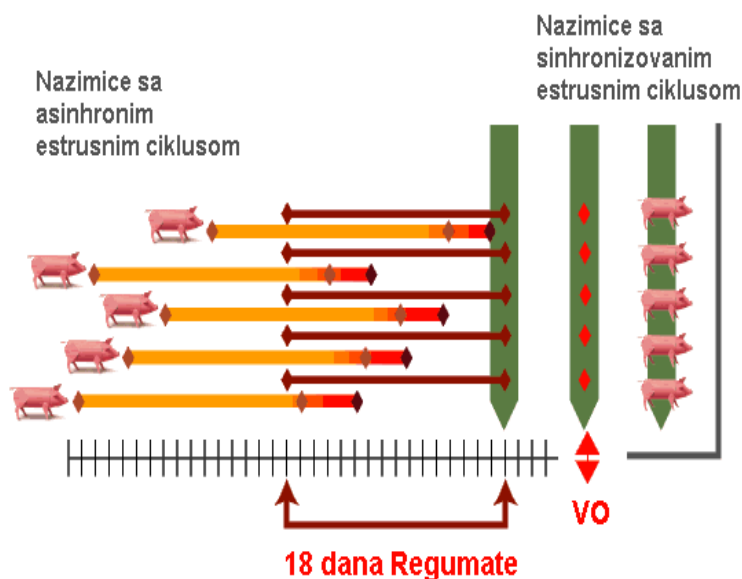
HORMONSKE METODE SINHRONIZACIJE ESTRUSA

Sinhronizaciju estrusa spontano asinhrono cikličnih ženki je, u principu, moguće izvršiti hormonskim metodama kontrole trajanja estrusnog ciklusa, pri čemu je cilj da se sve ženke, posle završetka tretmana, dovedu u istu fazu estrusnog ciklusa, tj. u poestrus. U tom slučaju, sve ženke će manifestovati estrus unutar 2 do 5 dana, koliko je potrebno vremena da prođe do pojave estrusa, odnosno ovulacije. Kako je trajanje estrusnog ciklusa određeno trajanjem lutealne faze, to je trajanje celog ciklusa moguće postići kontrolom trajanja ove faze ciklusa. S tim u vezi, sinhronizacija estrusa kod spontano asinhrono cikličnih (polno zrelih) ženki, moguće je izvesti primenom: (a) metode produžavanja (tretmanom progestagenim preparatima) i (b) metode skraćivanja folikularne faze (tretmanom luteolitičkim preparatima). U oba slučaja, po prestanku tretmana, ženke se sinhronizovano dovode u fazu proestrusa. Po završetku tretman progestinima ili luteoliticima, može se izvršiti i tretman jednokratnom injekcijom gonadotropnih preparata (eCG + hCG), radi povećanja ovulacione vrednosti (ili izazivanja superovulacije) i radi bolje sinhronizacije pojave estrusa i ovulacije. Produžavanje lutealne faze se izvodi tretmanom životinja preparatima progestagena, a skraćivanje tretmanom luteolitičkim, tj. prostaglandinskim (PGF_{2α}) preparatima. U oba slučaja, životinje se sinhronizovano dovode u proestrus, tj. na početak estrusnog ciklusa, a do manifestacije estrusa i ovulacije dolazi unutar 4 do 8 dana po prestanku tretmana.

Produžavanje lutealne faze. Danas se koristi dosta veliki broj sintetičkih progestagenih preparata, za sinhronizaciju estrusa metodom produžavanja lutealne faze. Pokazalo se da je aplikaciju ovih preparata, kod svinja, najpraktičnije izvesti *per os*, tj. mešanjem preparata u dnevne obroke. Tako se, na primer, koriste preparati Regumate i ICI 33.828. U poslednje vreme se koriste i subkutani implantati, kao što je, na primer, CRESTAR.

Osnovni princip ove metode se sastoji u tome da se spontano ciklične nazimice tretiraju progestogenim preparatom 15 do 18 dana, zavisno od starosti i telesne mase. Na kraju ovog tretmana, životinje se mogu tretirati i kombinacijom eCG+hCG, radi bolje sinhronizacije ovulacije i/ili povećanja ovulacione vrednosti.





Slika 13. Sinhronizacija estrus metodom produžavanja lutealne faze

Polno zrele nazimice (sa asinhronim estrusnim ciklusima), hrane se 15 do 18 dana progestagenim preparatom. Sledećeg dana, radi bolje sinhronizacije ovulacije i/ili povećanja ovulacione vrednosti, svaka nazimica dobija injekciju eCG. Sinhronizovani estrus se javlja unutar 4. do 7. dana posle prestanka tretmana.

Tabela 5. Pojava estrusa u nazimica posle tretmana progestagenim preparatom Regumate*

| Dnevna doza Regumate (mg) | Broj tretiranih nazimica | % nazimica u estrusu | Prosečno trajanje intervala od prekida tretmana do estrusa (dani) |
|---------------------------|--------------------------|----------------------|---|
| 10 | 65 | 78,0 | 6,2 |
| 15 | 60 | 97,0 | 5,6 |
| 20 | 24 | 100,0 | 4,6 |
| 40 | 24 | 100,0 | 6,1 |

*Allyltrenbolone, Altrenogest. Preparat je davan peroralno (u hrani), tokom 18 dana.

U jednom našem istraživanju, polno zrele ciklične nazimice (n=36) tretirali smo sa 20 mg preparata Regumate, umešanim u dnevni obrok, tokom 18 dana. Sledećeg dana po prestanku progestagenog tretmana, svaka nazimica je dobila injekciju 1.500 ij eCG (Sugonal, Veterinarski zavod Subotica), a 72 h kasnije injekciju 500 ij hCG (Chorulon, Intervet, Boxmer). Veštačko osemenjavanje je izvedeno prvi put 24 h, a drugi put 48 h posle injekcije hCG.

Unutar prvih 10 dana po prestanku tretmana, estrus je manifestovalo 91,4% nazimica, a prosečno trajanje intervala od prestanka tretmana do pojave estrusa je iznosilo 5,6 dana. Oprasilo se 82,3% osemenjenih nazimica, sa prosečno 9,7 živorodjene i 0,4 mrtvorodjene prasadi. Posle istog hormonskog tretmana, kod 48 tretiranih nazimica, ovulaciju smo izazvali kod 100% grla, pri čemu je ovulaciona vrednost iznosila 27,0 CL, prosečan broj neovuliranih folikula je bio 4,5, a folikularnih cista 1,7 po nazimici, što je ustanovljeno žrtvovanjem životinja 6. dana po prestanku tretmana. Broj živih embriona je bio veći (96,2%) kada je VO izvedeno 24 i 54h posle hCG, u odnosu na osemenjavanje izvedeno 18 h i 24 h posle hCG (78,3%).

Tretman nazimica kombinacijom eCG+hCG, po prestanku tretmana sa Regumate, povećava ovulacionu vrednost (26,2 CL) u odnosu na tretman samo sa Regumate (18,1 CL), ali ne povećava i broj embriona 30. dana gestacije.

I tretman drugim sintetičkim progestagenim preparatima, kao što je, na primer, metallibure (Suisynchron-P), takođe daje dobre rezultate sinhronizacije estrusa i fertiliteta tretiranih cikličnih nazimica.

Tabela 6. Estrusno reagovanje i fertilitet nazimica posle sinhronizacije estrusa preparatom Suisynchron-P*

| Starost nazimica (dani) | Broj tretiranih | % estričnih | % oprашenih | Živorodne prasadi/leglo (n) |
|-------------------------|-----------------|-------------|-------------|-----------------------------|
| 210 | 24 | 100,0 | 62,5 | 7,5 |
| 240 | 24 | 100,0 | 87,5 | 8,1 |
| 280 | 26 | 100,0 | 61,5 | 7,4 |

*5g Suisynchrona u obroku po nazimici, tokom 15 dana. 24h po prestanku tretmana, injekcije 1000 ij eCG, a 72 h kasnije injekcija 1ml Gn-Rh. VO dvokratno, na uobičajeni način, u otkrivenom estrusu.

Većina autora sugeriše da se najbolja sinhronizacija estrusa i ovulacije, kod polno zrelih cikličnih nazimica, postiže tretmanom preparatom Regumate, tokom 18 dana, a 24 h kasnije injekcijom 750 do 1.500 ij eCG, u kombinaciji sa injekcijom 500 ij hCG, datom 72 h posle eCG. Inseminaciju treba izvesti 18 h posle injekcije hCG, a reinseminaciju oko 24 h kasnije.

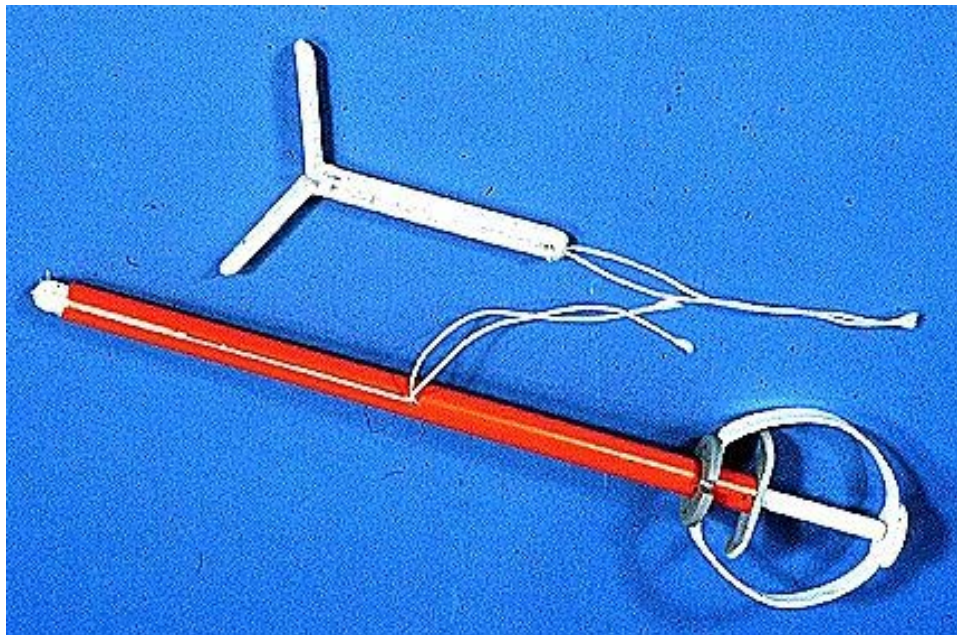
Metoda indukcije akcesornih žutih tela. Kontrola trajanja lutealne faze se može izvesti i metodom indukcije akcesornih žutih tela, primenom injekcije eCG, u bilo kojoj fazi estrusnog ciklusa svinje. U principu, sve tretirane životinje uspostavljaju novi (spontani) estrusni ciklus posle normalne regresije indukovanih akcesornih CL, 18 do 24 dana posle injekcije eCG. Međutim, ako se tretman sa eCG izvrši unutar prvih 6 dana spontanog estrusnog ciklusa, indukovana akcesorna CL će prerano regresirati, pa će ove životinje nastaviti svoj spontani estrusni ciklus, što će rezultirati slabom sinhronizacijom estrusa. Zbog toga ova metoda nije interesantna za praktičnu primenu, jer stepen sinhronizovanosti estrusa jako varira, kada se tretira veći broj nazimica ili krmača, za koje nije poznato u kojoj fazi spontanog ciklusa se nalaze na početku tretmana. Međutim, baš se ovaj metod često koristi u našoj proizvodnoj praksi, kada se tretiraju dugotrajno anestrične nazimice ili krmače posle zalučnja. U jednom našem istraživanju, tretirali smo polno zrele nazimice jednokratnom injekcijom 1000 ij eCG i to 5., 12. ili 18. dana spontanog estrusnog ciklusa. Preranu regresiju CL smo ustanovili kod 80%, 20% i 10% nazimica. Na osnovu navedenih činjenica, efikasna sinhronizacija estrusa metodom indukcije akcesornih CL, može se izvesti na sledeći način: Prvo se sve nazimice istovremeno tretiraju jednokratnom i/m injekcijom 500 do 750 ij eCG (indukcija akcesornih CL), a 7 dana kasnije injekcijom luteolitičkog preparata (da se izvrši regresija svih CL na jajnicima). Oko 24 h posle luteolitika, nazimice se mogu tretirati injekcijom eCG/hCG, radi bolje sinhronizacije estrusa i ovulacije.

Kod asinhrono, spontano cikličnih junica, može se izazvati veštačko produžavanje lutealne faze, primenom progesterona ili progestagenih sintetičkih supstanci.

Aplikacija ovih supstanci, može da se izvede na sledeće načine: (1) injekcijom u ulju, ili drugim medijumima, (2) subkutanom implantatima, (3) preparatima koji osobađaju progesteron u vagini, (4) intravaginalnim sunderima natopljenim progestagenom i (5) stavljanjem preparata u hranu.

Potkožni silikonski implantati, koji sadrže progesteron, u trajanju od 10 dana, kombinovani sa injekcijom estrogena, rezultiraju dobrom sinhronizacijom estrusa i zadovoljavajućim stepenom uspešne koncepcije. Primena CIDR-preparata, koji posle aplikacije, kontrolisano osobađaju progesteron tokom 10 dana, daje vrlo dobre rezultate sinhronizacije estrusa i fertiliteta osemenjenih krava. Primenom ovog preparata, u kombinaciji sa eCG i GnRh, moguće je izazvati preko 95% sinhronizovane pojave estrusa i oko 60%

konceptije, posle osemenjavanja krava u indukovanom estrusu. Posle prestanka tretmana sa progestagenim preparatima, većina krava manifestuje estrus unutar sledećih 24 h do 48 h.

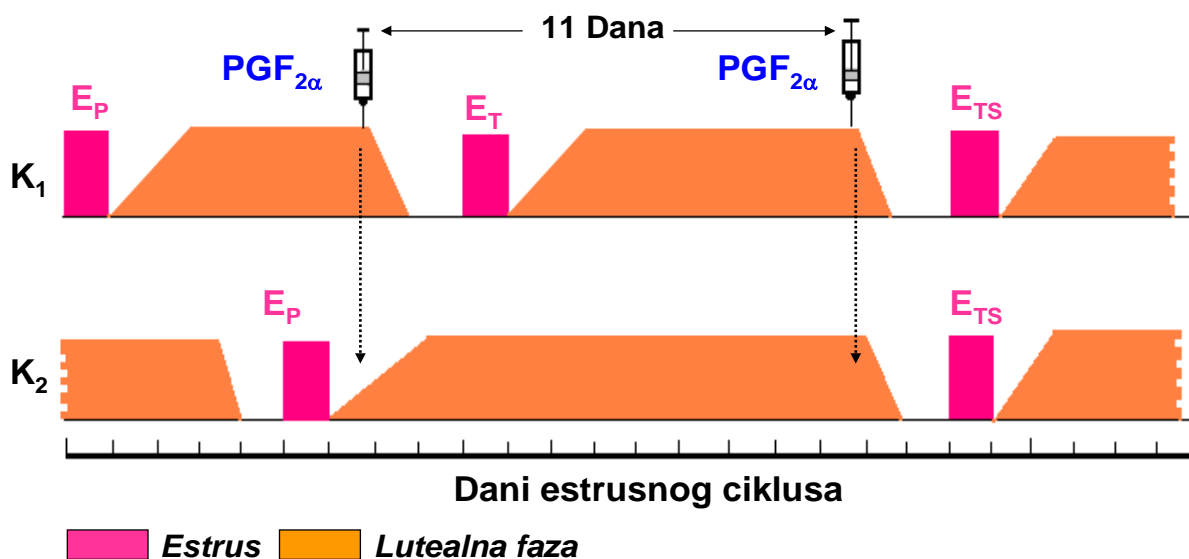


Slika 14. Intravaginalni progestageni (CIDR) pesari za kravu

Skraćivanje lutealne faze. Primena ove metode sinhronizacije estrusa u polno zrelih, cikličnih, nazimica nema većeg praktičnog značaja. Ovo proizilazi iz činjenice da CL svinje reaguje luteolizom na prostagladin $F_{2\alpha}$ (ili njegove sintetičke analoge), samo u vrlo kratkom periodu, između 12. i 18. dana estrusnog ciklusa. Zbog toga postoji velika verovatnoća da veliki broj životinja ne bude tretirano u aktivnoj fazi ciklusa, što rezultira vrlo slabim stepenom sinhronizacije estrusa. Zbog toga se prostaglandini mogu koristiti samo u kombinaciji sa gonadotropinima, kako je to opisano u metodi indukcije akcesornih CL. U tom slučaju dolazi do dosta dobre sinhronizacije estrusa (unutar 4 do 6 dana po prestanku tretmana), pri čemu se postiže i zadovoljavajuća vrednost fertiliteta nazimica osemenjenih u sinhronizovanom estrusu.

Estrogen, kod svinje, ima izuzetno luteotropno dejstvo, tj. podržava lutealnu funkciju. Tako, tretman estrogenim supstancama, tokom kasnije lutealne faze (10. do 14. dana), rezultira značajnim produžavanjem sekretorne aktivnosti cikličnih CL. Regresija ovako izazvanih perzistentnih CL se može izazvati injekcijom luteolitika i, tako, sinhronizovati estrus u tretiranih životinja. Perzistentna CL, izazvana delovanjem estrogenih mikotoksina (Zearalenon), takođe se mogu uspešno regresirati injekcijom luteolitičkih preparata.

Preparati nativnog $PGF_{2\alpha}$, ili nekoliko njegovih visokopotentnih sintetičkih analoga, ispoljavaju snažno luteolitičko dejstvo i mogu se efikasno koristiti za skraćivanje lutealne faze estrusnog ciklusa, radi sinhronizacije estrusa kod krava.



Slika 15. Skraćivanje lutealne faze kod krava, metodom 2 injekcije luteolitika

Posmatramo dve krave (K1 i K2), koje se nalaze u različitim fazama spontanog estrusnog ciklusa. Prva krava (K1) je, u momentu davanja prve injekcije $PGF_{2\alpha}$, bila na kraju lutealne faze spontanog E-ciklusa, a druga na početku lutealne faze spontanog E-ciklusa. Zbog toga je, kod K1, došlo do luteolize i ona je manifestovala estrus (E) za 2 dana posle prve injekcije prostaglandina, dok je druga nastavila svoj spontani ciklus, jer rani corpus luteum ne reaguje luteolizom. Kada je, nakon 11 dana, izvršen ponovni tretman injekcijom prostaglandina, obe krave su bile pri kraju lutealne faze, pa je, kod obe, izazvana luteoliza. Tako su obe krave sinhronizovano dovedene u proestrus, pa su, posle 2 dana, sinhronizovano ispoljile estrus i ovulaciju.

Međutim, ustanovljeno je da prostaglandinski preparati nemaju luteolitički efekt, ako se njihova aplikacija izvrši pre 5. ili posle 18. dana spontanog estrusnog ciklusa. Zbog toga, jedna injekcija ovog preparata, neće sinhronizovati estrus kod svih tretiranih krava (to su one, koje su bile u proestrusu, ili kasnoj lutealnoj fazi ciklusa). Zbog toga se ovaj tretman izvodi sa dve injekcije prostaglandina, date u razmaku od 11 dana. U tom slučaju, kod svih tretiranih životinja, dolazi do luteolize posle druge injekcije, pri čemu 80 do 90% životinja manifestuju znake estrusa i ovulaciju između 48 h i 96 h posle tretmana. Oko 60% grla manifestuje estrus 48 h do 72 h, a prestalih oko 20% do 30% između 72 h i 96 h posle prestanka tretmana. Kada se injekcija prostaglandina kombinuje sa malom dozom estradiol benzoata, datom 24 h posle prostaglandina, značajno se skraćuje interval od pojave estrusa do ovulacije.

U praksi se koriste različite kombinacije hormonskih supstanci, za sinhronizacije estrusa krava: (1) oralna aplikacija MGA i injekcija prostaglandina 17 dana kasnije, (2) kombinacija estradiola i progestagena, (3) kombinacija GnRh + prostaglandin + GnRh, (4) progestagen + GnRh + prostaglandin, (5) Progestagen + prostaglandin i (6) Prostaglandin + estradiol, 24h kasnije.

Postoje tri osnovna postupka za indukciju sinhronizovanog estrusa kod krava: (1) dve injekcije po 0,5 mg prostaglandina, u razmaku od 11 dana, pri čemu se osemenjavanje vrši 3 dana kasnije, (2) aplikacija progestagenog implantata i solucije Sinchromate B + injekcija 500 ij eCG i 0,5 mg prostaglandina, 9 dana kasnije. Implantat se vadi posle 11 dana. Veštačko

osemenjavanje se vrši dvokratno, ujutro i uveče, 12. dana i (3) aplikacija progestagenog implantata i solucije Sinchromate B. Implantat se vadi posle 11 dana, kada sve životinje dobijaju injekciju 500 ij eCG. Osemenjavanje je dvokratno, ujutro i uveče, 13. dana od početka programa sinhronizacije.

Jednostavna shema sinhronizacije ovulacije kod krava u laktaciji:

1. Krave se tretiraju sa 100 μg GnRh. Ovo rezultira ovulacijom i početkom novog ciklusa.
2. Injekcija 35 mg $\text{PGF}_{2\alpha}$, 7. dana posle injekcije GnRh. Izaziva se regresija formiranih CL.
3. Druga injekcija 100 μg GnRh, 48 h posle $\text{PGF}_{2\alpha}$. Izaziva se nova, sinhronizovana ovulacija.
4. Osemenjavanje se vrši 24 h posle druge injekcije GnRh.

Rezultati naučnih istraživanja, kao i praktična iskustva, pokazuju da na vrednost koncepcije, posle osemenjavanja u indukovanom estrusu, značajno utiču ishrana i opšta telesna kondicija tretiranih životinja. Ovaj autor je ustanovio da dodavanje 20MJ metaboličke energije dnevno, u obroke krava, ima za rezultat povećanje vrednosti telenja sa 50% na 69%, kod grla osemenjenih u veštački indukovanom estrusu.

Problemi u vezi sa farmakološkom kontrolom ciklusa

Efikasnost primene hormona u sinhronizaciji estrusa i ovulacije se meri: (a) stepenom sinhronizovanosti pojave estrusa i ovulacije (potrebno je, naime, da što veći broj (%) tretiranih grla manifestuje estrus unutar 48 do 72 sata posle tretmana i da se ovulacija dogodi oko 24 h posle pojave estrusa) i (b) vrednošću (%) postignute uspešne koncepcije, posle osemenjavanja u izazvanom estrusu.

Posle sinhronizacije izazvane *prostaglandinima*, javljaju se tri osnovna problema: (1) izostanak kompletne luteolize, (2) produžena folikularna faza posle luteolize i (3) izostanak ciklusa (aciklične krave).

Nekompletna luteoliza se javlja kod 10% ili više krava tretiranih *prostaglandinima*. To ima za posledicu potpuni izostanak pada koncentracije progesterona u telesnoj cirkulaciji, ili ova koncentracija padne na svega oko 50% od one pre injekcije. Ova pojava nije potpuno jasna, ali može biti posledica nekoliko faktora: (a) neka CL ne reaguju na prostaglandin, čak iako je injekcija data u pogodnoj fazi ciklusa, (b) tretman je izveden u suviše ranoj lutealnoj fazi (pre 5. dana), (c) nekorektno izvedena injekcija (data u masno tkivo, ili ligament) i (d) kratak period polu-života egzogenog prostaglandina u organizmu životinje.

Produžena folikularna faza, posle injekcije prostaglandina, javlja se kod oko 20% tretiranih krava. Naime, iako izgleda da je došlo do normalne luteolize, koncentracija progesterona ostaje visok, tokom neočekivano dugog perioda. To može biti povezano sa odlaganjem pojave estrusa i ovulacije. Fenomen prolongirane folikularne faze (preko 8 dana) se, međutim, javlja i kod oko 17% netretiranih krava, ali ne i kod junica. Zbog toga izgleda da estrusni ciklusi krava više variraju od onih kod junica.

Aciklične krave. Jajnici mogu odgovoriti luteolizom na injekciju prostaglandina, samo ako na njima postoji funkcionalno žuto telo. Zbog toga, krave koje nemaju uspostavljenu ovarijalnu aktivnost, ne odgovaraju na injekciju luteolitika. Proporcija krava, koje ne odgovore na tretman (aciklične krave), značajno varira između pojedinih zapata, kao i u zavisnosti od trajanja perioda post partum. Zapaženo je da se ovaj problem mnogo kod krava

tovnih rasa, u periodu dojenja. Iz tog razloga, mnogi preporučuju da se tretman prostaglandinom ne vrši pre 42. dana post partum.

Postoje dva osnovna uslova, pod kojima dolazi do asinhronone pojave estrusa kod krava, posle progestagenog tretmana: (1) neefikasnost luteolitičke supstance i (2) poremećaj održavanja visoke koncentracije progesterona u krvnom serumu.

Neefikasnost luteolitika. Estradiol se često koristi kao luteolitik, u kombinaciji sa progestagenskim tretmanom. Ako se, na primer, devetodnevni tretman sa progestagenom, bez tretmana sa luteolitikom, započne između 9. dana jednog i 1. dana narednog ciklusa, tada će takve životinje biti adekvatno sinhronizovane. To je zbog toga što se kraj tretmana sa procesom luteolize, ili progesteron blokira ovulaciju. Međutim, ako tretman započne između 2. i 8. dana ciklusa, žuto telo će preživeti period tretmana progestagenom.

Tabela 7. Uticaj devetodnevog tretmana sa progestagenom, bez luteolitičkog preparata, na sinhronizaciju estrusa

| Faza ciklusa kod implantacije progestagena | Da li je došlo do sinhronizacije? ¹ | Mehanizam |
|--|--|---|
| 9. do 17. dan | Da | Tretman se podudara sa trajanjem prirodnog CL |
| 18. do 1. dan | Da | Progesteron blokira ovulaciju |
| 2. do 8. dan | Ne | CL traje duže od tretmana |

¹ Za sinhronizaciju se smatra ako je krava ovulirala unutar 72 h posle vađenja implantata progestagena.

Izostanak održavanja visoke koncentracije progesterona u krvnom serumu. Pokazalo se da, u nekim uslovima, koncentracija progesterona može da padne pre prekida progestagenog tretmana. To može rezultirati pojavom estrusa i ovulacije pre vađenja progestagenog izvora. Ovo se posebno dešava kod intravaginalne metode aplikacije progestagenog preparata. Veruje se da je ovo posledica izmenjenog mehanizma resorpcije kroz vaginalnu sluzokožu, pod uticajem egzogenog progesterona.

Praktični rezultati sinhronizacije estrusa. Brojni ogledi, izvedeni u proizvodnim uslovima, pokazuju sledeće rezultate sinhronizacije estrusa: (1) Vrednost telenja, posle jednog osemenjavanja netretiranih krava, obično iznosi oko 50%. Slične vrednosti telenja se postižu i posle VO u sinhronizovanom estrusu, (2) Vrednost postignutog fertiliteta, posle VO u sinhronizovanom estrusu, obično su za 20% bolji kod junica, u odnosu na krave, (3) Jedno osemenjavanje daje za 10% do 15% niže vrednosti telenja, u odnosu na dva osemenjavanja, izvedena u fiksnim terminima posle sinhronizacije estrusa i (4) Bolji rezultati fertiliteta se postižu ako je VO izvedeno kada su znaci sinhronizovanog estrusa ustanovljeni, za razliku od fiksnog VO, bez obzira da li su znaci sinhronizovanog estrusa manifestovani ili ne. U tom slučaju, rezultati fertiliteta su čak i bolji posle VO u sinhronizovanom, u odnosu na VO u spontanom estrusu. Ovo se posebno ispoljava u onim zapaćtima, kod kojih je vrednost otkrivanja estrus inače

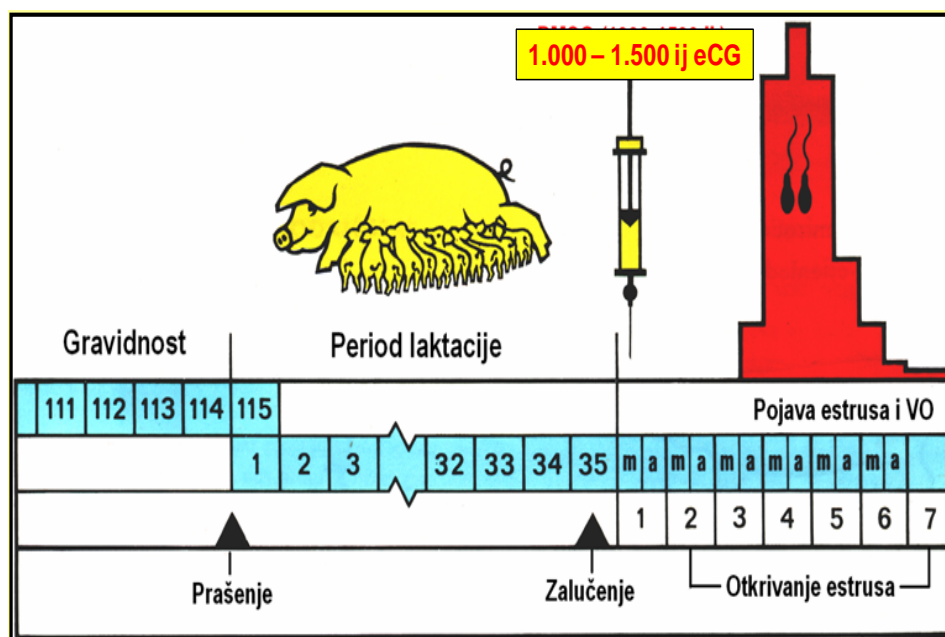
niska. Većina krava treba da manifestuje estrus unutar 10 dana po prestanku tretmana sinhronizacije.

Sinhronizacija estrusa se može postići i prisustvom bikova u stadu oteljenih krava ili tretmanom krava feromonima iz urina bika. Tako je, u jednom ogledu, izvršena oronazalna stimulacija krava feromonima iz urina bika, 18. dana post partum. Ustanovljeno je da prosečno trajanje intervala partus - estrus iznosi 24 dana kod stimulisanih i 32 dana kod kontrolnih krava. Interval od partusa do fertilnog estrusa je iznosio oko 81 dan kod

stimulisanih i 106 dana kod kontrolnih krava. I vrednost uspešne koncepcije je bila znatno viša (87,5%) kod krava stimulisanih feromonima, u odnosu na kontrolne krave (svega 37,5%).

Sinhronizacija estrusa kod zalučenih krmača

Tokom prvih 4 do 6 nedelja laktacije, kod krmača ne dolazi do uspostavljanja estrusnog ciklusa (tzv. laktacioni anestrus). Većina krmača manifestuje ovulatorni estrus unutar prve nedelje po zalučenju, mada ovaj interval značajno varira u zavisnosti od uticaja brojnih faktora. Danas je ustaljeno mišljenje da normalan interval od zalučenja do pojave estrusa iznosi maksimalno 7 dana, a da su dugotrajniji (prolongirani) intervali dobri predznaci smanjene reproduktivne efikasnosti.



Slika 16. Sinhronizacija estrusa zalučenih krmača, injekcijom eCG

Za praktičnu proizvodnju je veoma važno da interval zalučenje-estrus bude što kraći, jer osemenjavanje krmača u periodu do 7 dana posle zalučenja rezultira maksimalnom vrednošću (%) prašenja i veličinom legla u narednom reproduktivnom ciklusu. Zbog toga se, u industrijskim uslovima proizvodnje, često primenjuju različiti preparati egzogenih gonadotropina, sa ciljem da se (a) što veći broj krmača sinhronizovano uvede u estrus unutar prvih 7 dana po zalučenju, kao i da se (b) prevenira pojava dugotrajnih postlaktacijskih anestrusa. U tu svrhu se, najčešće, koriste preparati gonadotropina, koji se mogu kombinovati sa preparatima progestagena i prostaglandina.

Tabela 8. Estrusno reagovanje i fertilitet krmača tretiranih sa eCG ili PG600 posle zalučenja prvog legla

| | Preparat | | |
|---|------------------|--------------------|----------|
| | eCG ¹ | PG600 ² | Kontrola |
| Broj tretiranih krmača | 40 | 40 | 40 |
| Interval: injekcija hormona-estrus (dani) | 3,9 | 6,3 | 8,9 |
| U estrusu do 5. dana posle tretmana (%) | 77,5 | 67,5 | 42,5 |
| Fertilitet : | | | |
| - vrednost prašenja (%) | 88,8 | 76,9 | 63,3 |
| - živorođene prasadi u leglu (n) | 9,2 | 10,5 | 9,9 |

¹ Injekcija 1000 ij eCG, 24 h po zalučenju; ² Injekcija 400/200 ij eCG/hCG, 24 h po zalučenju.

Interval od pojave estrusa i ovulacije prosečno traje 44,8 h i ne razlikuje se između tretiranih i kontrolnih krmača. Međutim, interval od zalučenja do estrusa je obrnuto proporcionalan intervalu od estrusa do ovulacije. S obzirom na to da tretirane krmače manifestuju estrus brže posle zalučenja, a da je interval od estrusa do ovulacije duži, ove životinje treba osemenjavati kasnije posle početka estrusa, u odnosu na kontrolne. Ustanovljen je i znatno veći broj (90,3%) krmača koje su ovulirale posle tretmana, u odnosu na kontrolne krmače (81,5%). Tretman sa PG600 ne povećava vrednost prašenja i veličinu legla

Da bi 90% i više krmača manifestovalo estrus unutar prvih 7 dana po zalučenju, potrebno je da se izvrši tretman sa 750 ij do 1000ij eCG, 24 h posle zalučenja. Veće doze treba primenjivati kod teških krmača i posle laktacija kraćih od 5 nedelja. Radi bolje sinhronizacije ovulacije, što je bitno za određivanje optimalnog momenta inseminacije i postizanja maksimalnog fertiliteta osemenjenih krmača, injekcija eCG se kombinuje injekcijom 500 ij hCG, koja se daje između 50 h i 80 h posle eCG. Naime, ako laktacija traje 4 do 5 nedelja, hCG treba dati 72 h do 80 h posle eCG, a kod dužih laktacija injekciju hCG treba dati 56 h do 58 h posle eCG.

Preparati gonadotropina se mogu uspešno koristiti i kod rešavanja dugotrajnih postlaktacijskih anestrija, koje nisu retka pojava u proizvodnoj praksi. Dugotrajne postlaktacijske anestrije se uspešno rešavaju i primenom kombinacije progestagena (Regumate) i gonadotropina. Anestrične krmače se tretiraju oralnom aplikacijom preparata Regumate tokom 9 dana, a sledećeg dana sa 1.000 ij do 1.250 ij eCG. Primena preparata prostaglandina i estrogena ne daje dobre rezultate indukcije i sinhronizacije estrusa kod zalučenih krmača.

Tabela 9. Estrusno reagovanje i fertilitet anestričnih krmača tretiranih gonadotropnim preparatima 18 do 20 dana posle zalučenja

| | Preparat | |
|---------------------------------|------------------------|-------|
| | eCG/Gn-Rh ¹ | PG600 |
| Interval: tretman-estrus (dani) | 4,2 | 5,5 |
| Vrednost prašenja (%) | 66,7 | 71,5 |
| Živorodne prasadi u leglu (n) | 9,75 | 10,43 |

¹ 1.500 ij eCG 24 h po zalučenju + 0,15 mg Gn-Rh 70 h posle eCG.

Na osnovu prikazanih rezultata, u vezi sa primenom hormona za izazivanje sinhronizovane pojave estrusa kod polno zrelih nazimica i zalučenih krmača, može se zaključiti sledeće:

1. Uspešna sinhronizacija estrusa kod polno zrelih nazimica se postiže primenom kombinacije progestagenih i gonadotropnih preparata. Primena estrogenih i prostaglandinskih preparata nema praktičnog značaja u ovom pogledu.
2. Izazivanje sinhronizovane pojave estrusa kod zalučenih krmača, uspešno se izvodi injekcijom gonadotropnih preparata 24 h posle zalučenja. Dugotrajne postlaktacijske anestrije se uspešno rešavaju primenom preparata gonadotropina, ili njihovom kombinacijom sa progestagenim preparatima.

SINHRONIZACIJA ESTRUSA TOKOM SEZONE PARENJA OVACA I KOZA

Hormonski tretman

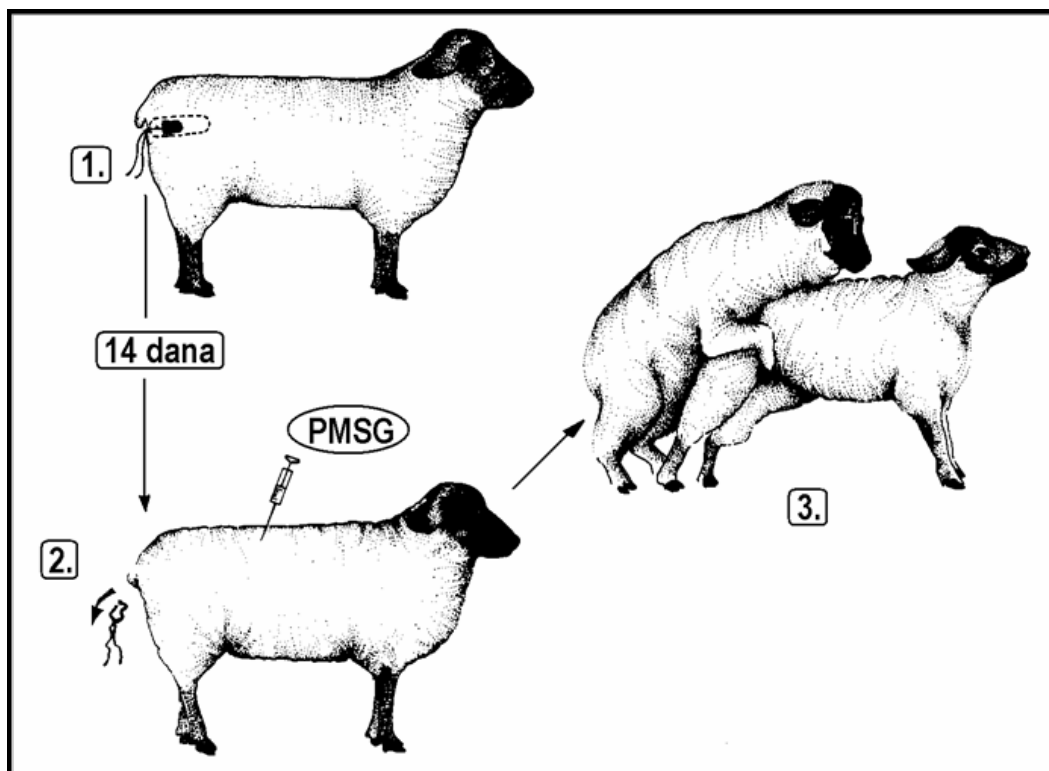
Primenom hormonskog tretmana ovaca, moguće je izazvati sinhronizovanu pojavu estrusa kod veće grupe ili kod svih ovaca u stadu, unutar samo nekoliko dana, što se ne dešava ako ovce estrusno cikliraju spontanom (prirodnim) ritmom. Sinhronizacijom estrusa i osemenjavanjem ovaca u ovom estrusu, značajno se skraćuje sezona parenja ovaca. Na taj način se sinhronizuje i skraćuje period jagnjenja ovaca, što ima više prednosti: dobija se veći broj jagnjadi ujednačene starosti, bolje se organizuje rad kod jagnjenja i td.

Sinhronizacija estrusa ovaca, tokom sezone parenja, može se izvršiti tretmanom sa hormonskim preparatima progestagena, prostaglandina ili melatonina.

Progestageni preparati. Najčešće se progestageni preparati nalaze impregnirani (natopljeni) u tzv. intravaginalne sunđere. Progestageni produžavaju lutealnu fazu spontanog estrusnog ciklusa, tako da se sve ovce, posle prestanka tretmana, sinhronizovano dovode u folikularnu fazu, odnosno u estrus za 2 do 5 dana. Ovi sunđeri se postavljaju u vaginu ovce, gde ostaju 14 dana. Na dan vađenja sunđera, ovce se mogu tretirati jednom injekcijom preparata gonadotropnog hormona iz seruma ždrebničkih kobila (eCG). Tretman ovim hormonom povećava broj ovuliranih jajnih ćelija i, time, broj rođene jagnjadi po ovci. Unutar 1 do 4 dana posle vađenja sunđera, preko 80% tretiranih ovaca ispoljava estrus i ovulaciju, pa se mogu uspešno osemeniti (prirodnim ili veštačkim putem). Većina ovaca ispoljava estrus 2. dana posle vađenja sunđera. U slučaju da se istovremeno tretira veliki broj ovaca, efikasnije je koristiti veštačko osemenjavanje ovaca, jer je potreban znatno manji broj ovnova, od onog koji bi bio potreban za prirodno osemenjavanje istog broja ovaca. Kada se koristi prirodno osemenjavanje, potrebno je obezbediti minimalno jednog ovna na svakih 10 tretiranih ovaca. Parenje treba vršiti metodom "iz ruke". Na taj način se postiže da svaka ovce bude uspešno parena, pri čemu se najefikasnije koriste ovnovi. Ovnove treba postiti u stado tretiranih ovaca 36 do 48h posle vađenja sunđera. Ako se ovnovi puste neposredno posle vađenja sunđera, oni će više puta pariti mali broj ovaca, koje uđu u estrus prvog dana po vađenju sunđera. Tako će oni značajno iscrpiti svoje rezerve sperme, pa neće biti sposobni da efikasno pare veliki broj ovaca, koji će istovremeno manifestovati estrus 2., 3. ili 4. dana po vađenju sunđera. Ovo će imati za posledicu da veći broj ovaca ne ostane sjagnjeno, pa će povadati.



Slika 17. Intravaginalni sunderi sa depozitorom (levo) i preparat eCG (desno)



Slika 18. Tretman intravaginalnim sunderima
1 - Postavljanje sundera, 2 - Vađenje sundera i 3- Parenje ovaca.

Kako se organizuje parenje sinhronizovanih ovaca? Najbolje je da se formiraju grupe od oko 50 tretiranih ovaca sa 5 ili više ovnova. Ova grupa se drži u zatvorenom (ograđenom) prostoru ili na otvorenoj površini, veličine oko jednog hektara. Važno je da se, za parenje,

koriste odrasli i iskusni ovnovi. Mladi ovnovi, koji još nisu parili ovce, često izbegavaju parenje, kada se nađu okruženi većim brojem razmrkanih ovaca, koje ispoljavaju želju da budu parene. Vrlo često se primećuje da mladi ovnovi, u opisanoj situaciji, frekventno vrte repom i beže od takve grupe ovaca. Važno je stalno nadgledanje parenja, kako bi se, na vreme, uočili ovnovi koji ne vrše skokove. Takvi ovnovi se odmah moraju zameniti drugim. Najefikasnije je parenje metodom "iz ruke". Ovo parenje se izvodi tako da se, u stado (grupu) sinhronizovanih ovaca stave ovnovi probači. Oni treba da budu podvezani sa keceljom ili vasektomisani – hirurški podvezani semevodima, tako da mogu da izvrše skok, ali ne i osemenjavanje zaskočenih ovaca. Ti ovnovi služe da markiraju (obeležu) razmrkane ovce. Takve ovce se odmah odvoje u posebnu grupu i ponovo se pare nakon 8-12h. Ovnu treba obezbediti 15-20 minuta odmora posle svakog skoka. Važno je pratiti da li ovan, prilikom skoka i ejakulira (izbaci spermu u vaginu ovce) ili samo zaskakuje. Znak ejakulacije je nekoliko brzih i snažnih trzaja karlicom, posle uvođenja penisa u vaginu.

Tabela 10. Kalendar programa sinhronizacije estrusa u sezoni parenja ovaca

| | |
|---|--|
| Postupci pre parenja Juni – Juli 24. Avgust 1. Septembar | Zalučivanje ovaca i ocena telesne kondicije. Priprema i testiranje ovnova. Ubacivanje ovnova probača u stado ovaca. |
| Postupci u toku sezone parenja 21. Septembar 5. Oktobar 7. Oktobar 9. Oktobar 21. Oktobar | Izdvajanje ovnova probača i postavljanje sundera u grupu razmrkanih (markiranih) ovaca. Vadenje sundera. Puštanje ovnova za parenje (1 ovana/10 ovaca). Izdvajanje ovnova, posle 2 dana parenja. Uvođenje ovnova probača, da markiraju ovce koje povadaju. |
| Vreme jagnjenja (mart) Oko 85% ovaca se jagnji posle 146 do 148 dana sjagnjenosti, iz osemenjavanja u sinhronizovanom estrusu. Oko 65% ovaca se ojagnji unutar 60 h od početka jagnjenja. Sve ovce se ojagnje unutar perioda od 5-6 dana. | |

U slučaju kada se sinhronizuje veliki broj ovaca u grupi, efikasnije je primeniti veštačko osemenjavanje ovaca. To se može izvršiti tako da se sve ovce, posle davanja injekcije eCG, osemene dva puta i to 48 h i 60 h posle injekcije eCG, bez prethodnog otkrivanja estrusa ovnovima probačima.

Primena prostaglandina. Sinhronizacija estrusa, tokom sezone parenja, može se izvesti i metodom skraćivanja lutealne faze spontanog estrusnog ciklusa. To se postiže tretmanom ovaca preparatima prirodnog prostaglandina $F_{2\alpha}$, ili preparatima sintetičkih analoga ovog prostaglandina. Ako nije poznato u kojoj fazi spontanog estrusnog ciklusa se nalaze ovce predviđene za sinhronizaciju, potrebno je izvršiti tretman sa dve injekcije prostaglandina, u razmaku od 9-10 dana. Sinhronizovana pojava estrusa se javlja 2 do 3 dana posle zadnje injekcije prostaglandina. Parenje ili veštačko osemenjavanje sinhronizovanih ovaca se vrši na opisan način.

Prostaglandini imaju štetno delovanje na gravidne žene i ljude koji pate od astme, pa njihova primena mora biti pod strogom kontrolom veterinara. Osim toga, tretman

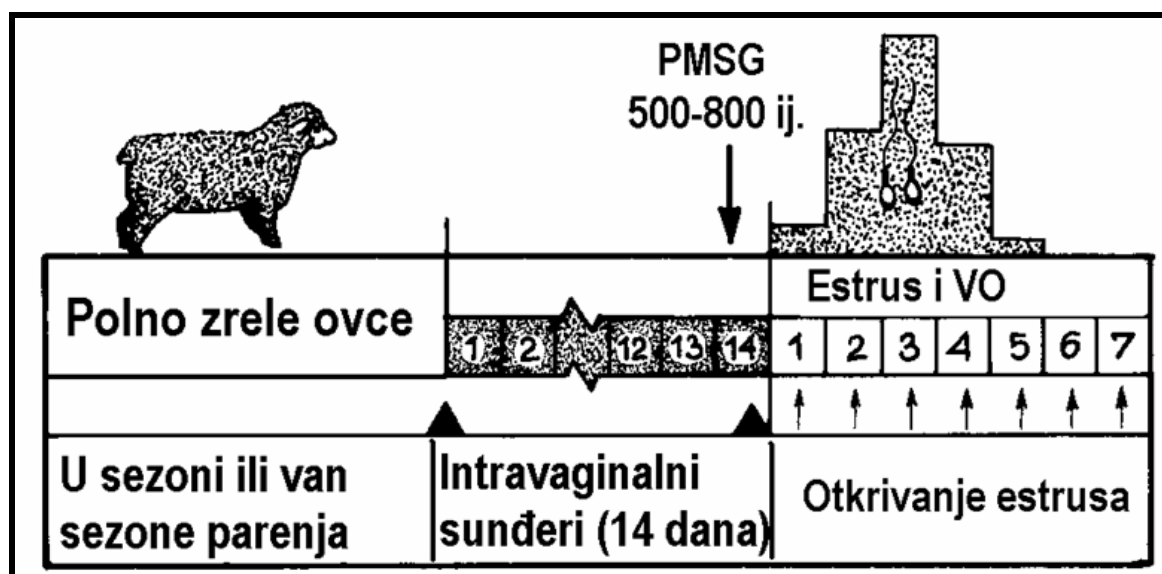
prostaglandinima je skuplji, daje slabije rezultate od intravaginalnih sundera i može se primenjivati samo u toku sezone parenja, kod spontano polno aktivnih (cikličnih) ovaca. Zbog ovih nedostataka, primena ove metode sinhronizacije estrusa, nije od većeg značaja za praksu.

Primena melatonina. Melatonin je hormon koga proizvodi jedna mala žlezda u mozgu, koja se zove pinealna žlezda. Melatonin se izlučuje tokom tamnog dela dana i stimulise polnu aktivnost ovce. Kako je ovaj deo dana vrlo kratak tokom proleća i leta, ne izlučuju se dovoljne količine melatonina, pa ovce nisu polno aktivne, tj. ne ispoljavaju estrusne cikluse i estrus.

Ako se ovce veštački tretiraju ovim hormonom, pomešanim u hrani, ili u vidu potkožnih implantata, ovca dobija više melatonina u krvi i počinje sa estrusnim ciklusima, kao da se nalazi u normalnoj sezoni parenja. Ipak, ovako izazvani estrusi nisu tako dobro sinhronizovani, kao što je to slučaj kod primene sundera.

IZAZIVANJE SINHRONIZOVANOG ESTRUSA IZVAN SEZONE PARENJA

Izvan sezone parenja, ovce nisu polno aktivne, odnosno ne uspostavljaju estrusne cikluse, ne ovuliraju i ne manifestuju znake estrusa. Zbog toga se, u ovoj sezoni, radi izazivanja ovulacije i estrusa, moraju upotrebiti gonadotropni hormoni (eCG), koji će stimulisati razvoj folikula na jajnicima i njihovu ovulaciju. S tim u vezi, svaka ovca se tretira jednom injekcijom 500 do 800 ij eCG. Ovulacija se, kod svih tretiranih ovaca, događa oko 72 h posle injekcije eCG. Važno je, međutim, znati da većina tretiranih ovaca (preko 80%) ne manifestuje spoljašnje znake estrusa, pa ostaju neosemenjene, jer ih ovnovi ne markiraju, odnosno ne pare. Međutim, ako se ovce prethodno tretiraju intravaginalnim sunderima, tokom 12 dana, a na dan vađenja sundera dobiju injekciju eCG, izazvana ovulacija je praćena manifestacijom spoljašnjih znakova estrusa. U slučaju da se koristi veštačko osemenjavanje, ovce se mogu osemeniti 48 h i 60 h posle injekcije eCG, bez obzira da li je ustanovljen estrus ili ne.



Slika 19. Hormonski tretman i veštačko osemenjavanje ovaca
Sunderi u vagini 12 ili 14 dana. Na dan vađenja sundera, tretman sa eCG. VO se izvodi 48h i 60h posle injekcije eCG.

Ako tretirane ovce, izvan sezone parenja, ne budu osemenjene ili ne ostanu sjagnjene, one neće uspostaviti sledeći spontani estrusni ciklus, sve do naredne, prirodne, sezone parenja.

Adekvatnim povećanjem doze eCG, kako u sezoni, tako i izvan sezone parenja, moguće je povećati broj ovuliranih jajnih ćelija i, time, povećati broj rođene jagnjadi po ovci u

rezultirajućem jagnjenju. Doza eCG, u principu, zavisi od telesne mase i opšte kondicije ovaca. Za povećane se smatraju doze od preko 500 ij eCG. Tretman sa eCG ima za rezultat znatno veći broj (%) rođenih blizanaca kod rasa ovaca koje, prirodno, imaju nizak procent bližnjenja, dok je povećanje procenta bližnjenja znatno manje ako se tretiraju rase ovaca koje, i prirodno, imaju veći procent bližnjenja. Procent bližnjenja odraslih ovaca rase Cigaja, posle pripusta u spontanom, prirodnom, estrusu, obično iznosi 20 do 30%, a povećava se na 43 do 50% posle osemenjavanja u estrusu izazvanom injekcijom 600 ij eCG. Značajno je istaći da je ovulaciona vrednost znatno veća posle tretmana Cigaja ovaca kombinacijom intravaginalni sunderi + eCG (2,0 ovulacija po tretiranoj ovci), u odnosu na ovce tretirane samo sa eCG (1,5).

Radanje većeg broja jagnjadi po ovci (dvojke, trojke i td.), zahteva primenu takve tehnologije odgoja, koja će obezbediti da se što veći broj ove jagnjadi održi u životu do određene klanične težine. Smrtnost jagnji u toku procesa jagnjenja i prvih dana posle jagnjenja se, u normalnim uslovima, kreće između 10 i 20% i predstavlja najznačajniji faktor smanjenja ukupnog broja proizvedene tovnje jagnjadi. Većina jagnjadi uginu tokom prvih nekoliko dana po rođenju, što je znatno većim delom posledica neadekvatne ishrane, slabog materinskog instinkta ili slabe vitalnosti jagnjadi, a manjim delom posledica infektivnih bolesti. Dobrom organizacijom rada i dodatnom prehranom jagnjadi, može se značajno povećati stepen preživljavanja jagnjadi. Zbog toga se preporučuje veštačko napajanje jagnjadi, odmah po rođenju, sa oko 60ml ovčijeg ili kravljeg kolostruma (mleko koje se izlučuje prvih nekoliko dana posle jagnjenja ili telenja) po jagnjetu. Radanje većeg broja jagnjadi, kod nekih ovaca, može izazvati stres, koji može značajno promeniti ponašanje majke. Ona može smanjiti dnevnu produkciju mleka i/ili odbiti da doji jedno ili oba jagnjeta.

Metoda skraćivanja dnevnog fotoperioda. Sinhronizovanu pojavu estrusa i ovulacije, moguće je izvesti i kontrolisanjem trajanja svetlosnog dela dana. Naime, kako je kratko trajanje svetlosnog dela dana (kratak fotoperiod), osnovni faktor stimulacije pokretanja ovarijalne aktivnosti kod ovaca, to je veštačkim skraćivanjem dana, tokom anestrlične sezone (kada su dani, prirodno, duži od noći), moguće izazvati manifestaciju estrusa i ovulacije, kod sezonski anestrličnih ovaca. Međutim, nedostatak ove metode je to što skraćivanje dnevne svetlosti treba da se izvodi postepeno i traje oko 50 do 60 dana. Za to vreme, ovce se moraju držati u štalskim uslovima, što poskupljuje proizvodnju jagnjadi.

Ubrzanje početka sezone parenja

Izazivanjem ranijeg i sinhronizovanog početka sezone parenja ovaca, moguće je dobiti jagnjad ujednačene starosti i telesne mase, ranije na početku tržišne sezone i, time, ostvariti veću tržišnu cenu jagnječeg mesa. Osim toga, na taj način se skraćuje jedna sezona parenja, čime se povećava broj jagnjenja po ovci, u toku perioda njenog reproduktivnog iskorištavanja.

Raniji početak sezone parenja ovaca se može postići primenom dve metode: **(a)** stimulacija anestrličnih ovaca prisustvom polno zrelih ovnova, tzv. "efekt ovna" i **(b)** pojačana ili tzv. "flašing" ishrana. Koliko ranije će početi sezona parenja, posle tretmana ovaca navedenim metodama, u odnosu na početak prirodne sezone parenja, primarno zavisi od rase

tretiranih ovaca. Naime, kod plemenitijih rasa ovaca, početak sezone parenja se može izazvati mnogo ranije, nego kod primitivnijih rasa.

Praktično efikasan sistem proizvodnje jagnjadi je sistem 3 jagnjenja za dve godine. Ovaj sistem podrazumeva da se vrši sinhronizovano parenje, tj. veštačkom osemenjavanjem ovaca izvan i tokom sezone parenja. S tim u vezi potrebno je vršiti indukciju sinronizovane pojeve vansezonskog estrusa, kao i sinhronizaciju estrusa u sezoni parenja ovaca.

Za kontrolu ovarijalne aktivnosti cikličnih i anestričnih kobilica, koriste se preparati progestagena, prostaglandina i gonadotropina (hCG i Gn-Rh).

Progestageni. Tretman sezonski anestričnih kobilica sintetičkim progestagenom Regumate, tokom 10 do 15 dana (30 mg dnevno u hrani), je efikasan praktičan metod ubrzanja početka sezone parenja. Naročito dobra sinhronizacija estrusa se postiže, ako se tretman izvede u toku prelaznog perioda između sezonskog anestrusa i početka sezone parenja.

Preparati progestagena se mogu uspešno koristiti i za sinhronizaciju estrusa kod cikličnih kobilica. Tako se može vršiti dugotrajni (18 dana) ili kratkotrajni (8 do 12 dana) peroralni tretman cikličnih kobilica preparatom Regumate. Na kraju kratkotrajnog tretmana, treba dati injekciju prostaglandina, da se izvrši regresija eventualnih cikličnih CL. Radi bolje sinhronizacije ovulacije, kobile se mogu tretirati injekcijom 2.500 ij. hCG, datom 5 do 7 dana posle injekcije prostaglandina. Estrus se javlja 2 do 5 dana posle prestanka progestagenog tretmana, a većina ovulacija se dogodi unutar 4 dana. Prihvatljiva vrednost fertiliteta se dobija kada se kobile pare svakog drugog dana estrusnog perioda.

Prostaglandini. Kao i kod drugih domaćih životinja, prirodni luteolitik je $\text{PGF}_{2\alpha}$, poreklom iz endometrijuma. Prostaglandin $\text{F}_{2\alpha}$ i njegovi sintetički analozi ispoljavaju snažno luteolitičko dejstvo kod kobilica, u znatno manjim dozama (10mg $\text{PGF}_{2\alpha}$) od onih koje se koriste kod krava. Kao i kod krave, corpus luteum kobile je osetljiv na luteolitičko delovanje kada je star 5 i više dana. Uspešna luteoliza se može izvesti i primenom sintetičkih analoga prostaglandina $\text{F}_{2\alpha}$.

Tretman preparatom $\text{PGF}_{2\alpha}$ može izazvati propratne efekte, kao što su jako znojenje i hiperomotilitet gastrointestinalnog trakta, koji su posledica delovanja ovog agensa na aktivnost glatke muskulature. Iako ove pojave brzo prolaze, njihovo postojanje favorizuje primenu nekih sintetičkih analoga (na primer Equimate), koji ne izazivaju tako jako izrežene navedene propratne efekte. Rezultati ždredbljenja, posle osemenjavanja u izazvanom, slični su onima koji se postižu osemenjavanjem u spontanom estrusu i kreću se oko 70%.

Primena hCG. Injekcija 1.500 ij do 3.000 ij. hCG, data u fazi predovulatornog folikula, izaziva ovulaciju 24 do 48h kasnije. Preparati hCG se mogu kombinovati sa prostaglandinskim tretmanom. Tako su, neki autori, tretirali kobile injekcijom 250 μg Equimate, a 6 ili 7 dana kasnije injekcijom 1.500 ij hCG, radi izazivanja sinhronizovane ovulacije kod grla koja su reagovala luteolizom. Posle 14 dana, kada se smatra da je većina kobilica između 4. i 15. dana diestrusa, data je druga injekcija Equimate, a 6 do 7 dana kasnije, data je i druga injekcija 1.500 ij hCG. Ovulacija se dogodila unutar 24 h posle injekcije hCG, kod većine tretiranih kobilica.

Primena Gn-Rh. Ovaj oslobađajući hormon hipotalamusa stimuliše izlučivanje hipofizarnog LH i, tako, izaziva ovulaciju. Reagovanje na egzogeni Gn-Rh zavisi od faze estrusnog ciklusa i nivoa estradiola u momentu tretmana. Ovulacija se događa unutar 48 h kod 96% kobilica, ako je tretman izveden u momentu kada dominantni estrusni folikul ima prečnik veći od 4 mm.

Indukcija estrusa i ovulacije kod kuje

Sinhronizacija estrusa u zdravih kuja se može postići tretmanom sa različitim hormonskim preparatima: estrogeni, luteinizirajući hormon (LH), folikulostimulirajući hormon (FSH), agonist gonadotropin-releasing hormona (GnRh) i prolaktin inhibitori. Za razliku od drugih domaćih vrsta, kod kuje nije moguće izazvati estrus metodom skraćivanja lutealne faze ciklusa (primenom luteolitika), zbog toga što, posle lutealne faze, nastaje faza anestrusa, vrlo dugog i varijabilnog trajanja.

Prolaktin je primarni luteotropni hormon u kuje. Zbog toga, tretman sa preparatima prolaktin-inhibitora, tokom lutealne faze ciklusa, dovodi do snažne i rapidne inhibicije podrške lutealne funkcije i, posledično, do rapidnog pada koncentracije progesterona u krvnom serumu. To dovodi do pojave estrusa. Pokazalo se da prolaktin ima ulogu i u definisanju trajanja interestrusnog intervala, verovatno tako što inhibira sekreciju hipofizarnih gonadotropina i/ili osetljivost jajnika na delovanje gonadotropina. S tim u vezi, kontinuiran tretman preparatima prolakti-inhibitora, tokom perioda anestrusa, izaziva brzu pojavu estrusa (obično unutar 30 dana od početka tretmana). Ako se sa tretmanom prekine, u monetu kada se uoče znaci početka proestrusa, osemenjavanje rezultira visokim procentom uspešne koncepcije, sličnom kao i posle osemenjavanja u normalnom (spontanom) estrusu. Danas se smatra da je tretman prolaktin-inhibitorima najefikasniji metod indukcije estrusa kod kuje.

Egzogeni estrogen značajno povećava koncentraciju endogenog LH, što ima za posledicu folikularni rast i sekreciju endogenog estrogena. Za sinhronizaciju estrusa primenom preparata estrogena, koriste se različiti protokoli. Obično se koriste niske doze, svakog dana, tokom perioda od 7 do 10 dana, posle čega se vrši tretman gonadotropinima. Jedan od protokola je sledeći: svakodnevni tretman dozom od 5mg diethylstilbestrola, sve do 2 dana posle pojave znakova proestrusa. Ako se ovi znaci ne pojave do 7. dana od početka tretmana, doza se povećava na 10mg, u maksimalnom trajanju od sledećih 7 dana. Posle pojave znakova proestrusa, kuja se tretira sa 5 mg LH (5. dana), 10 mg FSH 9. dana i 5 mg FSH 11. dana. Osemenjavanje u ovako izazvanom estrusu rezultira visokom vrednošću (%) uspešne koncepcije i normalnom veličinom legla. Tretman samo preparatom estrogena, daje vrlo slabu vrednost uspešne koncepcije, posle osemenjavanja u izazvanom estrusu. Međutim, postoje i značajni rizici od negativnih efekata tretmana estrogenim preparatima, kao što su: supresija funkcije koštane srži, promene na koži, uvećanje vimena i vulve, povećanje stimulativnog delovanja progesterona na uterus, što dovodi do cistične hiperplazije endometriuma i, verovatno, piometre.

Egzogeni gonadotropini, kao što su eCG (gonadotropin iz seruma ždrebne kobile) i humani horionski gonadotropin (hCG), se odavno koriste za indukciju estrusa kuje. Različiti protokoli, sa različitim dozama i različitim režimom tretmana, daju dosta različite rezultate uspeha indukcije estrusa, kao i postizaja uspešne koncepcije. Dugotrajan tretman visokim dozama ovih preparata, može izazvati hiperestrogenizam, inhibiciju implantacije i funkcije koštane srži, što dovodi i do smrti tretirane kuje. Tretman niskim dozama, u kratkom periodu (injekcija 20 ij/kg eCG, tokom 5 dana + jednokratna injekcija 500 ij hCG, 5. dana), dovodi do manifestacije estrusa, ali je postignuta vrednost uspešne koncepcije vrlo niska.

Egzogeni GnRh tretman, izveden pulsatilnom aplikacijom (svakih 90 minuta, tokom 6 do 12 dana), može imitirati prirodan efekt oslobađanja hipofizarnih gonadotropina i dovesti do pojave fertilnog estrusa i gravidnosti kod oko 60% do 70% tretiranih kuja. Međutim, ovaj metod pulsatile administracije GnRh je, za kliničku upotrebu, vrlo nepraktičan. Relativno dobri rezultati se dobijaju kada se GnRh daje posle tretmana sa progesteronom.

Kontracepcija kod kuje. Osnovni cilj kontracepcije je preveniranje gravidnosti, blokiranjem ili prevencijom manifestacije estrusa, ovulacije ili bilo koje druge reproduktivne funkcije, koja učestvuje u mehanizmu uspostavljanja gravidnosti (koncepcije).

Veći broj prirodnih ili sintetičkih steroidnih hormona, mogu uspešno blokirati estrus i ovulaciju, ili prevenirati manifestaciju promene u ponašanju kuje (interes za psa i manifestacija refleksa stajanja), čime se onemogućava izvođenje akta parenja. Međutim, nažalost, većina polnih steroida izaziva značajan broj neželjenih sekundarnih efekata kod kuje. Progesteron izaziva enormni rast endometriuma i uterusa, androgeni izazivaju maskulinizaciju kuje, kao i fetusa, ako se tretman izvede tokom gravidnosti. Estrogen izaziva ireverzibilnu aplastičnu anemiju kuje. Uslovi držanja i zahtevi vlasnika, sve više zahtevaju iznalaženje efikasnih preparata za kontracepciju, koji neće imati negativnih nuzefekata. U tom pogledu, prihvatljivim su se pokazali *megestrol acetat* (sintetički progestageni preparat) i *miboleron* (sintetički derivat androgena). Megestrol acetat se može davati *per os*. Uspešno inhibira prelazak kuje iz faze ranog proestrusa u proestrus i estrus. Ne treba ga davati kujama u estrusu, jer ovaj preparat ne inhibira manifestaciju specifičnih promena estrusnog ponašanja kuje, ali izaziva hiperplaziju endometriuma i pojačan rast uterusa. Miboleron efikasno blokira manifestaciju estrusa, kada se daje u dnevnim dozama (*per os*), kuji u anestrusu. Nisu se pokazali štetni efekti po zdravlje kuje, ni posle kontinuiranog tretmana tokom 2 godine.

Indukcija estrusa i ovulacije kod mačke

Jajnik mačke reaguje na egzogene gonadotropine (FSH, LH, eCG ili hCG) manifestacijom estrusa i ovulacije, kao i superovulacije, ako je tretman izveden u periodu anestrusa.

Tabela 11. Tretman za izazivanje superovulacije* kod anestrične mačke

| Vrsta gonadotropina | | Interval od tretmana do pojave estrusa |
|---|--|--|
| Da se izazove folikularni rast | Da se izazove superovulacija | |
| FSH (i/m injekcija, svakog dana, do pojave estrusa) | hCG (i/m injekcija 250 ij, 1. i 2. dana estrusa) | 4 do 5 dana posle prve injekcije FSH |
| eCG (jednokratna i/m injekcija 200 ij do 400 ij) | hCG (i/m injekcija, 2. dana estrusa) | 3 do 6 dana posle injekcije eCG. |

*Ako se ne želi izazvati superovulacije, tretman se izvodi znatno nižim dozama od navedenih u tabeli.

Kontracepcija mačke. Nema puno podataka o metodama i njihovom efikasnošću u kontracepciji mačaka.

Progestageni preparati (medroxyprogesteron acetat ili megestrol acetat), mogu uspešno izvršiti inhibiciju manifestacije estrusa u mačaka. Izgleda da, kod mačaka, postoji manji rizik pojave hiperplastične reakcije endometriuma i formiranja nodularnog tumora mlečne žlezde, posle tretmana sa progestagenim preparatima, u poređenju sa kujom. Ipak, kod primene ovog tretmana treba biti obazriv, posebno u slučaju kada postoji sumnja na postojanje infekcije uterusa.

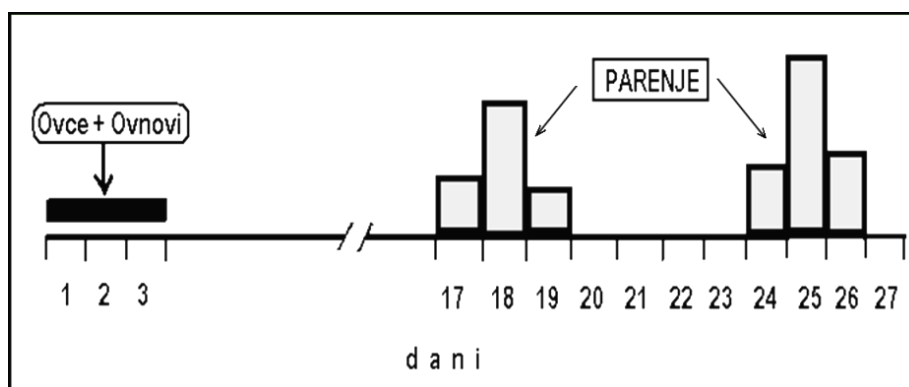
Androgeni sintetički preparat (Miboleron), za tretman *per os*, može izazvati inhibiciju pojave estrusa, u anestričnih mačaka.

Egzogeni estrogeni mogu prevenirati uspostavljanje neželjene gravidnosti, ako se tretman mačke izvrši oko 40h posle parenja. Izgleda da egzogeni estrogeni usporavaju transport ranih embriona kroz jajovod i, time, odlažu njihov prelazak u matericu. Estrogeni mogu biti toksični za mačku, pa se mora biti obazriv kod njihove primene.

Metoda “efekta ovna”

Dosta davno je ustanovljeno da prisustvo polno zrelih ovnova, u stadu sezonski anestričnih ovaca, vrlo efikasno stimuliše sinhronizovanu pojavu ovulacije i estrusa kod tako tretiranih ovaca. Ovo je posledica stimulativnog delovanja mirisnih materija, tzv. feromona, koje izlučuju lojne žlezde polno zrelih ovnova. Pri ovome je bitno da su tretirane ovce zaista sezonski anestrične, kao i da su, pre početka tretmana, bile izolovane od ovnova najmanje 30 do 45 dana. Veoma je važno da izolacija bude potpuna, tj. da ovce ne vide, ne čuju i, posebno, ne osele miris ovnova. U tom slučaju se, već posle manje od 30 minuta, u krvi ovaca nalaze hormoni koji stimulišu pokretanje aktivnosti jajnika, što dovodi do pojave ovulacije, nekoliko dana posle početka stimulacije prisustvom ovnova. Međutim, ovako izazvana ovulacija, ni kod jedne tretirane ovce, nije praćena ispoljavanjem spoljašnjih znakova estrusa, pa ovnovi ne markiraju ovce koje su, u stvari, uspostavile estrusni ciklus. Kod jednog broja ovaca će sledeća (druga) ovulacija biti praćena i pojavom spoljašnjih znakova estrusa, što se dogodi između 16. i 18. dana posle početka stimulacije ovnovima, dok se kod ostatka stimulisanih ovaca, spoljašnji znakovi estrusa javljaju tek kod treće ovulacije, odnosno između 24. i 26. dana posle početka stimulacije ovnovima.

Ako se želi da stimulisane ovce ispolje spoljašnje znake estrusa prilikom prve izazvane ovulacije, tj. unutar prvih 7 dana posle početka stimulacije prisustvom ovnova, potrebno je da se one, 14 dana pre početka stimulacije ovnovima, tretiraju progestagenim intravaginalnim sunderima. U tom slučaju se parenje ovaca izvrši unutar prvih 7 dana posle početka stimulacije ovnovima. Naravno, tada će, u toku jednog dana, biti više estričnih ovaca, pa je potrebno obezbediti veći broj ovnova, odnosno primeniti veštačko osemenjavanje.



Slika 20. Distribucija pojave estrusa, posle stimulacije ovaca prisustvom ovnova

Pojava estrusa i uspešno parenje ovaca se događa oko 18. i oko 25. dana posle početka stimulacije sezonski anestričnih ovaca, prisustvom polno zrelih ovnova.

Kod primene metode “efekta ovna” je važno znati sledeće:

1. Pojavu sinhronizovanog estrusa je moguće izazvati samo kod ovaca koje su zaista sezonski anestrične, tj. ne ispoljavaju estrusne cikluse.
2. Ovce će regovati sinhronizovanom pojavom estrusa, samo nekoliko nedelja pre početka njihove normalne sezone parenja.
3. U slučaju da, pre početka stimulacije ovnovima, nije izvršen tretman intravaginalnim sunderima, određen broj ovaca će manifestovati estrus oko 18. dana, a drugi oko 25. dana posle početka tretmana sa ovnovima.
4. Za izvođenje same stimulacije, dovoljno je obezbediti 3 ovna na 100 ovaca. Međutim, za parenje treba obezbediti 4 ili više ovnova za 100 ovaca.
5. Ovce moraju biti izolovane od ovnova najmanje 30 dana pre početka stimulacije.

Metoda pojačane ishrane

Ako se ovcama, 3 do 4 nedelje pre početka normlane sezone parenja, dnevni obrok pojača koncentrovanim (energetskim) hranivima, veliki broj grla će uspostaviti estrusni ciklus i ispoljiti estrus, znatno pre početka prirodne sezone parenja. Važno je da su ovce u dobroj telesnoj kondiciji i dobrog zdravstvenog stanja. Dovoljno je da se kabastom delu obroka (seno, silaža) doda 300 do 400 grama koncentrata (može i kukuruz ili žito).

Kontrola fotoperioda

Primena ove metode u veštačkoj kontroli estrusa i ovulacije kobilica se zasniva na dve osnovne činjenice fiziologije reprodukcije konja: (1) trajanje dnevnog fotoperioda je spoljašnji faktor, koji primarno određuje sezonski karakter polne aktivnosti kobile i (2) produžavanje dnevnog fotoperioda, u sezoni proleće – leto, stimuliše uspostavljanje ciklične ovarijalne aktivnosti, odnosno manifestaciju estrusnog ciklusa, estrusa i ovulacije kod kobilica, posle perioda sezonskog anestrusa (jesen – zima).

Sa ciljem da se izazove raniji početak sezone parenja, odnosno uspostavljanje ciklične ovarijalne aktivnosti sezonski anestričnih kobilica, obično se sa veštačkim produžavanjem svetlosnog dana (fotoperioda) počinje od sredine oktobra do sredine decembra (na severnoj hemisferi). Uspostavljanje indukovane ciklične ovarijalne aktivnosti se očekuje početkom februara, što je jedan do tri meseca ranije od početka spontane (prirodne) sezone parenja. Trajanje svetlosnog dela dana treba da iznosi 16h, a za osvetljavanje se može koristiti sijalica od 200W. Ustanovljene su rasne razlike u intenzitetu reagovanja kobilica na produžavanje dnevnog fotoperioda.



Slika 21. Sinhronizacija estrusa kobilica kontrolom dnevnog fotoperioda

Početak produžavanja dnevnog fotoperioda (na 16h dnevno), obično se vrši 1. decembra. Jačina svetla treba da omogući lako čitanje novina. Sinhronizovani estrus i ovulacija se, obično, događaju oko 90 dana posle početka osvetljavanja.

Tabela 12. Uticaj trajanja fotoperioda na ubrzanje početka sezone parenja

| | Dana do prve ovulacije | Kalendarski datum |
|-----------------------|------------------------|-------------------|
| Ogledna grupa (n=8) * | 33,4 | 2. februar |
| Kontrolna grupa (n=8) | 82,8 | 24. mart |

* Svetlo se automatski palilo sa zalaskom sunca i trajalo narednih 2,5h.

Kombinacija tretmana kobilu preparatima progestagena, na kraju perioda stimulacije produženim fotoperiodom, daju vrlo dobre rezultate sinhronizovane pojave estrusa i ovulacije, odnosno ubrzavaju početak sezone parenja. Tako su, neki autori, prvo stimulisali kobile produženim fotoperiodom, tokom 2 meseca, a zatim oralnom aplikacijom 10mg/dan progestagenog preparata altrenogest, tokom 10 dana. Veliki broj tretiranih kobilu je manifestovao ovulatorni estrus tokom februara meseca.

Primer protokola za tretman kobilu, radi sinhronizacije estrusa (Gordon, 1997):

1. Stimulacija kobilu produženim trajanjem dnevnog fotoperioda (16h svetla dnevno).
2. Zatim se kobile oralno tretiraju sa 20mg/dan altrenogest-a (progestageni preparat, „Equimate“), tokom 10 dana,
3. Zadnjeg dana tretmana sa altrenogest-om, kobile dobijaju jednokratnu i/m injekciju PGF_{2α} (luteolitički preparat).
4. 10 dana kasnije, kobile dobijaju jednokratnu i/m injekciju hCG (humani horionski gonadotropin, „Chorulon“).

Posle ovakvog tretmana, estrus se javlja 5 do 10 dana posle injekcije PGF_{2α}.

PROVERA ZNANJA

1. Navedite osnovne zootehnoške i veterinarsko-medicinske razloge za primenu veštačke kontrole estrusnog ciklusa i ovulacije kod ženki domaćih životinja.
2. Nabrojte metode veštačke kontrole estrusa i ovulacije.
3. Koji hormonski preparati se koriste za indukciju i sinhronizaciju estrusa?.
4. Opišite sinhronizaciju estrusa metodom skraćivanja lutealne faze.
5. Opišite sinhronizaciju estrusa metodom produžavanja lutealne faze.
6. Opišite hormonsku metodu indukcije pubertetskog estrusa kod nezimica.
7. Koja hormonska metoda je najefikasnije za sinhronizaciju estrusa kod polno zrelih (spontano cikličnih) nazimica? Opišite tretmanski postupak kod ove metode.
8. Opišite metodu hormonske indukcije sinronizovanog estrusa kod junica.
9. Opišite metodu hormonske indukcije estrusa kod krava posle telenja.
10. Opišite hormonsku i metodu kontrole fotoperioda, za indukciju sinhronizovanog estrusa kobilu.
11. Navedite osnovne principe metode "efekta mužjaka" u indukciji estrusa kod ženki.
12. Navedite osnovne principe metode "kontrole trajanja dnevnog fotoperioda" u indukciji estrusa kod ženki.
13. Opišite hormonske metode indukcije estrusa kod kuje i mačke.
14. Opišite hormonsku metodu kontracepcije kod kuje i mačke.

3.1.2. DIJAGNOZA RANE GRAVIDNOSTI

Za praktičnu proizvodnju je veoma važno da se, što ranije posle osemenjavanja, ustanovi da li je plotkinja gravidna ili nije. Posebno je važno što ranije ustanoviti da plotkinja nije gravidna, jer se, na taj način: (1) može pravovremeno doneti odluka o potrebnoj intervenciji kod plotkinje (adekvatno lečenje, indukcija novog estrusa i ponovno osemenjavanje, izlučivanje iz dalje reprodukcije), (2) smanjuje trajanje jednog reproduktivnog ciklusa (period između dva uzastopna partusa), odnosno smanjuje se broj neproduktivni hranidbenih dana (tzv. „prazni dani“ ili engl. „open days“) i (3) povećava ukupna reproduktivna efikasnost zapata, izražena brojem gravidnih plotkinja i brojem dobijenih potomaka po plotkinji godišnje.

Metode dijagnoze gravidnosti:

1. evidencija izostanka estrusa posle osemenjavanja,
2. manuelni rektalni pregled unutrašnjih polnih organa ženke,
3. ultrazvučni pregled unutrašnjih polnih organa ženke (transrektalni nili transabdominalni),
4. određivanje koncentracije polnih (progesteron, estrogen) u krvi ili mleku i gonadotropnih (eCG kod kobile) hormona,
5. laparoskopski pregled unutrašnjih polnih organa,
6. imunološki test na antigene gravidnosti i
7. dokazivanje prisustva specifičnih proteina vrlo rane gravidnosti u krvnom serumu.

Svaka od ovih metoda ima svojih prednosti i nedostataka, pre svega u: (a) preciznosti postavljanja pozitivne ili negativne dijagnoze gravidnosti, (b) jednostavnosti za praktičnu (kliničku) primenu, (c) potrebnog nivoa znanja i iskustva operatora i (d) ekonomičnosti primene (cene opreme, hemikalija, rada i td.).

3.1.2.1. DIJAGNOZA GRAVIDNOSTI KOD SVINJE

Postoje različite metode detekcije gravidnosti kod krmača, ali je za praksu važno da one budu efikasne, jeftine i jednostavne za praktičnu upotrebu.

Tradicionalna metoda detekcije negravidnih krmača je testiranje pojave estrusa, u periodu između 18. i 24. dana posle inseminacije. U ovom periodu, naime, estrus manifestuju (povađaju) krmače koje nisu uspostavile gravidnost (do 16. dana posle osemenjavanja). To su tzv. regularna povadanja. Međutim, zbog većeg broja razloga, krmače mogu da prekinu uspostavljenu (prepoznatu) gravidnost, zbog mortaliteta embriona, pase povadanje manifestuje 25 i više dana posle osemenjavanja (tzv. neregularna povadanja). Konačno, krmača može biti paragravidna (posle osemenjavanja ne manifestuje estrus, a nije gravidne). Stanje paragravidnosti je najštatnije, sa tehnološkog, veterinarskog i ekonomskog stanovišta. Zbog toga, iako se najčešće koristi u praksi, metoda dijagnoze gravidnosti na osnovu izostanka estrusa posle osemenjavanja, nije posebno efikasna u pogledu rane detekcije negravidnih krmača.

Znatno preciznije metode rane dijagnoze gravidnosti su: ultrazvučne tehnike, određivanje koncentracije estrogena i progesterona u krvnoj plazmi, mokraći i fecesu, određivanje

koncentracije $\text{PGF}_{2\alpha}$ u krvnoj plazmi, rektalna palpacija, vaginalna biopsija, imunološki test i pregled unutrašnjih polnih organa laparoskopijom. Najtačniji rezultati pozitivne i negativne dijagnoze rane gravidnosti, dobijaju se primenom ultrasonografije, rektalne palpacije i određivanjem koncentracije estron sulfata u krvnoj plazmi.

Metoda ultrasonografije u dijagnostici rane gravidnosti je počela da se primenjuje 60-ih godina dvadesetog veka. Prvo je korištena tzv. Doppler-tehnika, nešto kasnije A-model ultrasonografije i, konačno, B-model ultrazvučnog skeniranja.

Doppler tehnika se zasniva na odbijanju ultrazvuka od krvnih sudova uterusa krmače. Proticanje krvi kroz arterije uterusa se može detektovati i pre 21. dana gestacije, ali se precizniji rezultati dobijaju posle 30. dana.

A-model ultrazvučne tehnike je precizniji i jednostavniji za upotrebu. Ova metoda se zasniva na merenju razlika akustičnih karakteristika između tečnog sadržaja gravidnog uterusa (amnionska i alantoisna tečnost) i sadržaja drugih abdominalnih organa. Kako se maksimalan sadržaj ovih tečnosti u uterusu nalazi između 30. i 90. dana gestacije, to se i najpreciznija dijagnoza gravidnosti postavlja u ovom periodu gestacije. Relativna tačnost ove tehnike, ustanovljena na osnovu broja oprušenih od broja pregledanih krmača, između 31. i 35. dana posle inseminacije, iznosi 86%, pri čemu je broj pozitivnih i broj negativnih dijagnoza bio vrlo sličan.

B-model ultrasonografije je najprecizniji, jer daje i sliku ploda, materice i jajnika na monitoru. Tako se, ovim pregledom, mogu ustanoviti i eventualne anomalije unutrašnjih polnih organa i plodova. Kada se dijagnostika izvodi posle 21. dana gestacije, prosečna tačnost metode iznosi 93,6%, ali to dosta zavisi od obučenosti operatora da tačno tumači ehosonografsku sliku kod gravidnih ili negravidnih krmača. Greška u postavljanju negativne ili pozitivne dijagnoze gravidnosti je minimalna i iznosi manje od 5%.



Slika 22. Ultrazvučna dijagnoza gravidnosti krmače

Određivanje koncentracije polnih hormona. Odnos koncentracija estrogena i progesterona u krvnoj plazmi se menja tokom gestacije. Tako, koncentracija estrogena, na početku gravidnosti iznosi oko 10 ng/ml, zatim malo raste (do oko 20 ng/ml 30. dana), a onda opada i u periodu od 40. do 70. dana gestacije se zadržava na minimumu (5 do 8 ng/ml). Posle toga se zapaža permanentni rast koncentracije estrogena u krvnoj plazmi, koja dostiže maksimum (30 do 40 ng/ml) pred samo prašenje. Koncentracija progesterona u krvnoj plazmi je relativno konstantna i kreće se oko 20ng/ml. Važno je znati da minimalna koncentracija progesterona, potrebna za održavanje gravidnosti, iznosi oko 6 ng/ml krvne plazme, te da su graviditetna CL svinje jedini izvor progesterona tokom cele gestacije svinje.

Koncentracija estron sulfata u krvnoj plazmi se značajno povećava do 16. dana, dostiže maksimum 25. do 30. dana, a opada na vrlo nizak nivo oko 40. dana gestacije. Estron sulfat (vezani estrogen) je poreklom iz embriona, pa se određivanje njegove koncentracije može koristiti za dijagnozu gravidnosti. Ustanovljena je pozitivna korelacije između koncentracije estron sulfata i broja embriona. Na osnovu toga se može predvideti i broj prasadi u leglu kod prašenja, sa oko 73% tačnosti. Prisustvo estron sulfata se može odrediti i u fecesu i urinu, između 25. i 30. dana gestacije krmače.

Koncentracija progesterona u krvnoj plazmi se ne menja značajno tokom gestacije. Zbog toga, nalaz većih koncentracija (6ng/ml i više) progesterona u krvnoj plazmi, 18 i više dana posle osemenjavanja, ukazuje na uspostavljenju gravidnost kod 97% testiranih krmača. Međutim, nalaz nižih koncentracija progesterona je znatno manje siguran znak da krmača nije gravidna. Osim toga, krmače sa većim brojem lutealnih cista su, često, anestrčne ili ispoljavaju estrusne cikluse neregularnog trajanja, a u oba slučaja imaju visoke koncentracije progesterona u telesnoj cirkulacije. Zbog toga, takve krmače mogu biti pogrešno evidentirane kao gravidne. Takođe, krmače kod kojih nije došlo do mortaliteta embriona posle 14. dana gestacije, dosta dugo zadržavaju visoke koncentracije progesterona, kao posledica prolongirane sekretorne aktivnosti graviditetnih CL. I te krmače mogu biti evidentirane kao suprasne, na osnovu nalaza povišenih koncentracija progesterona u krvnom serumu. Inače, danas su razvijene vrlo jednostavne metode detekcije progesterona u krvnoj plazmi, fecesu i pljuvački krmača, i mogu se lako koristiti u praksi.

Određivanje koncentracije PGF_{2α}. Oko 13. do 14. dana posle ovulacije (odnosno osemenjavanja) ili 16. dana estrusnog ciklusa, u krvi se nalaze velike koncentracije PGF_{2α}, koji izaziva regresiju cikličnih CL. Kod gravidnih krmača do luteolize ne dolazi, jer u krvi nema ovog luteolitika (kao posledica inhibitornog delovanja estrogena iz preimplantacionih embriona). Nalazom niskih koncentracija PGF_{2α} u krvnoj plazmi krmača, oko 13. do 14. dana posle inseminacije, može se postaviti pozitivna dijagnoza gravidnosti sa 94% tačnosti, ali je stepen tačnosti postavljanja negativne dijagnoze mnogo niži i iznosi 63%.

Manuelna rektalna palpacijska. Ovu metodu dijagnoze gravidnosti je relativno teško izvesti kod krmača lakših od 150 kg, a krmača mora biti adekvatno imobilisana i/ili sedirana. Dijagnoza gravidnosti se uspostavlja na osnovu debljine i specifičnog treperenja arterije uterine medije, kao i na osnovu palpatornog određivanja pozicije, veličine i tonusa cerviksa uterusa. Kod većine negravidnih krmača se cerviks, uterus i bifurkacija rogova uterusa, a često i jajnici, mogu palpirati.

Vaginalna biopsija. Debljina epitela vagine se menja u pojedinim fazama ciklusa, odnosno periodima gestacije, kao posledica delovanja različitih odnosa koncentracija estrogena i progesterona. Tokom estrusa, vaginalni epitel je edematozan i hiperemičan, sa 5 do 20 slojeva epitelnih ćelija. U diestrusu i gravidnosti, broj epitelnih slojeva se redukuje na 3 do 4. Posle 22. dana gestacije, broj ovih slojeva iznosi 2 do 3. Uzorak vaginalnog epitela biopsijom se uzima posebnim instrumentom, oko 5 cm kaudalno od cerviksa i podvrgava se histološkom pregledu (brojanje slojeva epitelnih ćelija). Tačnost postavljene dijagnoze je visok i iznosi preko 90%, kada se test uradi između 30. i 90. dana gestacije.

Imunološki test. Neka istraživanja pokazuju da se u krvi krmča, tokom prvih nedelja gestacije, može naći antigen gravidnosti. Dokazivanjem ovog antigena se pozitivna dijagnoza gravidnosti postavlja sa oko 83%, a negativna sa oko 78% tačnosti.

Metod laparoskopije se, sve više, naročito u eksperimentalne svrhe, koristi za pregled unutrašnjih polnih organa gravidnih i negravidnih životinja, bez njihove veće traumatizacije.

Ovakvom direktnom vizuelizacijom polnih organa se može dijagnostikovati rana gravidnost, utvrditi ovulaciona vrednost, kao i utvrditi promene na unutrašnjim polnim organima.

3.1.2.2. DIJAGNOZA GRAVIDNOSTI KOD KRAVE

Reproduktivna efikasnost krave se meri brojem proizvedene teladi i količinom mleka u toku jedne godine. Zbog toga je veoma važno da međutelidbeni interval traje 365 dana. Produžavanje servis perioda zbog neuspelih inseminacija ili povadañja, značajno povećava cenu proizvodnje mleka i teladi. S tim u vezi, veoma je važno izvršiti što raniju dijagnozu gravidnosti, odnosno što ranije ustanoviti koje krave nisu uspešno koncipirale.

Osnovne metode dijagnoze gravidnosti kod krava: (1) Evidencija izostanka estrusa posle osemenjavanja, (2) Palpacija per rectum, (3) određivanje koncentracije specifičnih hormona u krvi ili mleku (progesteron, estrogen), (4) ultrazvučni pregled i (5) određivanje specifičnih proteina gravidnosti u krvi.

Izostanak estrusa posle osemenjavanja se tradicionalno koristi kao znak da je krava gravidna. To, međutim, nije pouzdana metoda dijagnoze gravidnosti, jer oko 7% krava manifestuje znake estrusa, iako su gravidne, dok estrus može biti tih ili neotkriven kod krave koja nije gravidna. Osemenjavanje krave, koja manifestuje estrus u gravidnosti, dovodi do mortaliteta embriona ili fetusa.

Manuelna palpacija per rectum je jedna od najstarijih kliničkih metoda dijagnoze gravidnosti, koja je relativno laka za izvođenje u praktičnim uslovima i daje dosta precizne rezultate. Ova metoda je korisna i zbog toga što se mogu ustanoviti razlozi zbog kojih životinja nije gravidna (na osnovu nalaza morfoloških promena na unutrašnjim polnim organima). Tačnost dijagnoze gravidnosti, primenom ove metode, prelazi i 95%, a zavisi od znaja i iskustva opeatora. Nedostatak ove metode je u tome što se precizna dijagnoza može ustanoviti u nešto kasnijoj fazi gestacije. Obično se rektalna palpacija izvodi između 35 i 65 dana posle prethodne inseminacije. Madaiskusni kliničari mogu dosta precizno dijagnostikovati gravidnost već između 30. i 35. dana gestacije.

Rektalna dijagnoza gravidnosti se zasniva na nalazu specifičnih promena na jajnicima, materici i krvnim sudovima materice, specifičnih za gravidnost. Naravno, osnovni nalaz je prisustvo ploda, njegovih ovojnica i tečnosti.

Na jajnicima se palpacijim može diferencijalno ustanoviti ciklično ili graviditetno žuto telo. Nalaz CL pune veličine, oko 3 nedelje posle inseminacije, sugeriše uspostavljenu gravidnost.

Elongacija uterusa, kao posledica izduživanja alantohoriona i prisustva plodovih voda, predstavlja znak gravidnosti. Rog uterusa, u kome se nalazi plod, je znatno duži i deblji od suprotnog roga, već između 30. i 35. dana gestacije. Zid uterusa se istanjuje i fluktuiru, zbog prisustva alantoične tečnosti. Disproporcija veličine rogova uterusa može biti i posledica nekih drugih stanja, kao što je nedovoljno završena involucija uterusa post partum, piometra (gnojna upala materice), veliki tumori i sl. Rogovi uterusa su slične veličine, ako se u svakom nalazi po jedan plod (blizanci). U tom slučaju se, međutim, nalazi po jedan CL graviditatis na oba jajnika.

Između 35. i 45. dana gestacije, moguće je palpirati alantohorionsku membranu. Kod placente tipa cotyledonaria, kakva se javlja kod krave, alantohorion se prihvata za endometrijum samo na mestima karunkula. Na ostalim mestima je slobodan. Tako se može osetiti tzv. efekat proklizavanja membrana, ako se prstima pipa alantohorion između pojedinih karunkula.

Napetost amnionske vreće se smanjuje posle 65. dana gestacije, pa se može direktno palpirati fetus. Posle trećeg meseca gestacije, gravidni rog se spušta u abdominalnu šupljinu, kao posledica razvoja konceptusa. Zbog toga, između 3. i 5. meseca, nije moguće palpirati ceo uterus. Međutim, ako se nalazi da uterus nije na svom mestu u karličnoj šupljini, a cerviks je zategnut preko simfize pelvis, na prednjem ulazu u karlicu, to je pozitivan znak gravidnosti, kao i palpacija placentoma. Placentomi se prvi put mogu identifikovati oko 70. do 80. dana gestacije. Tokom gestacije, placentomi rastu, iako je njihova veličina dosta varijabilana, zavisno od broja i lokacije u uterusu. Neki autori navode da njihov broj iznosi između 63 i 112.

Tabela 13. Pozitivni znaci gravidnosti kod rektalne palpacije krave

| Stadijum gravidnosti | Proklizavanje membrana | Amnionska vreća | Fetus | Placentomi | Fremitus A.uterine mediae | |
|----------------------|------------------------|-----------------|-------|------------|---------------------------|---------------------|
| | | | | | Ipsilateralni rog | Kontralateralni rog |
| 30 dana | ± | + | | | | |
| 45 dana | + | + | | | | |
| 60 dana | + | + | | | | |
| 75 dana | + | + | | + | | |
| 90 dana | + | | + | + | | |
| 105 dana | | | + | + | + | |
| 4 meseca | | | + | + | + | |
| 5 meseci | | | + | + | + | + |
| 6 meseci | | | | + | + | + |
| 7 meseci | | | + | + | + | + |

Tabela 14. Volumne plodove tečnosti u ranoj graviditetu krave

| Meseci gravidnosti | Volumen tečnosti |
|--------------------|------------------|
| Kraj 1. meseca | 20 do 25 ml |
| 2. mesec | 300 do 700 ml |
| 3. mesec | 1.000 ml |

Postoji određen stepen rizika kod rektalne palpacije. Ako se palpacija vrši ranije, oko 35. dana gestacije, oko 5% palpiranih konceptusa ne nastavlja dalji razvoj. Obično se nalazi da takvi fetusi uginjavaju između 35. i 70. dana gestacije. Smatra se da je rektalna palpacija sigurna, ako se izvodi posle 45. dana i ako je izvodi pažljiv i iskusan dijagnostičar.

Dijagnoza rane (1 do 3 meseca) gravidnosti manuelnom palpacijom *per rectum*, bazira se na sledećim nalazima: (1) asimetrija rogova uterusa, (2) smanjen tonus gravidnog roga, (3) fluktuirajući sadržaj u gravidnom rogu (kasnije u oba roga), (4) palpatorni corpus luteum na jajniku sa strane gravidnog roga, (5) proklizavanje fetalnih membrana i (6) palpacija amnionske vreće.

Dijagnoza kasnog (> 3 meseca) graviditeta manuelnom palpacijom *per rectum*, bazira se na sledećim nalazima: (1) cervix lociran ispred cranijalnog otvora karlice, a uterus nije moguće povući iz abdominalne u karličnu šupljinu, (2) uterus je opušten (mlitav), (3)

palpatorni su placentomi i, ponekad, fetus i (4) povećava se prečnik a. uterine medie i oseća se fremitus (treperenje).

Tabela 15. Velična placentoma u pojedinim fazama graviditeta krave

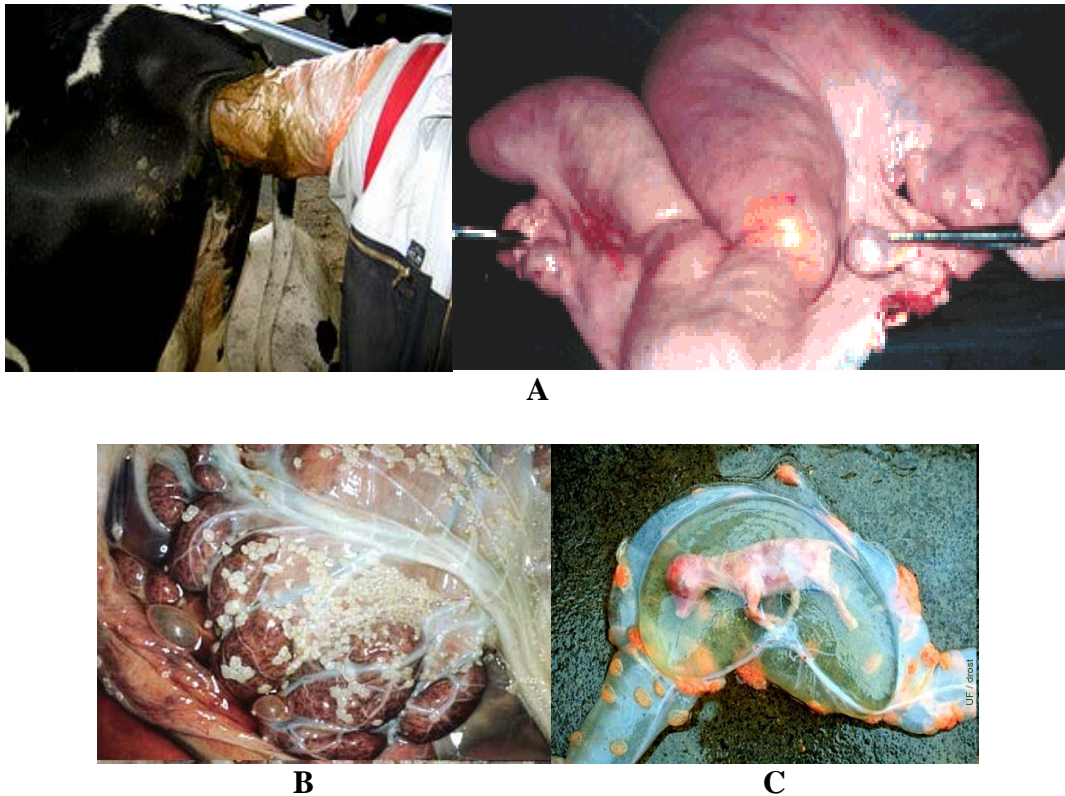
| Dan gravidnosti | Veličina |
|-----------------|--------------------|
| 75 | zrno graška |
| 100 | zrno većeg pasulja |
| 115 | manja trešnja |
| 125 | veća trešnja |
| 150 | manja šljiva |
| 180 | orah |
| 210 | manja jabuka |
| 240 | manja pesnica |

Tabela 16. Velična fetusa u pojedinim fazama graviditeta krave

| Stadijum gravidnosti | Veličina fetusa |
|----------------------|-----------------|
| Kraj 1. meseca | 2 cm |
| 2 meseca | miš |
| 3 meseca | pacov |
| 4 meseca | mala mačka |
| 5 meseci | velika mačka |
| 6 meseci | srednji pas |

Tabela 17. Pozicija i prečnik roga uterusa i palpatorne strukture u prvih 5 meseci gestacije krave

| Dani gestacije | Pozicija uterusa | Prečnik gravidnog roga | Palpatorne strukture |
|----------------|-------------------|------------------------|--|
| 35-40 | Dno karlice | Blago uvećan | Asimetrija uterusa /palpira se fetus |
| 45-50 | Dno karlice | 5.0 - 6.5 cm | Asimetrija uterusa /palpira se fetus |
| 60 | Karlica / abdomen | 6.5 - 7.0 cm | Proklizavanje fetalnih membrana |
| 90 | Abdomen | 8.0 - 10.0 cm | Mali placentomi/fetus (10-15 cm dugačak) |
| 120 | Abdomen | 12 cm | Placentomi/fetus (25-30 cm dugačak)/treperenje a. uterine (fremitis) |
| 150 | Abdomen | 18 cm | Placentomi/fetus (35-40 cm dugačak)/fremitis |



Slika 24. Osnovni nalazi gravidnosti krave kod rektalnog pregleda
 A – Uvećanje gravidnog roga uterusa; B – Placentomi i C – Fetus.

Česti razlozi pogrešne dijagnoze graviditeta per rectum: (1) nemogućnost reponiranja uterusa iz abdomena, (2) abnormalan sadržaj u uterusu (pyometra ili mucometra), (3) netačan datum osemenjavanja i (4) nedovoljno znanje i iskustvo pregledača.

Merenje koncentracije hormona, specifičnih za gravidnost, u telesnim tečnostima, kao što su mleko i krv, predstavljaju praktičnu i zadovoljavajuće preciznu metodu dijagnoze gravidnosti. Ova metoda se može i kombinovati sa metodom rektalne palpacije, ili ultrasonografije.

Progesteron sintetiše CL tokom gestacije. Maksimalnu koncentraciju u krvi dostiže oko 10. dana posle ovulacije, koja se dalje održava kod gravidnih krava, a naglo opada 17. dana ciklusa kod negravidnih. S tim u vezi, koncentracija progesterona u krvi i mleku ostaje visoka između 21. i 24. dana posle ovulacije kod gravidnih, dok je, u ovom periodu, na bazalnom nivou kod negravidnih krava. Zbog toga, dokazivanje visokog nivoa progesterona u uzorcima krvi ili mleka, uzetim u ovom periodu, ukazuju na uspostavljenu gravidnost. Razvoj brzih i visoko osetljivih procedura, kao što su RIA (radioimmunoassay) i ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), omogućavaju praktičnu upotrebu ovog testa.

Prisustvo visoke koncentracije progesterona u krvi ili mleku, posle 18. dana od osemenjavanja je rana indikacija gravidnosti. Optimalno je da se test krvne plazme ili mleka uradi 24. dana posle inseminacije. Time se eliminiše eventualno prolongiran estrusni ciklus. Tačnost pozitivne dijagnoze, primenom ove metode je preko 90%, dok je tačnost negativne dijagnoze samo oko 40%. Što znači, da primenom samo ovog testa, veliki broj negravidnih krava mogu biti proglašene kao gravidne. Najčešći razlozi za greške kod ove metode su: (a) piometra, zbog prolongirane funkcionalne aktivnosti žutog tela, (b) kratki estrusni ciklusi, (c)

lutelane ciste i (d) nekorektna manipulacija su uzorcima i nepravilno izvedena procedura analize krvi ili mleka.

Estrogen sintetiše goveđi konceptus, pa koncentracija estron sulfata raste u krvi majke od 70. dana gestacije. Ustanovljeno je da nalaz estron sulfata u mleku, oko 15 nedelje gestacije, daje 100% tačnu dijagnozu gravidnosti. Ovaj test se može kombinovati sa testom koncentracije progesterona, izvedenim 21. do 24. dana gestacije.

Proteinske komponente u krvi. Ustanovljeno je da se, u krvnom serumu gravidne krave nalaze visoke koncentracije proteinskih komponenti, specifičnih za gravidnost.

Faktor rane gravidnosti (EPF – early pregnancy factor) je proteinski kompleks, koji se nalazi u krvi gravidnih krava. Ustanovljeno je da se ovaj faktor nalazi u krvi majke ubrzo posle koncepcije i vrlo brzo nestaje, u slučaju uginuća embriona. Ovaj faktor se detektuje imunološkom tehnikom, tzv. test inhibicije rosete (rosette inhibition test-RIT). Vrednost RIT je vrlo niska na dan VO, da raste do 3. dana i zadržava visoku koncentraciju sve do smrti embriona, posle čega opada na vrlo nizak nivo, unutar narednih 7 dana. Zbog dosta visokog stepena ranog embrionalnog mortaliteta, dijagnozu treba potvrditi kasnije (rektalnim ili ultrazvučnim pregledom).

Specifičan protein gravidnosti (PSPB – pregnancy-specific protein B) je glikoprotein, koga sintetišu ćelije trofektoderma. Ovaj protein se može detektovati RIA metodom, u krvnom serumu krave, oko 30. dana gestacije. Još jedan protein, specifičan za gravidnost (PSP60), sintetišu kotiledoni krave, oko 168. dana gestacije. I on se može detektovati u krvnom serumu i poslužiti za dijagnozu gravidnosti.

Ultrazvučna dijagnostika graviditeta se sve više koristi u dijagnostici rane gravidnosti. Visoko razvijena ultrazvučna tehnologija omogućava vizuelizaciju goveđih embriona starih svega 9 do 10 dana. Međutim, u praksi se dobri rezultati dijagnoze dobijaju pregledom posle 18. dana gestacije. Tako se amnionska tečnost detektuje 24. dana, a fetus i fetalne membrane 28. dana gestacije, pri čemu tačnost dijagnoze iznosi preko 95%.

Tabela 18. Dužina fetusa na ultrazvučnom prikazu

| Starost fetusa (nedelje) | Dužina fetusa od čela do korena repa, mm | | |
|-----------------------------|--|---------|--------|
| | Minimum | Maximum | Prosek |
| 4 | 6 | 11 | 8.9 |
| 5 | 8 | 19 | 12.8 |
| 6 | 16 | 26 | 20.2 |
| 7 | 23 | 36 | 27.7 |
| 8 | 36 | 52 | 45.5 |
| 9 | 39 | 71 | 62.4 |
| 10 | 61 | 101 | 87.4 |
| 11 | 95 | 118 | 106.5 |
| 12 | 107 | 137 | 121.8 |

Tabela 19. Poređenje preciznosti raznih metoda dijagnoze graviditeta krave

| Metoda | Rani test | Tačnost pozitivne dijagnoze | Tačnost negativne dijagnoze |
|--|-----------|-----------------------------|-----------------------------|
| Rektalna palpacija | + | +++ | ++++ |
| Transrektalna ultrasonografija | ++ | ++++ | ++++ |
| Progesteron u mleku | +++ | ++ | +++ |
| Specifični protein (faktor) rane gravidnosti | ++++ | + | + |



Slika 25. Ultrazvučna metoda dijagnoze gravidnosti krave
 Transabdominalnom sondom (*levo*) i transrektalnom sondom (*desno*)



Slika 26. Ultrazvučni aparat i ultrasonografski prikaz gravidnosti krave 35. dana

3.1.2.3. DIJAGNOZA GRAVIDNOSTI KOD OVCE I KOZE

Kod ovaca i koza, zbog specifičnosti telesne građe (male životinje), dijagnoza gravidnosti se vrši na osnovu spoljašnjih znakova gravidnosti i na osnovu izostanka estrusa posle inseminacije (voditi računa o činjenici da osemenjene, a negravidne životinje, ne manifestuju estrus tokom prirodne anestrusne sezone). Za ranu dijagnozu gravidnosti se mogu koristiti metoda ultrazvučne dijagnostike i dokazivanja specifičnih hormona gravidnosti (progesteron i estrogen), u krvnom serumu ili mleku.

3.1.2.4. DIJAGNOZA GRAVIDNOSTI KOD KOBILE

Za povećanje reproduktivne efikasnosti kobila, rano otkrivanje ženki koje nisu gravidne ima velikog praktičnog značaja. Kod kobile je, takođe, vrlo značajno što pre ustanoviti i da li je ovulirala dve ovulacije ili je već uspostavljena gravidnost sa dva ploda (blizanci). Naime, blizanačku gravidnost kod konja treba izbegavati, jer je fertilitet kobile koja je rodila ili abortirala jedno ili oba ždrebeta, značajno smanjen u sledećoj sezoni parenja, zbog komplikacija tokom i posle porođaja ili abortusa.

Mogući rezultati blizanačke gravidnosti kod kobile: (1) rađanje jednog ždrebeta (60%), (2) uginuće oba ploda (31%) i (3) rađanje dva ždrebeta (9%), od čega su oba mrtva u 65% slučajeva, jedno živo u 21% i oba živa u svega 14% slučajeva.

Iz ovih razloga, veoma je važno što pre dijagnostikovati i prekinuti uspostavljenu blizanačku gravidnost (injekcijom luteolitika - $\text{PGF}_{2\alpha}$). U slučaju da se, pre inseminacije, dijagnostikuju dva predovulatorna folikula ili dve ovulacije (2 corpus hemorrhagicum-a), inseminaciju ne treba izvršiti u tom estrusu. U oba slučaja, treba sačekati 4 do 5 dana, da se formira novo žuto telo i izvršiti luteolizu (injekcijom luteolitika - $\text{PGF}_{2\alpha}$), a osemenjavanje izvršiti u narednom estrusu, ako nema dve ovulacije.

Za dijagnozu gravidnosti kod kobile se koriste sledeće metode: (1) izostanak manifestacije estrusa posle inseminacije, (2) palpacija per rectum, (3) detekcija eCG u krvnom serumu, (4) detekcija progesterona i estrogena, (5) ultrasonografija i (6) fetalna elektrokardiografija.

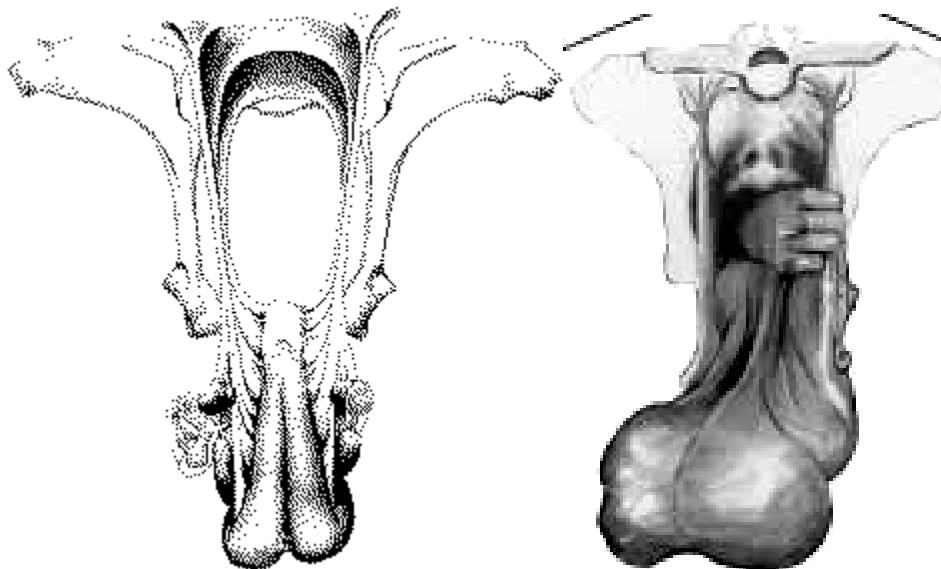
Izostanak manifestacije estrusa posle inseminacije može biti znak da je kobilica gravidna, ali nije precizan zbog toga što: (1) 5% do 10% gravidnih kobila može manifestovati znake estrusa i (2) negravidne kobile ne ispoljavaju estrus zbog tihog estrusa (ovulacija bez spoljašnjih znakova estrusa), pseudogravidnosti, koja se javlja kod 20% do 30% osemenjenih kobila, zbog (a) mortaliteta embriona 11. do 20. dana gestacije ili (b) održavanja funkcionalne aktivnosti akcesornih žutih tela posle prekida gravidnosti. Akceorna žuta tela se formiraju delovanjem eCG, koga sintetišu endometrijalne kupe, između 60. i 120. dana gestacije kobile.

Palpacija per rectum je klasična klinička metoda dijagnoze gravidnosti, koja se može izvesti u ranom stadijumu gestacije i daje zadovoljavajuće, ali ne maksimalno precizne rezultate. Vrlo iskusni dijagnostičari mogu ustanoviti gravidnost 20 do 30 dana posle osemenjavanja, na bazi detekcije povećanog tonusa uterusa i cerviksa. Naime, tokom ovog perioda se debljina zida materice tri puta povećava, u odnosu na negravidnu. Dobri praktičari obično vrše rektalni pregled između 25. i 35. dana gestacije. Tada postižu dobre rezultate dijagnoze, a metod je siguran po kobilu i plod.

Osnovni znaci gravidnosti kod rektalne palpacije kobile:

- ✓ Promene cerviksa od 16. ili 17. dana do termina: elongacija, pojačan tonus.

- ✓ Uterus povećava tonus.
- ✓ Horioniska kesa (vesikula) je izražena i sferična, prosečne veličine:
 - 28 d (4 nedelje), veličine kokošijeg jajeta
 - 35 d (5 nedelja), kao limun
 - 42 d (6 nedelja), kao pomorandža
 - 49 d (7 nedelja), kao grapefruit
 - 56 d (8 nedelja), kao manja dinja
 - By 90 d je teško palpirati kranijalni kraj uterusa.
 - Fetalni balotment per rectum postaje jasan posle 150. dana.
 - Posle toga, stalni rast fetusa.



Slika 27. Rektalni pregled na gravidnost kobile

Gravidni levi rog uterusa (*gore, desno*); Izgled negravidnih rogova uterusa (*dole, levo*);
Izgled rogova uterusa oko 3.meseca gravidnosti (*dole, desno*).

Detekcija eCG u krvnom serumu kobile se može izvršiti posle 40. dana gestacije. Ovaj hormon se može odrediti biološkim testovima na prepubertetskim laboratorijskim životinjama (pojava ovulacije na jajniku mišica, tretiranih uzorkom krvnog seruma gravidne kobile), ili mnogo preciznijom RIA-metodom (radioimmunoassay). Važno je istaći da endometrijalne kupe nastavljaju sekreciju eCG dosta dugo, ako do gubitka konceptusa dođe posle 40. dana

gestacije. Pokazalo se da, u tom slučaju, visoke koncentracije eCG u cirkulaciji kobile pre smanjuju nego što stimulišu ovarijalnu aktivnost. Zbog toga kobile manifestuje prolongiranu polnu neaktivnost, koja je više nego slična onoj u punom sezonskom anestrusu. Kod takvih kobile se estrus i ovulacija mogu očekivati tek posle 130. dana, kada endometrijalne kupe prekinu svoju aktivnost i, posledično, eCG nestane iz krvi.

Detekcija progesterona. Kobile, u čijoj krvi se ustanovi manje od 1,5ng/ml progesterona, 18 dana posle kraja estrusa, obično nisu gravidne. Tačnost ove metode je 96%.

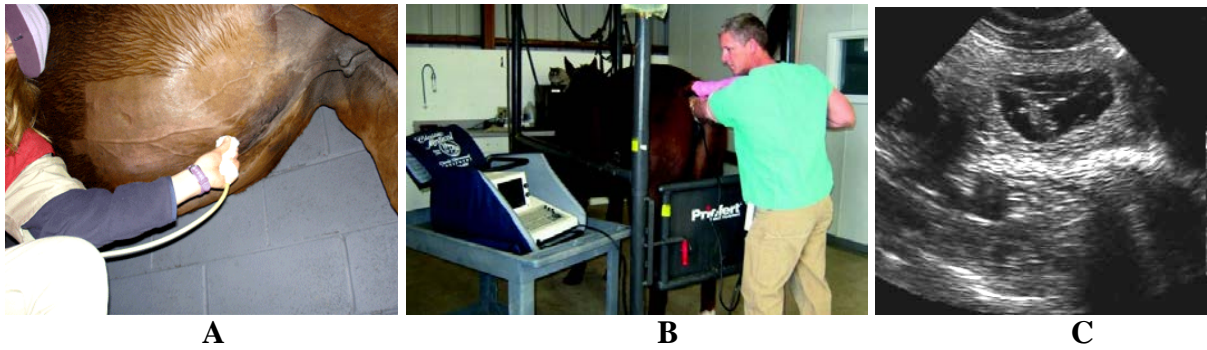
Detekcija estrogena. Koncentracija estron sulfata u plazmi i urinu se rapidno povećava tokom rane gravidnosti i povezana je sa prisustvom živog fetusa posle 45. dana gestacije.

Ultrasonografija je vrlo precizna i praktična metoda rane dijagnoze gravidnosti kod konja, koja se koristi poslednjih dvadesetak godina. Dva osnovna tipa ultrazvučne tehnike, koji se koriste u dijagnozi gravidnosti kobile, su A i B-model. A-model daje jednodimenzionalnu, a B-model dvodeimenzionalnu eho-sliku poprečnog preseka mekih tkiva. Tzv. real-time ultrazvuk je modifikacija B-modela, kojim se dobija pokretna dvodimenzionalna imaginacija. Primenom ove metode se dobijaju vrlo precizne rane dijagnoze gravidnosti kobile. Naj ranija dijagnoza zavisi od MHZ (jačine) sonde.

Specifičnosti nalaza kod ultrazvučne dijagnoze gravidnosti kobile:

- ✓ Stadijum gravidnosti se može odrediti na osnovu veličine alantoidne vezikule..
- ✓ Između 17.-24. dana veličina vezikule nije značajno različita.
- ✓ Migracija konceptusa je vrlo rapidna, kroz ceo uterus, do 16. ili 17. dana gestacije. Tada prestaje, jer dolazi do fiksacije (lacentacije) konceptusa za zid uterusa, u predelu baze roga uterusa.
- ✓ Otkucaji srca, oko 23-24 dana.
- ✓ Amnionska vreća stalno menja izgled, tok gestacije, što pregledač mora dobro znati!
- ✓ Oko 20. do 21. dana, embrion može da se vidi, obično u ventralnoj lokaciji amnionske vezikule.
- ✓ U ovom periodu, cela hipereho struktura predstavlja žumančanu vreću konceptusa.
- ✓ Ubrzo posle toga, vidljiva je i membrana alantoida.
- ✓ 30. dana embrion se nalazi u sredini vezikule.
- ✓ 36. dana embrion je blizu gornje baze vezikule.
- ✓ 40. Dana embrion je, ponovo, u sredini vezikule, pričvršćen za zid umbilicus-om.
- ✓ Znatno manja veličina vezikule, od one koja je normalna za određen stadijum gravidnosti, ukazuje na embrionalni mortalitet.
- ✓ Jedan od važnih razloga za vrlo ranu dijagnozu gravidnosti je detekcija blizanaca. U tom slučaju gravidnost treba prekinuti.

Fetalna elektrokardiografija, preko elektroda postavljenih na kožu kobile, se koristi za diferencijalnu dijagnozu jedinaca ili blizanaca, određivanje prisustva živog fetusa ili identifikacije zamora fetusa kod dugih i/ili teških porođaja.



Slika 28. Ultrazvučna metoda dijagnoze gravidnosti kobile

Transabdominalnom sondom (A) i transrektalnom sondom (B). UZ snimak 25. dana gravidnosti (C).

3.1.2.5. DIJAGNOZA GRAVIDNOSTI KOD KUJE I MAČKE

Kod pasa (kuja) i mačaka, zbog specifičnosti telesne građe (male životinje), dijagnoza gravidnosti se vrši na osnovu spoljašnjih znakova gravidnosti, manuelnom palpacijom abdomena i na osnovu izostanka estrusa posle inseminacije (voditi računa o činjenici da osemenjene, a negravidne životinje, ne manifestuju estrus tokom prirodne anestrlične sezone). Za ranu dijagnozu gravidnosti se mogu koristiti metoda ultrazvučne dijagnostike, rentgenografije i dokazivanja specifičnih hormona gravidnosti (progesteron i estrogen), u krvnom serumu ili mleku.



Slika 29. Ultrazvučni pregled na gravidnost kuje



Slika 30. Ultrazvučni pregled na gravidnost kuje

3.1.3. INDUKCIJA I SINHRONIZACIJA PARTUSA

Postoje zootehnološki i veterinarsko-medicinski razlozi za kontrolisan početak i tok procesa partusa (porođaja) kod domaćih životinja. Najčešći zootehnološki razlog se javlja u intenzivnoj proizvodnji, kada je potrebno da se izvrši porođaj većeg broja životinja u kratkom periodu. Tada se vrši tzv. sinhronizacija partusa, tretiranjem životinja hormonskim preparatima iz grupe prostaglandina (luteolitici), glukokortikoida, oksitocina ili antagonista progesterona. Veterinarsko-medicinski razlozi su, obično, prekid gravidnosti zbog predviđenih (mogućih) komplikacija, koje mogu imati štetne posledice po majku i/ili konceptus.

Za uspešnu indukciju sinhronizovanog partusa, veoma je važno dobro poznavati endokrinologiju vrlo kasne gravidnosti i samog partusa, odrediti adekvatne hormonske preparate za tretmana, posedovati tačnu evidenciju zadnjeg osemenjavanja, kao i detaljnu anamnezu životinja koje se podvrgavaju ovom tretmanu.

3.1.3.1. KONTROLA PARTUSA SVINJE

Trajanje suprasnosti se, kod većine krmača (preko 72%), kreće između 114 i 116 dana (prosečno 115 dana), sa normlanim variranjem između 108 i 122 dana. Međutim, prosečno trajanje laktacije varira između farmi i zavisi od brojnih faktora, kao što su: uslovi držanja, paritetna struktura, starosna struktura, rasni sastav i td. Osim toga, krmače sa većim brojem prasadi se prase ranije od onih sa manjim brojem prasadi. Sa druge strane, krmače započinju prašenje u bilo koje doba dana, trajanje procesa prašenja značajno varira, najveći broj mrtvorodne prasadi se događa kod zadnja tri rođena praseta (zbog anoksije), a najveći procent mortaliteta prasadi se događa unutar prvih nekoliko sati posle prašenja.

Ovo su glavni razlozi da se, na velikim farmama, vrši sinhronizacija prašenja većeg broja krmača, tako da se gro krmača prasi u toku radnog vremena, kada je moguće organizovati stručno nadgledanje i vođenje procesa prašenja. Na taj način je moguće smanjiti intra- i postpartalne gubitke prasadi i za 30%, u odnosu na prašenja koja nisu stručno nadgledana. Osim toga, indukcijom sinhronizovanog prašenja je moguće izvršiti efikasniju egalizaciju legala i organizovati druge zootehnološke postupke, kao što su: sečenje zuba i repova, davanje

preparat gvožđa novorođenoj prasadi, istovremeno zalučenje većeg broja krmača posle istog trajanja laktacije, izbeći prašenje tokom vikenda i praznika i slično. Navedene činjenice jasno pokazuju da se indukcijom sinhronizovanog prašenja značajno utiče na povećanje proizvodnje prasadi i povećava njena ekonomska efikasnost.

Indukcija sinhronizovanog prašenja se može izvesti tretmanom krmača preparatima prostaglandina $F_{2\alpha}$ ili njegovih sintetičkih analoga, glukokortikoidima, oksitocinom i oralnom aplikacijom antagonista progesterona.

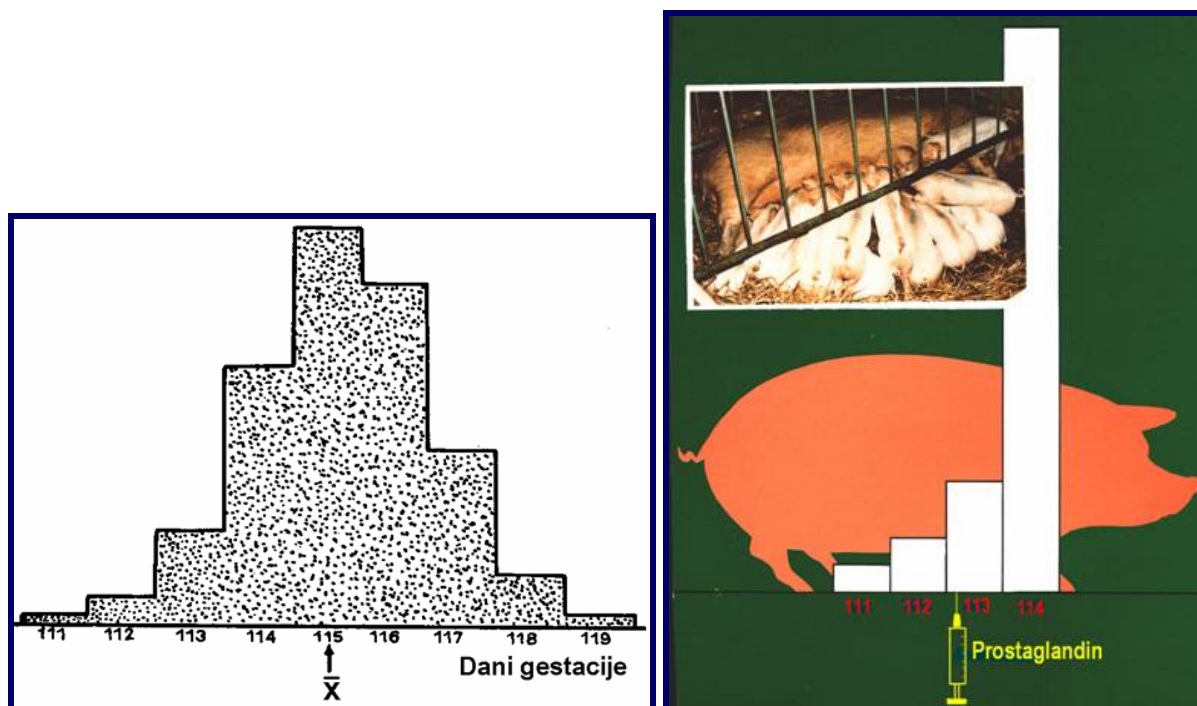
Prostaglandinski preparati se najčešće koriste za sinhronizaciju prašenja. Tretman injekcijom prostaglandina se izvodi 2 do 3 dana pre očekivanog normalnog termina prašenja. Zbog toga je veoma važno da se na farmi vodi precizna evidencija zadnjeg fertilnog osemenjavanja krmača. Prema većini istraživanja, proces prašenja započinje, kod većine krmača, između 26 i 36h posle injekcije prostaglandina, pri čemu se 95% krmača oprasi unutar 36h posle injekcije. Na taj način se može postići da se preko 70% krmača oprasi tokom radnog vremena. Prosečno trajanje procesa prašenja iznosi 4,6h, što je kraće u odnosu na spontano prašenje, a broj mrtvorodne prasadi je znatno manji (0,6 do 1,0) kod indukovano, u odnosu na spontano prašenje (2,5). Prosečno trajanje intervala od zalučenja do pojave estrusa iznosi 4,8 dana i ne razlikuje se između krmača sa indukovanim i spontanim prašenjem. Postoje podaci da tretman prostaglandinom, radi indukcije prašenja, smanjuje učestalost pojave MMA-sindroma (metritis-mastitis-agalaktacija). Bolja sinhronizacija početka i kraće trajanje procesa prašenja, postiže se injekcijom 10 do 20ij. oksitocina, datom 20 do 24h posle injekcije prostaglandina.

Glukokortikoidi nisu tako efikasni u indukciji sinhronizovanog prašenja krmače, kao što je to slučaj kod krave i ovce. Injekcijom većih doza glukokortikoida se može izazvati regresija graviditetnih CL, počevši od 100. dana gestacije krmače, ali je ustanovljeno da glukokortikoidi ne izazvaju luteolizu direktno, nego putem stimulacije sinteze i/ili sekrecije endogenog $PGF_{2\alpha}$. Primena ovih preparata nije interesantna za praksu.

Oksitocin efikasno izaziva početak prašenja samo kada se tretman izvede nekoliko sati pre spontanog početka prašenja.

Antagonist progesterona (RU 486), dat 111. ili 112. dana suprasnosti, može izazvati početak prašenja unutar 31h posle tretmana.

Odlaganje početka prašenja. Sinhronizacija prašenja se može izvesti i tako što se, kod nekih krmača, početak prašenja odloži za nekoliko dana. To je moguće izvesti tretmanom krmača preparatima progestagena. Ustanovljeno je da fetusu mogu ostati živi oko 11 dana posle očekivanog normalnog termina prašenja. Ako se gestacija produži za 6 dana, nema problema sa procesom prašenja i preživljavanjem fetusa, ali dalje produžavanje gestacije značajno povećava fetalni mortalitet. Tretman se, obično, izvodi sintetičkim progestagenima (na primer MAP, ili altrenogest), a prašenje započinje oko 30h posle prestanka tretmana. Ovi preparati, verovatno, inhibiraju kontraktilnu aktivnost miometriuma, pri čemu se održava normalan hormonski status krmače, specifičan za kasnu gravidnosti, i normalan početak laktacije.



Slika 31. Normalna distribucija trajanja suprasnosti (levo) i dobro sinhronizovano prašenje posle injekcije prostaglandina, date 113. dana suprasnosti (desno)

3.1.3.2. KONTROLA PARTUSA KRAVE

Trajanje gravidnosti je biološki determinisano i, kod krave, iznosi 9 meseci. Smatra se da gestacije koje traju kraće od 251 dan predstavljaju abortuse, između 251 i 271 dan prerano telenje, 272 do 293 dana normalan period gestacije, dok se gestacije koje traju 294 dana i duže, smatraju prolongiranim. Na variranje trajanja gestacije utiču: (1) faktori majke (njena starost, tj. paritet telenja, telesna kondicija i zdravstveno stanje), (2) faktori fetusa (broj fetusa, pol, aktivnost hipofize i adrena), (3) genetski faktori (rasa i genotip fetusa) i (4) faktori okoline (ishrana, temperatura i sezona).

S obzirom na to da su gravidnost i partus vrlo složeni fiziološki procesi, njihova veštačka kontrola može biti preduzeta samo ako se dobro znaju kratkotrajne i dugotrajne posledice po majku i plod, koje mogu proisteći iz primenjenih tretmana.

U intenzivnoj proizvodnji, postoje tri osnovna razloga, zbog kojih se preduzima indukcija i sinhronizacija partusa: (1) optimalizacija organizacije rada i iskorištavanja izvora hrane, (2) terminacija partusa u vreme kada je moguće stručno nadgledanje toka partusa i (3) ako se očekuje prevelika porođajna težina ploda, koja može izazvati dystociju (otežan i prolongiran porođaj, sa komplikacijama po kravu i plod), indukuje se nešto raniji porođaj.

Postoji više metoda za veštačku indukciju i sinhronizaciju porođaja, u završnim danima gestacije. Sve ove metode uključuju upotrebu egzogenih hormona za stimulaciju fizioloških mehanizama, koji učestvuju u normalnom procesu partusa, koji obuhvata interakciju fetusa, placente i uterusa.

Indukcija partusa se može izvršiti primenom preparata: (a) kortikosteroida, (b) prostaglandina i (c) antagonista progesterona - RU486.

Kortikosteroidi. Prvi pokušaj indukcije partusa preparatima kortikosteroida je izvršio Adams (1969). Smatra se da preparati sintetičkih kortikosteroida prolaze kroz komponente majčine placente, izazivajući pad progesterona u komponentama fetalne placente, uz istovremeno ubrzanje sinteze estrogena. Ipak, precizan mehanizam putem koga

kortikosteroidi izazivaju luteolizu i početak partusa, još uvek nije dovoljno poznat. Istraživanja pokazuju da se partus može indukovati jednokratnom injekcijom glukokortikoida, posle 255. dana gestacije. Tretman preparatima kratkotrajnog delovanja, kao što je dexamethasone troxundecanoate, značajno ubrzava i sinhronizuje partus. Većina tako tretiranih krava započinje telenje unutar 72 h posle injekcije. Indukcija izvedena dve nedelje pre termina, iako sigurna po tele, ima za posledicu znatno povećanu pojavu retencije placente i nisku vrednost koncepcije u narednom reproduktivnom ciklusu.

Prostaglandini (luteolitici). Poznato je da se prostaglandin $F_{2\alpha}$ izlučuje u vreme kada dolazi do pada koncentracije progesterona, u normalnom toku gestacije, tj. neposredno pred početak porođaja. Injekcija nativnog $PGF_{2\alpha}$, ili njegovih visoko potentnih sintetičkih analoga, dovodi do telenja 2 do 3 dana posle. Tretman krave injekcijom 500 μ g cloprostenola (sintetički analog prostaglandina), unutar dve nedelje pre normalnog termina telenja, i daje zadovoljavajuću sinhronizaciju indukovnog partusa. Dobru sinhronizaciju indukovnog partusa, kod visoko mlečnih krava, dobili su i neki drugi istraživači. Oni su koristili sintetički analog fenprostalene, koji ima duži biološki polu-život od $PGF_{2\alpha}$, posle 272. dana gestacije i ustanovili da se krave tele oko 35h posle tretmana. Ovi autori navode da tretman ovim preparatom, smanjuje pojavu retencije placente.

Antagonist progesterona RU 486, visokog afiniteta za progesteronske receptore, takođe se koristi za indukciju partusa. Injekcija ovog preparata 277. i 278. dana gestacije, indukuje partus unutar sledećih 53 do 55 h. Nisu ustanovljeni negativni efekti tretmana sa ovim preparatom, u smislu pojave dystocije, retencije placente ili smanjenog fertiliteta.

U nekim situacijama je potrebno odložiti početak telenja. Na primer, da se telenje ne odvija tokom noći, kada nema stručne radne snage, da nadgleda i pomaže kod porođaja. Injekcija potentnih adrenergičnih supstanci, kao što je clenbuterol, inhibira kontraktilnu aktivnost miometriuma i, tako, usporava prvu fazu porođaja. Međutim, ako tretman započne u drugoj fazi porođaja, efekt će biti minimalan.

3.1.3.3. KONTROLA PARTUSA KOBILE

Većina kobilica se ždrebi tokom noći, a porođaj traje relativno kratko. Zbog toga je osnovni cilj kontrole partusa da se on dogodi tokom dana, kada je moguće njegovo stručno nadgledanje i eventualna intervencija.

Pre početka tretmana za indukciju partusa, treba uzeti što detaljniju anamnezu, koja uključuje: starost kobile, datum prethodnog ždrebljenja, datum zadnjeg osemenjavanja, tok gravidnosti (sa informacijama o eventualnim komplikacijama i lečenjem) i td. Osim toga, treba izvršiti detaljan klinički pregled kobile, da se ustanovi starost ploda, njegov situs, pozicija i habitus, kao i opšte kondiciono i zdravstveno stanje kobile.

Indukcija partusa se ne vrši pre 320. dana gestacije. Releksacija ligamenata svoda karlice, relaksacija cerviksa, uvećanje vimena i sisa, sa pojavom kolostruma specifične konzistencije i boje, primarni su znaci skorog porođaja. Tako se boja kolostruma menja od prozirne do dim-sive, da bi u konačnoj fazi bila neprozirno žućkasto-bela. Neki smatraju da indukciju partusa ne treba započeti pre nego što kobilica otvori cerviks 3 do 4 cm. Takođe je veoma važno prepoznati i situacije u kojima indukcija partusa nije indikovana. Na primer, situacija kada kobilica manifestuje znake predstojećeg abortusa, kao što je abnormalan vaginalni ili cervikalni iscedak. Kobilica treba da se smesti u pogodan ambijent za ždrebljenje, oko nedelju do dve dana pre početka tretmana indukcije partusa.

Upotreba oksitocina. Injekcija 40 do 60ij. oksitocina dovodi do partusa unutar narednih 90 minuta. Veće doze (60 do 120ij.) oksitocina mogu imati negativne efekte. Iako estrogen ne

može sam izazvati porođaj, u kombinaciji sa oksitocinom poboljšava dilataciju cerviksa i tok porođaja.

Upotreba kortikosteroida. Rezultati primene egzogenih kortikosteroida u indukciji partusa kobila su dosta varijabilni. Uspešno ždrebljenje se postiže indukcijom sa 4 dnevne injekcije 100mg glukokortikoida (dexametason), počevši od 321. dana gestacije. Neki drugi autori, međutim, navode da je sličan tretman rezultirao rađanjem mrtve ždrebadi i retencijom placentе.

Upotreba prostaglandina. Iako se koncentracija $PGF_{2\alpha}$ rapidno povećava u vreme partusa, tretman ovim prirodnim luteolitikom ne daje dobre rezultate indukovanoг partusa kod kobila. Sa druge strane, tretman preparatima sintetičkih analoga prostaglandina, kao što je fluprostenol (Equimate), izaziva vrlo efikasnu indukciju partusa. Izbacivanje ploda se može očekivati unutar oko 4h posle prve (ili jedine) injekcije ovog analoga, a istiskivanje plodovih ovojnica unutar 2h posle istiskivanja ploda.

Prekid gravidnosti se vrši, ako se ne želi rađanje blizanaca ili zbog nekih drugih razloga. Jednokratna injekcija 12,5mg $PGF_{2\alpha}$, data 32. dana gestacije, efikasno prekida gravidnost. Primenom sintetičkog analoga cloprostenola, između 82. i 102. dana gestacije, može se izazvati prekid gravidnosti i završeno istiskivanje ploda za prosečno 48h posle injekcije prostaglandin-analoga

3.1.4. KONTOLA PERIODA POSLE PARTUSA

Posle partusa, ženka nastavlja fiziološki period laktacije, koja traje specifično za svaku vrstu životinja. Iz fizioloških, zootehnoloških, veterinarsko-medicinskih i ekonomskih razloga, važno je da ženka što pre, unutar normalnih fizioloških granica, reuspostavi novu cikličnu ovarijalnu aktivnost, odnosno estrusni ciklus, estrus i ovulaciju. Međutim, trajanje perioda od partusa do manifestacije prvog estrusa je specifično za svaku vrstu životinja. Tako, krava normalno uspostavlja cikličnu ovarijalnu aktivnost unutar prvih 30 dana post partum. Treba, međutim, znati da prva postpartalna ovulacija nije praćena manifestacijom spoljašnjih znakova estrusa kod oko 70% krava. Krmača ne uspostavlja cikličnu ovarijalnu aktivnost tokom prvih 4 do 5 nedelja laktacije (tzv. laktacioni anestrus). Ovulatorni estrus se manifestuje, normalno, unutar prvih 7 dana posle zalučenja legla. Manifestacija estrusa posle 7 dana od zalučenja se smatra prolongiranim intervalom zalučenje – estrus. Kobila uspostavlja prvi ovulatorni estrus prosečno 9 (5 do 14) dana posle ždrebljenja (tzv. „ždrebeći estrus“). U slučaju da osemenjavanje nije izvršeno u ovom estrus, ili je izvršeno ali kobila nije uspešno koncipirala, nastaviće sa cikličnom manifestacijom estrusa svakih prosečno 21 dan, ako se nalazi u sezoni parenja. Ovca i koza, normalno, ne manifestuju estrus dugo posle jagnjenja ili jarenja, jer se to događa izvan sezone parenja. Estrus će manifestovati tak u sledećoj sezoni parenja. Slična situacija je i sa kujom i mačkom.

Za intenzivnu reprodukciju je bitno da životinja što pre započne novi reproduktivni ciklus, odnosno da bude uspešno osemenjena u što kraćem vremenu posle prethodnog partusa. Period između partusa i sledeće uspešne koncepcije (osemenjavanje koje rezultira normalnim tokom i trajanjem gravidnosti i normalnim patusom), naziva se servis period. Za postizanje maksimalne reproduktivne efikasnosti, važno je da servis period traje što kraće, u okviru normalnih fizioloških granica.

3.1.4.1. KONTROLA SERVIS PERIODA KRAVE

Maksimalna reproduktivna efikasnost krave se postiže ako međutelidbeni interval (period između dva uzastopna telenja), traje 365 dana. Kako je trajanje gestacije biološka konstanta (9 meseci), to trajanje servis perioda može iznositi maksimalno 90 dana (3 meseca). Jedino u tom slučaju se može postići jedno telenje za godinu dana. Zbog toga je veoma važno da se, primenom različitih biotehnoloških metoda, kontroliše trajanje servis perioda. Time se utiče na trajanje ukupnog međutelidbenog intervala i, posledično, na nivo i efikasnost godišnje produkcije mleka i teladi.

Period od telenja do uspešne koncepcije (servis period) se može podeliti na dva osnovna intervala: (1) interval od telenja do prvog estrusa i (2) interval od prvog estrusa posle telenja do fertilnog estrusa.

Interval od telenja do uspostavljanja prvog estrusa, naziva se još i aciklični period, jer tada krava ne ovulira i ne manifestuje znake estrusa. Na trajanje acikličnog perioda post partum utiču brojni faktori: starost (paritet telenja), telesna masa, telesna kondicija, poremećaji tokom i posle telenja, opšte zdravstveno stanje krave, nivo mlečnosti, ishrana, frekvencija sisanja, sezona godine, efekt bika i tretman egzogenim hormonima. Većina normalnih krava (koje nisu obolele i/ili nisu imale komplikacija u toku i posle telenja) uspostavlja prvu cikličnu ovarijalnu aktivnost tj. ovulira, unutar prve 3 do 4 nedelje posle telenja.

Tako, prema nekim istraživanjima, kod krava Simentalske rase, prosečno trajanje intervala između telenja i prvog estrusa iznosi 15,5 dana. Značajno je istaći da prva ovulacija post partum, kod većine krava, prolazi bez ispoljenih spoljašnjih znakova estrusa, tzv. tihi estrus. Tako, većina autora nalazi da se prva ovulacija post partum javlja bez spoljašnjih znakova estrusa, kod 79% krava. Drugi estrus je tihi kod 55%, a treći kod 35% krava.

Ako se prvi estrus javi u normalnom periodu post partum, on se ne koristi za osemenjavanje. Pre svega zbog toga što nije završena involucija uterusu. Međutim, veoma je važno da krava uspostavi prvi estrus i da on bude evidentiran, jer je to dobar indikator zdravlja i sposobnosti životinje da uspešno započne estrusnu cikličnost i novi reproduktivni ciklus posle osemenjavanja. S tim u vezi, veoma je važno poznavati fiziologiju i endokrinologiju krave post partum, kao i metode kontrole i indukcije uspostavljanja ovarijalne aktivnosti krava post partum.

Fiziologija i endokrinologija krave post partum. Posle telenja, krava uspostavlja laktaciju. Laktacija, kod krave, ne izaziva potpunu blokadu ciklične ovarijalne aktivnosti i uspostavljanja naredne gravidnosti. Međutim, muža i sisanje mogu inhibirati ili odložiti ovulaciju, na nivou hipotalamusa, hipofize ili jajnika. Zbog toga se izostanak ovarijalne folikularne aktivnosti tokom gravidnosti, produžava i u ranoj laktaciji.

Neposredno posle telenja, koncentracija progesterona pada na bazalni nivo. Uspostavljanju prvog normalnog estrusnog ciklusa post partum, prethodi jedan kratak period povećanja koncentracije progesterona (oko 3 ng/ml u mleku), koje traje manje od 10 dana. Posle toga se, kod normalnih krava, uspostavljaju ovarijalni ciklusi sa ovulacijom, koja može i ne mora biti praćena spoljašnjim znacima estrusa, i sa normalnim nivoima koncentracije progesterona.

Koncentracija FSH u krvnoj plazmi je niska neposredno pre telenja (18,6 ng/ml), da bi se do 5. dana post partum značajno povećala i ostala na sličnom nivou do 30. dana post partum (36,9 do 45,3 ng/ml). Koncentracija LH je na vrlo niskom nivou (0,67 ng/ml) neposredno pre telenja i tokom prvih 5 dana post partum (0,08 ng/ml). Maksimalna koncentracija LH u mleku se nalazi između 6. i 10. dana post partum (1,39 ng/ml), pa zatim opada na 0,94 do 0,81

ng/ml, između 11. i 30. dana post partum. Posle inhibitornog efekta kasne gravidnosti, koncentracija FSH se brže povećava nego koncentracija LH, verovatno kao posledica različitih mehanizama, koji kontrolišu sekreciju ova dva gonadotropina.

Kod muznih krava se reuspostavljanje dinamike rasta folikula događa relativno brzo posle telenja i karakteriše se prvo rastom malih i folikula srednje veličine. Jedan od tih folikula se diferencira i postaje dominantan folikul. Broj dominantnih folikula, determinisanih pre prve ovulacije post partum, varira od 1 do 5 i ispoljava pozitivnu korelaciju sa intervalom od telenja do prve ovulacije.

Potpuna involucija uterusa, kod normalnih krava, se događa za 30 dana post partum. Krave koje su imale otežana telenja, ili komplikacije posle telenja, imaju produžen period involucije uterusa, za oko 20 dana.

Veštačka indukcija ovarijalne aktivnosti post partum. Za skraćivanje servis perioda i trajanja međutelidbenog intervala, od primarne je važnosti da krava brzo uspostavi novu cikličnu ovarialnu aktivnost post partum. Kontrolu trajanja anestričnog perioda post partum je moguće izvršiti pravilnom ishranom, prisustvom bikova i hormonskim tretmanom.

Ishrana. Uticaj ishrane tokom zasušenog perioda, na uspostavljanje ovarijalne aktivnosti post partum, je veoma dobro poznat. Tako je ustanovljeno da krave hranjene obrocima sa niskim nivoom energije, imaju znatno duži interval od telenja do prve ovulacije, od krava hranjenih obrocima sa visokim sadržajem energije. Dodavanje vitamina E i selena, u obroke krava pre telenja, može smanjiti pojavu retencije placente, povećati vrednost koncepcije i smanjiti interval od partusa do pojave estrusa.

“Efekt bika”. Prisustvo polno zrelih bikova, u stadima krava posle telenja, značajno smanjuje interval od telenja do prve ovulacije. Ovaj efekt se zasniva na činjenici da feromoni iz urina bika stimulišu oslobađanje LH iz adenohipofize i, time, ubrzava pojavu ovulacije kod krava post partum. Tako je ustanovljeno da se koncentracija LH u krvnom serumu značajno povećava od momenta oro-nazalnog tretiranja krava, 18. dana post partum (sa početnih 1,8 ng/ml, na 3,46 ng/ml 90. minuta posle tretmana). Kod tretiranih krava je prosečan interval od telenja do prvog estrusa iznosio 24 dana, a kod netretiranih krava je bio duži (32,5 dana).

Hormonski tretman. Danas je poznato da prvu ovulaciju post partum kod krava, prati formiranje CL sa kraćim trajanjem, kao i da se, tokom ranog perioda posle telenja, CL sa kraćim trajanjem formiraju i posle administracije hCG i GnRh. Radi izazivanja ranijeg reuspostavljanja ovarijalne aktivnosti post partum, koristi se tretman sa kombinacijom progesterona i progestagena, često uz injekciju gonadotropina i GnRH.

Dugotrajna oralna administracija sintetičkih progestagena (chlormadinone acetata – CAP, tokom 20 dana, ili melengestrol acetata – MGA, tokom 14 dana), značajno skraćuje interval od partusa do prve ovulacije. Moguće je primeniti i kratkotrajniji progestageni tretman (putem potkožnih implantata). Ovaj tretman može biti kombinovan sa eCG i PGF_{2α}. Takav tretman ima za rezultat stimulaciju reproduktivne aktivnosti krava, bez obzira da li su životinje bile ciklične ili ne. Neki autori su tretirali anestrične muzne krave, u 10 stada, preparatom CIDR tokom 7 dana i jednokratnom injekcijom 400 – 500 ij. eCG na dan vađenja CIDR. Oko 70% (50 do 100%) krava je manifestovalo estrus unutar 5 dana po vađenju CIDR, dok ih je oko 60% ostalo gravidno posle prve inseminacije.

Ima rezultata koji sugerišu da injekcija PGF_{2α}, data muznim kravama pre 40. dana post partum, može poboljšati fertilitet zapata. Nije potpuno jasan mehanizam kojim prostaglandin izaziva ovaj efekt. Neka istraživanja pokazuju da prostaglandin ili njegovi analozi, ne stimulišu aktivnost miometriuma kod muznih krava post partum. Rezultati do kojih su došli neki autori, pokazuju da injekcija analoga prostaglandina (cloprostenol), kod muznih krava post partum, povećava vrednost koncepcije, ali ne stimuliše ranije uspostavljanje ovarijalne aktivnosti post partum. Kanadski autori, takođe, izveštavaju da injekcija prostaglandina, data

između 24. i 31. dana post partum, kod muznih krava rase Holstein, značajno smanjuje interval od telenja do koncepcije.

Ustanovljeno je da injekcija preparata GnRh ili njegovih sintetičkih analoga, data 14 do 20 dana post partum, izaziva izlučivanje predovulatornog talasa LH iz adenohipofize i pojavu ovulacije. Posle tako izazvane prve ovulacije post partum, krave nastavljaju sa normalnom, spontanom cikličnom ovarijalnom aktivnošću.

3.1.4.2. KONTROLA SERVIS PERIODA KRMAČE

Za krmaču je specifično da ne uspostavlja estrus i ovulaciju tokom prvih 4 do 5 nedelja laktacije (laktacioni anestrus). Zbog toga, trajanje servis perioda krmače zavisi od (a) trajanja laktacije, koja se, u proizvodnim uslovima, može ograničeno produžavati ili skraćivati (obično traje 3 do 5 nedelja) i (b) od trajanja perioda od zalučenja legla do pojave estrusa (tzv. interval začučenje – estrus, IZE), koji bi normalno trebalo da traje maksimalno 7 dana. Iz ovih činjenica proizilazi da servis period krmače, paktično, može da se kontroliše uticajem na trajanje intervala zalučenje – estrus.

Na trajanje ovog perioda utiču brojni genetski (rasa, linija, stepen inbreedinga) i paragenetski faktori (ishrana tokom laktacije, uslovi smeštaja, ambijentalna temperatura i fotoperiod, efekt nerasta, paritet prašenja, trajanje laktacije, tretman egzogenim hormonima i opšte zdravstveno stanje plotkinje). Detaljni fiziološki mehanizmi delovanja, kao i mogućnost njihove kontrole, prikazani su u poglavljima 2.1. (Reprodukcija svinja) i 4.3.2 (Sinhronizacija estrusa polno zrelih ženki).

Kontrola trajanja servis perioda nema zootehnološkog značaja kod kobilica, zbog dugog trajanja gravidnosti i anestrusne sezone. Kod ovaca i koza, servis period je, prirodno, određen trajanjem sezone anestrusa i može se kontrolisati indukcijom vansezonskog fertilnog estrusa, što je detaljno objašnjeno u poglavlju 4.3.2 (Sinhronizacija estrusa polno zrelih ženki).

PROVERA ZNANJA

1. Navedite osnovne zootehnološke i veterinarsko-medicinske razloge za ranu dijagnozu gravidnosti kod ženki domaćih životinja.
2. Nabrojte metode za ranu dijagnozu gravidnosti.
3. Koje su pradžnosti, a koje mane pojedinih metoda dijagnoze gravidnosti?
4. Opišite specifične nalaze na materici i jajnicima krave primenom rektalne dijagnoze gravidnosti, od 3. do 9. meseca gestacije.
5. Koja metoda dijagnoze gravidnosti krmača je najpreciznija u praktičnim uslovima?
6. Opišite hormonsku metodu rane dijagnoze gravidnosti kod kobile.
7. Koji su osnovni razlozi veštačke indukcije partusa u intenzivnoj proizvodnji pojedinih vrsta domaćih životinja.
8. Nabrojte metode veštačke kontrole indukovnog partusa.
9. Zbog čega je važno pratiti i kontrolisati reproduktivnu aktivnost ženke u periodu posle partusa?
10. Zašto je važno kontrolisati trajanje servis perioda krave?

3.1.5. POVEĆNJE VELIČINE LEGLA

Prema broju rođene mladunčadi u jednom partusu, životinje mogu biti unipare (rađaju, normalno, jedno mladunče), kao što su krava i kobilica ili multipare (rađaju više mladunaca u leglu), kao što su krmača, ovca, koza, kuja i mačka. U zootehnološkom i ekonomskom pogledu, primena biotehnoloških metoda povećanja legla ima smisla kod krmače i, u manjoj meri, kod ovce i koze. Kod kobile rađanje blizanaca treba izbegavati, zbog štetnih posledica, koje su ranije opisane. Kod krave, indukcija rađanja blizanaca ima smisla, u tehnologiji proizvodnje većeg broja teladi za tov.

3.1.5.1. POVEĆANJE BROJA ŽIVOROĐENE PRASADI

Broj živorođene prasadi u leglu je jedan od osnovnih parametara fertiliteta plotkinja. Ovaj parametar fiziološki je, primarno, određen delovanjem četiri grupe faktora: (a) faktori koji određuju ovulacionu vrednost u fertilnom estrusu, (b) faktori koji utiču na broj oplodjenih od broja ovuliranih oocita, tzv. stepen oplodivosti ili fekunditet, (c) faktori koji utiču na intrauterino (prenatalno) preživljavanje embriona i fetusa i (d) faktori koji utiču na mortalitet plodova tokom procesa prašenja. Faktori koji određuju veličinu legla se mogu podeliti i prema načinu na koji se oni manifestuju i evidentiraju u proizvodnim uslovima. U jednu grupu spadaju faktori čije se vrednosti mogu iskazati određenim numeričkim vrednostima, kao što su: starost i paritet prašenja plotkinje, broj osemenjavanja po uspešnoj koncepciji, trajanje dnevnog fotoperioda, ambijentalna temperatura, trajanje prethodne laktacije, trajanje prethodnog IZE. Drugu grupu čine faktori čije vrednosti nije moguće iskazati numerički, kao što su: efekt nerasta, tehnologija držanja, bolesti, stresogeni i td.

FAKTORI KOJI ODREĐUJU OVULACIONU VREDNOST

Maksimalna prirodna ovulaciona vrednost iznosi 24 jajane ćelije u jednom estrusu, kod krmača i 18 kod nazimica. Ovulaciona vrednost veća od navedenih, smatra se za superovulaciju. Osobina ovulacione vrednosti poseduje najveći stepen naslednosti, u poređenju sa ostalim reproduktivnim osobinama. Vrednost heritabiliteta (h^2) za ovu osobinu, kod svinje, iznosi 0,42, što znači da ova osobina spada u grupu nisko naslednih osobina. Zbog toga, fenotipski ispoljena ovulaciona vrednost, u svakom pojedinačnom estrusnom ciklusu, zavisi od uticaja brojnih paragenetskih faktora. Među njima se posebno ističu: ishrana, starost životinje, faktori ambijenta i egzogeni hormoni.

Ishranom se može značajno uticati na ovulacionu vrednost. Povećanje sadržaja energije u obroku sa 21 MJ ME/dan na 34 MJ ME/dan, tokom kasnog prepubertetskog perioda, prosečna ovulaciona vrednost se povećava za 1,5 jajnih ćelija. Kada se, tokom sledećeg estrusnog ciklusa, energetska vrednost obroka poveća na 41 MJ ME/dan, ovulaciona vrednost se poveća za još 1,8 jajnih ćelija. Pokazalo se da je pozitivna korelacija između ovulacione vrednosti i sadržaja energije u obroku, povezano sa povećanjem koncentracije insulina u telesnoj cirkulaciji. Povećanjem sadržaja energije u obroku, takozvani flašing, u periodu od zalučjenja do pojave prvog estrusa, može se postići povećanje broja ovulacija u tom estrusu. Međutim, ovaj efekt se može manifestovati samo kod krmača koje su, posle laktacije, zadržale zadovoljavajuću telesnu kondiciju.

Starost životinje, takođe, utiče na ovulacionu vrednost. Ona je manja u nazimica, a veća u odraslih krmača. Ovulaciona vrednost se povećava kod nazimica između prvog i trećeg pubertetskog estrusa. U jednom istraživanju je ustanovljeno da prosečna ovulaciona vrednost

iznosi 12,1 (8-15) CL u prvom, 15,6 (14-19) CL u drugom i 18,5 (16-25) CL u trećem pubertetskom estrusu nazimica. Kod krmača se ovulaciona vrednost povećava od prvog do 5. ili 6. prašenja, zadržava sličnu vrednost do 9. prašenja, a posle postepeno opada.

Faktori ambijenta. Među ove faktore se ubrajaju trajanje dnevnog fotoperioda i temperatura. Njihov pojedinačni uticaj se teško može ustanoviti u geografskim širinama sa izraženim godišnjim sezonama. Naime, prolongiran fotoperiod i povišena temperatura se zajedno javljaju u toplijem periodu godine. Ustanovljeno je da trajanje dnevnog fotoperioda, izgleda, nema značajnijeg uticaja na ovulacionu vrednost. Ipak se, međutim, zapaža da je ovulaciona vrednost znatno veća u hladnijem periodu godine, a niža u toplijem. Izgleda da je ovo posledica delovanja povišenih letnjih ambijentalnih temperatura, jer je ustanovljena značajna negativna korelacija između povišene ambijentalne temperature i ovulacione vrednosti.

Egzogeni hormoni. Tretmanom plotkinja različitim egzogenim hormonima, donekle se može povećati veličina legla kod prašenja, tako što se primenom određenih doza hormona, povećava ovulaciona vrednost. Međutim, iako se ovulaciona vrednost izazvana injekcijom 500 do 1.500 ij. eCG, može povećati za 4,8 jajnih ćelija, broj živih embriona do 30. dana gestacije se povećava samo za 1,0. Dodavanje progestagenog preparata (altrenogest), u obroke krmača (20 mg/grlo/dan), tokom 5 dana, počevši od 2. dana po zalučenju, prosečan broj živorođene prasadi se, u narednom leglu, povećava za 0,9. Tretman krmača injekcijom 1000 ij. eCG (Sugonal, Veterinarski zavod Subotica), sledećeg dana po zalučenju i sa 500 ij. hCG (Intervet, Boxmer) 72 h posle eCG, rezultirao je sa prosečno 10,96 ukupno i 10,63 živorođene prasadi po leglu, u poređenju sa 10,54 ukupno i 10,07 živorođene prasadi po leglu kod netretiranih krmača.

Tabela 20. Uticaj doze eCG na ovulacionu vrednost

| Kategorija plotkinja | Vrsta hormonskog preparata | | Ovulaciona vrednost | % ovulacije |
|-----------------------------|----------------------------|----------|---------------------|-------------|
| | eCG (ij) | hCG (ij) | | |
| Prepubertetske nazimice | 400 | - | 10,2 | 85,0 |
| | 400 | 200 | 14,6 | 100,0 |
| | 750 | 500 | 25,1 | 72,3 |
| | 1.500 | 500 | 26,4 | 78,3 |
| Polne zrele nazimice | 750 | - | 25,5 | 100,0 |
| | 1.000 | 500 | 29,7 | 100,0 |
| | 1.500 | 500 | 34,3 | 83,3 |
| | 2.000 | 750 | 28,5 | 78,8 |
| Prvopraskinje ¹ | 750 | 500 | 18,8 | 84,5 |
| | 1.000 | - | 16,1 | 63,3 |
| | 1.000 | 500 | 25,7 | 87,2 |
| Starije krmače ¹ | 1.500 | - | 15,8 | 73,6 |
| | 1.500 | 750 | 23,6 | 90,8 |
| | 2.000 | 750 | 32,3 | 100,0 |

eCG – Sugonal (Veterinarski zavod Subotica); hCG – Chorulon (Intervet, Boxmer).

¹ Injekcija eCG je data 24h posle zalučenja legla.

Ovulaciona vrednost se može povećati i aktivnom imunizacijom plotkinja protiv intraovarijalnih regulatora (inhibin i folistatin). Ovi regulatori, koji se nalaze u folikularnoj tečnosti, inhibiraju sintezu FSH u adenohipofizi. Posle aktivne imunizacije, ovulaciona vrednost se povećala sa 12,8 na 17,8 CL, pri čemu je ustanovljeno značajno povećanje

koncentracije FSH i predovulatornog talasa LH, kod tretiranih, u odnosu na kontrolne životinje.

FAKTORI KOJI ODREĐUJU BROJ OPLOĐENIH OOCITA

U normalnim fiziološkim uslovima, broj uspešno oplođenih, od ukupnog broja ovuliranih oocita svinje je vrlo visok i, najčešće, se kreće preko 90%. Međutim, ovaj stepen oplodivosti može biti značajno redukovan, a u ekstremnim uslovima se može desiti da ni jedan oocit ne bude oplođen. Osnovi faktori, koji utiču na stepen oplodivosti ovuliranih oocita su: (a) kvalitet upotrebene sperme, (b) vreme inseminacije u odnosu na moment ovulacije, (c) kvalitet izvedene inseminacije i (d) kvalitet ovuliranih oocita.

Kvalitet sperme. Kod prirodnog osemenjavanja (pripusta), na stepen oplodivosti oocita utiču faktori fertilizacionog kapaciteta ejakulata: volumen, gustina, prisutvo neprirodnih sastojaka (krv, gnoj, nečistoća, infektivni agensi), broj progresivno pokretnih spermatozoida i stepen fertilizacione sposobnosti spermatozoida. Kada se radi o veštačkom osemenjavanju, ovi faktori su: volumen doze, stepen razređenja nativnog ejakulata, kvalitet razređivača za spermu, broj progresivno pokretnih spermatozoida i stepen fertilizacione sposobnosti spermatozoida, kao i uslovi čuvanja inseminacione doze pre upotrebe. Ovde se mora istaći i da fertilizacioni kapacitet sperme značajno varira u zavisnosti od rase i starosti nerasta, kao i između pojedinih nerastova iste rase i starosti. Pojedini paragenetski faktori, kao što su ishrana, faktori ambijentalnog klimata (temperatura i trajanje dnevnog fotoperioda), način smeštaja, frekvencija uzimanja ejakulata, higijenski uslovi, toksične supstance (naročito mikotoksini u hrani), higijenski uslovi, kao i različita obolenja, značajno utiču na vrednost fertilizacionog kapaciteta sperme.

Vreme inseminacije u odnosu na moment ovulacije vrlo značajno utiče na stepen oplodivosti oocita. Poznata je, naime, činjenica da se maksimalan stepen oplodivosti postiže ako se inseminacija izvede 10 do 12 časova pre početka ovulacije. Ovo je, primarno, posledica činjenice da jajna ćelija zadržava sposobnost uspešne oplodnje svega oko 8 časova posle ovulacije. Jajne ćelije, koje borave u ampuli jajovoda duže od 8 časova, vrlo brzo gube sposobnost formiranja bloka zone pelucide, koji sprečava polispermičnu penetraciju. U slučaju da dođe do polispermične penetracije (ulazak dva ili više spermatozoida u oocit), dolazi do formiranja dva ili više muških pronukleusa, odnosno formiranja poliploidne strukture zigota (jedan ženski pronukleus + dva ili više muških pronukleusa). Takav zigot nije sposoban za dalji normalan razvoj i uginjava do momenta formiranja blastocista.

Kvalitet izvedene inseminacije podrazumeva: potrebnu higijenu plotkinje, inseminatora i opreme za inseminaciju, upotrebu adekvatnih instrumenata za inseminaciju, pravilno uvođenje katetara u ženske polne organe do mesta depozicije sperme, adekvatan način aplikacije inseminacione doze, adekvatna stimulacija krmače tokom inseminacije, i pravilan postupak sa krmačom neposredno posle inseminacije. Nepravilno izvedena inseminacija značajno smanjuje stepen oplodivosti oocita, a u ekstremnim slučajevima ima za posledicu da ni jedan ovulirani oocit ne bude oplođen. Naročito značajan uticaj na smanjenje stepena oplodivosti ima: primena neadekvatnog katetera, nepravilno mesto depozicije inseminacione doze u ženskom polnom traktu, nepravilna tehnika aplikacije inseminacione doze. Ovo su i najčešće greške, koje se prave u praktičnoj veštačkoj inseminaciji krmača.

Kvalitet ovuliranih oocita primarno podrazumeva pravilnu morfološku građu i fiziologiju oocita. Poznato je, naime, da je za uspešnu fertilizaciju sposoban samo oocit koji se nalazi u metafazi druge mejotičke deobe, sa prvim polarnim telašcom u perivitelusnom prostoru. Samo oociti ovulirani u ovom stadijumu nuklearne deobe, mogu obezbediti monospermičnu penetraciju, formiranje dva pronukleusa (muški i ženski) i nastaviti normalnu deobu (brazdanje) posle završene singamije. Dešava se da neki od ovuliranih oocita nisu u navedenom stadijumu druge mejoze ili su ovulirani kao morfološki i/ili fiziološki degenerisani, ili su mrtvi. Povećan broj ovakvih oocita se javlja posle delovanja različitih nepovoljnih genetskih ili paragenetskih faktora. Visoke letnje temperature su jedan od najčešćih faktora koji dovode do ove pojave. Naime, povišena temperatura izaziva poremećaj hormonskog balansa, što ima za posledicu produženo trajanje procesa ovulacije, koji, kod svinje, prirodno traje oko 4 sata. U letnjim mesecima, ovaj period se produžava i na preko 10 sati. Slično produžavanje procesa ovulacije je zapaženo i posle tretmana krmača i nazimica visokim dozama gonadotropina (eCG i hCG), radi izazivanja superovulacije. U oba slučaja, nekoliko oocita koji su zadnji ovulirali, nisu normalno razvijeni, ili su mrtvi ili nisu u metafazi druge mejotičke deobe. Takvi oociti nisu sposobni za uspešnu oplodnju.

FAKTORI KOJI ODREĐUJU PRENATALNO PREŽIVLJAVANJE

Iako svinja ima veliku ovulacionu vrednost i visok stepen oplodnosti oocita, ipak se prenatalni mortalitet, najčešće, kreće između 25 i 45% od ovulacione vrednosti.

Smatra se da ovulaciona vrednost utiče na prenatalno preživljavanje tokom preimplantacionog perioda. Međutim, preživljavanje embriona se povećava sa povećanjem ovulacione vrednosti samo do određene granice. Dalje povećavanje broja ovulacija smanjuje preživljavanje embriona. Tako je ustanovljeno da se embrionalno preživljavanje povećava do 18 ovulacija, a sa daljim povećanjem ovulacione vrednosti se smanjuje.

Ukupno prenatalno (intrauterino) preživljavanje je procentualni odnos broja živorođene prasadi u leglu i ovulacione vrednosti u prethodnom fertilnom estrusu. Oko 80% od ukupnih prenatalnih gubitaka se događa tokom embrionalne faze gravidnosti, tj. do 30. dana posle fertilnog osemenjavanja. Najkritičnija faza ovog perioda je između 14. i 21. dana, odnosno period između završetka formiranja blastocista i završetka implantacije. Prenatalni gubici su znatno niži tokom fetalnog perioda gravidnosti i iznose oko 5 do 10%, dok još oko 10 do 15% fetusa ugine u peripartalnom periodu, tj. neposredno pre, tokom i posle prašnja.

Tabela 21. Morfometrija polnih organa, ovulaciona vrednost i preživljavanje embriona rase Meishan (MS) i Large White (LW)

| | Rasa nazimica | |
|--|---------------|------|
| | MS | LW |
| Prosečna težina uterusa, bez lig. lata uteri (g) | 414 | 640 |
| Prosečna dužina jednog roga uterusa (cm) | 199 | 281 |
| Prosečna težina oba jajnika (g) | 12,7 | 15,0 |
| Ovulaciona vrednost (broj CL) | 14,1 | 18,5 |
| Preživljavanje embriona ¹ | 89 | 55* |

¹ Od ovulacione vrednosti; * P < 0,05.

Faktori koji utiču na stepen (%) prenatalnog preživljavanja, odnosno na veličinu legla su brojni i mogu biti genetske i paragenetske prirode. Među genetskim faktorima su rasa, linija, stepen inbreedinga i individua, dok su najuticajni paragenetski faktori ishrana, ambijent,

način smeštaja, tehnologija osemenjavanja, starost plotkinje, infektivni agensi, sters i tretman egzogenim gonadotropinima.

Rasne razlike, u pogledu stepena embrionalnog preživljavanja i veličine legla, ustanovili su brojni autori. Tako je znatno veći stepen preživljavanja ustanovljen kod rase Durok, Poland-China i kod skoro svih plodnih kineskih rasa. Preživljavanje embriona je znatno veće kod kineske rase Meishan (89,0%) nego kod evropske bele rase Large White (55,0%). Postoje razlike u stepenu embrionalnog preživljavanja i među evropskim rasama svinja. Tako je ustanovljeno da preživljavanje embriona, do 30. dana gestacije, iznosi 59,8% kod rase Švedski Landras, 66,9% kod meleza Veliki Jorkšir x Švedski Landras i 72,7% kod rase Nemački Landras. Ove činjenice pokazuju da je veličinu legla moguće povećati korištenjem plodnih rasa svinja, kao i pogodnim kombinacijama ukrštanja.

Ishrana. Brojna istraživanja pokazuju da ishrana obilnim (*ad libidum*) obrocima, posebno obrocima sa visokim sadržajem energije, tokom prvih 30 dana gestacije, značajno povećava mortalitet embriona i, time, smanjuje veličinu legla kod prašenja. Tako je, još 1968. godine ustanovljeno da preživljavanje embriona iznosi 78,4%, 72,1% i 66,0%, kada su krmače hranjene sa 4,1 kg, 2,5 kg ili 1,25 kg dnevnog obroka, tokom prvih 20 dana gestacije. Znatno kasnije, 1980. godine, ustanovljena je znatno niža koncentracija progesterona (11,8ng/ml) u krvnoj plazmi i niži stepen preživljavanja embriona (71,9%), kod krmača hranjenih obilnim obrocima, u odnosu na krmače hranjene restriktivnim obrocima (1.5 kg/dan), kod kojih su navedene vrednosti iznosile 16,7 ng/ml i 82,8%. Smatra se da je ovo posledica smanjene sekrecije specifičnih proteina uterusa, neophodnih za histotrofnu ishranu preimplantacionih embriona, koju kontroliše progesteron.

Fiziološki mehanizam povezanosti konzumacije obilnih obroka i smanjenja koncentracije progesterona u telesnoj cirkulaciji nije potpuno jasan. Moguće je, međutim, da pojačana ishrana povećava protok krvi kroz jetru, čime se povećava intenzitet metaboličke razgradnje progesterona. Niži nivo progesterona u cirkulaciji smanjuje sintezu i/ili sekreciju specifičnih proteina uterusa, što ima za konačan rezultat povećan mortalitet embriona.

Nivo proteina u obroku ne utiče značajno na preživljavanje embriona, sve dok se nalazi u propisanim granicama potreba organizma plotkinje. Ovde je, međutim, važan sadržaj aminokiselina u obroku, posebno esencijalnih. Lizin je prva limitirajuća aminokiselina kod svinja, pa se o njegovom sadržaju u obroku mora voditi posebna pažnja.

Sadržaj vitamina u obroku je, takođe, važan faktor preživljavanja embriona. U poslednje vreme se posebno ističe značaj *folne kiseline* (tzv. vitamin rasta). Ustanovljeno je, naime, da sadržaj ovog vitamina u obrocima, kao i količina koju sintetiše mikroflora digestivnog trakta, ne zadovoljava potrebe krmača, tokom prvih 30 do 60 dana gestacije. Povećan broj rođene prasadi u leglu je ustanovljen kada se klasičnim obrocima, koji sadrže 0,5mg folne kiseline/kg obroka, doda još 2 do 5mg ovog vitamina. Naime, folna kiselina (vitamin iz grupe B-kompleksa) je važan prekursor u procesima sinteze fermenata, koji kontrolišu sintezu DNK i RNK. Zbog toga je sasvim razumljiva potreba povećane koncentracije folne kiseline u tkivima sa intenzivnom deobom ćelija, kakva su endometrijum, žuta tela, embrioni, trofoblast i horion, tokom rane gravidnosti. Dodavanje *vitamina A*, u obroke suprasnih krmača, takođe, povećava preživljavanje embriona. Ovaj vitamin održava integritet epitela endometrijuma i stimuliše sekreciju polnih steroida.

Mikotoksini se često nalaze u hranivima, koja se koriste u obrocima svinja. Povećane koncentracije estrogenih mikotoksina, posebno *Zearalenona* (preko 7 ppm), izazivaju

povećanje ili potpunu smrtnost preimplantacionih embriona. To ima za posledicu povećan broj krmača koje manifestuju neregularno povećanje (25 i više, obično između 25 i 35 dana posle zadnjeg osemenjavanja), ili paragravidnih krmača (ne povećaju, čak i do normalnog termina prašenja, a nisu gravidne), kada njihovi obroci sadrže 3,6 ng do 4,3 ng Zearalenona po 1 kg hrane. Na osnovu iznetih činjenica, u vezi sa količinom i kvalitetom obroka, suprasne krmače treba hraniti po sledećoj generalnoj shemi: (1) tokom prve trećine gestacije, dnevne obroke treba smanjiti na oko 2,3 kg kvalitetnog obroka za krmače i na oko 1,5 kg za nazimice. Cilj je da sa povećanjem preživljavanje embriona i, time, povećanje broja živorođene prasadi u rezultirajućem leglu, (2) tokom druge trećine gestacije, krmačama se može povećati dnevni obrok, ako se oceni da je potrebno poboljšati njihovu telesnu kondiciju i (3) u zadnjoj trećini gestacije treba značajnije povećati dnevni obrok krmača, obzirom da fetus postiže preko 80% porođajne telesne mase tokom ovog perioda. Cilj je, dakle, da se pojačanom ishranom povećaju porođajna telesna masa novorođene prasadi. Time se povećava njihova vitalnost i smanjuje vrednost postnatalnog mortaliteta.

Ambijent. Temperatura je faktor ambijenta koji značajno utiče na fertilitet krmača. Značajno povećanje smrtnosti embriona sa zapaža kod krmača izloženih ambijentalnoj temperaturi višoj od 32°C. Izgleda da povišena ambijentalna temperatura u ranoj gravidnosti, smanjuje produkciju estrogena kod embriona starih 12 do 14 dana. Povećana produkcija estrogena je, u ovom periodu gestacije, veoma potrebna, zbog sprečavanja luteolize i podrške lutealne sekcije progesterona. Logično je, zbog toga, pretpostaviti da poremećaji sekrecije embrionalnog estrogena i/ili lutealnog progesterona, ima za posledicu povećanu ili potpunu smrtnost ranih embriona.

Postupak sa plotkinjom posle inseminacije. Nepravilan postupak sa krmačom, naročito negativno deluje unutar prvih 3 do 4 nedelje posle osemenjavanja. Naime, procesi koji neposredno prethode oplodnji, sam proces oplodnje, kao i razvoj preimplantacionih embriona, regulisani su složenim fiziološkim mehanizmima interakcije materice, gameta i ranih embriona. Ovi mehanizmi mogu biti značajno poremećeni uticajem spoljašnjih faktora, kao što su navedeni nepravilni postupci sa plotkinjom, naročito tokom prvih 3 do 4 nedelje od osemenjavanja.

Smeštaj osemenjenih krmača može biti individualan i grupni. Neki autori su našli znatno veće vrednosti procenta prašenja i veličine legla, kod krmača držanih individualno, tokom prvih 20 dana gestacije, u poređenju sa krmačama držanih grupno. Sa stanovišta uspostavljanja i održavanja gravidnosti, znatno je bolje individualno držanje krmača, tokom 3 do 4 nedelje posle osemenjavanja. Kod grupnog držanja krmača, postoji problem egalizacije plotkinja prema starosti i telesnoj masi, kao i prema stadijumu gestacije. Kod nepravilno egalizovanih grupa, mlađe i lakše krmače doživljavaju jači stres, izazvan agresivnošću i konkurencijom starijih i teži krmača. Sličan stres krmače doživljavaju i ako se transportuju i/ili premeštaju od mesta inseminacije u do mesta gde se drže suprasne krmače. U proizvodnji se, najčešće, prave greške u smeštaju i transportu osemenjenih krmača, što može smanjiti vrednost prašenja za 7%, a broj živorođene prasadi u leglu za 1,8. Isti autori navode da je premeštanje i/ili transport krmača najbolje obaviti do 5. dana posle osemenjavanja ili posle završenog procesa implantacije, između 30. i 35. dana posle osemenjavanja.

Prirodno osemenjavanje, posle prethodno izvedenog veštačkog, treba izbegavati. Ovakav način pripusta može smanjiti procent prašenja za 5%, ali na rezultirajuću veličinu legla nema uticaja. Smanjena vrednost koncepcije se može objasniti lošijim (nekontrolisanim) kvalitetom sperme i zbog stresa izazvanog postupkom sa krmačom oko i tokom parenja. Najčešći problem u postupku sa krmačama posle osemenjavanja je, dakle, njihovo nepravilno grupisanje, zatim premeštanje i/ili transport krmača iz objekta u objekt, kao i izvođenje

prirodnog, posle veštačkog osemenjavanja. Naime, ako se krmače moraju držati grupno, onda je dobro da grupe budu što manje, da plotkinje u grupi budu što bolje ujednačene po paritetu, telesnoj kondiciji i periodu suprasnosti, kao i da raspoloživa površina boksa po krmači bude što veća. Transport i/ili premeštanje krmača iz grupe u grupu, ili iz objekta u objekt, predstavlja značajan stres. Nije dobro da se izvrši prirodno, posle veštačkog osemenjavanja. Naime, ovo može biti povećan stres za krmaču, može doći do povreda krmače, do prenosa raznih polnih infekcija i td. Svi navedeni nepravilni postupci sa osemenjenom krmačom, značajno povećavaju vrednost mortaliteta embriona i neregularnih povadañja.

Tehnologija inseminacije je jedan od najčešćih faktora, koji u proizvodnim uslovima, vrlo snažno utiče na veličinu legla kod prašenja. U ovom pogledu su veoma važni kvalitet upotrebljene sperme, i sama tehnika inseminacije. Sperma mora biti uzeta od nerastova proverenog i visokog fertiliteta, mora biti adekvatno razređena i čuvana do momenta inseminacije. Optimalno vreme inseminacije je oko 10 h do 12 h pre ovulacije, koja se javlja na početku zadnje trećine estrusnog perioda, čije trajanje varira između nazimica i krmača, kao i između krmača sa različitim trajanjem IZE. Inseminaciju treba izvesti tako da kateter dospe do zadnje trećine cerviksa, da dobro zadihtuje cervikalni kanal, te da se izvrši stimulacija cerviksa kateterom, pre i posle izbacivanja doze sperme.

Tabela 23. Uticaj različitih faktora kvaliteta sperme na % prašenja i broj živorođene prasadi u leglu

| Faktori kvaliteta sperme | Učestalost pojave problema (%) | % prašenja | Broj živorođene prasadi u leglu |
|--|--------------------------------|------------|---------------------------------|
| Stara sperma (predugo čuvana) | 27,4 | - 18,0 | - 1,0 |
| Loši uslovi čuvanja sperme | 15,7 | - 7,0 | - 0,7 |
| Loš kvalitet vode za razređivač | 15,7 | - 7,0 | - 0,6 |
| Loš kvalitet razređivača | 15,7 | - 17,0 | - 1,2 |
| Nepravilan stepen razređenja ejakulata | 9,8 | - 10,0 | - 1,0 |
| Povećan broj abnormalnih spermatozoida u | 9,8 | - 11,0 | - 1,0 |
| Nerastovi smanjenog fertiliteta | 5,9 | - 51,0 | - 5,8 |

Tabela 24. Uticaj različitih faktora kvaliteta inseminacije na % prašenja i broj živorođene prasadi u leglu

| Faktori kvaliteta inseminacije | Učestalost pojave problema (%) | % prašenja | Broj živorođene prasadi u leglu |
|-------------------------------------|--------------------------------|------------|---------------------------------|
| Loša tehnologija otkrivanja estrusa | 30 | - 15,0 | - 0,6 |
| Mali broj inseminacija u estrusu | 20 | - 8,0 | - 0,3 |
| Nepravilno vreme inseminacije | 16 | - 7,0 | - 0,4 |
| Mali broj spermatozoida u dozi | 12 | - 7,0 | - 0,5 |
| Mali volumen inseminacione doze | 10 | - 5,0 | - 0,5 |
| Nepravilna tehnika inseminacije | 10 | - 8,0 | - 0,5 |

Obolenja, naročito reproduktivnog i endokrinog sistema, često izazivaju povećanje mortaliteta embriona i fetusa. To dovodi do smanjenja veličine legla, ili do pojave povećanog procenta neregularnih povadañja, abortusa ili paragraviditeta. Ova obolenja mogu biti infektivne ili neinfektivne etiologije. Među najčešća obolenja, koja izazivaju mortalitet

embriona i/ili fetusa, spadaju: kuga svinja, bruceloza, leptospiroza, crveni vetar, parvoviroza, reproduktivni i respiratorni sindrom (PRRS), slinavka i šap.

Starost plotkinje, takođe, utiče na veličinu legla kod prašenja. Veoma je dobro poznato da nazimice i mlade krmače prase nešto manja legla (obično za 0,5 do 2 praseta) od starijih krmača. Kod suviše starih krmača, veličina legla ponovo opada. Zbog toga je potrebno voditi računa o paritetnoj strukturi zapata priplodnih krmača. Naime, u zapatu treba da dominiraju krmače koje daju maksimalno velika legla, a to su plotkinje između 3. i 6. pariteta prašenja. Ovo je, u praksi, moguće postići tako što se: (a) nazimice osemenjavaju u optimalnoj starosti, telesnoj masi i debljini leđne slanine i (b) obezbedi tehnologija koja omogućava što duži vek reproduktivne eksploatacije plotkinja.

Egzogeni hormoni utiču na veličinu legla indirektno, preko delovanja na ovulacionu vrednost (videti ranije u ovom poglavlju). Neka istraživanja pokazuju da tretman krmača kombinacijom estrogena i progesterona, tokom treće nedelje gestacije, povećava veličinu legla kod prašenja.

Stepen prenatalnog preživljavanja je, kao što se vidi iz prethodnog teksta, jedan od primarnih faktora koji utiče na broj živorođene prasadi u leglu. Na ovaj parametar utiče interakcija brojnih paragenetskih faktora, zbog čega je vrlo verovatno da neće biti moguće formulisati jedinstvenu, uvek primenljivu, formulu (tehnologiju) za rešavanje fenomena prenatalnog preživljavanja embriona i fetusa. Ipak, na osnovu dosadašnjih saznanja, stepen prenatalnog mortaliteta je moguće kontrolisati, ako se, u praksi, zadovolje sledeći uslovi:

1. Za reprodukciju birati nazimice, koje potiču iz legala sa velikim brojem živorođene prasadi, ali koje su odgojene u leglima sa redukovanim brojem prasadi na 6 do 8,
2. Koristiti plotkinje meleze, nastale kombinacijom sa jednom visoko plodnom rasom,
3. Za osemenjavanje koristiti nerastove visokog fertilizacionog kapaciteta,
4. Koristiti inseminacione doze sperme sa adekvatnim brojem progresivno pokretnih spermatozoida, pri čemu koristiti kvalitetne razređivače, izvršiti adekvatan stepen razređenja svakog ejakulata, a inseminacione doze čuvati što kraće i pod optimalnim uslovima, do momenta inseminacije,
5. Što preciznije otkrivati početak refleksa stajanja i, na osnovu toga, definisati optimalno vreme inseminacije i reinseminacije,
6. Osemenjavanje vršiti svakih 12 h, sve dok plotkinja manifestuje izražen refleks stajanja,
7. Iz priploda izlučivati plotkinje, koje u petom i narednim prašenjima, daju legla sa manje od 8 živorođene prasadi,
8. Temperatura objekta sa suprasnim krmačama treba da bude između 21 i 28°C, barem tokom prve tri nedelje gestacije,
9. Suprasne krmače držati individualno i ne izlagati ih bilo kakvom stresu, barem tokom prve četiri nedelje gestacije,
10. Nazimice osemenjavati u drugom ili trećem pubertetskom estrusu, stare između 220 i 240 dana, imaju telesnu masu 125 kg do 135 kg i min. 1,8 cm do 2 cm debljine leđne slanine,
11. Laktacija treba da traje minimalno 21 dan
12. Obezbediti maksimalnu dnevnu konzumaciju hrane tokom laktacije (oko 10kg 18. dana laktacije dnevno),
13. Povećati sadržaj energije i proteina u obrocima od zalučenja do osemenjavanja,
14. Obezbediti dovoljne količine vode i optimalnu temperaturu objekta,
15. Nazimice i krmače hraniti restriktivnim obrocima, tokom prvih 3 do 4 nedelje gestacije (nazimice 1,5 kg, a krmače 2,5 kg dnevno, sa 14% proteina, 18 MJ SE i 1% lizina)-
16. Krmačama dati injekciju 1 milion ij. vitamina A na dan zalučenja, nazimicama 5 dana pre fertilnog osemenjavanja (tj. 15 dana posle zadnjeg otkrivenog estrusa)-
17. Obroci bez mikotoksina, koji povećavaju smrtnost i mumifikaciju plodova-

18. Pre inseminacije izvršiti testiranje plotkinja na prisustvo intrauterinih infekcija, a kod pozitivnih grla izvršiti adekvatnu terapiju-
19. Voditi računa o sanitarno-higijenskim uslovima svih prostorija za veštačko osemenjavanje, objekata za smeštaj priplodnih grla, opreme, instrumenata, ljudi i td.
20. Pravilno odrediti vrstu, dozu i kombinaciju hormonskih preparata, koji se koriste za tretman nazimica i krmača, u svrhu izazivanja i/ili sinhronizacije estrusa i ovulacije,
21. Održavati optimalnu paritetnu strukturu plotkinja u zapatu, održavati dobru kondiciju plotkinja i nastojati da se preko 85% plotkinja fertilno osemeni unutar prvih 7 dana po zalučanju legla.

FAKTORI KOJI UTIČU NA MORTALITET PRASADI TOKOM PROCESA PRAŠENJA

Broj živo rođene prasadi u leglu je konačno određen brojem prasdi koja su uginula u toku procesa prašenja. Normalan proces prašenja traje 3 do 8 časova, što primarno zavisi od ukupnog broja plodova. Normalno je da interval između istiskivanja praseta traje 10 do 20 minuta, maksimalno oko 30 minuta. Otežano prašenje nastaje zbog: inercije uterusa (nesposbnost za kontrakcije), nepravilnog položja ploda (karlični, poprečni, dva ploda zajedno u porođajnom kanalu), obstrukcija porođajnog kanala (obstrukcija himena kod nazimica, prolapsus cerviksa ili vagine, uzana karlica krmače, konstipacija, puna mokraćna bešika), razne devijacije uterusa (uvrnce, torzija i sl.), suviše veliki plodovi, histerija krmače, retencija placentae, prolapsus vagine, uterusa ili mokraćne bešike, krvavljenje iz porođajnog kanala. U navedenim slučajevima je istiskivanje plodova otežano ili potpuno onemogućeno, što ima za konačan rezultat povećanu smrtnost plodova, odnosno povećan broj mrtvo rođene prasadi.

Najčešći direktan uzrok uginuća plodova, kod otežanog prašenja, je hipoksija (smanjena snabdevenost kiseonikom) ili anoksija (potpuni nedostatak kiseonika). Ovo je razlog uginuća oko 80% od ukupnog broja mrtvo rođene prasadi. Plodovi mogu uginuti i zbog gušenja izazvanog obmotavanjem pupčane vrpce oko vrata. Nepravilano pomaganje kod porođaja, takođe, može biti uzrok povećanog broja prasadi koja ugine tokom procesa prašenja. Jedan od čestih razloga povećanog uginuća plodova tokom prašenja (*intrapartum*) je davanje injekcije oksitocina pre nego što se tačno ustanovio razlog otežanog prašenja.

3.1.5.2. KONTROLA RAĐANJA BLIZANACA KOD KRAVA

Dobijanje većeg broja blizanaca, primenom jednostavnih i jeftinih metoda, predstavlja značajno povećanje biološke i ekonomske efikasnosti proizvodnje goveđeg mesa. Životna produktivnost mesnatih rasa krava, direktno je uslovljena reproduktivnom efikasnošću i stepenom proizvodnje blizanaca, koja se, normalno, kreće između 2 i 3%. Rađanje blizanaca povećava biološku i ekonomsku efikasnost proizvodnje goveđeg mesa za 20 do 25%. Međutim, jako je dobro poznato da, kod krava mlečnih rasa, rađanje blizanaca ima za posledicu povećanje mortaliteta teladi, povećanje pojave retencije placentae, skraćivanje trajanja gestacije i produžavanje intervala od telenja do sledeće koncepcije. Zbog toga je razumljivo da se rađanje blizanaca ne prihvata u stadima mlečnih krava. Neka istraživanja u Irskoj, međutim, pokazuju da identifikacija blizanaca u ranoj gravidnosti, kombinovana sa povećanjem sadržaja energije u obrocima tokom kasne gravidnosti, značajno minimizira negativne efekte bližnjenja na sledeću reproduktivnu performansu mlečnih krava.

Kod goveda, vrednost rađanja blizanaca iznosi, u proseku, 2,8% (sa variranjima između 0,2 do 4,5%). Od ukupnog broja rođene teladi, identični blizanci se javljaju u 0,02 do 0,73% slučajeva. Od broja istopolnih blizanaca, identični blizanci se javljaju u 1,48 do 17,5% slučajeva. Rađanje blizanaca zavisi od rase, starosti majke i raznih uslova spoljašnje sredine.

Tako je ustanovljeno da broj oteljenih blizanaca raste od 1,3%, kod prvog telenja, do 9,4% posle tri i više telenja. Trojke se rađaju u 0,01%, a četvorke u 0,002% slučajeva. U proseku, između 3,4 i 4,1% krava ovulira dve jajne ćelije u jednom ciklusu, pri čemu se blizanci rađaju u 2,76 do 2,82% slučajeva.

Indukcija bližnjenja. Poznato je da aplikacija rekombinovanog govedeg somatotropina, radi povećanja produkcije mleka kod mlečnih rasa krava, obično povećava i pojavu rađanja blizanaca. Postoje i drugi načini da se izazove rađanje blizanaca, kao što su: upotreba gonadotropina, imunizacijske procedure, selekcija i transplantacija embriona.

Tretman gonadotropinima. Jednokratna injekcija eCG, data 16. ili 17. dana ciklusa krave, značajno povećava rađanje blizanaca. Osnovni problem se sastoji u tome što je individualno variranje izazvane ovulacione vrednosti vrlo veliko, kao i činjenica da nije moguće predvideti rađanje trojki, četvorki, pa i petorki. U takvim slučajevima, značajno se povećava procent abortusa i drugih nepoželjnih posledica po majku i novorođenčad. Tretman krava sa ušnim implantatom norgestomet-a, tokom 10 dana, i sa 750 ij. eCG na dan vađenja implantata, rezultirao je sa 40 do 60% telenja, pri čemu je rođeno 11 do 13% blizanaca.

Imunizacijske procedure. Fiziologija jajnika je kompleksan proces, koji uključuje interakciju ekstragonadalnih (FSH i LH) i intragonadalnih (steroidi i peptidi, kao što je inhibin) regulatora. Sa ciljem povećanja ovulacione vrednosti, poslednjih godina se primenjuje imunizacija životinje na ovarijalne steroidide (androgeni/estrogeni) ili peptide (inhibin), koji učestvuju u negativnoj feedback kontroli oslobađanja hipofizarnih gonadotropina. Takav tretman rezultira značajnim povećanjem (oko 30%) broja krava sa dve ovulacije. Međutim, i kod ove metode nije moguće striktno kontrolisati ovulaciju tri i više jajnih ćelija i, s tim u vezi, nepoželjne posledice, kao što su niska vrednost koncepcije i/ili značajno povećanje embrionalnog ili fetalnog mortaliteta.

Selekcija. Povećanje broja bližnjenja se može postići i tako što se, za reprodukciju, koriste stada kod kojih se prirodno javlja veći broj bližnjenja. Tako je ustanovljeno da neka stada u SAD i Novom Zelandu, imaju između 10% i 30% bližnjenja. Ustanovljeno je da se gravidnost sa dva ploda bolje održava, ako je do ovulacije došlo na oba jajnika, tj. ako se gravidnost odvija u oba roga uterusa (38% : 11%). Pokazalo se da praćenje ovulacione vrednosti kod junica, tokom nekoliko pubertetskih estrusa, može biti efikasan metod selekcije na povećanje rađanja blizanaca. Neki autori su pokazali da i bikovi mogu uticati na broj rođenih blizanaca.

Transplantacija embriona. Blizanci se mogu proizvesti i tako što se drugi embrion transplantuje u negravidni rog uterusa, nekoliko dana posle osemenjavanja krave sa jednom ovulacijom. Tako krava nosi svoj plod i plod koji je dobila od druge krave. Neki autori su posltigli 73% bližnjenja, kada je, po jedan embrion, transplantovan u svaki rog uterusa krave koja je imala samo jednu ovulaciju, tj. jedan corpus luteum. U proseku, prema različitim autorima, postiže se 60% telenja, od kojih je 47% bližnjenja. Može se izvršiti i transplantacija dva ili više embriona, dobijenih posle *in vivo* ili *in vitro* fertilizacije, u rogove uterusa recipijenata.

Tabela 25. Vrednost bližnjenja posle transplantacije embriona

| | |
|-------------------------------------|-------|
| Prosečna vrednost superovulacije | 12,08 |
| Prosečan broj embriona | 4,81 |
| Vrednost koncepcije recipijenta | 57,4% |
| Recipijenata sa teljenim blizancima | 48,3% |
| Broj teladi po jednom teljenju | 1,49 |

Za transplantaciju se mogu koristiti i embrioni dobijeni posle *in vitro* fertilizacije (IVF), koji su dugotrajno čuvani dubokim zamrzavanjem, ili kao sveži. Kod upotrebe svežih IVF-embriona, postiže se 67% telenja, od kojih je 57% blizanačkih. Nešto niže vrednosti se dobijaju, ako se koriste duboko zamrznuti, pa otopljeni embrioni (65% telenja, sa 49% blizanaca).

Kada se radi o gravidnosti sa blizancima, neizbežno je razmotriti fenomen frimartinizma. Frimartinizam je pojava sterilnosti kod junice, koja je rođena kao blizanački par sa muškim teletom. Kod prirodno rođenih blizanaca, frimartinizam se javlja u 92% slučajeva, dok se kod hormonalne indukcije blizanaca, ova pojava povećava i češće se javlja kod unilateralnih (u istom rogu materice), a ređe kod bilateralnih (u oba roga materice) blizanaca. Međutim, ova pojava nije posebno značajna kod programirane indukcije bližnjenja, jer se tako dobijeni blizanci koriste za tov, a ne za dalju reprodukciju. Tim pre što frimartin-junice imaju bolje priraste u tovu od normalnih junica.

3.1.5.3. POVEĆANJE VELIČINE LEGLA OVCE

Povećanjem veličine legla, odnosno broja ojnjene jagnjadi po ovci, može se postići: (a) upotrebom rodnijih rasa ovaca, (b) poboljšanom ishrano, (c) tretmanom ovaca gonadotropnim hormonima (eCG i hCG, radi povećanja ovulacione vrednosti) i (d) poboljšanjem svih uslova smeštaja i zdravstvenog stanja priplodnih grla.

Rađanje većeg broja jagnjadi po ovci (dvojke, trojke i td.), zahteva primenu takve tehnologije odgoja, koja će obezbediti da se što veći broj ove jagnjadi održi u životu do određene klanične težine. Smrtnost jagnji u toku procesa jagnjenja i prvih dana posle jagnjenja se, u normalnim uslovima, kreće između 10% i 20% i predstavlja najznačajniji faktor smanjenja ukupnog broja proizvedene tovnje jagnjadi. Većina jagnjadi ugine tokom prvih nekoliko dana po rođenju, što je znatno većim delom posledica neadekvatne ishrane, slabog materinskog instinkta ili slabe vitalnosti jagnjadi, a manjim delom posledica infektivnih bolesti. Dobrom organizacijom rada i dodatnom prehranom jagnjadi, može se značajno povećati stepen preživljavanja jagnjadi. Zbog toga se preporučuje veštačko napajanje jagnjadi, odmah po rođenju, sa oko 60ml ovčijeg ili kravljeg kolostruma (mleko koje se izlučuje prvih nekoliko dana posle jagnjenja ili telenja) po jagnjetu. Rađanje većeg broja jagnjadi, kod nekih ovaca, može izazvati stres, koji može značajno promeniti ponašanje majke. Ona može smanjiti dnevnu produkciju mleka i/ili odbiti da doji jedno ili oba jagnjeta.

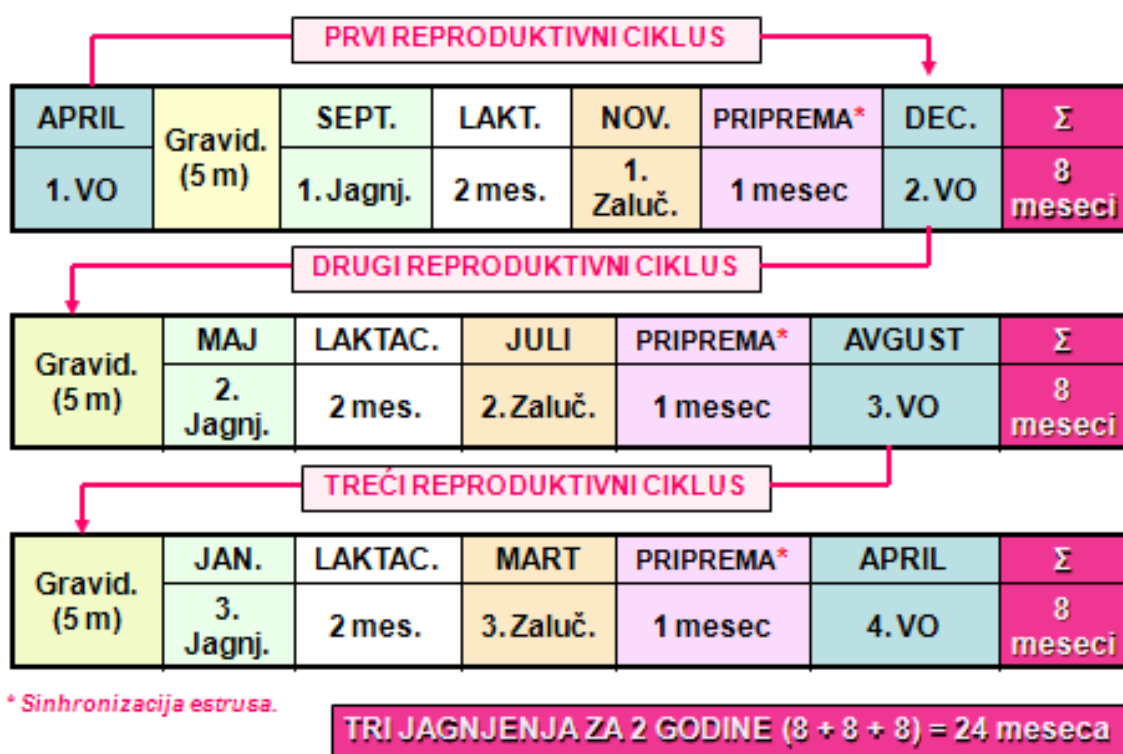
3.1.5.4. POVEĆANJE FREKVENCIJE JAGNJENJA

Ukupan broj proizvedene jagnjadi po ovci godišnje, može se povećati metodama povećanja broja rođene jagnjadi po ovci, kao i povećanjem broja jagnjenja u toku godine. Za povećanje broja (frekvencije) jagnjenja, treba odabrati one rase ovaca koje imaju produženu sezonu parenja i koje daju veći broj rođene jagnjadi po ovci. S obzirom na to da gravidnost ovce traje 5 meseci, moguće je postići 2 jagnjenja u toku jedne godine, pri čemu se mora izvršiti vrlo rano odbijanje jagnjadi (sa 30 dana starosti) i primeniti vanezonsko izazivanje sinhronizovane pojave estrusa.

Ovo je, međutim, u praksi, vrlo teško postići i dosta je skupo. Zbog toga je program tri jagnjenja u toku dve godine, za praksu mnogo prihvatljiviji i ekonomski opravdaniji. Kod ovog programa, ovce treba da se pare, odnosno jagnje u osmomesečnim intervalima. Jedan

interval od 8 meseci je podeljen na: (a) 5 meseci sjagnjenosti, (b) 2 meseca laktacije (dojenja jagnjadi) i (c) 1 mesec pripreme za sledeće parenje (odbijanje jagnjadi, tretman intravaginalnim sunderima i osemenjavanje).

Za ovaj program, stado priplodnih ovaca treba podeliti na dve grupe (A i B), koje će se osemenjavati u različitim periodima godine. Na taj način se ovce, iz jedne grupe, naizmenično pare tokom i izvan sezone parenja. Izvođenje ovog programa zahteva primenu sinhronizaciju estrusa, kako u sezoni, tako i izvan sezone parenja. Osim toga, preporučuje se i sinhronizacija jagnjenja, tako što se ovce tretiraju injekcijom luteolitika, datom 141. dana sjagnjenosti (gravidnosti), da bi se sve ovce ojagnjile 143.-144. dana gravidnosti. Za laktaciju, tj. dojenje jagnjadi se planira 2 meseca, a za pripremu ovaca za sledeće parenje mesec dana. Svi ovi postupci zahtevaju dobre uslove smeštaja, ishrane, dodatna ulaganja za hormonske preparate i stručnu radnu snagu. Prednosti ovog sistema je obezbeđenje većeg broja ujednačene jagnjadi, tokom većeg dela godine, bolja organizacija parenja i jagnjenja, što sve ima uticaja na znatno veću ekonomsku dobit. Slične metode povećanja ukupnog broja proizvedene jaradi, mogu se koristiti i u reprodukciji koza.



Slika 33. Redosled događaja u programu tri jagnjenja za dve godine

PROVERA ZNANJA

1. Navedite osnovne faktore koji direktno utiču na broj rođene prasadi u leglu.
2. Na koje načine je moguće kontrolisati i stimulirati ove faktore, radi povećanja broja rođene prasadi?
3. Navedite osnovne faktore intrauterinog (prenatalnog) mortaliteta kod krmače, krve, ovce i kobile.
4. Koji faktori direktno utiču na rađanje blizanaca ili više teladi?
5. Zbog čega treba izbegavati blizanačku gravidnost kod kobile?
6. Nabrojite metode za povećanje broja rođene jagnjadi po ovci godišnje.
7. Opišite osnovne principe svake od ovih metoda i navedite njihove prednosti i ane u praktičnoj primeni.

3.1.6. VEŠTAČKO OSEMENJAVANJE

Veštačko osemenjavanje (VO) je osnovna i najvažnija biotehnološka metoda, koja se primenjuje u intenzivnoj stočarskoj proizvodnji, već više od 60 godina. Primenom veštačkog osemenjavanja ostvaren je veliki napredak u stočarskoj proizvodnji, zbog velikog broja prednosti veštačkog nad prirodnim osemenjavanjem.

Prednosti primene veštačkog osemenjavanja:

- ✓ dobijanje znatno većeg broja potomaka od genetski superiornih mužjaka,
- ✓ mogućnost bržeg i efikasnijeg genetskog poboljšanja postojećih zapata,
- ✓ mogućnost efikasnog sprečavanja širenja i iskorenjavanja (eradikacije) zaraznih bolesti,
- ✓ mogućnost dugotrajnog čuvanja sperme mužjaka sa genetski poželjnim osobinama,
- ✓ lak transport sperme na velike udaljenosti
- ✓ izbegava se rizik povrede i/ili uginuća priplodnjaka prilikom transporta,
- ✓ izbegavaju se troškovi karantina priplodnjaka, transportovanih iz jednog u drugi zapat,
- ✓ mogućnost trgovine spermom i opremom za veštačko osemenjavanje i
- ✓ mogućnost naučnih istraživanja.

Mora se, međutim, istaći da sve navedene prednosti veštačkog nad prirodnim osemenjavanjem, mogu postati vrlo ozbiljne mane, koje dovode do velikih zootehnoloških, veterinarskih i ekonomskih gubitaka, ako se tehnologija veštačkog osemenjavanja izvodi nestručno. Značaj i obim primene veštačkog osemenjavanja, dobro ilustruje i činjenica da se, danas, u svetu godišnje proizvede preko 300 miliona inseminacionih doza sperme bikova, oko 90 miliona doza sperme nerastova i oko 8 miliona doza sperme ovnova.

Kratak istorijat veštačkog osemenjavanja. Postoje podaci da su stari Asirci, pre oko 4.000 godina, pokušavali veštačko osemenjavanje ovaca, dok su Arapi vršili pokušaje veštačkog osemenjavanja kobilica, u XIII veku nove ere. Međutim, prvi pisani dokumenti, u vezi sa veštačkim osemenjavanjem, potiču iz XVII veka, kada je *Antoan Leeuwenhoek* (1678), pod mikroskopskim uvećanjem 270 puta, video pokretanje spermatozoida, koje je

nazvao “*animalcules*”. Više od 100 godina kasnije, italijanski naučnik *Lazzaro Spallanzani* (1784) je veštački osemenio kaju, koja je oštenila 3 kučeta, 62 dana kasnije. Međutim, od tada, je prošlo više od 100 godina, kada su *Heape i sar.* (1897) izvestili da je, u različitim državama, uspešno izvedeno veštačko osemenjavanje zečeva, pasa i konja. Praktičnu primenu VO u stočarstvu započeo je, u Rusiji, akademik *E.I. Ivanov*, 1899. Ovaj naučnik je prvi razvio metodologiju kontrole kvaliteta sperme, formulisao sastav razređivača za spermiju i metode selekcije genetski superiornih mužjaka za upotrebu u tehnologiji VO (*Ivanov*, 1922). Kasnije je njegov rad nastavio, takođe u Rusiji, *Milovanov* (1938), koji je razvio osnovne principe današnje tehnologije veštačkog osemenjavanja (uzimanje sperme veštačkom vaginom, razređivanje sperme, tehniku inseminacije i td.), posebno kod ovaca i goveda (*Milovanov*, 1964). Rezultate *Milovanova* su, kasnije, razvijali japanski naučnici (*Ishikawa, Ito, Niwa, Sato, Yamane i drugi*). Nagli razvoj primene VO goveda započinjje u SAD, početkom 40-ih godina XX veka (*Salisbury et al.*, 1978), dok je VO svinja, započeta je u Japanu (*Ito i sar.*, 1948).

Značajan doprinos razvoju osnovnih principa i metoda savremene tehnologije VO, dali su i naučnici univerziteta u Keimbridžu (UK), *C. Polge, A.U. Smith* i *A.S. Parkers*, krajem prve polovine XX veka. Tehnologiju VO razvijaju i naučnici u drugim zemljama (Danska, Nemačka, Francuska, USA i druge). U našoj zemlji (bivša Jugoslavija), VO se značajnije razvija u drugoj polovini XX veka, na veliki industrijskim farmama goveda i svinja, naročito u SR Sloveniji, SR Hrvatskoj i SR Srbiji. Od tada se veštačko osemenjavanje sve masovnije, primenjuje u intenzivnoj stočarskoj proizvodnji i, danas, predstavlja najvažniju biotehnološku metodu unapređenja stočarske proizvodnje.

Tehnologija VO se permanentno razvija, sa osnovnim ciljem da se: (a) postigne maksimalan stepen fertiliteta osemenjenih ženki, (b) maksimalno poveća broj inseminacionih doza po jednom ejakulatu, (c) da se obezbedi maksimalna higijena primene VO i (d) da se postigne maksimalna ekonomska efikasnost tehnologije VO. S tim u vezi, savremena istraživanja su naročito usmerena na iznalaženje efikasnih metoda ocene kvaliteta sperme, metode efikasnog razređivanja i dugotrajnog čuvanja inseminacionih doza sperme različitih vrsta životinja, tehnike inseminacije ženki, određivanje optimalnog momenta inseminacije, efikasnih metoda otkrivanja i sinhronizacije estrusa i td.

3.1.6.1. VEŠTAČKO OSEMENJAVANJE SVINJA

Danas se, u industrijskim uslovima proizvodnje, preko 80% krmača i nazimica veštački osemenjava klasičnom intracervikalnom tehnologijom. Ova tehnologija podrazumeva upotrebu inseminacionih doza sveže razređene sperme, koje sadrže 3 do 5×10^9 progresivno pokretnih spermatozoida. Doze tečne razređene sperme se čuvaju na temperaturi $+17^{\circ}\text{C}$, a najčešće se upotrebe unutar 1 do 2 dana, posle uzimanja sperme od nerasta.

Prosečno se, od jednog nerasta, dobija oko 1.300 inseminacionih doza godišnje (21 doza po ejakulatu), što je dovoljno za uspešno osemenjavanje svega oko 300 krmača godišnje. Savremena intenzivna proizvodnja, međutim, zahteva brže dobijanje što većeg broja potomaka od genetski superiornih nerastova. Zbog toga se vrše se ispitivanja mogućnosti dobijanja znatno većeg broja inseminacionih doza po nerastu godišnje. Ovo povećanje je moguće postići značajnijom redukcijom broja spermatozoida u jednoj inseminacionoj dozi, sa sadašnjih 3 do 5 milijardi, na 1 do 2 milijarde). Upotrebu inseminacionih doza sa znatno redukovanim brojem spermatozoida, bez značajnog smanjenja fertiliteta osemenjenih krmača, omogućava nova tehnologija plitke intrauterine inseminacije. Za plitku intrauterinu inseminaciju (u telo materice), koriste se modifikovani kateteri za klasičnu intracervikalnu

inseminaciju. Naime, kroz klasičan katetr je provučen jedan tanji, fleksibilniji kateter, kroz koji se deponuje sperma u telo materice. Procedura inseminacije je sledeća: Vrh klasičnog katera se uvede u cervikalni kanal, kao i kod klasične inseminacije. Zatim se, kroz njega, polako, uvodi tanji kateter, sve do tela materice (u dužini od oko 20 cm), gde se izvrši depozicija inseminacione doze sperme. Dalje smanjenje volumena i broja spermatozoida u inseminacionoj dozi, moguće je postići primenom duboke intrauterine inseminacije. Ova inseminacija se izvodi transcervikalnim uvođenjem specijalnog katetera duboko u rog materice. Cilj je da se inseminaciona doza deponuje što bliže vrhu roga materice, tj. utero-tubalnom spoju. Dosadašnji rezultati pokazuju da je dovoljno uvesti fleksibilni kateter 30 do 40 cm u rog, kranijalno od bifurkacije uterusa, da bi se postigli dobri rezultati fertiliteta krmača, osemenjenih dozama volumena 10 do 20 ml, koje sadrže 1 do 5×10^8 spermatozoida. Zadovoljavajuća vrednost koncepcije se postiže i dozama volumena 0,5 ml sa 1×10^6 progresivno pokretnih spermatozoida, ako se ovakva doza, hirurškim putem (laparotomijom ili laparoskopijom), deponuje direktno u vrh roga materice.

FAKTORI KOJI UTIČU NA USPEH VO

Uspeh VO se, u praksi, meri postignutom vrednošću (%) prašenja i veličinom legla kod osemenjenih krmača. Ovi parametri fertiliteta krmača, naravno, mogu biti modifikovani uticajem brojnih genetskih i paragenetskih faktora. Međutim, sa stanovišta same tehnologije VO, fertilitet osemenjenih krmača određuju tri grupe faktora: (1) kvalitet upotrebene sperme, (2) kvalitet izvedene inseminacije i (3) postupak sa plotkinjom posle inseminacije.

Kvalitet sperme je faktor koji najčešće i najsnažnije modifikuje fertilitet osemenjenih plotkinja. Naime, loš kvalitet sperme je razlog smanjenog fertiliteta u 42,5% slučajeva, i može smanjiti % prašenja za 17%, a prosečan broj živorođene prasadi u leglu za 1,2. Osnovni parametri kvaliteta sperme su: starost sperme (interval od uzimanja ejakulata do inseminacije), loši uslovi čuvanja razređene sperme, loš kvalitet vode i razređivača, koji se koriste za razređivanje sperme, nepravilan stepen razređenja sperme, suboptimalan broj fertilno sposobnih spermatozoida u ejakulatu i/ili inseminacionoj dozi i smanjen fertilitet nerastova. Neadekvatne vrednosti svakog od ovih parametra, u određenoj meri, smanjuje fertilitet osemenjenih krmača.

Kvalitet inseminacije definišu moment inseminacije u toku estrusnog perioda, broj izvedenih inseminacija u jednom estrusu, parametri inseminacione doze i tehnika izvedene inseminacije.

Moment inseminacije. Nepravilno odabran moment inseminacije, u odnosu na početak estrusa, odnosno pojavu ovulacije, predstavlja najčešći razlog smanjenog ili potpunog izostanka fertiliteta osemenjenih krmača. Prilikom određivanja optimalnog momenta inseminacije, radi postizanja maksimalnih vrednosti parametara fertiliteta osemenjenih krmača, potrebno je uzeti u obzir sledeće činjenice: (1) da se ovulacija događa na početku zadnje trećine perioda standing estrusa, (2) da krmače sa kraćim trajanjem IZE imaju duže trajanje perioda standing estrusa i obrnuto i (3) da se maksimalne vrednosti fertiliteta krmača postižu kada se inseminacija izvede u periodu 0 do 24h pre ovulacije.

Uvažavajući ove činjenice, optimalno vreme inseminacije, u praksi, je moguće odrediti ako se:

1. Što preciznije ustanovi početak manifestacije refleksa stajanja. To se postiže ako se testiranje estrusa izvodi u prisustvu nerasta probača, najmanje dva puta u toku 24h, ali tako da razmak između dva testiranja iznosi 12h.
2. Izvedu dve do tri inseminacije, a njihovo vreme podesi prema trajanju IZE, odnosno trajanju perioda standing estrusa, tako da sve inseminacije budu izvedene u optimalno vreme u odnosu na moment ovulacije.

Tabela 26. Optimalno vreme osemenjavanja

| Početak estrusa-VO | Interval zalučenje-estrus (dani) | | | | | Nazimice | Krmače koje povadaju |
|--------------------|----------------------------------|---|----|----|------|----------|----------------------|
| | 3 | 4 | 5 | 6 | 7-10 | | |
| 0 h | - | - | - | - | * | ** | - |
| 12 h | - | - | ** | ** | * | * | ** |
| 24 h | - | * | ** | ** | - | - | ** |
| 36 h | ** | * | - | - | - | - | * |
| 48 h | ** | * | - | - | - | - | - |
| 60 h | * | - | - | - | - | - | - |

** Obavezno osemenjavanje; * Osemenjavanje je refleks stajanja ispoljen i 12h nakon zadnjeg VO.

Pravilno određen moment inseminacije značajno utiče na vrednost postignutog fertiliteta, i on nije isti kod različitih kategorija plotkinja, zbog različitog trajanja perioda refleksa stajanja i, s tim u vezi, različitog trajanja intervala od početka standing estrusa do početka ovulacije. Kod krmača je trajanje IZE dobar indikator trajanja refleksa stajanja, na osnovu koga se može, dovoljno precizno, odrediti optimalno vreme inseminacije. Ustanovljeno je da prosečno trajanje refleksa stajanja, kod zalučenih krmča, iznosi 36,4h. Međutim, postoji značajna obrnuta proporcija između trajanja IZE i trajanja refleksa stajanja. Naime, refleks stajanja je najduži (52,3h) kod krmača sa najkraćim trajanjem IZE (do 4 dana), kod krmača sa IZE 5 do 6 dana refleks stajanja traje prosečno 36 h, dok je najkraći (21 h) kod krmača sa najdužim IZE (7 i više dana). Ustanovljeno je, takođe, da vrednost (%) prašenja može biti manji za 15 do 20%, ako se prva inseminacija izvede 12 h pre i za preko 30%, ako se prva inseminacija izvede 12 h posle optimalnog momenta za krmače sa određenim trajanjem IZE.

Broj inseminacija. Za praktičnu primenu je dovoljno da se izvedu dve inseminacije, u optimalno vreme tokom standing estrusa. Treća inseminacija, u principu, ne povećava parametre fertiliteta krmača. Izuzetak su krmače sa izuzetno dugim trajanjem standing estrusa. Međutim, jedna inseminacija, u praksi, nije dovoljna, jer daje znatno niže rezultate postignutog fertiliteta.

To je zbog toga što, u praktičnim uslovima, nije moguće dovoljno precizno ustanoviti tačan moment početka refleksa stajanja, jer se estrus otkriva najviše dva puta dnevno. Tako, neki rezultati pokazuju da jedna inseminacija rezultira sa 76% prašenja i prosečno 10,45 ukupno rođene prasadi u leglu. Kada se izvedu dve inseminacije, vrednost prašenja se povećava na 90%, a broj rođene prasadi u leglu na 11,29.

Inseminaciona doza. Osnovni parametri inseminacione doze tečne razređene sperme su njen volumen i koncentracija progresivno pokretnih spermatozoida u njoj. Obično se volumen doze kreće između 50 i 150 ml (obično 80 do 100 ml), a ukupan broj progresivno pokretnih spermatozoida između 2 i 5 milijardi. Na uspeh osemenjavanja više utiče koncentracija progresivno pokretnih spermatozoida u dozi, nego njen volumen.

Tehnika inseminacije vrlo značajno utiče na fertilitet osemenjenih krmača. Na uspeh inseminacije, vrlo značajno utiču: (a) stimulacija cerviksa kateterom, pre i posle ubacivanja inseminacione doze, (b) mesto i način aplikacije inseminacione doze sperme i (c) trajanje inseminacije. Sva tri faktora imaju za cilj da stimulišu fiziološke procese pasivanog transporta

spermatozoida od mesta ubacivanja (telo materice) do utero-tubalnih spojeva, koji predstavljaju tzv. fiziološki rezervoar spermatozoida u polnom traktu krmače.

Postupak sa plotkinjom posle inseminacije. Nepravilan smeštaj, transport i/ili premeštanje plotkinja iz objekta u objekt, kao i izvođenje prirodnog posle veštačkog osemenjavanja, mogu imati znatan negativan uticaj u pogledu uspostavljanja i održavanja gravidnosti, tj. na uspeh veštačkog osemenjavanja (detaljnije videti u prethodnom poglavlju).

TEHNOLOGIJA VEŠTAČKOG OSEMENJAVANJA

Veštačko osemenjavanje je složena biotehnološka metoda, koja obuhvata sledeće postupke: (1) izbor, trening i držanje nerastova, (2) uzimanje sperme od nerasta, (3) kontrolu kvaliteta sperme, (4) razređivanje sperme i formiranje inseminacionih doza, (5) čuvanje doza razređene sperme, i (6) tehniku inseminacije. Svaki od ovih postupaka ima tačno određene principe i pravila, kojih se mora striktno pridržavati. U suprotnom, ciljevi veštačkog osemenjavanja, kao što su visok fertilitet (% prašenja i veličina legla) osemenjenih plotkinja, efikasno reproduktivno iskorištavanje nerastova, kontrola i prevencija zaraznih bolesti, mogućnost dugotrajnijeg čuvanja sperme i td., neće biti postignuti. Primena veštačkog osemenjavanja zahteva i adekvatno opremljenu laboratoriju i dobro obučenu, savesnu,iskusnu i motivisanu radnu snagu, kao i dobro organizovan i koordinisan rad.

Izbor, terening i smeštaj nerastova. Relativno je lako definisati osobine nerasta, koji se koristi za veštačko osemenjavanje. Priplodni nerast treba da ima sve osobine rase kojoj pripada, da poseduje visok genetski kapacitet za poželjna produktivna i reproduktivna svojstva, da ova svojstva prenosi na svoje potomstvo, da je potpuno zdrav, da jasno ispoljava karakteristike polnog ponašanja, da je istreniran za skok na fantoma, da daje spermu visokog fertilizacionog potencijala, tokom što dužeg vremenskog perioda. Sve ove osobine značajno zavise od nasledne osnove, i od uticaja brojnih faktora spoljašnje sredine, u kojoj se odgajaju mladi i reproduktivno iskorištavaju polno zreli nerastovi. Zbog toga, proces odgoja nerasta, koji će se koristiti za VO, mora započeti mnogo pre nego što on postigne polnu zrelost. U ovom pogledu je, od primarne važnosti, da mlad nerast, što ranije pre puberteta, bude u kontaktu sa polno zrelim mužjacima i/ili polno zrelim ženkama. U tom slučaju će znatno bolje razviti sve osobine polnog ponašanja.

Kada nerast postigne 6 do 7 meseci starosti, kontakt sa odraslim mužjacima, ženkama, prostorom za uzimanje sperme i, naravno, ljudima, mora da se intenzivira. Pre uvođenja nerasta u farmu, odnosno pre početka reproduktivne eksploatacije mladog nerasta, potrebno je da on bude u izolaciji (karantinu), tokom 30 dana. Za ovo vreme, treba detaljno ispitati njegovo zdravstveno stanje, fizičke i psihičke osobine koje su od važnosti za polno ponašanje (skok, erekcija i ejakulacija, odnosno normalno davanje sperme), ispitati genitalije (penis, testesi, skrotum, prepucijum), kao i parametre kvaliteta sperme.

Zdravlje. Prikupiti detaljne informacije o zdravstvenom stanju zapata iz kojeg dolazi nerast, kao i zdravstveno stanje samog nerasta. Za vreme 30 dana boravka u izolaciji, nerast treba da se testira na: Brucelozu, PRV, PRRS, SIV, APP i TGE. Nalazi na ove zaraze moraju biti negativni. Pozitivni nerastovi se ne uvode na farmu i ne koriste za VO.

Konstitucija i polno ponašanje su važni faktori reproduktivnog iskorištavanja nerasta. Problemi sa nogama, morfologijom penisa i psihičkim ponašanjem nerasta, značajno utiču na efikasnost dobijanja i kvalitet sperme. Ako je moguće, ovi problemi se moraju otkloniti ili se nerast mora isključiti iz upotrebe u reprodukciji.

Genitalije nerasta se moraju detaljno ispitati. Treba ustanoviti da li su normalne građe i funkcije. Penis treba da se potpuno izvuče iz prepucijuma i proveriti na eventualno prisustvo

oštećenja i/ili anomalija u građi (skraćeni frenulum i slično). Penis mora da ima sposobnost potpune erekcije. Testise treba opipati, da se ustanovi da li su simetrični i normalnog oblika i tvrdoće. Normalan testis nerasta starog 6 do 7 meseci, treba da ima minimalno 4,5 cm širine i 7 cm dužine. Nerastovi sa znatno manjim testesima imaju znatno manju koncentraciju spermatozoida u ejakulatu. To je vrlo čest razlog izlučivanja nerasta iz upotrebe.

Kvalitet sperme. Za vreme izolacije, nerasta treba istrenirati za skok na fantom, ako je u pitanju mlada životinja. Spermom mladog nerasta treba uzimati jednom nedeljno. Obično 3 do 4 ejakulata mladog nerasta imaju puno bakterija, epitelnih ćelija i mrtvih spermatozoida. U sledećim ejakulatima, ako je nerast normalan, sadržaj ovog debrisa u ejakulatu se znatno smanjuje. Postepeno treba preći na uzimanje sperme dva puta nedeljno, sa ne više od 6 dana odmora između dva uzimanja. Tada treba početi sa detaljnim ispitivanjem kvaliteta sperme. Ejakulat treba da ima minimalni volumen 120 cm, da je bistar i beličast, bez specifičnog i/ili neprijatnog mirisa, sa minimalno 15 milijardi spermatozoida, sa više od 70% progresivne pokretljivosti i sa manje od 20% morfološki abnormalnih spermatozoida, uključujući i one sa proksimalnom citoplazmatičnom kapi. Nerastovi sa lošijom spermom treba da se još detaljnije i više puta ispituju na kvalitet sperme. Ako se kvalitet duže vreme ne menja i ne postoje klinički simptomi da ova pojava može biti privremenog karaktera, nerasta treba isključiti iz dalje upotrebe.

Prvih 40 dana početka reproduktivne eksploatacije mladog nerasta, imaju odlučujući uticaj na njegovu životnu reproduktivnu performansu. Aklimatizacija obuhvata mnoge aspekte, kao što su: zdravstveni (izgradnja imuniteta), smeštaj, kontakt sa drugim nerastovima, krmačama, ljudima, ishrana i td. U tom periodu sa nerastom moramo postupati vrlo pažljivo. On treba da ima kontakt sa krmačama, ali ne direktan. Sa treningom treba započeti kada su nerastovi stari oko 4 meseca.

Reproduktivno iskorištavanje nerasta (uzimanje sperme za VO), treba započeti kada napuni 8 do 8,5 meseci. Tokom prvih nekoliko meseci, spermom treba uzimati 1 do 2 puta nedeljno, a posle toga, zavisno od nerasta, sperma se može uzimati 3 do 6 puta nedeljno. Ispoljavanje polnog ponašanja, kao i kvalitet dobijenog ejakulata, značajno zavise od ponašanja čoveka sa nerastom.

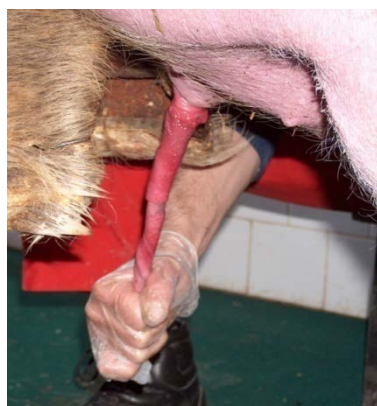
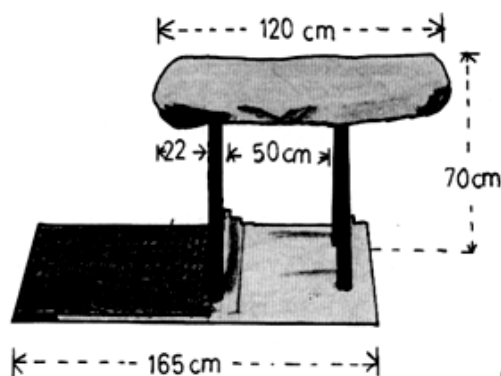
Nerastove treba držati u posebnim boksovima, sa dovoljno prostora za kretanje i prostranim ispustom. Posebno treba obratiti pažnju na tvrdoću poda, jer jako tvrdi i hrapavi podovi oštećuju papke, što ima za posledicu kraće reproduktivno iskorištavanje nerasta. Prostor u kome boravi nerast treba da je dobro provetren, čist i zaklonjen od direktnog uticaja jakog sunca. Važno je da se u prostoriji gde boravi nerast može dobro održavati temperatura i vlažnost vazduha.

Temperature preko 28⁰C, naročito dugotrajne, značajno smanjuju ukupnu produkciju i kvalitet sperme.

Uzimanje sperme od nerasta. Za uspešno dobijanje kvalitetne sperme (ejakulata), potrebno je da nerast bude naučen da izvrši skok na veštačku krmaču, tzv. fantom, da se obezbedi prostorija sa adekvatnim uslovima za uzimanje sperme, da se vodi računa o higijeni samog nerasta, čoveka koji uzima spermom i opremi koja se koristi za uzimanje sperme, kao i o adekvatnom intervalu između dva uzastopna uzimanja sperme. Ovaj interval treba da je duži kod mlađih, a kraći kod starijih nerastova, ali je bitno da se optimalno trajanje ovog intervala ustanovi za svakog pojedinačnog nerasta. Posebno je važno da se izvrši dobra stimulacija nerasta za skok i ejakulaciju, neposredno pre uzimanja sperme (navika na fantom, prostoriju, čoveka, miris fantoma na nerasta, sigurnost oslonca, adekvatna visina fantoma, mladi nerastovi treba da vrše skok u prisustvu estrične krmače).

Postoje tri osnovne metode za uzimanje sperme: *manuelna fiksacija penisa*, *veštačka vagina* i *elektroejakulacija*. U praksi se, najčešće, koristi prva metoda, jer se, pomoću nje, postiže najbolji refleks erekcije i ejakulacije, kao i najbolji kvalitet sperme. Ovo je zbog toga, što se rukom može postići jak pritisak na glans penisa, koji je, kod nerasta, primarni stimulus za izazivanje refleksa erekcije i ejakulacije.

Kada nerast izvrši skok, treba sačekati da izvrši 3 do 4 trzaja karlicom. Kada izvrši erekciju, rukom u sterilnoj plastičnoj rukavici bez talka (za jednokratnu upotrebu), treba prihvatiti glans penisa i čvrsto ga stisnuti i potpuno izvući iz prepucijuma. Glavni pritisak treba izvršiti sa prva dva prsta ruke, između prvog i drugog spiralnog zavoja glansa penisa. Tada će nerast uzastopno vršiti trzaje karlice i ejakulirati u periodu između 3 i 10 minuta. Ne smanjivati pritisak ruke na penis, sve dok se ejakulacija potpuno ne završi. Važno je dozvoliti nerastu da završi ejakulaciju, bez obzira na njeno trajanje.



Sika 35. Uzimanje sperme od nerasta, metodom manuelne fiksacije penisa

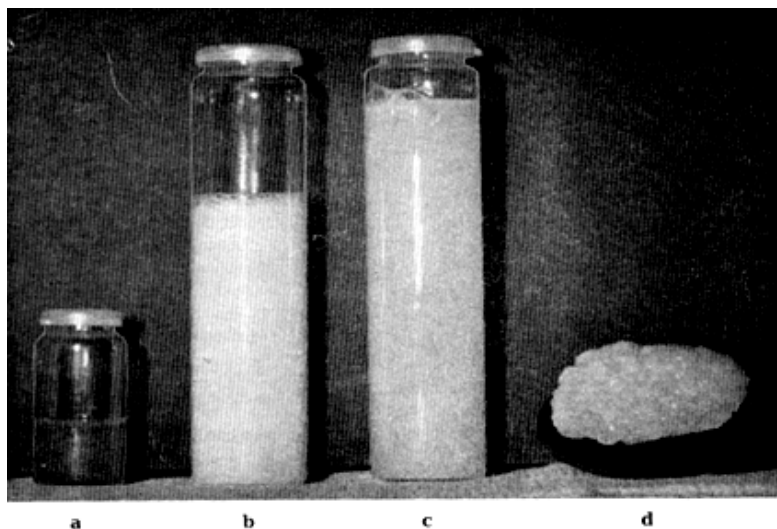
Gore je prikazan fantom, sa potrebnim dimenzijama.

Dole je veštačka vagina i moderniji fantom za uzimanje sperme od nerasta.

Posuda za uzimanje sperme treba da je zapremine 500 do 1000 ml, sterilna, zagrejana na telesnu temperaturu nerasta (39 do 40⁰C) i zaštićena od svetlosti i promene temperature. Najbolje je koristiti originalnu (fabričku) posudu. Dobro je da se u posudu stavi sterilna plastična vrećica, u koju se sakuplja sperma. Preko vrha posude treba staviti sterilnu gazu, da se spreči ulazak nečistoća i gel-frakcije sperme u spermosabirač. Nerast ejakulira u tri odvojene frakcije: 1. prespermalna, bistra tečnost sa vrlo malo spermatozoida, 2. spermalna, mlečno bela, bogata spermatozoidima (sadrži 90% od ukupnog broja spermatozoida u ejakulatu) i 3. želatinozna ili gel-frakcija. U spermosabirač treba hvatati samo drugu, spermalnu frakciju i nju koristiti za VO. Neki uzimaju i zadnju, post-spermalnu frakciju. Međutim, ako se hvata cela post-spermalna frakcija, vreme čuvanja nativne sperme (do razređivanja) treba skratiti. Najbolje je da se prikupi kompletna spermalna i malo post-spermalne frakcije.

Posuda za uzimanje sperme treba da je zapremine 500 do 1000 ml, sterilna, zagrejana na telesnu temperaturu nerasta (39 do 40⁰C) i zaštićena od svetlosti i promene temperature. Najbolje je koristiti originalnu (fabričku) posudu. Dobro je da se u posudu stavi sterilna plastična vrećica, u koju se sakuplja sperma. Preko vrha posude treba staviti sterilnu gazu, da se spreči ulazak nečistoća i gel-frakcije sperme u spermosabirač.

Nerast ejakulira u četiri odvojene frakcije: 1. *prespermalna*, bistra tečnost sa vrlo malo spermatozoida, 2. *spermalna*, mlečno bela, bogata spermatozoidima (sadrži 90% od ukupnog broja spermatozoida u ejakulatu), 3. *Postspermalna*, sa vrlo malo spermatozoida i 4. *želatinozna ili gel-frakcija*. U spermosabirač treba hvatati samo drugu, spermalnu frakciju i nju koristiti za VO. Neki uzimaju i zadnju, post-spermalnu frakciju. Međutim, ako se hvata cela post-spermalna frakcija, vreme čuvanja nativne sperme (do razređivanja) treba skratiti. Najbolje je da se prikupi kompletna spermalna i malo post-spermalne frakcije.



Slika 36. Frakcije ejakulata nerasta

a - Prespermalna, b - Spermalna, c - Postspermalna i d - želatinouni čepići.

Problemi koji se javljaju kod uzimanja sperme:

Klizav pod može uticati na volumen ejakulata. Oko fantoma treba da bude podloga koja omogućava dobar oslonac nerastu, kako bi mogao izvršiti skok i ejakulaciju.

Nepodobna visina fantoma. Ako je fantom suviše visok, nerast može da sklizne sa njega ili da se prevrne na leđa. Visina fantoma zavisi od veličine nerastova za koje se koriste. Ipak, pokazalo se da je koncentracija spermatozoida u 1ml ejakulata najveća (84 miliona), pri visini fantoma od 46 cm i da opada na 69 miliona, kod fantoma visokih 61 cm i, dalje, na 65 miliona, kod fantoma visine 74 cm, kod nerastova teških 94 do 148 kg.

Neadekvatne rukavice. Neke rukavice, bez obzira da li imaju puder ili ne, značajno povećavaju broj (%) mrtvih spermatozoida u ejakulatu. Treba upotrebljavati polivinil rukavice, bez pudera. Ako se koriste rukavice, prvo ih treba proveriti, tako što se stave u kontakt sa spermom. Posle 1 minut, ne sme se ustanoviti povećanje % mrtvih spermatozoida, od onog pre probe.

Neadekvatna priprema nerasta pre uzimanja sperme. Dugačke dlake na prepucijumu treba odrezati, a prepucijum dobro oprati. Treba dobro iscediti prepucijum, da iz njega izađe tečnost sa nečistoćama, a zatim ga dobro obrisati suvim, čistim papirom za jednokratnu upotrebu. Nije dobro da tečnost iz prepucijuma curi niz erektiran penis, za vreme ejakulacije. Ako se to dogodi, vrh penisa treba podići i ne dozvoliti da ova tečnost uđe u spermosabirač.

Neadekvatna frekvencija uzimanja sperme. Starost nerasta i vremenski period između dva uzimanja sperme (frekvencija uzimanja), značajno utiču na volumen ejakulata, % progresivno pokretnih i ukupan broj spermatozoida u ejakulatu, kao i na broj inseminacionih doza, koje se mogu napraviti od datog ejakulata. Zbog toga se, za svakog nerasta pojedinačno, mora utvrditi koji mu interval uzimanja sperme najviše odgovara!

Kontrola kvaliteta sperme. Neposredno posle uzimanja, spermu treba doneti u laboratoriju i staviti je u vodeno kupatilo, na temperaturu od 35-36⁰C. Čim se sperma malo zagreje, treba pristupiti kontroli njenog kvaliteta, tako što se, na određen način, ocenjuju i mere pojedine osobine, koje utiču na stepen njene oplodne sposobnosti. Sperma se može ocenjivati *makroskopski* (volumen, boja, miris) i *mikroskopski* (koncentracija, % pokretljivosti, % morfološki abnormalnih i % mrtvih spermatozoida). Ove ocene se moraju rutinski uraditi za svaki ejakulat, pre njegove upotrebe za VO. Ako postoje neki problem sa kvalitetom sperme, odnosno smanjenim fertilitetom osemenjenih krmača, kao i kod mladih nerastova, pre njihove upotrebe za VO, treba izvršiti i druge, specifične biohemijske, mikrobiološke i biološke testove.

Volumen, boja i miris. Normalan ceo ejakulat nerasta mora imati zapreminu veću od 150 ml. Zavisno od koncentracije spermatozoida, treba da ima mlečno belu boju. Ponekad može imati žućkastu boju, ali je obično boja slična boji obranog mleka. U ejakulatu se može naći i malo krvi, obično poreklom iz uretre, što mu daje svetlo ružičastu boju. Takav ejakulat, obično, nema smanjenu oplodnu sposobnost. Međutim, ako je boja tamnije crvena, a ejakulat ima oštar, neprijatan i/ili neobičan miris, takvu spermu ne treba koristiti. Dobra sperma ne treba da ima izražen miris, ako su higijena nerasta i uzimanja sperme zadovoljavajući. Neobičan (neprijatan) miris potiče od prepucijalne tečnosti i/ili urina, koja je jako kontaminirana bakterijama i nečistoćama. Antibiotici, koji se nalaze u razređivačima su tako dozirani da kontrolišu rast patogenih bakterija u razređenoj spermi, tokom perioda njenog čuvanja do upotrebe, a ne da smanjuju ogroman broj bakterija dospelih u spermu prilikom nehigijenskog postupka uzimanja od nerasta. Korisno je da se sperma nerastova povremeno pošalje na bakteriološku analizu. Tako se dobija informacija u prisutnim vrstama bakterijske flore i njenim izvorima na farmi, kao i preporuka za prevenciju i terapiju. Malo je poznato o direktnom uticaju broja i vrste bakterija u ejakulatu na parametre njegovog fertilizacionog kapaciteta. Ipak, pokazalo se da kontaminacija bakterijama otpornim (rezistentnim) na gentamicin, prouzrokuje aglutinaciju spermatozoida. Vrste ovih bakterija su: *Actinobacter spp.*, *Aeromonas schubertii*, *Alcaligenes spp.*, *Enterobacter cloacae* i *Serratia marcescens*.

U spermi nerasta se nalaze joši: *Bacillus sp.*, *Staphylococcus spp.*, *Flavobacterium sp.*, *Klebsiella sp.*, *Pseudomonas spp.*, *Micrococcus sp.*, *E. coli*, *Proteus sp.*, *Streptococcus sp.*, *Enterobacter sp.* i drugi. Glavni izvori kontaminacije ovim bakterijama su: laboratorijska oprema, sudovi, kateteri, nerastovi i objekti u kojima se oni drže.

Koncentracija spermatozoida je broj spermatozoida u jednom mililitru sperme. To je vrlo važan parametar kvaliteta, odnosno oplodne sposobnosti sperme. Broj spermatozoida se može odrediti metodom *hemocitometrije* i *fotometrije*.

Hemocitometrija je indirektna metoda, jer se ukupan broj spermatozoida u 1ml, odnosno u celom ejakulatu, meri na osnovu ustanovljenog broja spermatozoida u jednom malom, razređenom uzorku. Za ovu metodu se koristi *hemocitometar*, tj. staklena pločica, sa urezanom komoricom (mrežicom) za brojanje krvnih zrnaca.



Slika 38. Oprema za brojanje spermatozoida metodom hemocitometrije



Slika 39. Fotometer za određivanje parametara sperme fotometrijom



Slika 40. Oprema za citomorfološki pregled sperme CASA (levo) i protočna citometrija (desno)

Progresivna pokretljivost je sposobnost spermatozoida, koja značajno odražava njihovu oplodnu sposobnost. Spermatozoidi mogu da se kreću: (a) *progresivno* (pravo, glavom prema napred), (b) *cirkularno* (u krug), (c) *talasasto, undulentno* (trepere u mestu) ili (d) *ne pokreću se*. Za oplodnju su sposobni samo oni, koji ispoljavaju energičnu progresivnu pokretljivost. Stepen (%) progresivne pokretljivosti spermatozoida se može oceniti subjektivnom ocenom, posmatranjem pod mikroskopom i, znatno tačnijom, fotometrijskom metodom.

Postupak ocene pokretljivosti spermatozoida. Pod mikroskop se stavi zagrejana staklena predmetna pločica, na nju mala kap sperme, koja se pokrije pokrovnom ljusticom. Ocenjuje se koji broj (%) spermatozoida u vidnom polju mikroskopa, ispoljava aktivno kretanje glavom napred (progresivno kretanje). Progresivna pokretljivost se može kretati od 0% do 100%. Nepokretnost spermatozoida ne znači da su i mrtvi. Ovim postupkom se ocenjuje i tip (način) pokretanja i to rangiranjem od 0 do 5 i to:

- **0** – vrlo slabo pokretni ili nepokretni spermatozoidi;
- **1** – bez progresivne pokretljivosti, ali se spermatozoidi okreću u mestu, oko svoje uzdužne osovine;
- **2** – abnormalno kretanje, sa vrlo malo progresivne pokretljivosti;
- **3** – slaba progresivna pokretljivost, u cik-cak smeru;
- **4** – puno spermatozoida sa izraženom progresivnom pokretljivošću;
- **5** – puno spermatozoida sa vrlo snažnom i izraženom progresivnom pokretljivošću.
- Oznakom **M** se označava sperma u kojoj su svi spermatozoidi mrtvi, mada koncentracija može biti sasvim normalna (to je *azoospermija*);
- **OS** – *oligospermija*, tj. vrlo mali broj spermatozoida;
- **AS** – *aspermija*, kada se u spermi ne nalaze spermatozoidi. Pošto stepen progresivne pokretljivosti opada sa dužinom čuvanja razređene sperme, početna vrednost progresivne pokretljivosti nativne sperme treba da bude 65% i više.

Morfološki abnormalni i mrtvi spermatozoidi. Fertilizacioni kapacitet sperme, pored procenta progresivno pokretnih spermatozoida, znatno određuje i odnos morfološki normalnih i abnormalnih, odnosno mrtvih spermatozoida. Što je broj (%) morfološki abnormalnih i mrtvih spermatozoida veći, fertilizaciona sposobnost sperme je niža i obrnuto. Morfološke anomalije se mogu javiti na glavi, srednjem delu i repu spermatozoida. Tip i lokacija morfološke anomalije može ukazati na to gde, kada i koji uzrok kako je došlo do poremećaja građe spermatozoida.

Defekti glave spermatozoida se ogledaju u promeni njenog oblika. Ona može biti suviše mala ili velike, mogu postojati dve glave i td. Oblik glave može biti promenjen i zbog različitih defekata u građi i integritetu akrozoma. Pošto je akrozom veoma bitan u procesu oplodnje, spermatozoidi sa defektom akrozoma nisu sposobni za oplodnju. Defekti glave se mogu dogoditi tokom procesa formiranja spermatozoida u testisu, tokom njegovog boravka u epididimisu, kao i nepravilnom manipulacijom sa spermom posle uzimanja od nerasta.

Defekti srednjeg dela spermatozoida, tj. veze između glave i repa, mogu biti različite. Srednji deo može biti zadebljao, dupli, prelomljen i sl. Ove anomalije mogu nastati u toku formiranja spermatozoida, kao i tokom nepravilnog rukovanja sa spermom in vitro. Defekti građe ovog dela izazivaju poremećaje kretanja spermatozoida. Na ovom delu se može nalaziti jedna sitna kapljica, postavljena bliže glavi (proksimalna kap) ili početku repa (distalna kap). To je tzv. citoplazmatska kap, koja ukazuje da spermatozoid nije zreo (sposoban za oplodnju). Prisustvo većeg broja spermatozoida sa ovom kapi (posebno proksimalnom) u ejakulatu, pokazuje da je nerast suviše mlad i/ili da je interval između pojedinih uzimanja sperme suviše kratak. Takvog nerasta treba odmoriti nekoliko dana. Temperaturni sters, takođe, može uticati na povećan broj spermatozoida sa citoplazmatskom kapi.

Defekti repa spermatozoida mogu biti različiti: kratak, uvrnut, slomljen, dupli, nedostatak celog repa. Neke anomalije građe repa se događaju tokom boravka (sazrevanja) spermatozoida u epididimisu. Neke druge, kao što su nedostatak repa, slomljen ili uvrnut rep, su anomalije koje se često dešavaju kao posledica neadekvatnog postupka sa spermatozoidima tokom kontrole kvaliteta i čuvanja sperme.

Aglutinacija spermatozoida je relativno česta pojava u spermi nerasta. To je skupljanje većeg broja živih spermatozoida u veće ili manje grupice. Grupisanje mrtvih spermatozoida se ne definiše kao aglutinacija! Obično se spermatozoidi, u ovim grupicama, spajaju glavama, ređe se nalazi spajanje glava-rep ili rep-rep. Aglutinacija može biti, jednostavno, pripajanje spermatozoida za sitne kapljice gela (želatinoznog sekreta bulbouretralnih žlezda nerasta). Drugi razlog aglutinacije spermatozoida nerasta je zbog toga što njihove ćelijske membrane menjaju polaritet električnog naboja. Zbog toga dolazi do privlačenja spermatozoida sa negativnim i pozitivnim električnim nabojem. Promena električnog naboja je posledica velike količine sekreta pomoćnih polnih žlezda u spermi nerasta. Postoje dva osnovna tipa aglutinacije, prema faktorima (uzrocima) koji izazivaju promenu električnog naboja membrane spermatozoida: *hemijska* i *imunološka*. Razlozi hemijskog tipa aglutinacije su nespecifični i uključuju: stres izazvan visokom temperaturom (spoljašnjom ili telesnom), promenom pH, promenom osmotskog pritiska sperme, povećana koncentracija jona metala (magnezijum, kalcijum, teški metali), ili prisustvo organskih spermicidnih materija, kontaminacija sperme bakterijama, posebno ubikvitarnih (naročito *Escherichia coli*), kontaminacija sperme urinom i/ili drugim nečistoćama. Povećan broj mrtvih i spermatozoida sa oštećenim akrozomom, kao i povećan sadržaj epitelnih ćelija u ejakulatu.

Prema tome, ovaj tip aglutinacije se prevenira održavanjem higijene i dobrog zdravstvenog stanja nerastova, kao i poštovanjem svih principa pravilnog manipulisanja sa spermom tokom uzimanja, kontrole kvaliteta, razređivanja i čuvanja. Imunološka aglutinacija je vrlo specifična, ali i retka pojava kod normalne sperme nerasta. Naime, specifične komponente membrane spermatozoida mogu delovati kao antigeni i izazvati proizvodnju specifičnih antitela.

Tabela 27. Poželjne vrednosti parametra kvaliteta native sperme, koja će se koristiti unutar 24h posle uzimanja i razređivanja

| Vrednosti | Normalne vrednosti | Granične vrednosti |
|---|--------------------------|---------------------------|
| Volumen ejakulata | 100-500 ml | min. 120 ml |
| Ukupan broj spermatozoida u ejakulatu | 10-100 x 10 ⁹ | min. 10 x 10 ⁹ |
| Progresivna pokretljivost | 70 – 95% | min. 65% |
| Aglutinacija (% pokrivenosti vidnog polja mikroskopa) | 0 – 10% | max. 25% |
| Morfološke anomalije | 5 – 15% | max. 35% |
| Abnormalnosti akrozoma | 5 – 10% | max. 45% |
| Proksimalna citoplazmatska kap | 5 – 10% | max. 40% |
| Distalna citoplazmatska kap | do 80% | max. 60% |

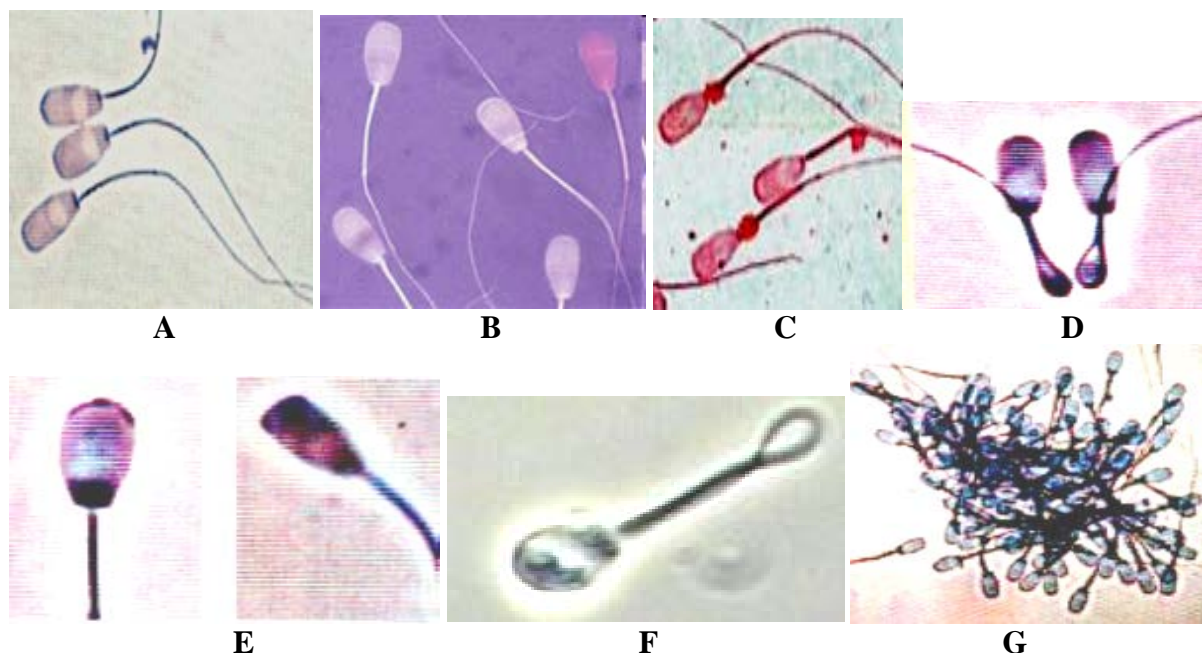
Ejakulate sa povećanom aglutinacijom treba detaljno ispitati i ustanoviti njihov uticaj na fertilitet osemenjenih krmača. Ako nema smanjenog fertiliteta, ejakulat sa aglutinacijom se može koristiti za VO. Međutim, prisustvo aglutinacije otežava određivanje broj i

pokretljivosti spermatozoida, a povećava i sedimentaciju spermatozoida u dozama za VO, što smanjuje njihovu fertilizacionu sposobnost.

Određivanje broja mrtvih i morfološki promjenjenih spermatozoida u nativnoj i razređenoj spermi se može izvršiti pravljenjem trajnih histoloških preparata, različitim metodama bojenja spermatozoida, kao i metodom fotometrije.

Za praksu je najpodesnija metoda bojenja spermatozoida po *Blom-u*. Ona se zasniva na činjenici da se glave mrtvih spermatozoida boje crvenom histološkom bojom (eozin), dok glave živih ostaju nebojene. To je zbog toga što ćelijska membrana živih spermatozoida ne propušta ovu boju u unutrašnjost ćelije (glave) spermatozoida. Postoje i druge metode histološkog bojenja spermatozoida, kojima se može detaljnije ispitivati njihova morfologija.

Detaljnija ocena stepena oplodne sposobnosti i kvaliteta sperme se ocenjuje i drugim fiziko-hemijskim, biološkim i mikrobiološkim metodama. Ove metode se primenjuju kod mladih nerastova, pre njihove upotrebe za VO, da se dobije preciznija slika kvaliteta njihove sperme, kao i kod ejakulata kod kojih postoji sumnja na lošiju oplodnu sposobnost i/ili različita obolenja.



Slika 41. Spermatozoidi nerasta

A – Normalni, B – Obojeni po Blom-u (glava mrtvog je obojena crveno), C – Spermatozoidi sa citoplazmatskom kapi (proksimalna citoplazmatska kap, dva gornja, distalna kap kod spermatozoida u sredini), D – Spermatozoidi sa uvrnutim repom (abnormalni), E - Oštećen akrozom, F - Uvrnut rep i loptata glava, G - Aglutinacija.

Fizičko-hemijskim metodama se određuju *otpornosti (rezistencije)* spermatozoida na izotoničan (1% vodeni rastvor) NaCl i stepen *preživljavanja* spermatozoida izloženih temperaturnom stresu, tj. niskim ili povišenim temperaturama. Biohemijskim metodama se određuje prisustvo različitih neorganskih i organskih materija u spermi, dok se mikrobiološkim metodama određuje prisustvo raznih mikroorganizama. U posljednje vreme se primenjuje biološka metoda određivanja stepena oplodne sposobnosti spermatozoida *in vitro*. Naime, izvrši se *in vitro* oplodnja jajnih ćelija i, na osnovu broja spermatozoida u njihovoj zoni pelucidi, ocenjuje se stepen oplodne sposobnosti spermatozoida.

Razređivanje i čuvanje sperme. Neposredno posle izvršene kontrole kvaliteta, nativna sperma (ejakulat) se razređuje i čuva, pod određenim uslovima, do momenta upotrebe za VO.

Razređivanje sperme se vrši iz dva osnovna razloga: (1) da se poveća volumen nativnog ejakulata, kako bi se mogao napraviti veći broj inseminacionih doza i (2) da se spermi dodaju potrebne hranljive, zaštitne i druge materije, koje obezbeđuju uslove da spermatozoidi zadrže što duže visok stepen oplodne sposobnosti. Parametri, koji određuju broj inseminacionih doza, koji se može napraviti od jednog ejakulata su: (1) volumen ejakulata, (2) ukupan broj spermatozoida u ejakulatu, (3) % progresivne pokretljivosti, (4) broj spermatozoida u jednoj inseminacionoj dozi i (5) volumen razređene sperme u inseminacionoj dozi. Na osnovu ovih parametara ejakulata i doze, određuje se stepen razređenja ejakulata, tj. odnos volumena ejakulata i razređivača, koji se u njega dodaje. Pri tome, treba uvek imati na umu činjenicu da se tolerancija na isti stepen razređenja, može razlikovati između pojedinih nerastova, odnosno njihovih ejakulata.

Naime, ejakulati dva različita nerasta mogu imati potpuno identične navedene parametre, na osnovu kojih se određuje broj mogućih doza, koji se može od njih napraviti. To znači da bi oba ejakulata trebalo razrediti u istom odnosu. Međutim, može se desiti da spermatozoidi jednog nerasta (ejakulata) ne podnose zadati stepen razređenja, što će imati za posledicu smanjenje fertilizacione sposobnosti takve sperme posle razređivanja. S tim u vezi, za svakog nerasta treba da se odredi maksimalan stepen razređenja, koji podnosi njegova sperme. Kako je ova osobina genetski određena, dovoljno je da se tolerancija sperme na određen stepen razređenja jednom odredi za svakog nerasta. Najbolje na početku njegovog korišćenja za VO. Prilikom postupka razređivanja, nativna sperma, razređivač i posude u kojima se vrši razređivanje, treba da budu zagrejani na istu temperaturu (37⁰C). Razređivanje se vrši tako da se razređivač sipa polako, uz zid menzure, u spermu. Ne sperma u razređivač! Posle razređivanja, spermu treba staviti u vodeno kupatilo, na istu temperaturu, da se malo smiri (tzv. ekvilibracija sperme). Zatim se pristupa rastakanju razređenog ejakulata u određen broj plastičnih flašica, od kojih svaka predstavlja jednu inseminacionu dozu, volumena 80 do 100 ml. Od jednog ejakulata se, najčešće, može napraviti 10 do 30 inseminacionih doza, što zavisi od starosti i rase nerasta, frekvencije uzimanja sperme, kao i parametara kvaliteta sperme, koji mogu značajno varirati između pojedinih nerastova, ali i kod jednog istog nerasta, čak i onda kada se ne vide neki posebni razlozi za to. Neposredno posle formiranja inseminacionih doza, treba ponovo, pod mikroskopom, proveriti stepen progresivne pokretljivosti spermatozoida. Zatim, inseminacione doze treba držati na sobnoj temperaturi (21⁰C), tokom 1 sat, a potom ih staviti u termo-boks, na temperaturu od + 17⁰C! To je optimalna temperatura čuvanja tečne razređene sperme nerasta, sve do momenta upotrebe (zavisno od primenjenog razređivača, vreme čuvanja može biti između 1 i 10 dana). Ako se sperma čuva 24 h i više, bočice sa razređenom spermom treba 2 puta dnevno blago promešati, da se sedimentirani spermatozoidi ponovo pomešaju sa razređivačem.

Tabela 28. Parametri jedne inseminacione doze, volumena 100 ml

| Parametri doze | Broj spermatozoida u dozi (milijarde) | | | |
|---|---------------------------------------|--------|--------|------|
| | 5 | 4 | 3 | 2 |
| Progresivna pokretljivost | 60-70% | 70-80% | 80-90% | >90% |
| Spermatozoidi sa normalnim akrozom | 50-60% | 60-70% | 70-90% | >90% |
| Spermatozoidi sa uvrnutim repom | 30-40% | 20-30% | 5-20% | <5% |
| Spermatoz. sa proksimalnom citopl. kapi | 35-50% | - | - | - |
| Spermatozoidi sa distalnom citopl. kapi | 50-80% | - | - | - |

Čuvanje razređene sperme. Razređena sperma se može čuvati u tečnom stanju (1 do 10 dana) i dubokim zamrzavanjem, na temperaturi tečnog azota, -196°C (više nedelja, meseci ili godina). U praktičnoj proizvodnji se koristi tečna razređena sperma, koja može biti čuvana kratkotrajno (do 3 dana) ili dugotrajno (4 do 10 dana).

Kratkotrajno čuvanje tečne razređene sperme:

- Period čuvanja do 3 dana.
- Uzima se kompletna spermalna i deo postspermalne frakcije ejakulata, bez gela.
- Volumen doze je 80 do 100 ml.
- Broj spermatozoida u dozi je od 3 do 5 milijardi.
- Koriste se razređivači za kratkotrajno čuvanje tečne razređene sperme.
- Temperatura čuvanja je $+17^{\circ}\text{C}$.

Dugotrajno čuvanje tečne razređene sperme:

- Period čuvanja od 4 do 10 dana.
- Uzimaju se samo ejakulati nerastova visokog fertilizacionog kapaciteta, čija sperma podnosi veća razređenja i duži period čuvanja.
- Koristi se samo spermalna frakcija ejakulata, bogata spermatozoidima (60-100 ml).
- Ejakulat se uzima jednom nedeljno od mladih i 2 puta nedeljno od starih nerastova.
- Stepenu razređenja je 1 : 10, sa razređivačima za dugotrajno čuvanje sperme.
- Temperatura čuvanja je $+17^{\circ}\text{C}$.

Čuvanje sperme dubokim zamrzavanjem:

- Koristi se samo spermalna frakcija ejakulata nerastova visokog fertiliteta.
- Centrifugiranje, da se eliminišu soli iz semene tečnosti.
- Sperma se razredi, tako da se postigne koncentracija od 600.000 spermatozoida/ml.
- Specijalni razređivači, koji sadrže žumance jajeta, TRIS i glukozu. Dodaju se i krioprotektantne materije (na primer 1-2% glicerola).
- Ekvilibracija razređene sperme, tokom 2h, na temperaturi $+20^{\circ}\text{C}$.
- Postepeno hlađenje do $+5^{\circ}\text{C}$.
- Dodavanje razređivača BF5 i glicerola.
- Pakovanje u makro-pajete (5-8 ml) ili u mikro-pajete (0,5 do 0,2 ml).
- Zamrzavanje u pari tečnog azota, na -196°C .

Važno je znati da kvalitet sperme, tj. njena oplodna sposobnost opada sa dužinom čuvanja, bez obzira na način čuvanja i upotrebljenu vrstu razređivača. To znači da će rezultati osemenjavanja (% prašenja i veličina legla) biti sve niži, što je duži period između uzimanja i upotrebe sperme za VO. Takođe treba znati da se nerastovi razlikuju po stepenu tolerancije njihove sperme na dužinu čuvanja. Ovo je genetski određena osobina, pa je treba ustanoviti za svakog pojedinačnog nerasta. Prilikom razređivanja i čuvanja sperme, treba posebno obratiti pažnju na sledeće:

1. Period između uzimanja i razređivanja sperme. Ako se koristi samo spermalna frakcija sperme (bogata spermatozoidima), razređivanje treba izvršiti unutar 10 do 15 minuta posle uzimanja. Ceo ejakulat (spermalna + postspermalna frakcija) može biti razređen 30 do 60 minuta posle uzimanja. Izrazito gust ceo ejakulat treba razrediti unutar 15 minuta od uzimanja. Posude za uzimanje i razređivanje sperme, treba da budu zagrejane na $37-38^{\circ}\text{C}$.

2. Treba koristiti dobre i sveže razređivače. Ako se koriste praškasti razređivači, u većim pakovanjima, otvoreno pakovanje ne sme biti u frižideru, jer će absorbovati vodu, pa će hemijske komponente biti promenjene. Antibiotici se dodaju u razređivač neposredno pre upotrebe.

3. Loš kvalitet vode ima negativan uticaj na pokretljivost i oplodnu sposobnost spermatozoida. Treba koristiti re-destilovanu i sterilisanu vodu za razređivače. U takvoj vodi se ne smeju nalaziti organske materije i druge štetne materije za spermatozoide.

4. Razređivač treba da bude pripremljen najmanje 60 minuta pre upotrebe. Za ovo vreme se stabilizuje pH vrednost o osmotski pritisak razređivača. Pripremljen razređivač treba čuvati do upotrebe u vodenom kupatilu, na 38⁰C.

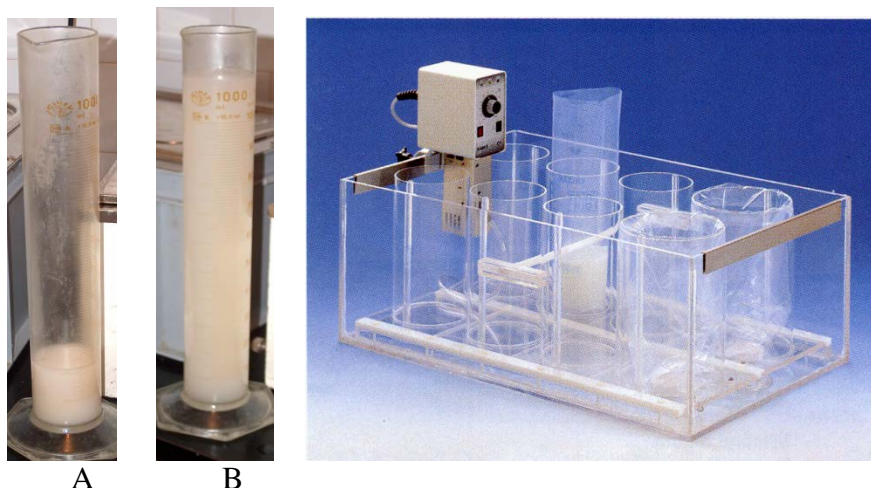
5. Razređivač sipati polako u spermu, a ne obrnuto. Da bi se izbegao šok spermatozoida, koji može nastati zbog razlike u pH i/ili osmotskom pritisku između sperme i razređivača, treba primeniti dvofazno razređivanje. Određen volumen razređivača se podeli na dva jednaka dela. Prvo se, u spermu sipa jedan deo volumena razređivača, a posle 5 do 10 minuta drugi deo.

Vrsta razređivača, kao i početna koncentracija spermatozoida u nativnoj spermi, utiču na optimalan stepen razređenja, kao i na moguć period čuvanja razređene sperme.

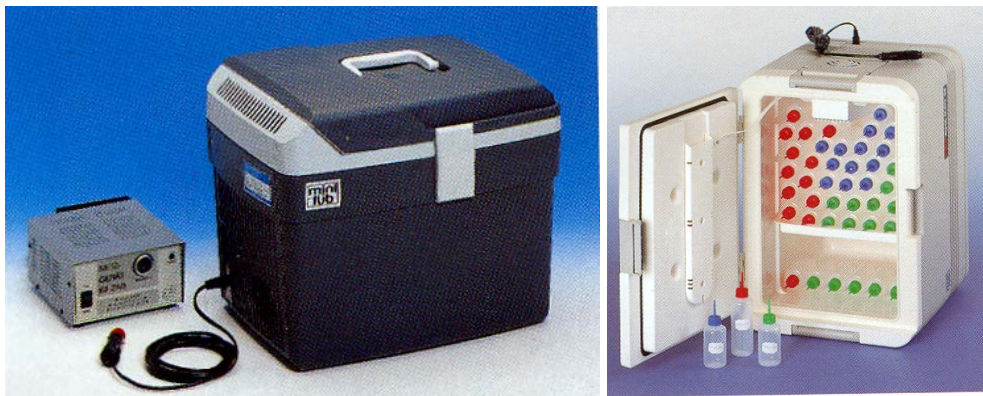
6. Obavezno prekontrolisati stepen progresivne pokretljivosti u razređenoj spermi. Minimalno dozvoljena vrednost je 60%. Osemenjavanje dozama sa manje od 60% progresivno pokretnih spermatozoida, ima za rezultat značajno nižu vrednost uspešne koncepcije plotkinja. Morfologiju spermatozoida nije potrebno pregledati svaki put kada se uzme ejakulat od nerasta, ali je to potrebno vršiti tokom toplih letnjih meseci i tokom rane jeseni. Povećan broj spermatozoida sa citoplazmatskom kapi, abnormalnom glavom i repom, ukazuje na to da je nerast doživeo temperaturni stres.

7. Razređenu spermu treba čuvati na temperaturi + 17⁰C i zaštititi od uticaja ultravioletnih zraka, sve do upotrebe. Najbolje je da se doze razređene sperme čuvaju u specijalnim termo-boksovima. Doze koje se duže čuvaju, treba pažljivo pomešati, svakih 12h, da se spermatozoidi pomešaju sa razređivačem.

8. Za svakog nerasta treba odrediti toleranciju sperme na maksimalan stepen razređenja i na maksimalan period čuvanja, tokom koga sperma, u datom razređenju, zadržava zadovoljavajuću progresivnu pokretljivost. Ustanovljeno je, naime, da se ovi parametri značajno razlikuju između pojedinih nerastova. Istraživanja koja su izveli *Stančić i sar. (2003)*, pokazuju da svega oko 20% vojvođanske populacije nerastova podnosi veći stepen razređenja i čuvanje na +17⁰C tokom 72h. Ovo, praktično, znači da od ejakulata sa identičnim parametrima kvaliteta (volumen, broj spermatozoida i % progresivne pokretljivosti), dva različita nerasta, nije uvek moguće napraviti isti broj inseminacionih doza, jer ih nije moguće razrediti u istom odnosu, niti je dobijene doze moguće čuvati isto vreme do upotrebe.



Slika 42. Nativni (A) i razređeni ejakulat (B) i vodeno kupatilo za čuvanje ejakulata pre razređivanja (desno)



Slika 43. Prenosni klima box za kratkotrajno čuvanje doza, na +17°C



Slika 44. Ručno i automatsko formiranje inseminacionih doza



Slika 45. Bočice i tuba za inseminacione doze sperme

Tehnika veštačke inseminacije. Pravilno izvedena tehnika veštačke inseminacije, u značajnoj meri utiče na postignutu vrednost (%) uspešne koncepcije i veličinu legla osemenjenih krmača. Pre početka ubacivanja sperme, potrebno je uvesti inseminacioni kateter u cerviks i, njegovim naizmeničnim povlačenjem napred-nazad, stimulisati cerviks. Na taj način se stimuliše oslobađanje oksitocina iz neurohipofize, koji izaziva antiperistaltičke

(usisavajuće) kontrakcije rogova materice. Tim kontrakcijama se vrši pasivan transport spermatozoida do utero-tubalnih spojeva. Ove kontrakcije rogova se dešavaju naizmenično, svakih 1 do 1,5 minuta, a između svake kontrakcije nastaje pauza, sličnog trajanja. Zbog toga je jako bitno da usisavanje sperme traje onoliko dugo, koliko traju kontrakcije materice (obično je to 5 do 8 minuta). Tako se postiže podjednak raspored doze sperme u oba roga materice, i sprečava značajniji refluks (izbacivanje) sperme iz materice u spoljašnju sredinu, tokom procesa inseminacije. Oba ova faktora bitno određuju stepen oplodnosti ovuliranih jajnih ćelija, na oba jajnika i, time, vrednost prašenja i veličinu legla osemenjenih krmača. Za krmaču je normalno da, tokom 0,5 do 2,5 h posle inseminacije, izbaci 70 do 80% unetog volumena sperme, u kome se nalazi oko 30 do 40% od ukupnog broja unetih spermatozoida. To je jedan od fizioloških načina na koji materica reguliše optimalan broj spermatozoida u utero-tubalnim spojevima i na mestu oplodnje (ampula jajovoda) i to ne utiče na fertilitet osemenjene krmače, nego ga optimalizuje. Međutim, ako zbog nepravilno izvedene tehnike inseminacije, ili zbog toga što se ona ne izvodi u optimalno vreme, bude izbačeno samo 5% unetog volumena sperme, parametri fertiliteta se znatno smanjuju ili do oplodnje i ne dolazi. S tim uvezi, pokušava se i sa tzv. trofaznom inseminacijom. Kod ovog postupka se, prvo, ubacuje 35 ml pred-razređivača (Pre-SUS), zagrejanog na 37 do 42⁰C, radi stimulacije materičnih kontrakcija, odnosno boljeg transporta sperme. U drugoj fazi se ubacuje 80 do 100ml razređene sperme, sa 3 do 4 milijarde spermatozoida. Na kraju se ubacuje oko 15 ml tapioka-gela, radi prevencije refluksa sperme iz materice. Ovim načinom inseminacije se, u stvari, imitira proces ejakulacije nerasta kod kopulacije. Naime, nerast ejakulira u tri faze. Prva faza je bistra tečnost (spermalna plazma), koja sadrži vrlo malo spermatozoida, a čine je sekreti vezikularnih žlezda, prostate i uretre. Druga faza je gusta, beličasta i bogata spermatozoidima i čini 20% ukupnog volumena ejakulata. Treća faza sadrži dosta bistre tečnosti, sa ponekim spermatozoidom, a na kraju se ejakulira granulozni gel, koji je sekret bulbo-uretralnih žlezda. Istraživanja u Meksiku pokazuju da trofazna inseminacija povećava vrednost prašenja za oko 5% i veličinu legla za 0,53 praseta, u odnosu na klasičan način inseminacije. Bolji rezultati fertiliteta se postižu i ako se krmače tretiraju intravulvalnom injekcijom 5ij. oksitocina, datom neposredno pre inseminacije, ili ako se dupla doza (10ij.) oksitocina ubaci u inseminacionu dozu sperme. Sličan efekat se može postići i tretmanom krmača malim dozama PGF₂ □ Fiziološki mehanizam, koji kontroliše ovaj efekat, nije potpuno jasan. Verovatno je, međutim, da oba hormona stimulišu bolji transuterini transport spermatozoida i ubrzavaju početak ovulacije. Tako se postiže bolja sinhronizacija između inseminacije i ovulacije, što je bitan uslov efikasne oplodnje. U poslednje vreme se primenjuje nehiruruška duboka intrauterina inseminacija. Ova tehnika se sastoji u tome da se fleksibilni endoskop, provučen kroz inseminacionu spiretu, uvede kroz cerviks, sve do blizu utero-tubalnih spojeva, u koje se deponuje inseminaciona doza. Cela procedura se pokazala lakom za izvođenje i traje 4 do 5 minuta. Na ovaj način se koristi oko 100 puta manja doza sperme, od klasične (3 x 10⁹ spermatozoida, u 80 do 100ml). Na ovaj način je izvršeno osemenjavanje dozama sa 100, 20 ili 5 x 10⁷ spermatozoida i postignuto je 86,6%, 88,9% i 92,3% prašenja.

Vrednost prašenja krmača osemenjenih na klasičan način, dozama sa 3 x 10⁹ spermatozoida, iznosila je 87,5%, a prosečna veličina legla je bila nešto veća (10,02 prasadi) od one dobijene klasičnom tehnikom inseminacije (9,41).

Prilikom izvođenja inseminacije, važno je pridržavati se sledećih principa:

- ✓ Plotkinja mora da ispoljava potpuni refleks stajanja
- ✓ Koristiti adekvatne i sterilne katetere i ostalu opremu za inseminaciju
- ✓ Higijena plotkinje, inseminatora i objekata
- ✓ Uvesti kateter u ispravan deo kanala grlića materice

- ✓ Izvršiti dovoljnu stimulaciju grlića materice, pre i posle ubacivanja doze sperme
- ✓ Dozvoliti da krmača sama usisava spermu iz flašice za inseminaciju
- ✓ Prisustvo nerasta prilikom inseminacije

Postupak veštačke inseminacije:

1. Oprati vulvu i njenu okolinu čistim sunderom, i obrisati čistom krpom.
2. Namazati vrh katetera sterilnim, neutralnim uljem ili tečnim parafinom (najbolje je koristiti kateter za jednokratnu upotrebu, koji ima plastičnu navlaku, sa kojom se kateter uvede u vaginu, a navlaka se izvuče).
3. Jednom rukom razdvojiti usmine vulve, a drugom uvesti kateter u vaginu, pod uglom od oko 30⁰ prema leđima i uvući ga 5 do 6 cm u vaginu.
4. Zatim kateter ispraviti i gurati ga napred, dok se ne oseti malo jači otpor, što je znak da je vrh katetera na ulazu u kanal grlića materice.
5. Okretanjem katetera u smeru suprotnom od kretanja kazaljke na satu, pažljivo gurati kateter u kanal grlića materice.
6. Izvršiti stimulaciju grlića, tokom 1,5 do 2 minuta, tako što se kateter povlači napred – nazad (okretanjem u smeru obrnutom i istom kazaljki na satu).
7. Zatim treba pažljivo pogurati vrh katetera dublje u cervikalni kanal, sve dok se ne oseti otpor. Da je vrh katetera dobro zabavljen u kanalu grlića materice, osetiće se po tome što ostaje stegnut, a kad se pusti, sam se okrene za oko ¼ kruga, u smeru kazaljke na .
8. Spojiti vrh inseminacione plastične bočice sa zadnjim krajem katetera, a bočicu sa spermom držati podignutu nagore.
9. Blagim pritiskom na bočicu, započeti ubacivanje sperme. Blago pomicanje katetera će omogućiti bolje usisavanje sperme. Važno je da krmača sama usisava spermu. Takvo usisavanje traje minimalno 2,5 do 3 minuta. Nikako nasilno, pritiskanjem flašice, ubacivati spermu. To će imati za posledicu isticanje većeg dela sperme napolje.
10. Kada je ubačena kompletna doza sperme, ponovo izvršiti stimulisanje cerviksa, povlačenjem katetera napred – nazad, u trajanju 1,5 do 2 minuta, a zatim polako izvući kateter iz polnih organa plotkinje.

Inseminacija se obavlja u prisustvu nerasta. To će obezbediti da plotkinja dobro ispolji refleks stajanja i poboljšati antiperistaltičke kontrakcije materice. Kontrakcije se pojačavaju i opisanom stimulacijom cerviksa, vrhom katetera. Dobre kontrakcije materice su veoma važne za pravilan raspored i transport doze sperme u rogovima materice, što je veoma bitno za uspešnu oplodnju! Ako se tehnika inseminacije izvodi ispravno (poštujući navedene principe i postupke), plotkinja će usisati kompletnu dozu sperme i neće biti refluksa (povratka) sperme u spoljašnju sredinu.

To je jako važno za uspeh inseminacije. Pokazalo se, naime, da se vrednost koncepcije značajno smanjuje, ako krmača, tokom inseminacije, izbaci samo 5% od celokupne doze sperme. Sa druge strane, za krmaču je normalno da, unutar 30 minuta do 2 sata posle inseminacije, izbaci i preko 70% od ukupnog volumena ubačene doze sperme, u kome se nalazi oko 30% ukupnog broja unesenih spermatozoida. Ipak, to ne utiče na vrednost koncepcije. Naprotiv, to dokazuje da je inseminacija izvršena na vreme, kada postoje peristaltičke kontrakcije materice, kojima krmača određuje optimalan broj spermatozoida u vrhovima rogova materice i u jajovodima. Kvalitet izvedene inseminacije se može oceniti na osnovu ponašanja krmače i određenih pojava, koje se događaju tokom procesa inseminacije. Ova ocena pokazuje da li se osemenjavanje vrši na vreme i da li postoje eventualna oštećenja i/ili obolenja, posebno reproduktivnih organa krmače.

Tabela 29. Ocena kvaliteta izvedene inseminacije

| Pokazatelj | Ocena kvaliteta inseminacije | | |
|---------------------------------------|------------------------------|------------------------|------------------|
| | 1 | 2 | 3 |
| Refleks stajanja | Jako nemirna | Slabo stoji | Stoji mirno |
| Zabavljenost vrha katetera u cerviksu | Ne oseća se | Vrlo slabo | Potpuno izraženo |
| Povratak sperme | Velika količina | Mala količina | Nema |
| Krv na kateteru | Velika količina | Mala količina | Nema |
| Gnoj na kateteru | Prisutan | Nema | Nema |
| Gnojni iscedak | Prisutan | Nema | Nema |
| Trajanje inseminacije | Manje od 90 sekundi | 90 sekundi do 3 minuta | Više od 3 minuta |

Tabela 30. Problemi kod inseminacije, mogući razlozi i postupci rešavanja

| Problem | Mogući razlozi | Postupci rešavanja |
|---|---|--|
| Nema refleksa stajanja, ili je on slabo izražen | - plotkinja nije u estrusu - rani ili kasni estrus | - proveriti evidenciju - odložiti VO za 12h: ako tada stoji osemeniti ili testirati dok ne stane. |
| Kateter ne ulazi u cerviks | - plotkinja nije u estrusu - rani ili kasni estrus - poremećaj građe cerviksa | - ne gurati nasilno kateter u cerviks; izvući kateter iz vagine. - proveriti evidenciju - odložiti VO za 12h - ako postoji problem, prijaviti veterinaru |
| Povratak sperme, curi iz vagine napolje | - plotkinja nije u estrusu - rani ili kasni estrus - nasilno istiskivanje sperme, pritiskom flašise - poremećaj građe cerviksa | - proveriti evidenciju - odložiti VO za 12h - ne pritiskati flašicu; dozvoliti da plotkinja sama usisava spermu - odložiti VO za 12h - ako je problem, javiti veterinaru |
| Krv na kateteru | - ozlede ili poremećaj polnih organa | - prekinuti VO - prijaviti veterinaru |
| Gnoj na kateteru | - obolenje polnih organa (endometritis) | - prekinuti VO - prijaviti veterinaru |
| Gnojni iscedak iz vagine | - obolenje polnih organa, bubrega, mokraćevoda, mokraćne bešike ili uretre | - ne uvlačiti kateter - prijaviti veterinaru |
| Inseminacija traje kraće od 90 sekundi | - rani ili kasni estrus | - odložiti VO za 12h |

Laboratorija i oprema za VO. U laboratoriji za veštačko osemenjavanje se vrši makroskopska i mikroskopska ocena sperme, njeno razređivanje i čuvanje do momenta upotrebe. Osim toga, u ovoj laboratoriji se vrši pranje i sterilizacija instrumenata i druge opreme za VO, kao i higijena ljudi, koji rade na VO. Ovoj nameni treba prilagoditi građevinsko-tehničke uslove i opremu laboratorije za VO.

Laboratorija za VO treba da ima najmanje tri odeljenja (prostorije): za manipulaciju sa spermom, za pranje i sterilizaciju instrumenata i druge opreme i za održavanje lične higijene radnika. Podovi treba da se lako peru, zidovi da su obloženi keramičkim pločicama, barem 1,5 m od poda. Potreban je sto za mikroskop i manipulaciju sa spermom, dupli lavabo, bojler sa toplom i hladnom vodom, ormari za držanje instrumenata i opreme, kao i dovoljan broj električnih utičnica u zidovima. Treba da je dobro osvetljena, ali tako da je sperma zaštićena

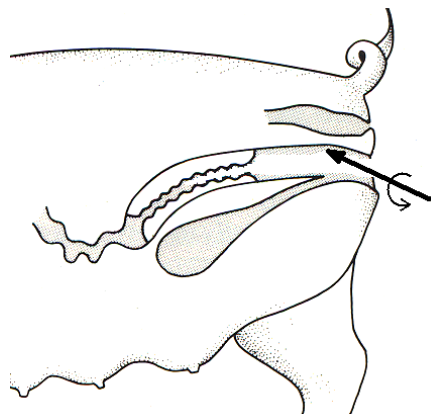
od direktnog uticaja sunčeve svetlosti, odnosno ultravioletnih zraka. Na prozorima treba da se nalaze mrežice, radi zaštite od insekata (muve). Prostorije laboratorije treba da su veoma blizu prostoriji u kojoj se uzima sperma od nerasta, tako da se sperma donese u laboratoriju najkraćim putem.

Najbolje je da između ove dve prostorije postoji jedan prozorčić, kroz koji se sperma dodaje u laboratoriju, tako da oni koji uzimaju spermu ne ulaze u laboratoriju. U laboratoriji treba da se nalazi oprema za efikasnu kontrolu kvaliteta sperme, čuvanje sperme do momenta upotrebe, oprema za sterilizaciju instrumenata i svega što dolazi u dodir sa spermom. Princip savremenog VO je da se koristi oprema za jednokratnu upotrebu (kateteri, spermosabirači, filteri, rukavice i td.).

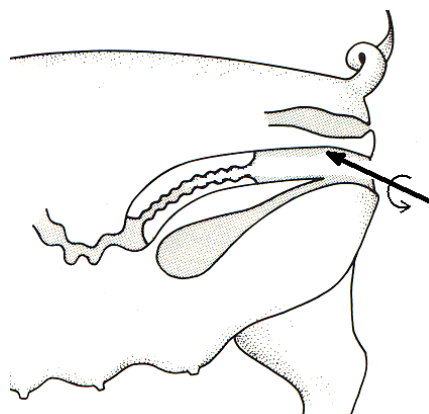


Slika 46. Metode otkrivanja estrusa

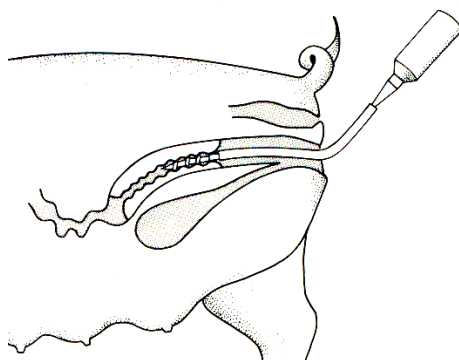
Punim kontaktom sa polno zrelim nerastom (*gore*), Izazivanjem lumbo-sakralnog refleksa uz prisutvo nerasta (sredina), nepotpunim kontaktom, preko ograde, sa polno zrelim nerastom (*dole levo*) i merenjem električnog otpora vaginalne sluzi (*dole desno*).



1. Vrh katetera se uvodi u vaginu, okrenut prema leđima krmače, pod uglom od oko 35° , rotirajući ga u smeru obrnutom od kazaljke na satu.

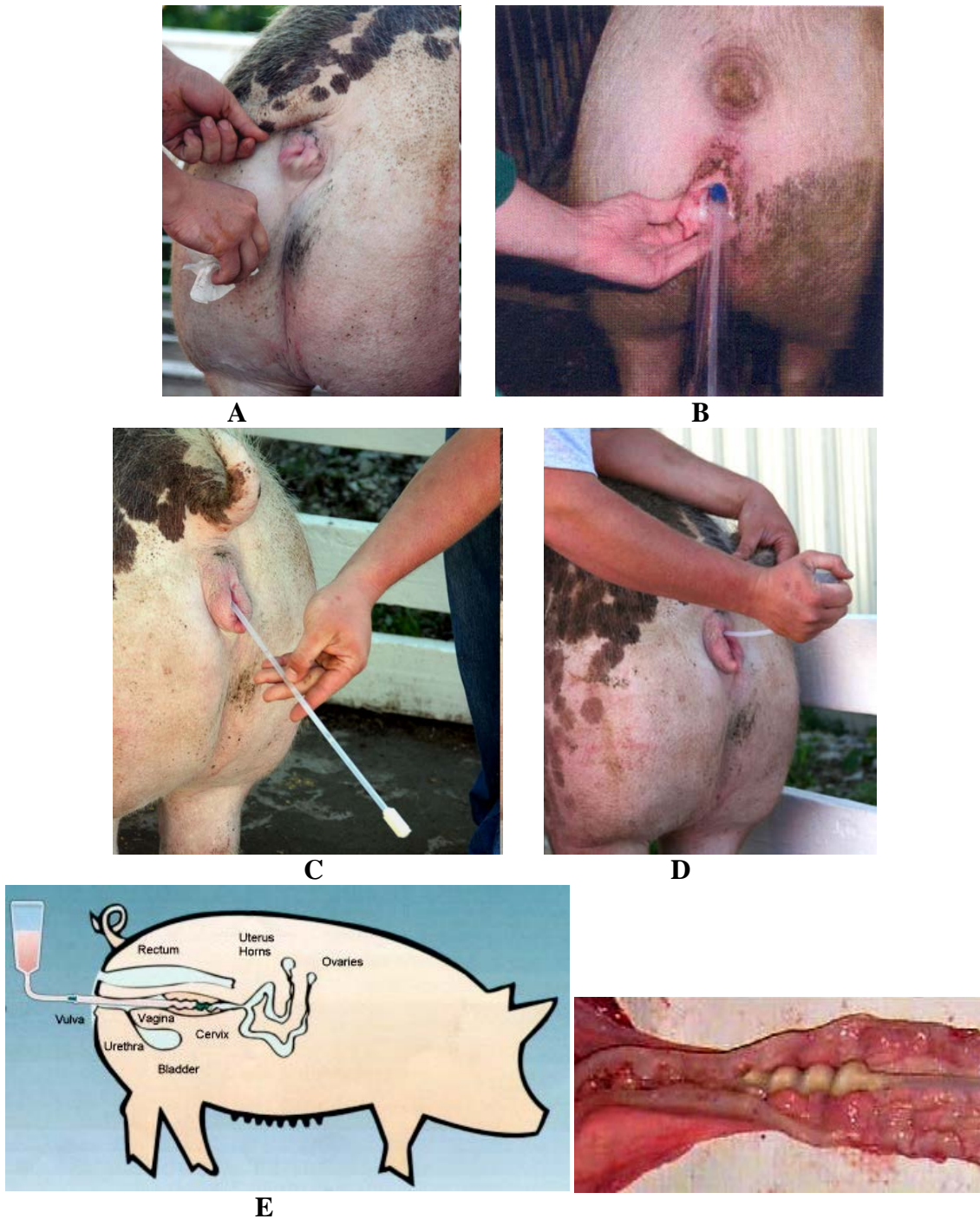


2. Zatim se kateter ispravi u vodoravan položaj i nastavi sa uvođenjem u vaginu, sve dok se ne oseti blagi otpor. To je znak da je vrh katetera dospelo do ulaza u grlić (cervix) materice.



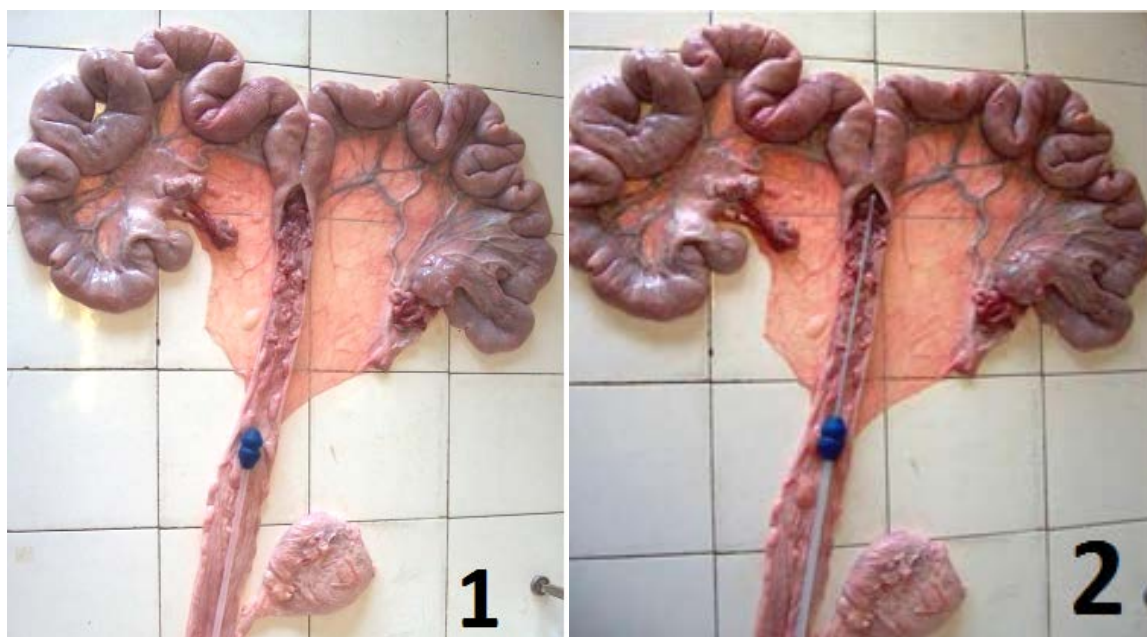
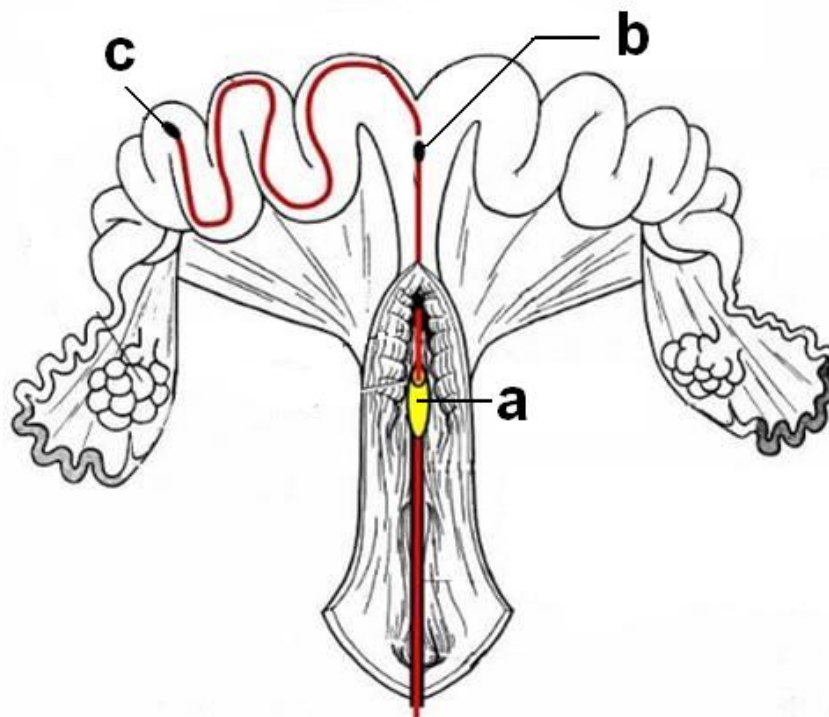
3. Daljim rotiranjem katetera u smeru suprotnom od kazaljke na satu i pomeranjem prema napred, kateter se uvodi u grlić materice, sve dok se ne oseti da je vrh katetra dobro stegnut u grliću. To se oseti po tome što kateter nije moguće izvući, blagim povlačenjem prema nazad. Tada se, na slobodan kraj katetera, stavlja flašica sa dozom i pusti da krmača sama uvlači spermu.

Slika 47. Tehnika klasične (intracervikalne) veštačke inseminacije

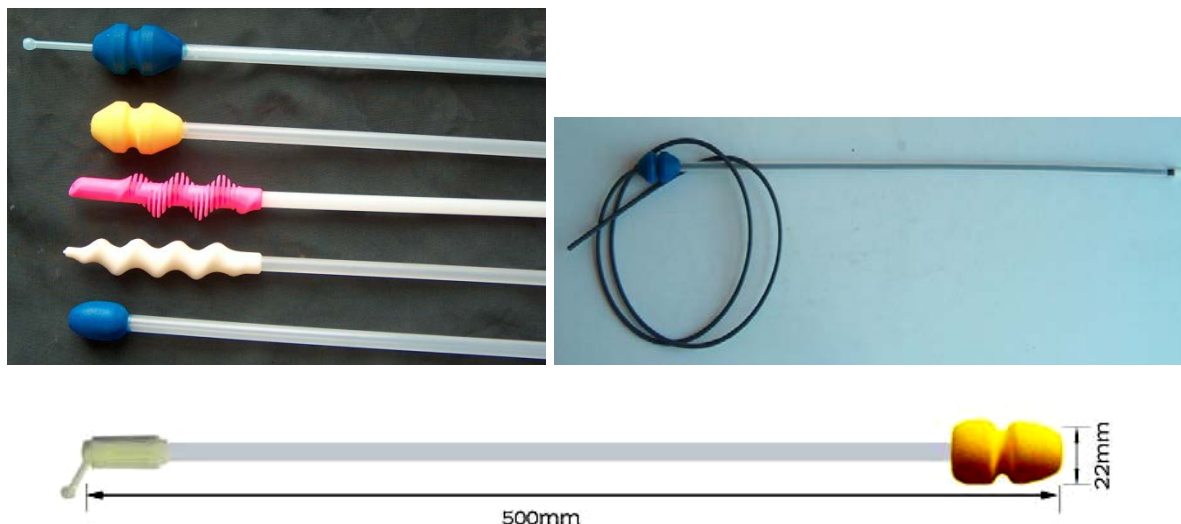


Slika 48. Postupci inseminacije

A – Pranje vulve, B – Uvođenje sterilnog katetera u vulvu, C – Uvođenje katetera u vaginu, D – Kateter postavljen u cervik i deponovanje sperme, E – Shematski prikaz situacije intracerviklane inseminacije. Desno je izgled otvorenog cerviksa, da se vide spiralni nabori.



Slika 49. Moguća mesta depozicije sperme kod VO
a i 1 – klasična intracervikalna inseminacija (u cerviks materice)
b i 2 – intrauterina inseminacija (u telo matereice)
c – duboka intrauterina inseminacija (bliže vrhu roga materice)



Slika 50. Izgled različitih vrhova katetera za VO svinja

Gornji je za plitku intrauterinu inseminaciju, u sredinu su kateteri za klasičnu intracervikalnu inseminaciju, a donji za inseminaciju nazimica (manji vrh), levo je kateter za duboku intrauterinu inseminaciju. Sasvim dole su dimenzije klasičnog, intracervikalnog katetera.



Slika 51. Sterilizator za VO opremu i frižider



Slika 52. Laboratorija (levo) i objekt za uzimanje sperme i VO (desno)

3.1.6.2. VEŠTAČKO OSEMENJAVANJE KRAVA

Veštačko osemenjavanje goveda je započelo dozama sveže sperme, razređene žumančano-citratnim razređivačem. Međutim, vrlo brzo je razvijena tehnologija dugotrajnog čuvanja inseminacionih doza dubokim zamrzavanjem, u tečnom azotu, na temperaturi -196°C . Danas se preko 90% VO krava obavlja dozama otopljenim posle čuvanja u duboko zamrznutom stanju. Moderna tehnologija VO goveda podrazumeva primenu efikasnih metoda kontrole kvaliteta nativne sperme, razređivanja sperme, dugotrajnog čuvanja inseminacionih doza, tehnike inseminacije, određivanja optimalnog momenta osemenjavanja i sinronizacije estrusa kod većeg broja krava planiranih za istovremenu inseminaciju. Savremena doza za VO krava ima volumen 0,25 ml (tzv. mini pajeta), koja sadrži 12 do 15×10^6 progresivno pokretnih spermatozoida. Inseminacija se izvodi intracervikalno, posebnim kateterom, dozom koja je, neposredno pre inseminacije, otopljena na temperaturi 37 do 38°C . Za uspeh osemenjavanja je veoma važno odrediti optimalno vreme inseminacije. Naime, maksimalna vrednost koncepcije se postiže ako se inseminacija izvede oko 10 do 12h pre ovulacije. S tim u vezi, potrebno je primeniti efikasnu metodologiju otkrivanja estrusa kod krava, što je, često, problem na farmama, jer estrus traje dosta kratko (često i manje od 12h). Zbog toga je najbolje da se estrus otkriva opažanjem spoljašnjih znakova estrusa barem 4 puta dnevno u jednakim vremenskim intervalima, uz kombinaciju sa rektalnim pregledom. Sve je češća i upotreba vazektomisanih bikova probaća, koji najefikasnije markiraju estrične krave, kao i raznih modela elektronskog praćenja ponašanja krava. Danas su dobro razvijene metode efikasne sinhronizacije estrusa i ovulacije, pa se visok stepen uspešne koncepcije može postići i fiksiranom inseminacijom, bez otkrivanja znakova estrusa. Razvoj tehnologije seksiranja (sexing - odvajanje polova) spermatozoida, kvantifikacijom DNA metodom protočne citometrije, omogućava još širu upotrebu VO u razvoju stočarske proizvodnje. Naime, osemenjavanjem krava dozama koje sadrže «muške» ili «ženske» spermatozoide, moguće je kontrolisano dobijanje teladi određenog pola, u zavisnosti od želje proizvođača.

TEHNOLOGIJA VEŠTAČKOG OSEMENJAVANJA

Tehnologija veštačkog osemenjavanja obuhvata sledeće osnovne postupke: (1) uzimanje sperme od bika, (2) kontrola kvaliteta dobijenog ejakulata, (3) razređivanje ejakulata, (4) formiranje određenog broja inseminacionih doza, (5) duboko zamrzavanje doza i njihovo

čuvanje do momenta upotrebe, (6) otapanje (odmrzavanje) doze i (7) inseminacija. Svi ovi postupci imaju striktno principe i pravila, kojih se mora pridržavati, ako se želi postići maksimalan efekt VO, pre svega, meren brojem oteljenih od broja veštački osemenjenih krava. Pored toga, uspeh inseminacije zavisi i od: (a) optimalnog vremena inseminacije, u odnosu na početak manifestacije refleksa stajanja (oko 10h posle prestanka spoljašnjih znakova estrusa) i (b) pravilno izvedene tehnike inseminacije (vrh katetera se uvodi u kanal grlića materice).

Uzimanje sperme od bika se može izvesti primenom tri metode:

1. *Metodom veštačke vagine* se imitiraju uslovi koji vladaju u prirodnoj vagini, koji su važni za stimulaciju ejakulacije (toplota, skliskost i pritisak na penis).
2. *Metodom elektroejakulacije* se vrši električna stimulacija centara za ejakulaciju u kičmenoj moždini, koji su odgovorni za formiranje refleksa ejakulacije.
3. *Metodom masaže akcesornih polnih žlezda ili ampula semevoda*, takođe se vrši stimulanje centara za ejakulaciju u kičmenoj moždini bika.

Prva metoda se koristi u svakodnevnoj praksi, dok se druge dve metode koriste samo u vrlo retkim slučajevima, kada nije moguće primeniti metodu veštačke vagine, a vrlo je važno dobiti ejakulat od određenog bika. Obično je razlog nemogućnost bika da izvede skok i/ili erekciju penisa, zbog starosti ili nekih obolenja, najčešće lokomotornih organa.

Veštačko osemenjavanje krava se vrši specijalnim kateterom, čiji se vrh uvodi u cervikalni kanal. Kako kaudalni kraj cerviksa kupasto prominira u vaginalnu šupljinu, kateter se, u cerviks, može uvesti na tri načina: (1) manuelnom fiksacijom cerviksa *per rectum*, (2) vizuelizacijom cervikalnog otvora, kroz spekulum, postavljen u vaginu ili (3) povlačenjem cerviksa u vaginu, specijalnim hvatačem za cerviks, tako da se njegov otvor vidi kroz otvor vulve.

Kontrola kvaliteta sperme. Na kvalitet sperme bika utiče veliki broj genetskih i paragenetskih faktora. Među njima su najznačajniji: rasa, linija, individua, starost, ishrana, način držanja, godišnja sezona, frekvencija ejakulacije i zdravstveno stanje bika.

Kvalitet sperme se određuje na osnovu njenih fertilizacionih parametara: volumen ejakulata, koncentracija spermatozoida u 1 ml sperme, ukupan broj spermatozoida u ejakulatu, broj (%) progresivno pokretnih spermatozoida, broj (%) morfološki promenjenih i mrtvih spermatozoida u ejakulatu.

Volumen ejakulata dosta varira, prvenstveno u zavisnosti od starosti bika i frekvencije uzimanja ejakulata. Mladi bikovi, na početku polnog iskorištavanja, daju ejakulate zapremine 1 do 2 ml i manje, dok potpuno odrasli bikovi mogu davati ejakulate između 10 i 15 ml zapremine.

Koncentracija spermatozoida u ejakulatu obično iznosi oko 2 do 3 milijarde u 1 ml.

Parametri dobrog ejakulata, koji se koristi za VO su:

- ✓ Volumen ejakulata = 6,0 ml i više
- ✓ Koncentracija spermatozoida = $1,2 \times 10^9$ i više
- ✓ Progresivna pokretljivost spermatozoida = više od 80%
- ✓ Abnormalnih spermatozoida = manje od 20%
- ✓ Preživljavanje spermatozoida = više od 48 sati
- ✓ Rezistencija spermatozoida = 45 minuta
- ✓ pH = 6,5 do 7,0
- ✓ Patogenih mikroorganizama po mililitru sperme = 0,0
- ✓ Nepatogenih mikroorganizama po mililitru sperme = 5000.

Razređivanje sperme se vrši razređivačima, koji se prave u farmaceutskim kućama i mogu se kupiti u slobodnoj prodaji. Sperma se razređuje zbog: (a) povećanja volumena nativnog ejakulata i (b) kako bi su u ejakulat dodale supstance koje produžavaju život spermatozoida tokom in vitro čuvanja (glukoza, puferi, elektroliti, krioprotektanti). Step en razređenja (odnos volumena nativnog ejakulata i volumena dodatog razređivača) se određuje na osnovu volumena ejakulata i izračunatog broja inseminacionih doza, koji se može napraviti od tog ejakulata.

Formiranje inseminacionih doza. Posle razređivanja, od dobijene zapremine razređene sperme, formiraju se određen broj inseminacionih doza. Ovaj broj se određuje na osnovu broja progresivno pokretnih spermatozoida u ejakulatu, volumena inseminacione doze i broja spermatozoida u dozi. Od jednog bika se, godišnje, može dobiti 100 do 200 hiljada inseminacionih doza sperme. Pretpostavka je da se godišnje dobije 100 ejakulata od jednog bika, da u ejakulatu ima 2 milijarde progresivno pokretnih spermatozoida, kao i da jedna inseminaciona doza sadrži 20 miliona spermatozoida. Danas se, od dobrih ejakulata, prave doze sa 11 do 12 miliona spermatozoida. Jedna inseminaciona doza je zapremine 0,25 ml razređene sperme (tzv. minutuba ili minipajeta).

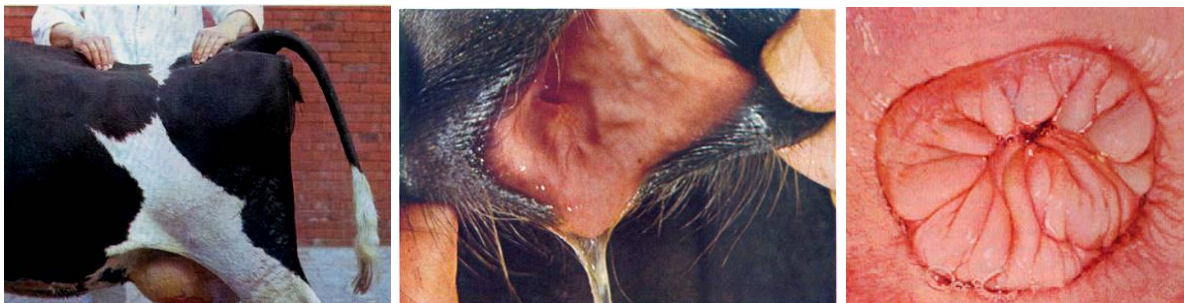
Čuvanje duboko zamrznute sperme. Sperma se može dugotrajno čuvati dubokim zamrzavanjem u suvom ledu (čvrst CO₂), na - 90°C, ili u tečnom azotu, na temperaturi - 196°C. Vrš i se neposredno posle formiranja inseminacionih doza.

Osnovni postupci dubokog zamrzavanja pejeta: 1. koristi se žumančanocitratni razređivač, sa dodatkom krioprotektanta (glicerina) i antibiotika, 2. ejakulat se razredi na polovinu konačnog razređenja, 3. razređeni ejakulat se ohladi na 2 do 3°C, 4. glicer in se dodaje u koncentraciji 7,5 do 8,0%, i to tako da se dodaje postepeno: 10%, 20%, 30% i td., svakih 15-20 minuta, sve dok se ne doda cela količina, 5. ovako pripremljena sperma se čuva na 1 do 30C, tokom 12 do 16 časova. To je ekvilibracija sperme, za koje vreme se glicer in oblaže spermatozoide, što sprečava kristalizaciju kod zamrzavanja 6. zatim se vrši punjenje obeleženih (datum, tet. br. bika, rasa, firma), pejeta, koje mogu imati zapreminu 0,5 ml (dužine 13,4 cm, a debljine 3 mm) ili 0,25 ml (dužine 13,4 cm, a debljine 1,5 mm). Na krajevima se pejeta zatvori i 7. Napunjene pejete se zamrzavaju, prvo u pari tečnog azota 7 minuta, a u tečnom azotu 5 minuta. Ztim se urone u kontejner sa tečnim azotom i čuvaju do upotrebe. Svaka pejeta, posle otapanja, mora sadržati minimalno 10 – 12 x 10⁶ progresivno pokretnih spermatozoida!



Slika 53. Otkrivanje estrusa biokom probaćem i markiranjem krava bojom

Na desnoj slici je krava sa postavljenom bojom, i krava sa obrisanom bojom, kao rezultat zaskakivanja.



Slika 54. Otkrivanje estrusa ispitivanjem lumbo-sakralnog refleksa (*levo*), pojavom vaginalnog sluzavog iscetka (*sredina*) i izgledom vaginalne sluzokože i cerviksa (*desno*)



Slika 55. Otkrivanje estrusa merenjem promene električnog otpora vaginalne sluzi



Slika 56. Otkrivanje estrusa elektronskim monitoringom promena ponašanja krave

Tehnika inseminacije podrazumeva način na koji se kateter za inseminaciju uvodi do mesta na kome se vrši deponovanje sperme u ženski polni trakt. Klasinčna tehnologija inseminacije se izvodi tako što se doza sperme deponuje u cerviks uterusa krave. Uvođenje katetera u cerviks se može izvesti: (*a*) metodom manuelne fiksacije cerviksa per rectum i (*b*) vizuelizacijom kaudalnog otvora cerviksa, uvođenjem spekuluma u vaginu krave.

Pre početka inseminacije, potrebno je inseminacionu dozu izvaditi iz kontejnera sa tečnim azotom i otopiti je u vodi, temperiranoj na 35 do 37°C, tokom 40 do 45 minuta. Posle otapanja, dozu treba dobro posušiti sterilnim papirom (voda je spermicidna!) i pravilno je postaviti u inseminacioni kateter. Otopljenu dozu treba ubaciti u cerviks unutar maksimalno 10 do 15 minuta. Što pre, to bolje.

Činjenice važne za uspešno VO:

- ✓ Estrus traje prosečno 24h; kod većine krava traje između 12 i 16h.
- ✓ Ovulacija se događa 10 do 12h posle prestanka znakova estrusa.
- ✓ Optimalno vreme osemenjavanja je pri kraju estrusa. Praktično, ako se znaci estrusa primete u rano jutro, osemenjavanje treba izvršiti kasno posle podne i obrnuto.
- ✓ Osemenjavanje treba vršiti dozom kvalitetne sperme.
- ✓ Doza duboko zamrznute sperme se odmrzava u toploj vodi, na 35 do 37°C, u trajanju 40 do 45 sekundi. Inseminaciju treba izvršiti unutar maksimalno 10 do 15 minuta posle odmrzavanja doze.
- ✓ Vrh inseminacionog katetera se uvodi u kanal cerviksa, gde se vrši deponovanje doze sperme.
- ✓ Pre inseminacije, treba izvršiti rektalni pregled materice i jajnika. Na taj način se ustanovi da li su ovi organi zdravi, kao i da li se, na jajniku, nalazi folikul pred ovulaciju.
- ✓ Osemenjavanja treba izvršiti sterilnim kateterom.
- ✓ Vulvu i njenu okolinu, treba oprati (najbolje blagim dezinficijensom) i obrisati suvom i čistom krpom.
- ✓ Lice, koje vrši inseminaciju, treba da je stručno, da je adekvatno odeveno i sa čistim rukama.

Potrebna oprema za izvođenje klasične (intracervikalne) inseminacije krava: (1) dva sterilna vaginalna spekulum (za krave i junice), (2) baterijska lampa, ako nije ugrađena u spekulum, (3) dva katetera za inseminaciju, sa dovoljnim brojem sterilnih plastičnih cevčica, za jednokratnu upotrebu, (4) pinceta (5) makaze, (6) sterilna vata i gaza, (7) dezinfekciono sredstvo za dezinfekciju spoljašnjih polnih organa i njihove okoline, (8) vodeni termostat ili veća termos flaša, sa vodom temperature 37°C, za odmrzavanje pejeta, (9) dovoljan broj inseminacionih rukavica, čizme, kecelja, naramenica, mantil i (10) ulje za mazanje rukavice.

Fertilitet bikova. Iako krava ima značajnijeg uticaja na fertilitet, postoje brojni dokazi da na ukupan fertilitet zapata utiču i bikovi. Neki istraživači pokazuju da fertilitet zapata može da varira između 34% i 70%, u zavisnosti da li se koriste bikovi niskog ili visokog fertilizacionog potencijala. Zbog toga je važno što objektivnije utvrditi fertilizacioni potencijal bikova. Neki istraživači su utvrdili da postoji dosta široko variranje u fertilitetu pojedinih bikova, zavisno od vremena izvedene inseminacije tokom estrusnog perioda. Naime, razlika u postignutoj koncepciji, između pojedinih bikova, je iznosila 16%, kada je inseminacija izvedena na početku estrusa, oko 5,5% kod inseminacije u sredini estrusa, dok razlike u postignutoj koncepciji, između pojedinih bikova, nije bilo, kada je inseminacija izvedena na kraju estrusa. Ovi rezultati pokazuju da se fertilitet bikova može oceniti na osnovu rezultata postignute koncepcije, posle osemenjavanja u ranom estrusu. I neki drugi parametri, kao što su kvantitet i kvalitet ejakulata, seksualni libido i veličina (obim) testisa, takođe mogu poslužiti kao indikatori potencijalnog fertiliteta bikova. Veličina testisa je visoko povezana sa kapacitetom za produkciju i kvalitet sperme. Svojtvo veličine testisa se može lako i višekratno meriti, a ima i visok heritabilitet. Step en progresivne pokretljivosti

spermatozoida je jedan od bitnih pokazatelja potencijalnog fertiliteta bika. Danas postoje precizne metode za određivanje progresivne pokretljivosti, kao što je metoda fotometrije. Koristi se i indeks fertiliteta sperme, baziran na odnosu volumena ejakulata, njegove koncentracije i stepena progresivne pokretljivosti spermatozoida. Upotreba sperme visoke koncentracije i progresivne pokretljivosti, nema uvek za rezultat postizanje visoke vrednosti koncepcije. Ovo se, obično, dešava u slučaju da se u spermi nalazi veliki broj spermatozoida sa oštećenim akrozomom. Bojenjem preparata sperme sa Naphthol Yellow S + Aniline Blue, predstavlja praktičnu metodu mikroskopske ocene stanja akrozoma spermatozoida bika. Sposobnost penetracije spermatozoida kroz cervikalnu sluz, je takođe jedan od indirektnih testova fertilizacionog potencijala bika. Tako je ustanovljena pozitivna korelacija između stepena penetracije sluzi i vrednosti uspešne koncepcije. Direktno testiranje fertilizacione sposobnosti spermatozoida pojedinih bikova se može izvesti tzv. heterospermnom inseminacijom. Sperma bikova koji se testiraju se pomeša i, sa istim dozama takve sperme, osemeni se određeni broj krava. Fertilitet bikova se ocenjuje na osnovu broja potomaka, dobijenih od pojedinih bikova. Poreklo potomaka se određuje na osnovu tipizacije krvi.

Problem smanjenog fertiliteta veštački osemenjenih krava. Dešava se da neke krave uspešno ne koncipiraju ni posle tri ili više osemenjavanja, nego ponovo manifestuju znake estrusa (povađaju). Kod takvih krava je estrusni ciklus bio normalan, manifestovale su normalne znake estrusa, na njihovim jajnicima, prilikom rektalnog pregleda, nisu ustanovljene nikakve anomalije i nije primećen abnormalan iscedak iz vulve. U zapažanjima dobrog fertiliteta, svega 9 do 12% krava može biti osemenjeno više od tri puta, pre uspostavljanja uspešne koncepcije.

Trebalo bi da više od 90% krava uspešno koncipira posle manje od tri osemenjavanja. Ako postoji dovoljan broj dobrih junica, krave sa tri ili više neuspelih osemenjavanja, treba da budu izlučene iz dalje reprodukcije.

Vrlo je teško ustanoviti pravi razlog opisanih učestalih povadañja. Neke krave mogu, zaista, imati niže reproduktivne sposobnosti, ali ako se višekratna povadañja dešavaju kod više od 15% krava u zapatu, onda ovo nije jedini razlog. Postoji veći broj faktora koji mogu dovesti do ovakvog stanja, posebno ako deluju zajedno. Zbog toga je, radi prevazilaženja ovog problema, tj. otkrivanja pravog razloga višekratnih povadañja, potrebno voditi tačnu i detaljnu reproduktivnu evidenciju i izvršiti što detaljniju analiza svih faktora na farmi, koji mogu dovesti do smanjenog fertiliteta krava.

Faktori koji mogu dovesti do niske vrednosti koncepcije:

1. Problemi povezani sa otkrivanjem estrusa:
 - ✓ nije osemenjena krava koja je u estrusu,
 - ✓ osemenjena krava koja nije u estrusu,
 - ✓ neoptimalno vreme osemenjavanja, u odnosu na početak refleksa stajanja,
 - ✓ netačna reproduktivna evidencija.
2. Problemi u vezi sa načinom osemenjavanja:
 - ✓ bik slabog fertiliteta (kod prirodnog osemenjavanja),
 - ✓ neadekvatna tehnika osemenjavanja (kod VO).
3. Problemi u vezi sa kravom:
 - ✓ Metritis (infekcija materice),

- ✓ *hormonski poremećaj,*
- ✓ *obstrukcija (neprohodnost) jajovoda,*
- ✓ *anatomske defekte reproduktivnih organa i*
- ✓ *rani mortalitet embriona.*

4. Problemi u vezi sa ishranom:

- ✓ *slaba telesna kondicija,*
- ✓ *nedostatak mineralnih materija i vitamina u obrocima i*
- ✓ *prisustvo mikotoksina.*

Veoma je teško identifikovati svaki pojedinačni navedeni faktor, kao i stepen njegovog uticaja na smanjen fertilitet krava u zapatu. Zbog toga, specifične akcije mogu redukovati pojavu smanjenog fertiliteta, ako nisu zastupljeni svi od gore navedenih faktora. Tako, na primer, injekcija preparata GnRH, u momentu inseminacije, nekada ima uticaj na smanjenu pojavu višekratnih povadanja, posebno kada se tretiraju krave kod drugog ili narednih osemenjavanja, u slučaju kada se radi o redukovanoj sekretornoj aktivnosti žutog tela (hormonalna disfunkcija). Naime, GnRH pojačava sekreciju progesterona, koji je neophodan za održavanje gravidnosti.



Veštačkom vaginom, u centru za VO



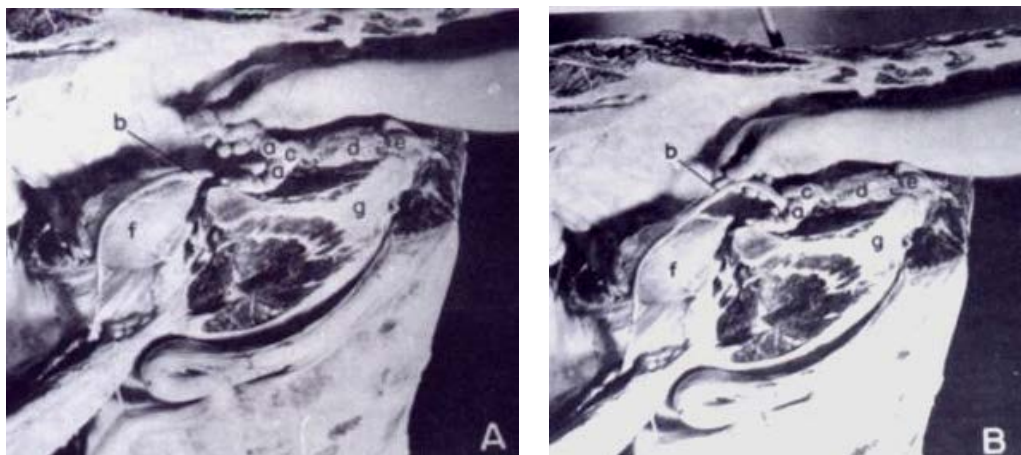
i na slobodnoj ispaši



izgled veštačke vagine

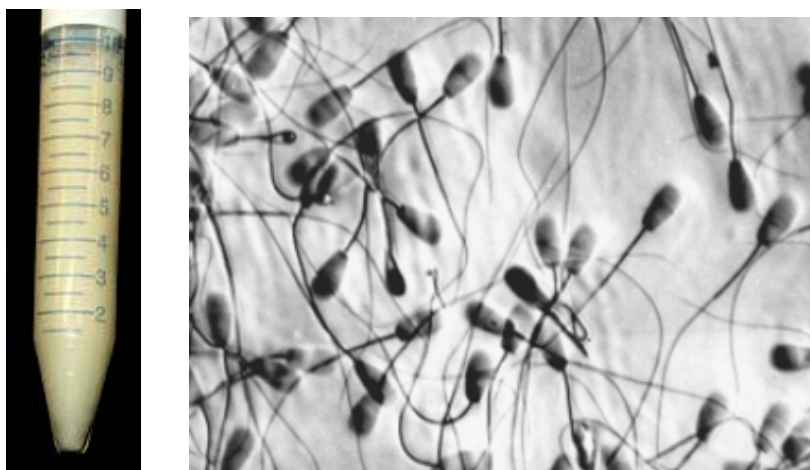


Oprema za elektroejakulaciju

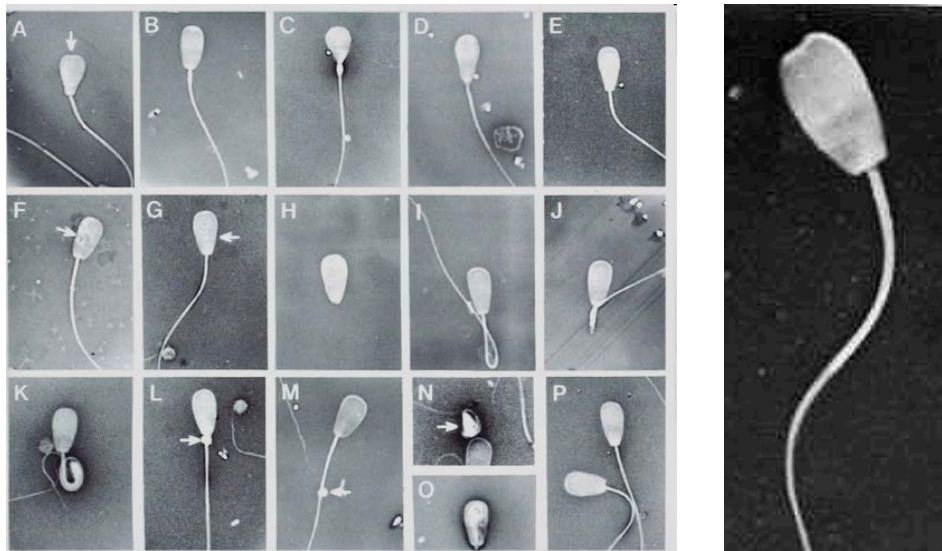


Rectalnom masažom vezikularnih žlezda (A) i ampule semevoda (B)

Slika 57. Metode uzimanja sperme od bika



Slika 58. Izgled dobrog ejakulata (levo) i normalnih spermatozoida bika (desno)



Slika 59. Morfološke anomalije spermatozoida (levo) i oštećen akrozom (desno)

RAZREĐIVANJE I ČUVANJE SPERME



Slika 60. Razređivač za spermu bika



Slika 61. Francuski tip slamčica za doze



Slika 62. Pakovanje razredene sperme



Slika 63. Formirane inseminacione doze



Slika 64. Kontejneri sa tečnim azotom za čuvanje i transport doza



Slika 65. Otvoren kontejner sa dozama

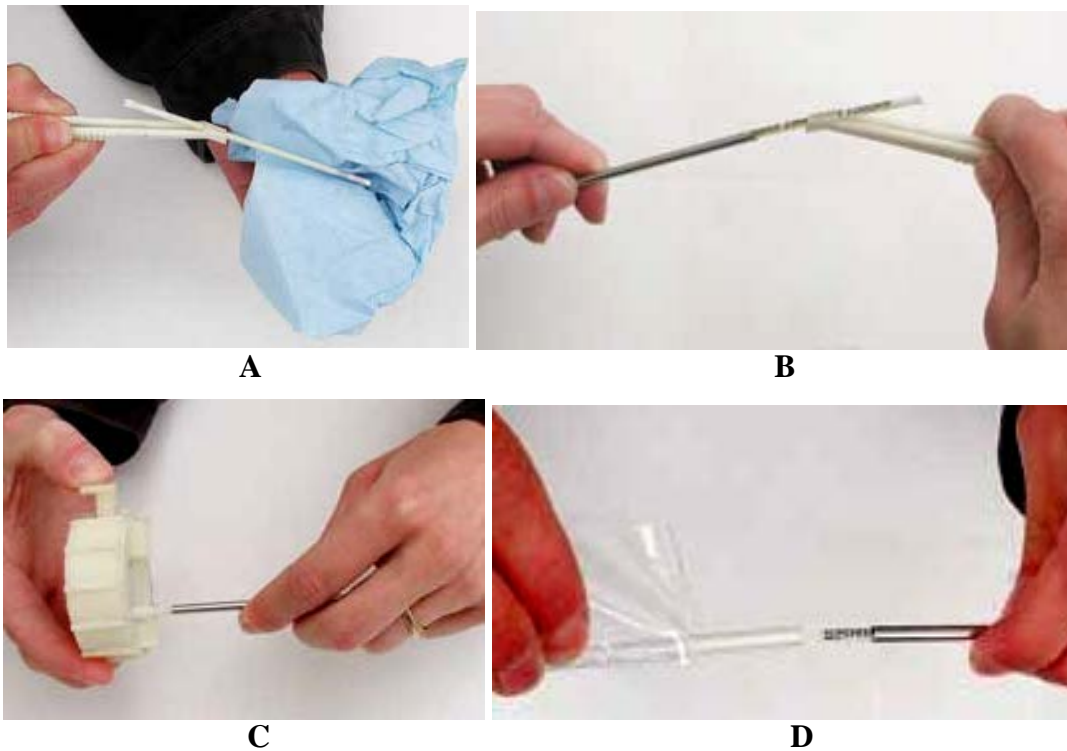
PRIPREMA DOZE ZA INSEMINACIJU



Slika 66. Uzimanje doze iz kontejnera

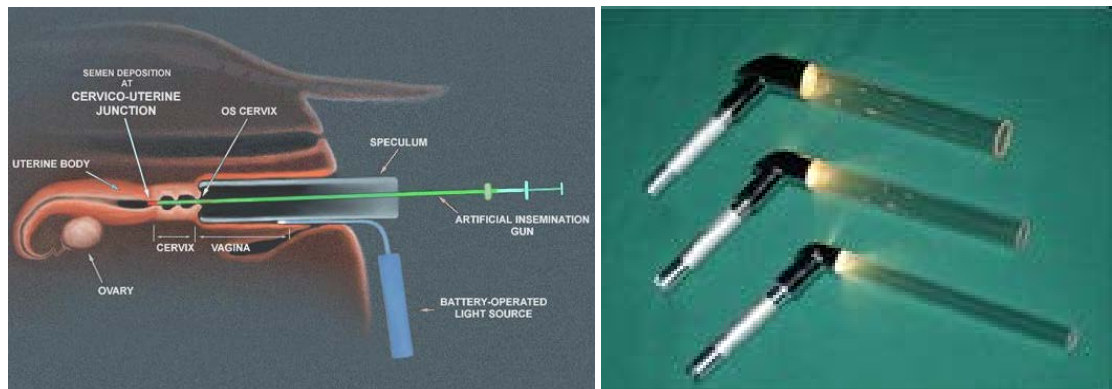


Slika 67. Otapanje doze



Slika 68. Posle otapanja, doza se obriše i osuši (A), postavi u kateter (B), odseče se vrh inseminacione doze (C) i preko katetera sa dozom se postavi plastična navlaka (D)

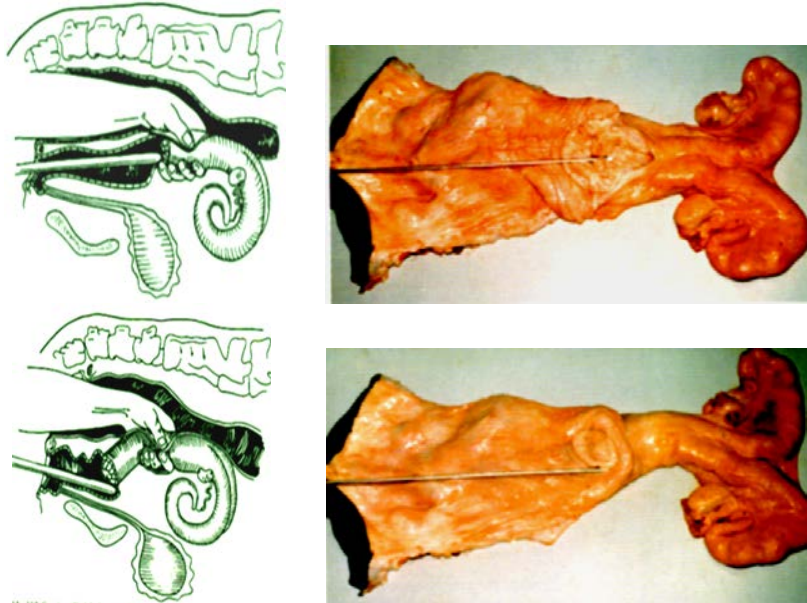
TEHNIKA INSEMINACIJE KRAVE



Slika 69. Inseminacija primenom vaginalnog spekuluma

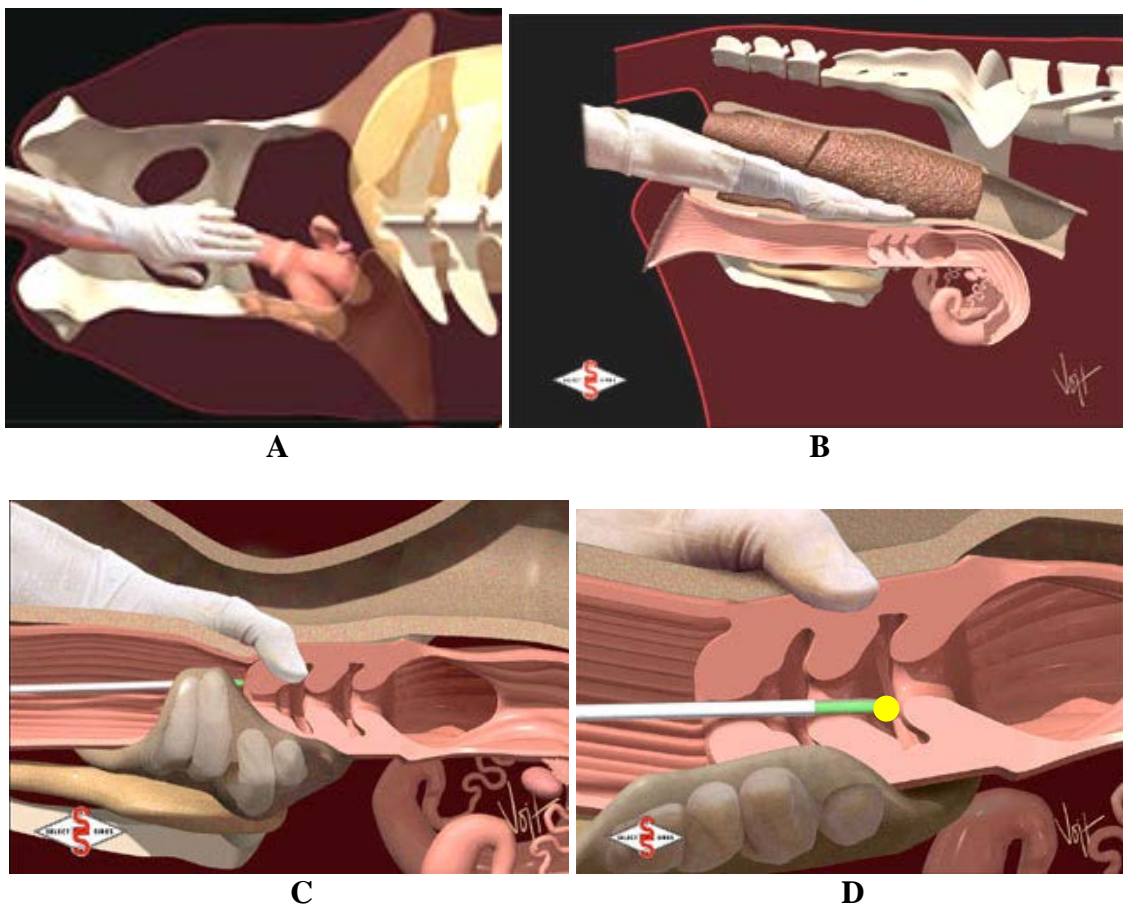


Slika 70. Inseminacija manuelnom fiksacijom cerviksa *per rectum*

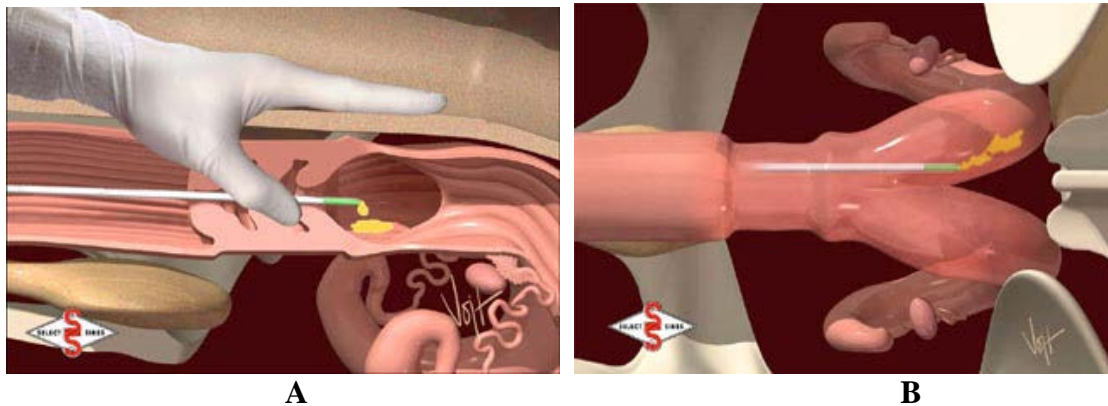


Slika 71. Pravilno (gore) i nepravilno uveden kateter (dole)

OSNOVNE FAZE INSEMINACIJE PER RECTUM



Slika 72. Intracervikalna inseminacija: Pozicija uterusa, dorzalni pogled (A), Evakuacija fecesa iz rectuma (B), Fiksiranje cerviksa (C) vrh katetera u cerviksu i deponovanje sperme.



Slika 73. Inseminacija u telo materice (A) i rog materice (B)

3.1.6.3. VEŠTAČKO OSEMENJAVANJE OVACA I KOZA

A. OVCE

Veštačko osemenjavanje ovaca i koza se primenjuje u industrijskoj proizvodnji, sa ciljem da se dobije znatno veći broj jagnjadi od genetski superiornih ovnova, kao i da se poveća efikasnost reproduktivne eksploatacije ovnova. Koristi se tehnika vaginalne, cervikalne, transcervikalne i intrauterine (putem laparoskopije) depozicije inseminacione doze. Koriste se doze sveže razređene sperme ili doze čuvane dubokim zamrzavanjem. Vrednost koncepcije je znatno niža kod ovaca osemenjenih dozama čuvanim dubokim zamrzavanjem, bez obzira da li je osemenjavanje izvršeno u spontanom ili sinhronizovanom estrusu. U poslednje vreme se primenjuje tehnika laparoskopske intrauterine inseminacije, dozama volumena 0,25 ml, koje sadrže 80×10^6 spermatozida. Pri tome se postiže 60% do 70% uspešne koncepcije, što je slično koncepciji koja se postiže klasičnom cervikalnom inseminacijom, dozama sveže razređene sperme, koje sadrže 200×10^6 spermatozoida u dozi volumena 0,25 ml.

Postoji veći broj prednosti primene veštačkog nad prirodnim osemenjavanjem: (1) dobija se značajno veći broj potomaka od jednog ovna, koji ima visok genetski potencijal za određena (poželjna) produktivna svojstva. Naime, prirodnim osemenjavanjem, jedan ovan može da pari oko 50 ovaca u sezoni. Primenom veštačkog osemenjavanja (VO), spermom jednog ovna se može osemeniti oko 1.000 ovaca u sezoni, (2) sperma se može duboko zamrznuti i čuvati duži vremenski period, (3) duboko zamrznuta sperma se može prenositi na velike udaljenosti. Tako se smanjuju troškovi i rizici prevoza ovnova. Osim toga, izbegava se širenje zaraznih bolesti i (4) značajno se smanjuje broj potrebnih ovnova za osemenjavanje ovaca u programu sinhronizacije estrusa.

TEHNOLOGIJA VEŠTAČKOG OSEMENJAVANJA

Tehnologija VO obuhvata: (1) otkrivanje estrusa ovaca, (2) uzimanje sperme od ovna, (3) kontrolu kvaliteta dobijene sperme, (4) razređivanje sperme, (5) formiranje određenog broja inseminacionih doza razređene sperme i (6) inseminacija.

Otkrivanje estrusa ovaca se vrši ovnovima probačima, koji mogu biti podvezani specijalnim keceljama, koje su namazane bojom, kojom se markiraju ovce kada budu

zaskočene. Mogu se koristiti i vasektomisani ovnovi. To su ovnovi kojima su, hiruruškim putem, podvezani semevodi.



Slika 74. Estrus ovce se može otkriti samo ovnom probaćem

Uzimanje sperme od ovna se vrši metodom veštačke vagine ili metodom elektroejakulacije. Ovnovi treba da budu naučeni da skoče i daju ejakulat u veštačku vaginu.



Slika 75. Uzimanje sperme od ovna (*levo*) i veštačka vagina (*desno*)

Kontrola kvaliteta dobijene sperme. Svaki ejakulat (količina sperme koju izbaci ovan u jednom skoku) se mora pregledati, kako bi se ocenila njegova oplodna sposobnost. Zbog toga se mora odrediti volumen, gustina i boja ejakulata. Zapremina normalnog ejakulata ovna se kreće između 0,5 i 2,0ml. Boja je mlečno bela do belo-žućkasta. Sperma je gusta i vidi se vrtloženje, zbog prisustva velikog broja pokretnih spermatozoida. Dobar ejakulat ne sme da ima stranih (neprirodnih) primesa, kao što su krv, gnoj, nečistoća i td. Posle ovog, makroskopskog, sperma se preglada mikroskopski. Tako se određuje: stepen i način pokretanja spermatozoida, izgled i građa spermatozoida, broj živih, mrtvih i abnormalno građenih spermatozoida. Za oplodnju su sposobni samo spermatozoidi koji su normalno građeni i pokazuju intenzivno kretanje, glavom prema napred (tzv. progresivna pokretljivost). Sve navedene osobine sperme imaju velikog uticaja na njenu oplodnu sposobnost. Na osnovu ovih vrednosti se određuje broj inseminacionih doza, koji se može napraviti od jednog ejakulata.

Dobra sperma ovna treba da ima: volumen ejakulata 0,5 –2,0ml; 3 do 4 milijarde spermatozoida u 1ml ejakulata; preko 70% progresivne pokretljivosti spermatozoida; manje od 20% mrtvih i nepravilno građenih spermatozoida. Ovnovi daju znatno bolje ejakulate (veći

volumen, sa većim brojem progresivno pokretnih spermatozoida), tokom prirodne sezone parenja, u odnosu na anestrličnu sezonu. Tako se, na primer, tokom sezone parenja može dobiti oko 20 dobrih ejakulata nedeljno od jednog dobrog ovna, dok se izvan sezone parenja može dobiti samo 4 do 5 dobrih ejakulata nedeljno od jednog ovna.

Važnije osobine sperme i spermatozoida ovna:

Sperma:

- Volumen ejakulata (ml).....0,9 (0,1 – 1,5)
- Koncentracija (10⁹/ml)..... 4,0 (1,5 – 6)
- Ukupan broj spz. u ejakulatu (x 10⁹) 3,6
- Prosečna progresivna pokretljivost spz.75%
- pH 5,9 – 7,3
- Fruktaza (mg/100 ml) 247
- Ukupni azot (mg/100 ml) 875

Spermatozoid:

- * Dužina glave 8,2mm; širina glave 4,2mm.
- * Dužina repa 55 – 60mm.

Razređivanje sperme. Neposredno posle uzimanja i kontrole kvaliteta, ejakulat se mora razrediti u određenom odnosu, koji se određuje na osnovu njegovog volumena, koncentracije i procenta progresivne pokretljivosti spermatozoida. Razređivanje se vrši posebnim razređivačem za spermu ovna, a vrši se iz dva osnovna razloga: (a) da se poveća volumen ejakulata, kako bi se mogao podeliti na veći broj inseminacionih doza, čiji volumen iznosi 0,2 do 0,5ml i (b) da se ejakulatu dodaju potrebne hranljive i zaštitne materije, koje će omogućiti održavanje visoke oplodne sposobnosti spermatozoida, od momenta razređivanja do momenta inseminacije.

Broj inseminacionih doza. Dobar ejakulat se može razrediti i podeliti na 10-20 inseminacionih doza, od kojih svaka ima oko 200 do 400 miliona spermatozoida.

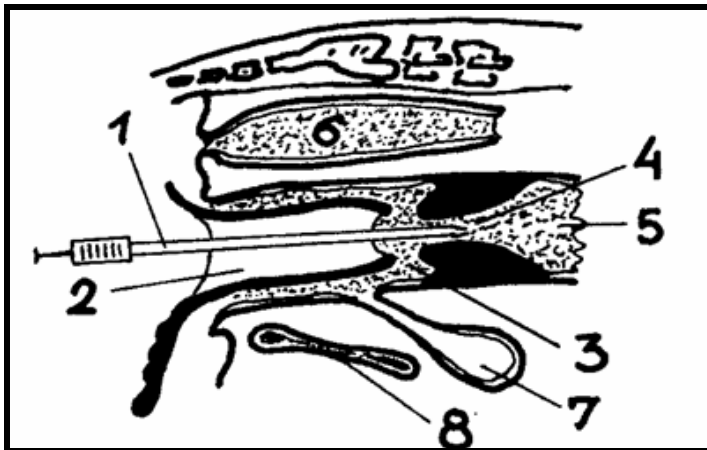
Inseminacija se može izvršiti prirodnom (nerazređenom), tečnom razređenom ili spermom koja je bila zamrznuta i otopljena neposredno pre inseminacije. Nerazređenu spermu treba iskoristiti za inseminaciju unutar maksimalno 20-30 minuta posle uzimanja. Ako se koristi tečna razređena sperma, onda se ona može čuvati na temperaturi oko 15 do 18⁰C i upotrebiti maksimalno 10 sati posle uzimanja od ovna. Razređena sperma se može čuvati u duboko zamrznutom stanju, na temperaturi tečnog azota (-196⁰C), tokom neograničenog vremena. Naravno da oplodna sposobnost sperme opada sa produžavanjem perioda čuvanja. U širokoj praksi se, najčešće, koristi metoda intracervikalne inseminacije. To znači da se doza sperme istisne u grlić materica. Može se koristiti i tzv. intrauterina inseminacija, kada se znatno manje doze sperme ubacuju direktno u rog materice. Međutim, ova metoda zahteva hirurški zahvat, pa je, zbog toga, skuplja i nepogodna za široku praktičnu primenu. Optimalno vreme inseminacije je druga polovina estrusnog perioda, odnosno oko 10-12h pre ovulacije. U tom slučaju je dovoljno izvršiti samo jednu inseminaciju. Ako osemenjena ovca pokazuje jasne znake estrusa 12h posle prve inseminacije, treba izvršiti i drugu inseminaciju.

Tabela 31. Primer programa VO posle sinhronizacije estrusa ovaca

| Dan | Postupak (operacija) |
|-----|--|
| 1. | Postavljanje intravaginalnih sunđera. |
| 14. | a) Vađenje intravaginalnih sunđera. b) Injekcija eCG (350 do 500ij. u sezoni, ili 500 do 1000 ij. izvan sezone parenja). |
| 16. | a) Uzimanje, kontrola, razređivanje i čuvanje sperme. b) Veštačko osemenjavanje ovaca, oko 56 sati posle vađenja sunđera, dozom u kojoj ima 100 do 200 miliona spermatozoida. |
| 24. | Početak puštanja ovnova probača, da se otkriju ovce koje povadaju. Njih treba ponovo osemeniti, prirodnim ili veštačkim putem. Ako je ovaj program izvršen izvan sezone parenja, ovce koje nisu ostale sjagnjenje, neće spontano ispoljiti estrus 17 dana kasnije! |

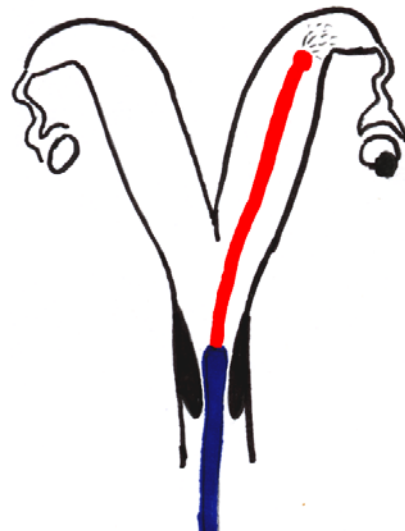
Doza eCG (ij) zavisi od *sezone* (izvan sezone parenja je veća od one u sezoni parenja), *starosti ovaca* (mlade ovce – koje se prvi put pare – treba da dobiju 50 ij eCG više od odraslih, starijih ovaca), *telesne mase* (teže ovce treba tretirati sa nešto većim dozama eCG) i *rase ovaca* (plodnije rase treba tretirati nižim, manje plodne rase višim dozama eCG). U slučaju da se planira dobijanje većeg broja jagnjadi po ojagnjenoj ovci (veći broj dvojki, trojki, četvorki), doza PMSG se mora znatno povećati. Pri tome treba znati da prekomerno povećanje doze eCG (1500 ij i više) značajno povećava broj degenerisanih jajnih ćelija i pojavu folikularnih cista kod tretiranih ovaca.

**Slika 76. Veštačko osemenjavanje ovce**

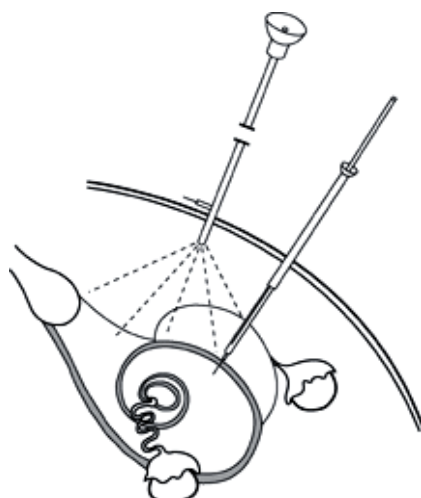


- 1- Kateter u cerviksu
- 2- Vaginalni spekulum
- 3 – Vagina,
- 4 – Cervikalni kanal
- 5 – Telo materice
- 6 - Rektum
- 7 – Mokraćna bešika
- 8 – Sinfiza pelvis

Slika 77. Klasična intracervikalna inseminacija ovce



Slika 78. Transcervikalna intrauterina inseminacija



Slika 79. Intrauterina inseminacija metodom laparoskopije

B. KOZE

Primena veštačkog osemenjavanja je osnovna i efikasna mera genetskog unapređenja poželjnih produktivnih osobina koza. Zbog toga se ova tehnologija sve više primenjuje u intenzivnom gajenju koza. Tako je, u Francuskoj, tokom desetogodišnjeg perioda (1983. – 1993. godina), broj veštački osemenjenih koza povećan sa oko 5.000 na oko 60.000. Vrednost postignute koncepcije, posle prvog osemenjavanja je iznosila 62,4%, a posle svih inseminacija 87,9%.

Dobijanje sperme. Ejakulat se od jarca može dobiti metodom veštačke vagine ili elektroejakulacijom. Primenom veštačke vagine se dobijaju ejakulati manje zapremine, ali veće koncentracije, u poređenju sa ejakulatima dobijenim elektroejakulacijom. Jarci reaguju na elektrostimulaciju znatno intenzivnije od ovnova i često ispuštaju vrlo jak glas, što može da uznemiri prisutne ljude. Treniranje jarca na ejakulaciju u veštačku vaginu može da traje nekoliko dana do nekoliko meseci, dok neki jarci uopšte ne mogu da se naviknu na ejakulaciju u veštačku vaginu. Ejakulat se može uzimati jednom ili dva puta dnevno, tokom sezone parenja, a mogu se dobijati i tokom cele godine. Ipak, fertilizaciona sposobnost sperme varira, u zavisnosti od meseca do meseca. Najkvalitetniji ejakulati se dobijaju tokom sezone parenja.

Manipulacija sa spermom in vitro. Neposredno posle dobijanja, izmeri se volumen i oceni gustina ejakulata. Vrednosti ovih parametara variraju u zavisnosti od sezone, starosti, rase, ambijentalne temperature i telesne kondicije, odnosno ishrane. Volumen većine ejakulata varira između 0,5 i 2,0 ml, sa 1,5 do 4,0 milijardi spermatozoida u 1ml. Progresivna pokretljivost spermatozoida, u dobrim ejakulatima, treba da je veća od 75%. Boja ejakulata varira od žute, svetlo žute do bele. Varijacija boje ejakulata zavisi od koncentracije riboflavina, koji se sintetiše u vezikularnim žlezdama. Ako se za osemenjavanje koristi natičan (nerazređen) ejakulat, volumen inseminacione doze treba da bude oko 0,1ml, a osemenjavanje treba izvesti neposredno posle uzimanja ejakulata. Tako se može osemeniti 5 do 15 koza. Razređivanje sperme se vrši na 30°C, primenom razređivača na bazi mleka ili Tris-a.

Razređivači na bazi žumanceta jajeta ne treba da se koriste za razređivanje sperme jarca. Naime, ferment koga sintetišu bulbo-uretralne žlezde jarca, katalizuje hidrolizu lecitina u žumancetu jajeta do masnih kiselina i lizolecitina, koji je, izgleda, toksičan za spermatozoide. Stepenn razređenja se određuje na bazi odnosa volumena ejakulata i razređivača (1:2 do 1:4) ili na bazi konstantne koncentracije spermatozoida (obično 250 do 600 miliona spermatozoida u 1ml razređene sperme). Razređena sperma se rashlađuje do sobne temperature (20 do 21°C) ili do 4°C i na toj temperaturi se može čuvati do 12h. U zavisnosti od stepena razređenja, jednim razređenim ejakulatom se može osemeniti 10 do 40 koza.

Optimalno vreme inseminacije. Generalno se smatra da kozu treba osemenjavati unutar 12h posle momenta kada koza prvi put manifestuje refleks stajanja, ustanovljen jarcem probaćem. Postoje podaci koji pokazuju da je intrauterina inseminacija efikasnija od intracervikalne, a da intravaginalnu inseminaciju treba izbegavati. Dvokratnu inseminaciju, takođe, treba izbegavati. Jedan od razloga za to je činjenica da distenzija vagine u estrusu izaziva refleksno izlučivanje oksitocina, što ima za rezultat izraženu kontrakciju vagine i cerviksa. Ove kontrakcije remete normalan transport spermatozoida, posledično, smanjuju uspeh osemenjavanja. Intrauterina inseminacija daje znatno bolje vrednosti koncepcije od intracervikalne. Doza sperme se može uneti u uterus kroz cervikalni kanal (transcervikalna intrauterina inseminacija) ili direktno u vrh roga uterusa, primenom laparotomije ili laparoskopije. Ako se sperma unosi direktno u matericu, primenom laparoskopije, doza može

da sadrži 1, 5 ili 25 miliona spermatozoida i da to nema značajnog uticaja na postignutu vrednost koncepcije.

Posle veštački izazvanog estrusa i ovulacije, VO treba izvesti 43 do 45h nakon prestanka hormonskog tretmana. Ustanovljeno je da LH postiže maksimalnu koncentraciju u krvi koza između 16 oko 40h posle prestanka tretman kombinacijom intravaginalnih sundefera (45mg FGA), prostaglandina (50 μ g cloprostenola) i 400 do 500ij. PMSG. Određivanje pika LH u krvnoj plazmi je dobar metod za određivanje optimalnog vremena VO koza različitih rasa.

Duboko zamrzavanje sperme. Optimalne vrednosti fertiliteta sperme se postižu ako se doze sperme prvo potope u paru tečnog azota, oko 4cm iznad tečnosti, najmanje 30 sekundi, a zatim se potope u tečni azot. Volumen doze može biti 0,25 do 0,50ml. Step en pokretljivosti spermatozoida se znatno smanjuje posle 6 meseci čuvanja u tečnom azotu, bez obzira na volumen doze, kao i na to da li je korišten ratređivač sa žumancem jajeta ili da li je semena plazma bila prisutna ili ne.

Kao krioprotektanti se koriste glicerol, dimethyl sulfoxid (DMSO) i laktoza. Kombinacija glukoze i glicerola, takođe, daje dobre rezultate krioprezervacije. Loša krioprezervacija, odnosno delovanje hladnog šoka, ima za rezultat znatno povećanje broja spermatozoida sa deformitetima i abnormalnostima građe repa. Pokazalo se da je ovakvih spermatozoida najmanje kada se koriste razređivači sa glukozom, kao krioprotektantom.



Slika 80. Klasično intracervikalno (*levo*) i intrauterino VO koze, putem laparoskopije (*desno*)

3.1.6.4. VEŠTAČKO OSEMENJAVANJE KOBILA

Za veštačko osemenjavanje kobila, najčešće se koriste doze tečne razređene sperme, volumena 10 do 15 ml, koje sadrže 500 do 600 x 10⁶ progresivno pokretnih spermatozoida. Nativni ejakulati treba da imaju minimalno 60% progresivne pokretljivosti. Ove doze se mogu čuvati na temperaturi +20°C ili +5°C, maksimalno 24h do 48h. Posle ovog vremena, vrednost postignute koncepcije osemenjenih kobila značajno opada, i to za 7 do 10% kod

osemenjavanja dozama čuvanim na +20°C, odnosno za oko 40% kod osemenjavanja dozama čuvanim na temperaturi +5°C.

Poslednjih godina se, sve češće, koristi veštačko osemenjavanje kobilica dozama dugotrajno čuvanim dubokim zamrzavanjem. Dosadašnji rezultati pokazuju da broj progresivno pokretnih spermatozoida u ovim dozama varira od 100 do 600 x 10⁶, pri čemu se smatra da optimalan broj spermatozoida u dozi iznosi oko 250 x 10⁶. Postignuta vrednost koncepcije značajno varira od 50 do 90%, u zavisnosti od primenjene tehnologije dubokog zamrzavanja, sastava razređivača za spermu, dužine čuvanja inseminacionih doza, tehnologije odmrzavanja doze, od tehnologije inseminacije (mesto deponovanja sperme u ženske polne organe i optimalno vreme inseminacije kobile), kvaliteta sperme pojedinih pastuva, kao i od sezone godine (sezona parenja ili anestrična sezona) u kojoj su dobijeni nativni ejakulati.

Značajno smanjenje volumena inseminacione doze i broja progresivno pokretnih spermatozoida u dozi, moguće je postići dubokom intrauterinom inseminacijom kobilica. Ovom tehnologijom se, putem endoskopije, specijalni kateter, transcervikalno, uvodi u blizinu uterotublanog spoja roga uterusa kobile. Na taj način se, posle vizuelizacije papile kaudalnog istmusa ovidukta, u njenu okolinu deponuje doza volumena 5 ml sperme, koja sadži 50 do 100 x 10⁶ progresivno pokretnih spermatozoida. Primenom VO se postižu isti ili bolji rezultati koncepcije i ždrebljenja, od onih posle prirodnog osemenjavanja. Ovo je, pre svega, posledica mogućnosti bolje kontrole i sprečavanja širenja zaraznih bolesti, kao i činjenice da se primenom VO može tačnije odrediti optimalno vreme osemenjavanja.

Fertilitet i polna aktivnost pastuva. Maksimalne vrednosti fertiliteta kobilica se, između ostalog, postižu upotrebom pastuva dobrog polnog libida, koji proizvode spermu visokog fertilizacionog potencijala. Ovo se posebno ističe kod veštačkog osemenjavanja, jer se spermom jednog pastuva osemenjava znatno veći broj kobilica. Zbog toga je veoma važno ispitati reproduktivni potencijal pastuva, pre njegove upotrebe u VO. Ovo podrazumeva ispitivanje opšte telesne kondicije i zdravstvenog stanja, a posebno stanja i funkcije reproduktivnih organa, ispitivanje fertilizacionog kapaciteta sperme, kao i nivo polnog libida. Način držanja, ishrane, treninga i zdravstvene zaštite pastuva pre i tokom perioda reproduktivnog iskorištavanja, značajno utiču na njegovu reproduktivnu efikasnost.

Tabela 32. Neke osobine sperme pastuva

| Osobina | Prosek | Varijacija |
|--|--------|------------|
| Volumen (ml) | 70 | 30 – 300 |
| Volumen gel-frakcije (ml) | 27 | 0 – 200 |
| Broj spermatozoida u 1ml sperme (x 10 ⁶) | 120 | 30 – 800 |
| Ukupan broj spermatozoida u ejakulatu (x 10 ⁹) | 8,4 | 4 – 20 |
| Progresivna pokretljivost (%) | 73 | 60 – 95 |
| Morfološki normalnih spermatozoida (%) | 75 | 65 – 94 |
| pH | 7,4 | 6,8 – 7,8 |

Pastuvi daju fertilne ejakulate tokom cele godine, mada se zapažaju određene varijacije u vrednostima osnovnih parametara (volumen, koncentracija, progresivna pokretljivost), između pojedinih godišnjih sezona. Najlošiji kvalitet ejakulata se dobija u periodu između novembra i decembra. Broj fertilizaciono sposobnih spermatozoida u ejakulatu zavisi od starosti pastuva, godišnje sezone, veličine testesa, frekvencije uzimanja sperme i polnog libida pastuva. Nivo dnevne produkcije spermatozoida je veoma važan parametar za određivanje broja kobilica, koje mogu biti osemenjene jednim pastuvom, tokom sezone parenja. Postoji

pozitivna korelacija između volumena testisa i dnevne produkcije sperme. Volumen testisa se može odrediti merenjem njegove dužine i debljine ili ultrasonografijom. Polno ponašanje je faktor koji značajno određuje reproduktivnu efikasnost pastuva, odnosno broj ejakulata koji pastuv može dati tokom jedne sezone parenja. Veći broj oblika abnormalnog polnog ponašanja je fiziološke, a manji fizičke prirode. Ovo ukazuje na činjenicu da je polno ponašanje, u velikoj meri, kontrolisano endokrinim mehanizmima na osovini hipotalamus-hipofiza-testis.

Poznato je, naime, da hipofizarni gonadotropini (FSH i LH) kontrolišu endokrinu (sekrecija androgena) i gametogenu (produkcija spermatozoida) funkciju testisa. Endogeni opioidni peptidi inhibiraju sekreciju gonadotropina i testostosterona. Aktivnost ovih opioida se povećava tokom zime, a smanjuje tokom sezone parenja. Putem regulacije sekrecije LH, endogeni opioidi regulišu sezonske promene polnog ponašanja pastuva. Koncentracija inhibina u testesima subfertilnih pastuva je znatno niža od one kod fertilnih.

Kod pastuva se javljaju različite forme subfertilneta. Autoimunitet na spermatozoide je čest razlog idiopatskog subfertilneta pastuva. Naime, spermatozoidi fertilnih i subfertilnih pastuva ispoljavaju različitu interakciju sa zonom pelucidom oocita. Pokazalo se da spermatozoidi subfertilnih pastuva nemaju receptore za vezivanje sa glikoproteinima zone pelucide. To je, verovatno, razlog da se značajno veći broj spermatozoida fertilnih pastuva vezuje za zonu pelucidu oocita, što je od velikog značaja za uspešnu oplodnju.

Fertilite veštački osemjenjenih kobila primarno zavisi od broja i kvaliteta spermatozoida u inseminacionoj dozi, vremenu i frekvenciji inseminacije, volumena doze, rukovanja sa spermom i od razređivača za spermu.

TEHNOLOGIJA VEŠTAČKOG OSEMENJAVANJA

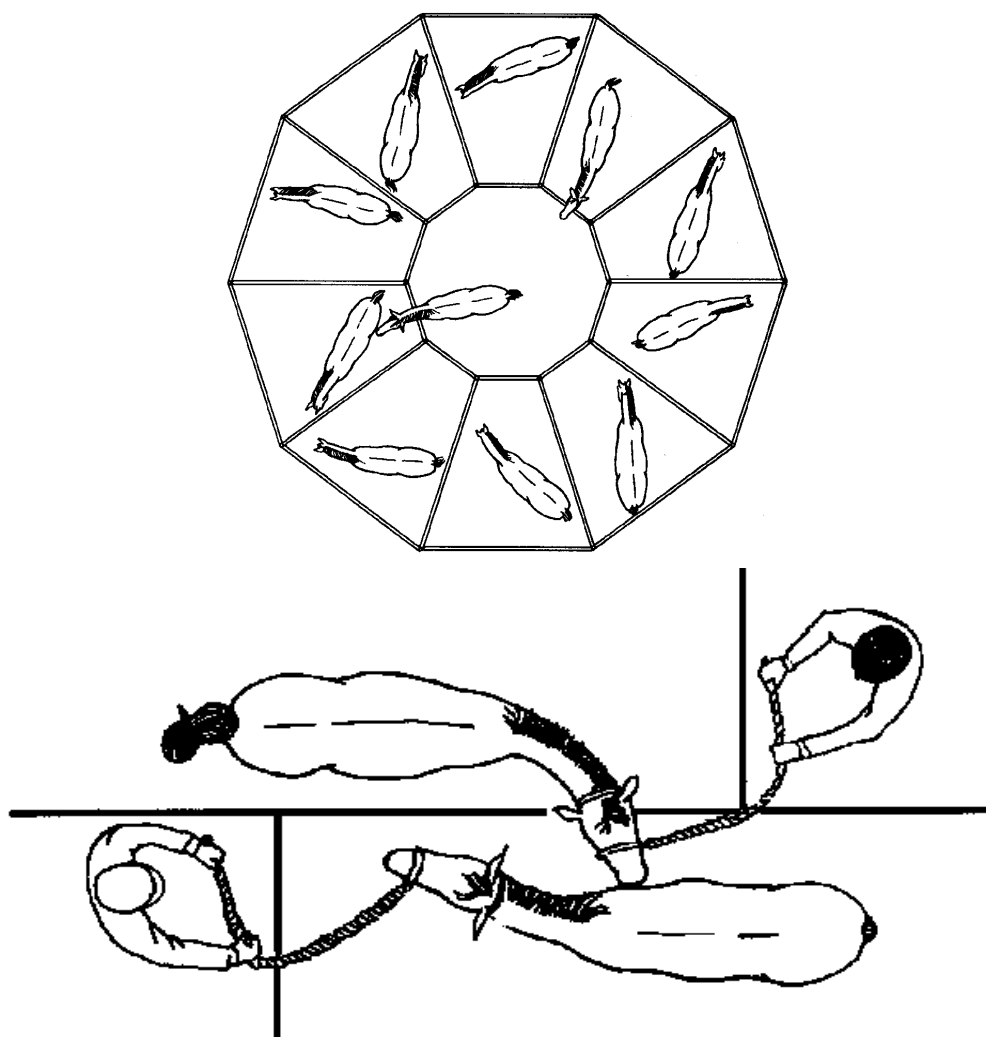
Osnovni postupci tehnologije VO konja su: (a) otkrivanje estrusa kobile (b) uzimanje i kontrola sperme, (c) razređivanje sperme, (d) čuvanje razređene sperme i (e) inseminacija.

Znaci estrusa kobile su vrlo dobro izraženi. Estrus se otkriva u prisustvu pastuva.



Slika 82. Estrus kobile

Karakteristično podizanje repa (*levo*), flehmen pastuva (*sredina*) i bliskanje vulve (*desno*)



Slika 83. Načini otkrivanja estrusa kobile

Tabela 33. Ocena estrusnog reagovanja kobile

| Ocena stepena reagovanja | Ponašanje kobile |
|--------------------------|---|
| Nije u estrusu | Agresivna i ne dozvoljava pristup pastuvu |
| Pasivna | Slab interes i odlazi od pastuva |
| Slabo aktivna | Slab interes za pastuva i povremeno pokazuje znake estrusa |
| Izražena aktivnost | Interes i pokazuje znake estrusa, brzo posle kontakta sa pastuvom |
| Potpuno u estrusu | Pokazuje znake estrusa i bez kontakta sa pastuvom |

Uzimanje i kontrola sperme. Sperma se uzima posebno dizajniranom veštačkom vaginom za pastuva, kojih ima više modela. Važno je da sperma ne dolazi u kontakt sa polietilenskim unutrašnjim zidom vagine, koji je toksičan za spermatozoide. Zbog toga je bolje koristiti model veštačke vagine sa otvorenim krajem. Skok pastuva se izvodi na fantom.

Fantom se ne mora koristiti kod pastuva koji ne mogu izvršiti skok. Pri tome se dobri rezultati postižu manuelnom stimulacijom penisa. Posle dobijanja ejakulata, odvaja se gel-frakcija i tada se izmeri tačan volumen nativnog ejakulata. Koncentracija spermatozoida se određuje metodom hemocitometrije ili spektrofotometrije. Neposredno posle uzimanja

sperme, određuje se stepen progresivne pokretljivosti spermatozoida ispod mikroskopa. Generalno se smatra da su broj spermatozoida i stepen njihove progresivne pokretljivosti primarni faktori koji utiču na fertilitet pastuva. Postoje značajne varijacije u veličini i obliku glave, kao i u broju spermatozoida između pojedinih ejakulata jednog istog pastuva, ali su varijacije ovih parametara veće između različitih pastuva. Broj spermatozoida sa morfološki normalnim glavama je značajno veći kod fertilnih, od onog kod subfertilnih pastuva. Osim toga, morfološke dimenzije glave spermatozoida su veće kod subfertilnih pastuva.

Razređivanje i čuvanje sperme. Postoji veći broj razređivača za kratkotrajno čuvanje tečne razređene sperme, na temperaturi 4-5⁰C, do 3 dana. Ovi razređivači su, obično, na bazi obranog mleka, glicina, žumanca jajeta i krem-gela. Procedura hlađenja razređene sperme ima značajnog uticaja na održavanje progresivne pokretljivosti. Linearna vrednost rashlađivanja sperme od 0,05⁰C/min, između 20 i 5⁰C, obezbeđuje maksimalnu progresivnu pokretljivost. Sperma može biti brzo rashlađena sa 37 na 20⁰C. Razređena sperma većine pastuva zadržava visok stepen progresivne pokretljivosti tokom 24h, na temperaturi 5⁰C. Dodavanje 2mM pyruvata, u razređivače na bazi obranog mleka ili žumanca jajeta, značajno povećava održavanje progresivne pokretljivosti do 48h. U razređivače se obavezno dodaju određeni antibiotici, u adekvatnim dozama. Volumen inseminacione doze može da se kreće između 5 i 30ml, u kojima se nalazi 100 do 500 miliona progresivno pokretnih spermatozoida. Glavni problem upotrebe duboko zamrznute sperme predstavlja značajno redukovana progresivna pokretljivost spermatozoida posle odmrzavanja, kao i veliko variranje između pojedinih pastuva u ovom pogledu. Ovo su i glavni razlozi smanjenog fertiliteta (56% koncepcije) posle osemenjavanja duboko zamrznutom, u odnosu na osemenjavanje tečnom razređenom spermom (65% koncepcije). U ovom pogledu, međutim, postoji vrlo veliko variranje između pojedinih pastuva, jer duboko zamrznuta sperma nekih pastuva rezultira sa 71% koncepcije, a nekih sa svega 23% koncepcije. Veći broj istraživanja pokazuje da postoje značajne razlike u hemijskom sastavu semene plazme, između pojedinih pastuva, te da je ovo važan faktor koji određuje sposobnost sperme za krioprezervaciju. Ustanovljeno je da su oštećenja akrozoma, najčešći razlog redukovanog fertiliteta duboko zamrznute sperme. Proceduru pripreme, zamrzavanja i otapanja sperme pastuva, detaljno su opisali.

Tehnika inseminacije. Volumen inseminacione doze tečne razređene sperme se kreće između 10 i 12ml, koja treba da sadrži 300 do 500 x 10⁶ spermatozoida, progresivne pokretljivosti preko 60%. Broj spermatozoida u dozi se ocenjuje na osnovu fertilizacionih parametara svakog ejakulata. Ako je ejakulat lošiji, pravi se manje doza sa većim brojem spermatozoida u dozi i obrnuto. Osim toga, od ejakulata dobijenih izvan sezone parenja, treba praviti manje doza sa većim brojem spermatozoida, zbog toga što su ejakulati izvan sezone parenja, lošijeg kvaliteta. Osemenjavanje treba vršiti svakog drugog dana estrusnog perioda, sve dok se ne ustanovi moment ovulacije. Iako kobila može koncipirati i 18h posle ovulacije, takva osemenjavanja rezultiraju značajnim povećanjem ranog embrionalnog mortaliteta, što je, često, posledica debalansa hromozoma.

U slučaju kada se predvidi moment ovulacije (na osnovu veličine predovulatornog folikula), moguće je izvršiti jednu inseminaciju nekoliko sati pre ovulacije. Ovo je posebno značajno kod upotrebe duboko zamrznute-odmrznute sperme, jer je ustanovljena značajna redukcija vremena preživljavanja ovih spermatozoida u reproduktivnom traktu kobile (na samo 12h, u odnosu na 3 do 4 dana kod svežih spermatozoida). Pre inseminacije, kobilu treba adekvatno pripremiti. Perinealna regija kobile se mora dobro oprati, a rep umotati gazom. Zatim se kobila imobilize u boks za inseminaciju. Lice koje izvodi inseminaciju se adekvatno obuče. Na jednu ruku se navuče sterilna plastična rukavica. Ta ruka se uvodi u vaginu, a kažiprst se uvlači u cervikalni kanal. Drugom rukom se uvlači inseminacioni kateter

u cervikalni kanal, tako da njegov vrh dostigne lumen tela materice, gde se izvrši deponovanje sperme.



Slika 85. Uzimanje sperme od pastuva



Slika 86. Veštačka vagina: Delovi (levo) i pripremljena za upotrebu (desno)



Slika 87. Priprema spermosabirača za jednokratnu upotrebu



Slika 88. Priprema dobijenog ejakulata u laboratoriji



Slika 89. Priprema kobile za VO



Slika 90. Inseminacija metodom vizuelizacije cerviksa vaginalnim spekulomom

Postavljanje vaginalnog spekuluma (levo), Izgled kaudalnog otvora cerviksa u vagini (sredina) i Uvođenje inseminacionog katetera u cervikalni kanal (desno).



Slika 91. Inseminacija digitalnom palpacijom otvora cerviksa *per vaginam*

A. KUJA

Intravaginalna inseminacija dozama sveže razređene sperme je efikasna klasična metoda veštačkog osemenjavanja kuja, koja daje dobre rezultate fertiliteta (Rota i sar., 1999). Međutim, upotreba inseminacionih doza dugotrajno čuvanih dubokim zamrzavanjem, daje vrlo varijabilne rezultate, zavisno od kvaliteta sperme, mesta depozicije inseminacione doze (intravaginalno ili intrauterino), vrste katetera za inseminaciju, kao i rase osemenjenih kuja. Ustanovljeno je da vrednost uspešne koncepcije iznosi 84% posle intrauterine i 59% posle intravaginalne inseminacije, dozama čuvanih dubokim zamrzavanjem. Intrauterinom inseminacijom dozama sveže razređene sperme postiže se znatno bolja vrednost uspešne koncepcije (86,7%), u odnosu na inseminaciju dozama čuvanih dubokim zamrzavanjem (60,7%). I veličina legla je veća posle inseminacije svežom, u odnosu na inseminaciju duboko zamrznutom spermom. U savremenoj tehnologiji veštačkog osemenjavanja kuja, dozama čuvanih dubokim zamrzavanjem, koriste se doze volumena 2 do 2,5 ml, koje sadrže 2×10^8 progresivno pokretnih spermatozoida. Za razređivanje sperme se koristi tris-fruktoza-citratni razređivač, sa 8% (v/v) glicerola i 20% (v/v) žumanca jajeta. Otapanje zamrznutih doza se vrši na 37°C, tokom 30 sekundi. Primenuje se, isključivo, intrauterina inseminacija, koja se izvodi transcervikalno ili metodom laparoskopije.

Primenom ove metode se postiže 62 do 91% uspešne koncepcije (Thomassen i sar., 2006).

Veštačko osemenjavanje (VO) obuhvata sledeće procedure: uzimanje sperme od mužjaka, kontrola kvaliteta sperme, razređivanje sperme, formiranje inseminacionih doza, čuvanje inseminacionih doza do upotrebe (inseminacije) i tehnika inseminacije kuje.

Uzimanje sperme od psa se, obično, vrši *manuelnom stimulacijom penisa* (preko prepucijuma), a ređe *veštačkom vaginom*. U oba slučaja se sperma uspešnije dobija kada je prisutna estrična kuja, na koju pas izvrši skok. Tada se vrši manualna stimulacija penisa, preko prepucijuma, dok se ne postigne erekcija. Spermalna frakcija ejakulata se hvata u sterilni spermosabirač, koji mora biti zaštićen od uticaja svetla i temperiran na 35 do 37°C.



Slika 92. Uzimanje ejakulata od psa

Levo je manžeta sa spermosabiračem, a desno su epruvete sa spermalnom i aspermalnom (strelica) frakcijom ejakulata.

Kontrola kvaliteta ejakulata se obavlja *makroskopski* (volumen, gustina, boja, miris, strane primese) i *mikroskopski* (% progresivne pokretljivosti, ukupan broj spermatozoida, broj morfološki abnormalnih i mrtvih spermatozoida), na temperaturi 35°C.

Prosečne vrednosti nekih važnijih parametara ejakulata psa:

- Volumen = 10ml;
- Koncentracija = 300×10^6 spermatozoida;
- Ukupan broj spermatozoida u ejakulatu = 3×10^9 ;
- Progresivna pokretljivost = 85%;
- Morfološki normalnih spermatozoida = 80%;
- Ukupna dužina spermatozoida = 55µm.

Inseminacione doze se mogu praviti od: (a) nativnog ejakulata i (b) tečnog, razređenog ejakulata. Doze od nativnog ejakulata se moraju upotrebiti odmah. Doze napravljene

razređivanjem 1:1 ili 1:2 se mogu čuvati do 48h, na temperaturi +4°C. Sperma psa se može čuvati dubokim zamrzavanjem (u tečnom azotu, na – 198°C).

Volumen inseminacione doze tečne razređene sperme za kuje: *lakše od 4,5 kg = 3ml, 4,5 do 22kg = 3 do 5ml i 23 i više kg = 5 do 8ml*. Broj spermatozoida u dozi se kreće između 2 i 5×10^8 .

U savremenoj tehnologiji veštačkog osemenjavanja kuja, dozama čuvanih dubokim zamrzavanjem, koriste se doze volumena 0,5 ml, koje sadrže 2×10^6 progresivno pokretnih spermatozoida. Za razređivanje sperme se koristi tris-fruktoza-citratni razređivač, sa 8% (v/v) glicerola i 20% (v/v) žumanca jajeta. Otapanje zamrznutih doza se vrši na 37°C, tokom 30 sekundi. Primenjuje se, isključivo, intrauterina inseminacija, koja se izvodi transcervikalno ili metodom laparoskopije. Primenom ove metode se postiže 62% do 91% uspešne koncepcije.

Postupak pripreme inseminacionih doza za duboko zamrzavanje:

- Ekvilibracija nativnog ejakulata na telesnoj temperaturi, tokom 15 minuta.
- Žumančano-citratni razređivač, sa dodatkom glicerola, zagrejan na sobnu temperaturu, dodaje se u ejakulat, u razmeri 1:1.
- Tako dobijen razređen ejakulat, se postepeno rashlađuje u frižideru, na + 5°C, tokom 30 minuta.
- Sledi još jedna količina razređivača, ohlađenog na + 5°C, do razređenja 1:2.
- Razređena sperma se pakuje u plastične pajete (slamčice), volumena 0,5ml i zamrzava u tečnom azotu, gde se čuva do upotrebe.

Pre inseminacije, duboko zamrznute doze se otapaju u vodi, na +37°C, tokom 50 sekundi. Inseminacija kuje se mora izvršiti unutar 10 minuta po otapanju doze!

Inseminacija se izvodi tako što se plastični kateter uvodi u prednji deo vagine, gde se deponuje doza sperme. Depozicija sperme treba da se vrši polako, u trajanju od oko 5 minuta, pri podignutoj karlici kuje. Ovo prevenira refluks sperme iz vagine, tokom procesa inseminacije. Dobro je da se, prstom u rukavici, stimuliše vaginalni zid, jer se, na taj način, pospešuju antiperistaltičke kontrakcije materice i poboljšava transport sperme od mesta depozicije, kroz rogove materice.

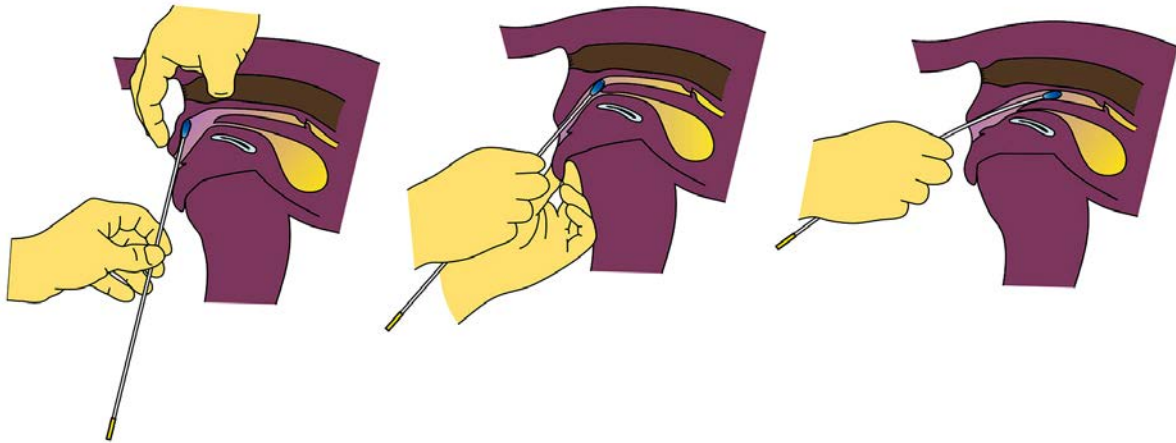
Intracervikalna ili intrauterina inseminacija, kroz vaginu, je skoro nemoguća kod kuje. Intrauterina inseminacija dozama zamrznute-odmrznute sperme, izvedena hirurškim putem, daje dobre rezultate, ako doza sadrži minimalno 100×10^6 progresivno pokretnih spermatozoida.

Tabela 34. Variranje uspešne koncepcije posle veštačkog osemenjavanja kuje

| Način osemenjavanja | Uspešna koncepcija (%) |
|--|------------------------|
| Prirodno | 80-90 |
| Intravaginalno VO svežom spermom | 62.3-100 |
| Intravaginalno VO rashlađenom spermom | 59-80 |
| Intravaginalno VO duboko zamrznutom-odmrznutom spermom | 52.6-60 |
| Intrauterino VO duboko zamrznutom-odmrznutom spermom | 0-80 |

Za uspešno osemenjavanje kuje, važno je znati: (1) kuja ovulira oko 10 dana posle početka proestrusa (pojava krvavog vaginalnog iscetka) ili 1. do 2. dana estrusa, (2) ovulacija može biti detektovana: (a) utvrđivanjem koncentracije LH u krvnoj plazmi (ovulacija se dešava oko 24h posle postizanja pika LH, (b) utvrđivanjem koncentracije progesterona u krvnoj plazmi (>5 ng/ml) ili (c) citologijom vaginalnog brisa (>50% kornifikovanih ćelija),

(3) oocit pasa bude ovuliran u primarnom stadijumu (nukleus u stadijumu germinativnog vezikula, diploten prve mejoze) i mora sazreti u jajovodu do sekundarnog oocita (metafaza II mejoze), pre fertilizacije, (4) inseminaciju svežom ili zamrznutom spermom treba izvesti 2 dana posle utvrđene ovulacije i ponoviti 48 i 73h kasnije. (5) osemenjavanje zamrznutom spermom treba izvoditi 5 do 7 dana posle ovulacije i (6) intrauterina inseminacija je bolja od intracervikalne.



Slika 93. Tehnika intracervikalne veštačke inseminacije kuje



Slika 95. Komplet za klasičnu intracervikalnu inseminaciju kuje





Slika 96. Endoskopska oprema (gore) i tehnika transcervikalne (dole levo) i intrauterine (dole desno) inseminacije kuje

B. MAČKA

Uzimanje sperme od mačka se može izvesti primenom veštačke vagine ili elektroejakulacije. Metod veštačke vagine je, sam po sebi, jednostavan, ali nije praktičan za kliničku upotrebu, jer je vrlo teško istrenirati mačka da ejakulira u veštačku vaginu. Podaci pokazuju da se svega 10 do 20% mačkova može uspešno istrenirati za ejakulaciju u veštačku vaginu. Osim toga, kvalitet ejakulata je lošiji posle primene veštačke vagine, u odnosu na one dobijene elektroejakulacijom, koja se izvodi u opštoj anesteziji. Primenom elektroejakulacije se može dobiti ejakulat od, praktično, svakog mačka. Zbog toga je elektroejakulacija metod izbora za dobijanje sperme od mačka.

Tabela 35. Parametri ejakulata mačka, dobijeni veštačko vaginom ili elektroejakulacijom

| Parametri | Metoda dobijanja | | | |
|--|------------------|-------------|---------------------|-------------|
| | Veštačka vagina | | Elektroejakulacija* | |
| | Prosek | Granice | Prosek | Granice |
| Volumen (ml) | 0,06 | 0,03 – 0,09 | 0,26 | 0,11 – 0,49 |
| Broj spermatozoida u ejakulatu ($\times 10^6$) | 61 | 21 - 117 | 43 | 11 - 66 |
| Progresivna pokretljivost spermat. (%) | 58 | 4 - 87 | 65 | 44 - 85 |
| pH | 8,3 | 8,1 – 8,6 | 8,6 | 8,4 – 8,7 |

* Dobijeno posle ukupno izvedenih 240 električnih stimulusa (4 serije \times 60), od 6V.

Inseminacija mačke se može izvesti nativnom spermom, kao i dozama sperme čuvanim dubokim zamrzavanjem. Pri tome se postižu dosta niski rezultati koncepcije, posle osemenjavanja dozama sperme čuvanih dubokim zamrzavanjem. Inseminaciona doza, koja sadrži minimalno 5×10^6 spermatozoida, unosi se kateterom u vaginu, do ulaza u cervikalni kanal i tu se deponuje. Bitno je da se, ispitivanjem vaginalnog brisa, ustanovi da je mačka u estrus. Neposredno posle inseminacije, mačka se mora tretirati preparatom hipofizarnog LH ili HCG, radi izazivanja ovulacije.

PROVERA ZNANJA

1. Definišite pojam veštačkog osemenjavanja (VO).
2. Nabrojte prednosti veštačkog, u odnosu na prirodno osemenjavanje.
3. Navedite osnovne postupke u savremenoj tehnologiji VO.
4. Nabrojte metode za uzimanje sperme od domaćih vrsta priplodnjaka.
5. Koja od ovih metoda se koristi u praksi, za uzimane sperme nerasta? Navedite osnovne razloge za primenu baš te metode.
6. Navedite parametre koji se određuju makroskopskim i mikroskopskim pregledom nativnog ejakulata, neposredno posle uzimanja od mužjaka.
7. Kojim metodama se može odrediti broj spermatozoida u uzorku sperme?
8. Nabrojte načine pokretanja spermatozoida.
9. Koja je najjednostavnija metoda određivanja broja mrtvih spermatozoida u uzorku sperme?
10. Na šta ukazuje postojanje proksimalne citoplazmatske kapi na spermatozoidu?
11. Navedite vrednosti osnovnih parametara ejakulata nerasta, bika, ovna, jarca, pastuva, psa i mačka.
12. Navedite osnovne parametre inseminacione doze (volumen i broj progresivno pokretnih spermatozoida) za klasično (intracervikalno) VO bika, ovna, jarca, pastuva, psa i mačka.
13. Koliko inseminacionih doza se može napraviti od jednog prosečno dobrog ejakulata bika, ovna, jarca, pastuva, psa i mačka.
14. Navedite osnovne razloge razređivanja nativnog ejakulata u tehnologiji VO.
15. Koliko dugo, i na kojoj temperaturi, se mogu čuvati inseminacione doze tečne razređene sperme?
16. Na kojoj temperaturi se, u kom medijumu i koliko dugo se mogu čuvati doze sperme tehnologijom dubokog zamrzavanja. Sperma koje vrste domaćih priplodnjaka najbolje, a koje najlošije tehnologiju dubokog zamrzavanja?
17. Opišite proces (tehniku) veštačkog osemenjavanja krmače, krave, kobile, ovce, koze, kuje i mačke.

3.1.6.6. VEŠTAČKO OSEMENJAVANJE PTICA

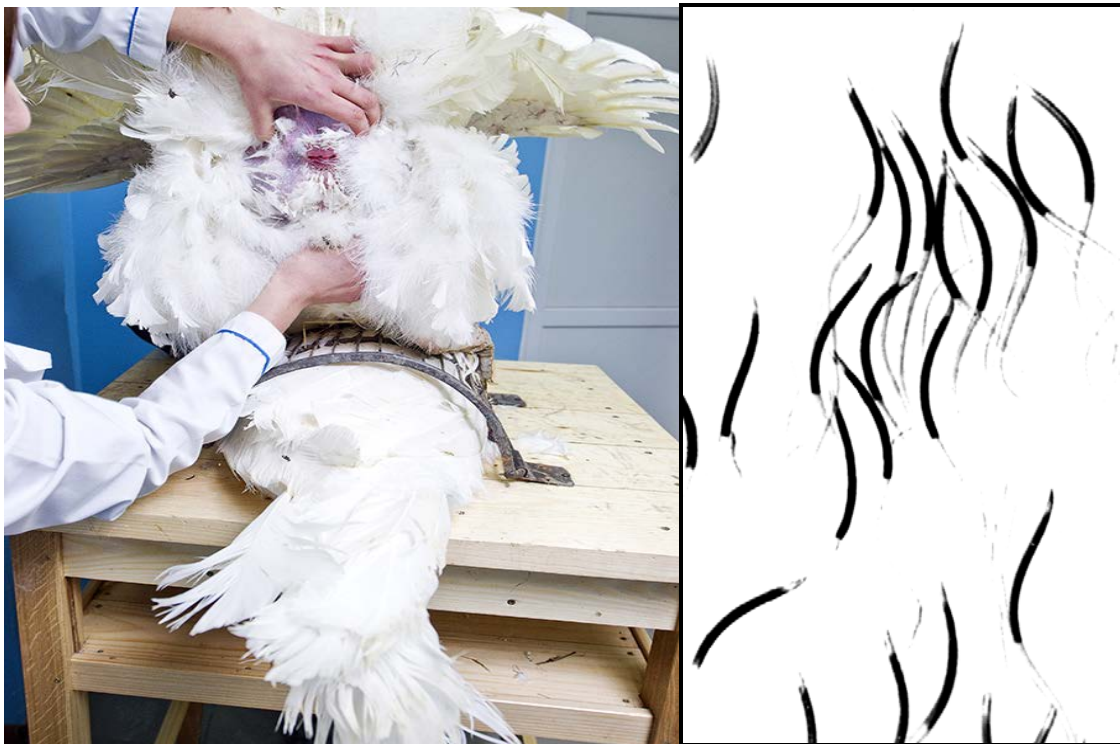
Kao i kod drugih domaćih životinja, i u intenzivnoj proizvodnji živine, postoji više zootehničkih, sanitarno-veterinarskih i ekonomskih razloga za primenu tehnologije veštačkog osemenjavanja. Među njima su najvažniji: povećanje reproduktivnog iskorištavanja genetski superiornih mužjaka, mogućnost dugotrajnog čuvanja sperme genetski kvalitetnih mužjaka, lakši transport sperme na veće udaljenosti, izostanak komplikacija prilikom adaptacije i/ili aklimatizacije mužjaka, sprečavanje širenja zaraznih bolesti.

Osnovni principi tehnologije veštačkog osemenjavanja ptica su slični onima kod VO sisara, ali postoje i bitne razlike, koje proističu iz specifičnosti građe i funkcije muških i ženskih polnih organa, i specifičnosti fizioloških karakteristika sperme ptica. Veštačko osemenjavanje se može izvoditi kod svih vrsta domaćih ptica, ali se, najčešće, primenjuje kod kokoši i ćuraka.

Dobijanje sperme. Sperma se može uzimati 3 do 4 puta nedeljno od petla, tokom neograičenog vremenskog perioda. Od ćurana se sperma uzima u toku sezone parenja, 5 do 6 puta unutar 2 nedelje. Posle toga, treba napraviti pauzu od nekoliko dana. Ejakulacija se izaziva masažom kloake, odnosno završnih delova semevoda, koji se nalaze u zidu kloake. Prisustvo fekalija značajno smanjuje fertilitet ejakulata i kontaminira ga mikroorganizmima.

Razređivanje sperme. Sperma ptica je osetljivija na negativne uticaje razređivanja i čuvanja *in vitro*, u poređenju sa spermom sisara. Upotrebom adekvatnih razređivača, sperma petla se može razrediti u maksimalnom odnosu 1 : 10. Razređena sperma se mora iskoristiti maksimalno do 30 minuta posle razređivanja. Nije razvijena efikasna tehnologija dubokog zamrzavanja i dugotrajnog čuvanja sperme ptica.

Inseminacija. Prosečan volumen doze native (nerazređene) sperme, za osemenjavanje kokoške, iznosi 0,1ml. Znači da se, od jednog ejakulata, može napraviti 7 do 10 inseminacionih doza. Visok stepen fertiliteta se može postići i sa duplo manjom dozom (0,05ml). Mada je volumen ejakulata ćurana znatno manji od petla, koncentracija spermatozoida je veća, pa jedna inseminaciona doza native sperme može da iznosi 0,025 do 0,035ml. Kokoške treba osemenjavati u sedmodnevnim intervalima. Spermatozoidi petla zadržavaju oplodnu sposobnost u jajovodu 12 do 14 dana. Tako se vrednost oplodnje zadržava na oko 85%, tokom 10 dana od prethodne inseminacije. Ćurke se mogu osemenjavati svake 3 do 4 nedelje, jer spermatozoidi ćurana zadržavaju visoku oplodnu sposobnost u jajovodu i preko 30 dana, od momenta inseminacije.



Slika 97. Uzimanje sperme od ćurana (levo) izgled spermatozoida ptica (desno)
Zapazaiti jako izduženu glavu spermatozoida.

Tabela 36. Osnovne osobine ejakulata domaćih vrsta ptica

| Vrsta | | Volumen ejakulata (ml) | Konc. Sptz. ($\times 10^9/\text{ml}$) | Boja | Dužina sptz. (nm) |
|-------|------------|------------------------|---|---------------|-------------------|
| PETAO | Teške rase | 0,2 - 0,8 | 1 - 4 | Melčno-bela | 107 |
| | Lake rase | 0,3 - 1,5 | 3-10 | Melčno-bela | 100 |
| ĆURAN | | 0,2-1,0 | 6-12 | Melčno-bela | 105 |
| PATAK | Domaći | 0,2-1,2 | 1-4 | Žuta i bistra | 106 |
| | Divlji | 0,05-1,5 | 1-4,5 | - | - |
| GUSAN | | 0,1-0,5 | 0,2-1,0 | Žuta i bistra | - |



Slika 98. Veštačko osemenjavanje ćurke

3.1.7. TRANSPLANTACIJA EMBRIONA

Kratak istorijat

Prvi pisani dokument o uspešnoj transplantaciji ranih embriona kunića, objavio je *Heape (1890)*. Međutim, prvi značajnija istraživanja i interes za primenu tehnologije transplantacije embriona u stočarstvu, započeo je *Hammond (1925)*, dok je uspešan transfer embriona ovaca izveden u bivšem SSSR (*Lopirin, 1957*) i u Poljskoj (*Kardymowicz i Stepinski, 1957*). Postoje podaci da je *Kvasnitski (1951)* prvi izveo uspešnu hiruršku transplantaciju embriona svinje, a

prvu transcervikalnu (nehiruršku) transplantaciju embriona goveda su izveli Laming i Rowson, (1952).

Naglo povećanje interesa za primenu transplantacije embriona, kao biotehnoške metode za unapređenje stočarske proizvodnje, nastaje sa istraživanjima koja su razvila tehnologiju hirurškog i ne hirurškog ispiranja i transplantacije embriona domaćih životinja (Rowson i sar., 1969). Tokom 1980-ih, učinjen je značajan razvoj ove tehnologije i početak njene masivnije praktične primene u stočarstvu. U tom periodu se razvijaju i tehnologije *in vitro* manipulacije sa embrionima, kao što su *in vitro* maturacija (IVM) i *in vitro* fertilizacija (IVF) oocita, radi dobijanja ranih embriona za transplantaciju (Seidel, 1981; Hammer i sar., 1985). Prvo ždrebe, posle transplantacije embriona, dobijeno je u Japanu, 1974. godine.

Praktična primena

Transplantacija ranih embriona je biotehnoška metoda reprodukcije, koja se praktično primenjuje od polovine 80-ih godina XX veka. U suštini, cilj transplantacije embriona je da se, od jedne plotkinje superiornih genetskih predispozicija za pojedina produktivna svojstva, dobije značajno veći broj potomaka, u odnosu na onaj koji se dobija prirodnim ritmom reprodukcije. Primena ove tehnologije je naročito važna u reprodukciji onih vrsta domaćih životinja, kod kojih jedan reproduktivni ciklus (period između dva uzastopna partusa) dugo traje, a veličina legla je mala. To je slučaj sa kravom, kobilom i, donekle, ovcom i kozom. Tako, na primer, međutelidbeni interval krave, u optimalnim uslovima, traje 365 dana (u proizvodnjim uslovima duže, 13 ili 14 meseci), a rađa se jedno tele. Zbog toga se, od jedne krave, visoko mlečnih rasa, u intenzivnoj proizvodnji mleka, dobije prosečno 3 do 4 teleta. Ovo je jako mala produkcija teladi, koja se može ostvariti od genetski superiornih majki. Zbog toga, proces genetskog unapređenja traje dugo, jer se proizvodi mali broj njihovih potomaka.

S tim u vezi, primenjuje se tehnologija transplantacije embriona, koja podrazumeva dobijanje većeg broja ranih embriona u jednom ciklusu, od genetski superiornih krava (donatori embriona), koji se transplantiraju u određen broj junica (recipijenti embriona), koje služe kao fiziološke majke, odnosno iznose gravidnost do kraja. Ovi recipijenti treba da su odličnog zdravstvenog stanja i reproduktivne aktivnosti, ali ne moraju biti superiornih genetskih predispozicija. Na taj način se, za 9 meseci (koliko traje gestacija krave) dobije, na primer 10 teladi od jedne genetski superiorne krave (jer se superovulacijom donora može dobiti 15 do 20 ovulacija, odnosno nešto manje embriona sposobnih za transplantaciju), a ne jedno tele, kako bi to bilo kada bi genetski superiorna krava iznela svoju gravidnost do kraja.

Kod kobila, tehnologija transplantacije ima još više efekta, jer gravidnost kobile traje 11 meseci, a postoji i period anestrusa, koji traje oko 6 meseci. Zbog toga je prirodna reproduktivna efikasnost kobile vrlo niska. Kod ovaca i koza se transplantacija embriona izvodi radi dobijanja većeg broja potomaka od genetski superiornih rasa, kao i za prevazilaženje problema sezonskog anestrusa. Transplantacija embriona prvenstveno koristi za dobijanje potomaka od genetski superiornih ženki, koji se mogu na sterilan način ubacivati iz jednog u drugi zapat (tzv. SPF - Specific pathogens free zapati). Za transplantaciju se koriste embrioni dobijeni superovulacijom ženke donatora, ili tehnologijom fertilizacije *in vitro* (IVF – *in vitro* fertilization). U momentu ispiranja iz donora, odnosno transplantacije, embrioni moraju biti potpuno morfološki pravilno razvijeni i treba da su stari 6 do 8 dana (u stadijumu kasne morule ili ranog blastocista).

Primenom tehnologije transplantacije ranih embriona, moguće je:

- ✓ Dobijanje znatno većeg broja potomaka od jedne, genetski superiorne, ženke.

- ✓ Dugotrajno čuvanje embriona od određene ženke.
- ✓ Lakši transport embriona na veće udaljinosti
- ✓ Izbegavanje rizika transporta, aklimatizacije i karantina genetski visoko vrednih ženki.
- ✓ Sprečavanje širenja zaraznih bolesti.
- ✓ Definisane pola dobijenih potomaka.
- ✓ Ekonomska korist od prodaje embriona.

Osnovni postupci u tehnologiji transplantacije ranih embriona:

1. Odabiranje genetski superiornih ženki za dobijanje embriona (donatori)
2. Odabiranje zdravih i reproduktivno sposobnih junica za primanje embriona (recipijenti)
3. Sinhronizacija estrusa donatora i recipijenata, gde se donatori tretiraju visokim dozama gonadotropina, radi izazivanja superovulacije, i dobija veći broj embriona
4. Veštačko osemenjavanje donatora.
5. Ispiranje embriona iz uterusa donatora
6. Kontrola kvaliteta (morfologije) ispranih embriona
7. Priprema kvalitetnih embriona za transplantaciju i
8. Transplantacija embriona u recipijente, koji se nalaze u istoj fazi estrusnog ciklusa sa donatorima

3.1.7.1. TRANSPLANTACIJA EMBRIONA SVINJE

Prvu uspešnu transplantaciju embriona svinje je izveo *Kvasnický (1951)*, u bivšem Sovjetskom Savezu, dok su klasičnu proceduru hirurškog dobijanja i transplantacije ranih embriona svinje opisali *Hancock i sar. (1962)*.

Tehnologija transplantacije ranih embriona, pruža sledeće mogućnosti: (a) dobijanje prasadi od krmača proverenog zdravstvenog stanja, (b) unošenje novih genotipova u zatvorene zapate, bez rizika unosa zaraznih bolesti, (c) unošenje novih gena u tzv. SPF (Specific pathogens free) zapate, (d) relativno jednostavan i lak način razmene genetskog materijala između pojedinih zemalja, pri čemu se izbegava karantin i adaptacija životinja, (e) dobijanje potomaka od genetski superiornih roditelja, (f) dugotrajno čuvanje poželjnih genotipova (formiranje tzv. banke gena) i (g) naučna istraživanja.

TEHNOLOGIJA TRANSPLANTACIJE

Klasična tehnologija transplantacije embriona svinje obuhvata sledeće procedure: (1) superovulacija donora, (2) sinhronizacija estrusa donora i recipijenata, (3) ispiranje embriona, (4) kontrola kvaliteta i čuvanje embriona i (5) transplantacija embriona u recipijente.

Superovulacija donora. Kod krmača se superovulacijom smatra ovulacija 23 i više, a kod nazimica 18 i više oocita u jednom estrusnom periodu. Superovulacija se može izazvati jednokratnom injekcijom većih doza (1.000 do 2.000 ij.) eCG, datom na kraju folikularne faze spontanog estrusnog ciklusa (tj. 15. ili 16. dana ciklusa). Radi bolje sinhronizacije ovulacije i povećanja broja ovuliranih predovulatornih folikula, injekcija eCG se kombinuje injekcijom 500 do 750 ij. hCG, datom 72h kasnije. Zadovoljavajući fertilitet tretiranih krmača se postiže uobičajenom procedurom VO. Vrednost izazvane superovulacije primarno zavisi od primenjene vrste i doze hormonskih preparata, kao i od starosti i telesne mase plotkinja. Tako

je, na primer, prosečna ovulaciona vrednost, kod krmača ili polno zrelih nazimica, prema različitim autorima, iznosila između 28 i 46 ovulacija. Kod svinja je osnovni problem što vrednost izazvane superovulacije nije enormno veća od spontane ovulacione vrednosti. Naime, prosečna vrednost superovulacije nije ni duplo veća od spontane ovulacione vrednosti, za razliku od krave, kod koje je superovulacija obično veća 10 do 20 puta od spontane ovulacione vrednosti. Osim toga, povećanje doze gonadotropine ne rezultira proporcionalnim povećanjem ovulacione vrednosti, nego se povećava broj neovuliranih folikula i/ili broj folikularnih cista. Pri tome se povećava i broj degenerisanih oocita i ranih embriona. Zbog toga je, radi dobijanja dovoljnog broja embriona, potrebno izvršiti sinhronizaciju estrusa i superovulacije kod većeg broja donora.

Tabela 37. Sinhronizacija estrusa, superovulacija donora i dobijanje embriona

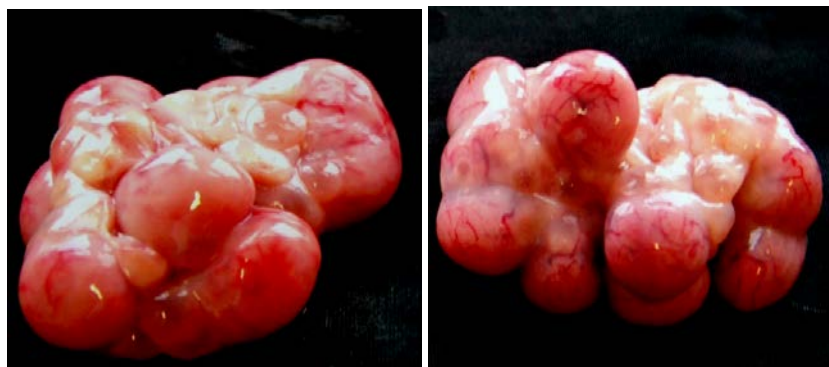
| Dan tretmana | Donori | |
|--------------|------------------------------------|-----------------------------------|
| | Polno zrele nazimice | Zalučene krmače |
| 1. do 15. | Progestagen u dnevnom obroku * | - |
| 16. | U 08,00h injekcija 1.500ij. PMSG | Od 8 do 9h zalučivanje prasadi |
| 17. | - | U 8h injekcija 1.500ij. PMSG |
| 19. | U 16h injekcija 300ij. HCG + Gn-RH | U 16h injekcija 300ij. HCG +Gn-RH |
| 20. | U 14-15h prva inseminacija | U 14-15h prva inseminacija |
| 21. | U 8-9h druga inseminacija | U 14-15h druga inseminacija |
| 24. - 26. | Ispiranje embriona | Ispiranje embriona |

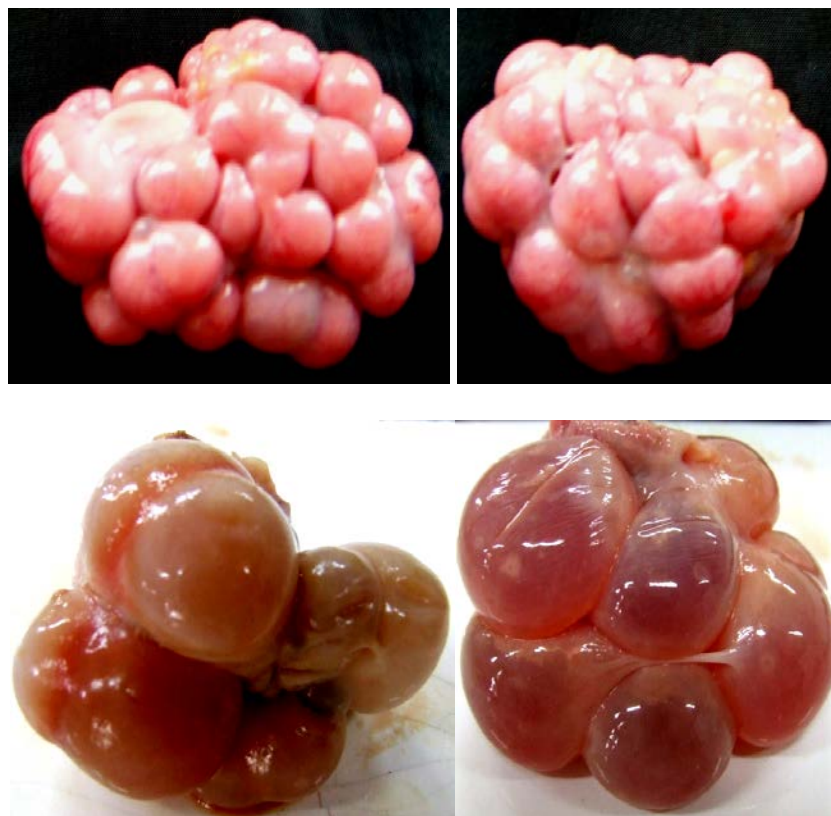
* Vrste i doze preparata videti u poglavlju o sinhronizaciji estrusa polno zrelih nazimica.

Veći broj ponovljenih superovulacija, kod istog donora, u većini slučajeva, ne ostavlja negativne posledice na funkciju jajnika i opšte zdravstveno stanje. Moguće je izvesti 4 do 16 uzastopnih superovulacija kod istog donora, bez uočenih negativnih posledica.

Sinhronizacija estrusa donora i recipijenata je jedan od primarnih uslova uspešne transplantacije embriona. Kod svinja nema značajnije redukcije postignute gravidnosti kod recipijenata, ako se estrus kod donora javio jedan dan kasnije od recipijenata.

Veća razlika u stepenu sinhronizovanosti estrusa kod donora i recipijenata, rezultira vrlo niskom vrednošću prašenja recipijenata.





Slika 99. Jajnici svinje u diestrusu, sa normalnom ovulacionom vrednošću, vide se aktivna žuta tela (*corpora lutea*) (*gore*), jajnici u diestrusu sa izazvanom superovulacijom, vidi se znatno veći broj aktivnih žutih tela (oko 27 na levom i oko 35 na desnom jajniku) (*sredina*) i velike folikularne ciste, koje se formiraju kada se krmača ili nazimica tretira previsokim dozama eCG (*dole*)

Tabela 38. Sinhronizacija estrusa kod donora i recipijenata

| Dan tretmana | Donori | Recipijenti |
|--------------|--|--|
| 0. | a. Prepubertetske nazimice: injekcija 1.250 ij eCG. | Prepubertetske nazimice (80-90kg): injekcija 750-1.000 ij eCG. |
| | b. Ciklične nazimice: 16. dana estrusnog ciklusa injekcija 1.250-1.500 ij eCG. | |
| | c. Krmače 24h po zalučanju: injekcija 1.500 ij eCG. | |
| 3. | Injekcija 750 ij hCG | Injekcija 750 ij hCG |
| 4. | Prva inseminacija | Kontrola pojave estrusa |
| 5. | Druga inseminacija | Kontrola pojave estrusa |
| 8.-10. | Ispiranje embriona | Transplantacija embriona ¹ |

¹Koriste se samo recipijenti kod kojih je estrus otkriven istog dana ili dan pre donora.

Ispiranje embriona se, najčešće, vrši klasičnom hirurškom metodom. Zahvat se izvodi u opštoj anesteziji i strogo aseptičkim uslovima. Svaki jajovod se ispira sa 20 ml do 30 ml tečnosti za ispiranje. Uspeh ispiranja se izražava procentualnim odnosom ovulacione vrednosti i broja ispiranih embriona. Ova vrednost se kreće između 80% i 90%. Kod jedne iste krmače je moguće izvesti 5 uzastopnih ispiranja embriona, unutar 90 dana.

Transcervikalna (nehirurška) metoda ispiranja embriona svinja se manje koristi, jer se kateter za ispiranje dosta teško uvodi u kranijalne partije uterusa, zbog njihove velike dužine. Pokušaj prevazilaženja ovog problema, prethodnim hirurškim skraćivanjem rogova uterusa donora, nije dao zadovoljavajuće rezultate ispiranja. Ipak, novija istraživanja u Holandiji, pokazuju značajniji napredak u transcervikalnoj metodi ispiranja embriona svinja, primenom specijalno dizajniranih katetera za ispiranje. Ispiranje embriona se može izvršiti i endoskopskom metodom. Vrednost ispiranja je dosta niža od one koja se dobija klasičnom hirurškom metodom, i kreće se između 35% i 65%. Embrioni se mogu dobiti i ispiranjem iz uterusa, posle žrtvovanja.

Kontrola kvaliteta i čuvanje emnriona. Posle ispiranja, mora se izvršiti kontrola kvaliteta dobijenih embriona. Degenerisani embrioni (nepravilan oblik i debljina ili prsnuta zona pelucida, fragmentacija blastomera), embrioni koji nisu u određenoj fazi razvoja (obzirom na njihovu starost) i mrtvi embrioni se ne koriste za transfer. Divergentnost u stadijumu razvoja embriona, značajno povećava njihov mortalitet posle transplantacije. Čuvanje embriona *in vitro* je neophodno od momenta ispiranja do transfera. Embrioni se mogu čuvati na 20⁰C, tokom 24 h, u pogodnim medijumima. Dugotrajno čuvanje embriona se izvodi postupkom dubokog zamrzavanja, na – 196⁰C. Međutim, uspeh transplantacije duboko zamrznutih-odmrznutih embriona, meren stepenom preživljavanja embriona i postignutom vrednošću prašenja, je veoma nizak.

Transplantacija embriona u recipijente se može izvršiti klasičnom hirurškom metodom, transcervikalnom metodom i endoskopijom. Metoda endoskopije se sve više koristi, zbog svojih prednosti nad klasičnom hirurškom metodom. Ove prednosti su: (1) minimalna hirurška traumatizacija recipijenta, (2) znatno manja mogućnost postoperativnih infekcija i (3) mogućnost vizuelnog pregleda unutrašnjih polnih organa. Za transplantaciju se, obično, koriste embrioni u stadijumu 4 do 8 blastomera. Uspeh transplantacije zavisi od više faktora, među kojima su primarni: stepen sinhronizovanosti estrusnih ciklusa donora i recipijenata, primenjena metoda transplantacije, razvojni stadijum i stepen divergentnosti razvojnih stadijuma embriona, broj transplantiranih embriona i mesto transplantacije.

Proizvodnja embriona *in vitro*. Jedan od glavnih problema klasične tehnologije transplantacije embriona svinje je dobijanje relativno malog broja embriona, posle izvedene superovulacije. Naime, praktično svi embrioni, dobijeni od jednog donora, mogu se transplantirati u samo jednog recipijenta. Zbog toga, broj potomaka, dobijenih od jednog donora, nije značajno veći od onog koji bi se dobio prirodnim ritom razmnožavanja, što je jedan od osnovnih ciljeva embriotransfera.

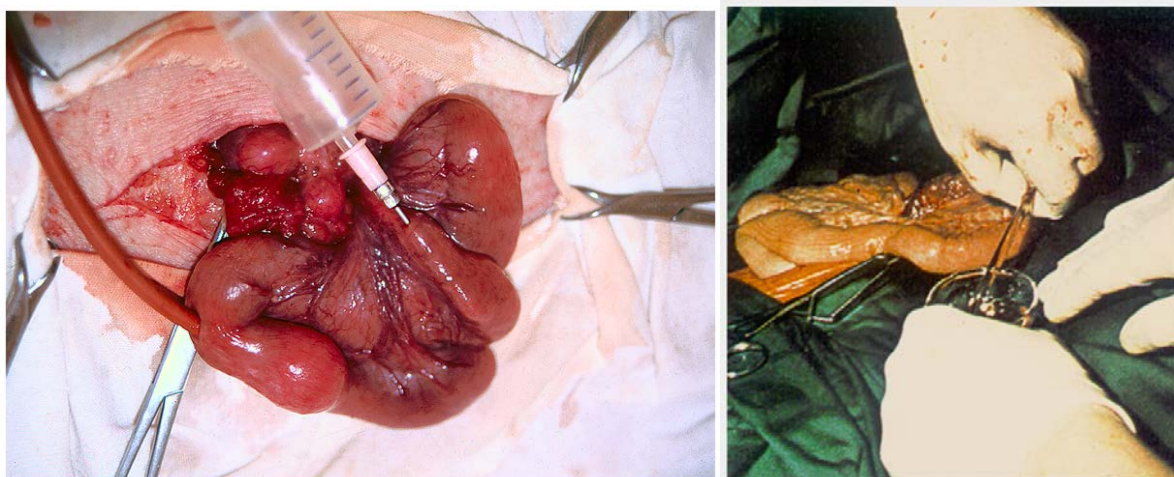
Ovaj problem se pokušava rešiti dobijanjem oocita iz ovarijalnih folikula (tzv. *folikularni oociti*), te njihovim *in vitro* dozrevanjem (maturacijom – *IVM*) i *in vitro* oplodnjom (fertilizacijom – *IVF*). Prednosti ove metode dobijanja embriona se ogledaju u tome što nije potrebno koristiti hormone supstance i relativno komplikovanu hiruršku metodu ispiranja embriona, nego se oociti mogu dobiti iz jajnika žrtvovanih životinja. Te životinje mogu biti genetski visoko vredne nazimice, kao i krmče izlučene iz dalje normalne reprodukcije. Međutim, glavni nedostatak ove metode je činjenica da folikularni oociti nisu zreli, tj. nalaze se u diplotenu prve mejotičke deobe (tzv. *stadijum germinativnog vezikula* – *GV*). Zbog toga se njihovo dozrevanje, do stadijuma metafaze druge mejoze (Mf II), kada su sposobni za oplodnju, mora izvršiti *in vitro* (u posebnim laboratorijskim uslovima) ili *in vivo* (na primer u jajovodima miša, pacova, ili nazimice). Još jedan vrlo ozbiljan nedostatak dobijanja embriona

svinje metodom IVF je pojava enormno visokog procenta polispermčno penetriranih oocita. Dobijanje i dozrevanje folikularnih oocita je detaljnije opisano u sledećem poglavlju (3.2).



Slika 100. Hirurška transplantacija embriona svinje

Prof. dr Blagoje Stančić, Đoka Vulić, DVM i asist. Milovan Nedeljkov, dipl. ing., Institut za stočarstvo, Novi Sad, OPD „Kamendin“, Sirig, 1988.



Slika 101. Hirurška metoda ispiranja embriona svinje (Foto: B. Stančić)



Slika 102. Hirurška (levo) i nehirurška, transcervikalna) metoda transplantacije embriona svinje (Foto: B. Stančić, leva slika)

3.1.7.2. TRANSPLANTACIJA EMBRIONA GOVEDA

Prva uspešna transplantacija embriona krave, izvršena je 1951. godine. Od tada, transplantacija embriona ima sve veću ulogu u povećanju genetskog napretka u goveda. Tako je već 1990. godine u SAD, primenom transplantacije embriona, proizvedeno 27,5% vrhunskih krava i 44% vrhunskih bikova.

Danas se tehnologija transplantacije embriona (ET) koristi za: (a) dobijanje teladi od genetski superiornih majki, (b) dobijanje teladi od “infertilnih” krava, (c) dobijanje teladi tovnih rasa od majki mlečnih rasa, (d) trgovina sa embrionima i njihova distribucija u pojedine krajeve sveta, (e) upotrebu u programu MOET (multiovulacioni embrio transfer), (f) proizvodnju identičnih blizanaca, (g) proizvodnju potomaka željenog pola, (h) čuvanje genetskih resursa i (i) naučna istraživanja.

Sadašnje stanje u tehnologiji ET. Osnovne procedure tehnologije ET (superovulacija, ispiranje, ocena kvaliteta, čuvanje/zamrzavanje i transplantacija embriona) su, danas, dobro razvijene i pogodne za praktičnu primenu. Ipak, poslednjih 10 do 15 godina, nije došlo do značajnijeg povećanja vrednosti superovulacije, pri čemu ostaje problem dosta velikog variranja ove vrednosti. Tako je ustanovljeno da se vrednost superovulacije kreće između 3 i preko 20 ovulacije, zavisno od vrste i doze primenjenih gonadotropina. Obično se dobija 7 do 12 embriona kvalitetnih za transplantaciju. Nije za očekivati da se sadašnja vrednost koncepcije recipijenata sa svežim (65% - 80%) ili zamrznutim embrionima (55% - 70%), značajnije poveća. Broj genetski superiornih krava, koje se koriste kao donori embriona je, još uvek, dosta mali (oko 1% u razvijenim i manje od 0,1% u zemljama u razvoju).

Dalji napredak tehnologije ET se vidi u razvijanju postupaka dobijanja folikularnih oocita, koji se koriste za *in vitro* dobijanje embriona. To će omogućiti da se izbegne procedura superovulacije i ispiranja genetski kvalitetnih donora.

Uspeh i ekonomska opravdanost praktične primene ET, zavisi od većeg broja faktora, među koje se ubrajaju: (a) obučenosť i iskustvo operatora, (b) selekcija i uzgoj recipijenata, koji moraju biti zdravi i reproduktivno normalni, (c) precizna sinhronizacija estrusnog ciklusa donora i recipijenata i (d) način manipulacije sa embrionima i njihov transfer u farmskim uslovima.

TEHNOLOGIJA TRANSPLANTACIJE

Indukcija superovulacije. Za izazivanje superovulacije kod donora, koriste se različiti preparati placentalnih (eCG i hCG) ili hipofizarnih gonadotropina (FSH i LH), u različitim dozama. Ovi preparati mogu biti kombinovani sa prostaglandinom $F_{2\alpha}$.

Broj krava, koje reaguju superovulacijom, zavisi od primenjenih hormonskih preparata. Izgleda da manji broj krava reaguje superovulacijom posle tretmana sa eCG (oko 63%), u odnosu na krave tretirane sa FSH (76% do 96%). Optimalno vreme za početak tretmana za superovulacije je između 9. i 13. dana estrusnog ciklusa, pri čemu je dan estrusa nulti dan. Injekcija prostaglandina se daje 48 h kasnije, radi izazivanja lutealne regresije, estrusa i ovulacije. Trajanje estrusa određuje moment početka tretmana. Tako, krave kod kojih ciklus traje 21 do 23 dana, treba početi tretirati 9. dana, a one kod kojih ciklus traje 18 do 20 dana, treba početi tretirati 10. dana ciklusa.

Višekratno izazivanje superovulacije kod istog donora, daje varijabilne rezultate. Neki autori nisu ustanovili značajno variranje vrednosti superovulacije između prvog i četvrtog tretmana, kada je primenjena standardna shema superovulacije (eCG + $PGF_{2\alpha}$). Neki autori su izvršili 31 uzastopnu superovulaciju kod jedne iste krave, sa FSH ili eCG, i ustanovili da vrednost superovulacije nije značajno zavisila od broja izvedenih tretmana, prirode upotrebljenih gonadotropina, dana estrusnog ciklusa u kome je započet tretman, kao ni od godišnje sezone.

Faktori koji utiču na superovulaciju su: (a) genetske osobine donora, (b) trajanje post partum intervala, (c) reproduktivni poremećaji, (d) starost životinje, (e) rasa, (f) ishrana, (g) godišnja sezona.

Ustanovljeno je da krave sa manjim koncentracijama progesterona u mleku, imaju značajno manje *corpora lutea* (CL), t. ovulacija, od onih sa standardnim ili većim koncentracijama (10,5 $\mu\text{g/ml}$).

Maksimalna vrednost superovulacije se postiže kod krava između 50. i 70. dana post partum, a minimalna između 90. i 110. dana.

Krave koje povadaju, imaju znatno manju vrednost superovulacije.

Krave stare 5 do 6 godina, daju maksimalnu vrednost superovulacije. Povećanje doze gonadotropina (eCG ili FSH) može uticati na povećanje vrednosti superovulacije kod starijih krava.

Mlečne rase reaguju većom prosečnom vrednošću superovulacije od tovniha rase krava. Veruje se da su mlečne rase osetljivije na stimulaciju gonadotropinima.

Ako se kreće u normalnim granicama kvantiteta i kvaliteta obroka, ishrana krava ne utiče značajno na vrednost superovulacije.

Neki autori navode da se maksimalna vrednost superovulacije postiže u zimskim mesecima. Na osnovu rezultata koje su dobili istraživači u Nemačkoj, izgleda da vazdušni pritisak i vlažnost ne utiču na vrednost superovulacije. Međutim, maksimalan broj ovulacija se dobija kada se ambijentalna temperatura kreće između 10 i 15°C.



Slika 103. Normalni jajnici krave u diestrusu, na levom jajniku se vidi aktivno žuto telo (*gore*) i jajnici sa superovulacijom, na oba jajnika se vidi više aktivnih žutih tela (*levo*)

Osemenjavanje donora. Sledeći korak posle izazivanja superovulacije je otkrivanje estrusa i osemenjavanje donora. Optimalno vreme inseminacije se određuje na osnovu početka i tavanja estrusa. Prvo VO treba izvesti 12 h posle precizno ustanovljenog početka estrusa, a drugo i treće u 12-to časovnim intervalima. Obično se estrus javlja oko 2 dana posle injekcije prostaglandina. Međutim, ako se injekcija prostaglandina da u dve odvojene doze, po 0,25 mg svaka, estrusno reagovanje krava se povećava u odnosu na jednokratnu injekciju (87% prema 79%), a period od tretmana do pojave estrusa se smanjuje. Za prvo osemenjavanje se koriste dve doze (po 0,25 ml) zamrznute/otopljene sperme, a za svako sledeće VO je dovoljna jedna doza.

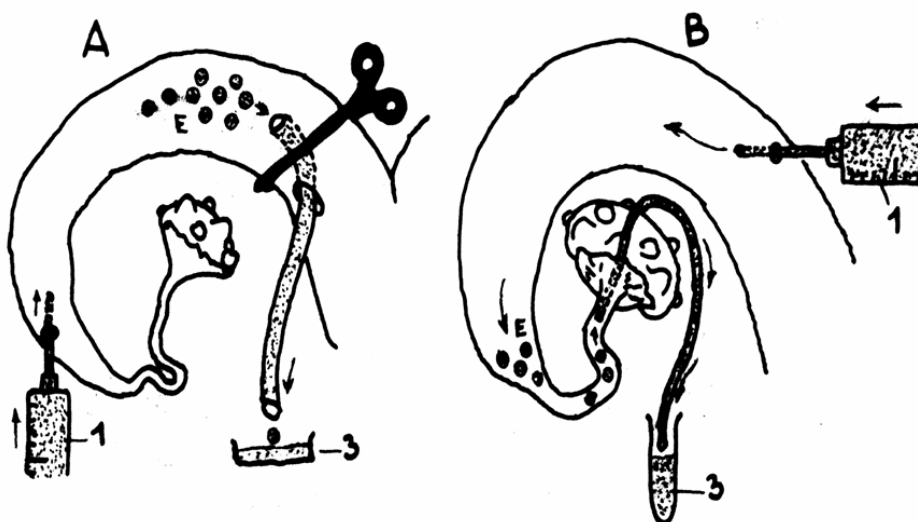
Veliki broj embriona se nalazi i ako se izvrši jednokratna inseminacija, više od 6 h posle postizanja pika predovulatornog talasa LH (ustanovljenog immunoassay-metodom). Veoma je važno da se, za osemenjavanje, koristi sperma visoko fertilnih bikova, kao i da se vrši selekcija takvih bikova, za upotrebu u programu ET.

Ispiranje i kvalitet embriona. Ispiranje embrina se vrši hiruruškim ili ne-hiruruškim putem, kako je opisano u prvom delu ovog teksta. Pre početka ispiranja, životinja se

anestezira, tzv. epiduralnom injekcijom 5 ml do 10 ml 2% procaina ili lignocain hydrochlorida.

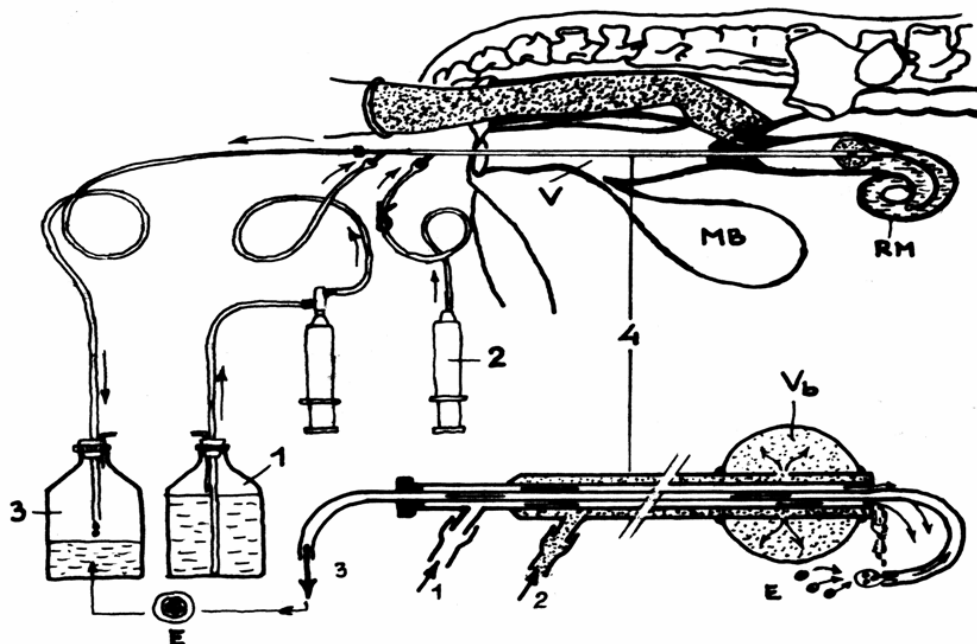
Prilikom ispiranja embriona, treba da: (1) tečnost za ispiranje stigne u vrh oba roga uterusa, jer se tamo nalazi većina embriona 7. dana posle estrusa, (2) sva unesena tečnost bude i isprana iz uterusa i (3) ispiranje na sme da izazove stres ili traume kod donora.

Uspeh ispiranja je direktno povezan sa količinom isprane tečnosti. Efektivno ispiranje znači da je isprano 90% do 100% ubačene tečnosti u uterus. Cilj ispiranja je da se dobije što veći broj embriona, u stadijumu ranog blastocista, koji se normalno može očekivati 7. dana posle dana prvog osemenjavanja. U zavisnosti od korištene tehnike ispiranja, broj ispranih embriona može znatno da varira i, obično, se kreće između 80% i 100%. Uspeh transplantacije, meren postignutim procentom telenja recipijenata, direktno zavisi od stadijuma razvoja i morfološkog kvaliteta transplantiranih embriona. Kvalitet embriona se određuje na osnovu njihovih morfoloških parametara: uniformnost veličine i oblika embriona, njihove boje i dimenzija. Tako neki autori navode da je vrednost uspešne koncepcije iznosila 83%, 75%, 63% i 46%, kada su korišteni embrioni klase 1, 2, 3 ili 4.



Slika 104. Hirurško ispiranje embriona, kroz rog uterusa (A) ili kroz jajovod (B)

1. Ubacuje se tečnost za ispiranje; E – Embrioni; 3. Prihvatanje embriona.

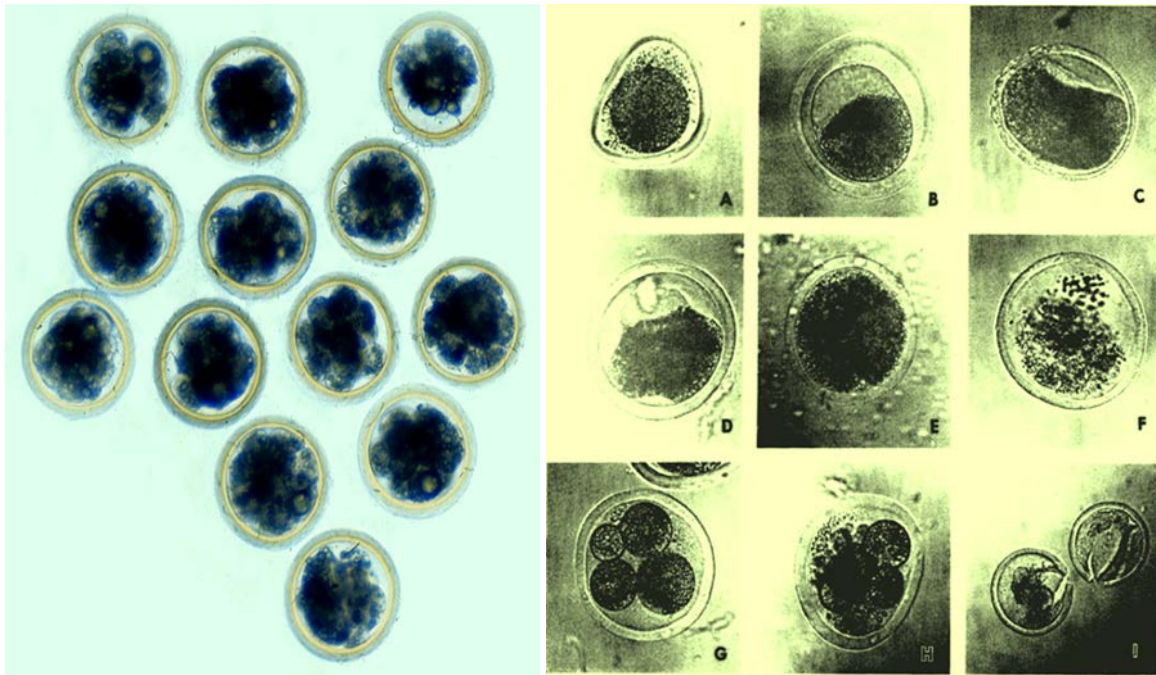


Slika 105. Nehirurško (transcervikalno) ispiranje embriona

1. Tečnost za ispiranje; 2. Špric za naduvavanje balona na kateteru, radi zaptivanja roga uterusa; 3. Posuda sa tečnošću za čuvanje ispranih embriona; 4. Folijev trožilni kateter: 1-cev za ubacivanje tečnosti za ispiranje, 2-cev za ubacivanje vazduha u balončić, 3-cev za izvođenje tečnosti sa ispranim embrionima; RM-rog materice; MB-Mokraćna bešika; Vb-Vazdušni balončić; E-embrioni.

Dva osnovna faktora se uzimaju u obzir, prilikom vizuelne ocene kvaliteta embriona: (1) prisustvo regularnih i degenerisanih embriona (procentualni odnos) i (2) distribucija razvojnih stadijuma embriona, u odnosu na njihovu starost. Prečnik govedih embriona se kreće između 150 i 190 μm , uključujući i debljinu zone pelucide, koja iznosi 12 do 15 μm . Ova veličina embriona se ne menja značajno, sve do stadijuma ekspanzije blastocista (oko 9. do 10. dana posle osemenjavanja). Iako se većina embriona krave, dobijenih 7. dana posle osemenjavanja, nalazi u stadijumu kasne morule ili ranog blastocista, mogu se naći i embrioni ranijih ili kasnijih stadijuma razvoja. Tako su neki istraživači ustanovili sledeću distribuciju razvojnih stadijuma embriona starih 7 dana: kasna morula (18,7%), vrlo rani blastocist (47,7%), rani blastocist (20,5%), ekspanzovan blastocist (9,5%), blastocis u fazi izvaljivanja, tj. prsnuta zona pelucida (2,1%) i izvaljen blastocist, tj. bez zone pelucide (0,5%). Ovo može biti posledica činjenice da proces ovulacije, kod superovuliranih krava, može da traje i preko 8h, što može dovesti do divergencije u razvoju ranih embriona. Kasni blastocist goveda ima oko 140 ćelija, od kojih oko 93 ćelije pripadaju trofoblastu, a 47 ćelija unutrašnjoj ćelijskoj masi.

Laboratorijsko ispitivanje kvaliteta embriona za ET se može izvesti na sledeće načine: (a) morološkom ocenom, (b) na osnovu integriteta membrana blastomera, (c) na osnovu metaboličke aktivnosti embriona i (d) intenzitetom respiracije embriona.



Slika 106. Isprani embrioni u stadijumu blastocista (levo) i razne morfološke anomalije embriona krave (desno)

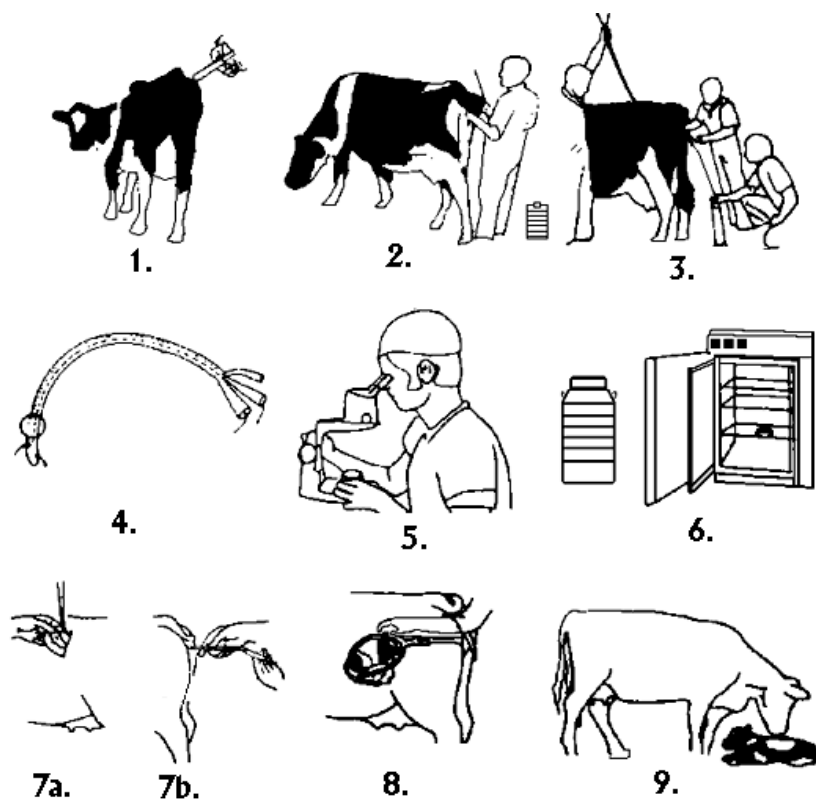
Transplantacija embriona u recipijente. Embrioni se, do transplantacije, čuvaju u pogodnim medijumima. Prvo je za ispiranje i transfer korišten medijum M-199, ali je on komponovan tako da se embrioni čuvaju u atmosferi sa 5% CO₂. Kasnije se koristio Dulbecco PBS medijum, u koji su dodavani glukoza, Na-pyruvat, BSA (bovine serum albumine) ili FCS (foetal calf serum), u koncentraciji 1% za ispiranje i 10-20% za transfer.

Transfer embriona u recipijente se može izvršiti hiruškom ili ne-hiruškom metodom. Bez obzira na metodu, većina autora navodi da se veća vrednost telenja recipijenata postiže, ako se izvrši transfer 2 u odnosu na 1 embrion. Tako je ustanovljeno da vrednost koncepcije 90. dana gestacije iznosi 44,4% kada je izvršen transfer jednog, a 63,6%, kada je izvršen transfer 2 embriona po recipijentu.

Uspeh transplantacije zavisi i od drugih faktora, kao što su kvalitet i razvojni stadijum korištenih embriona, reproduktivni status majke, kao i veličina žutih tela kod recipijenata. Tretman recipijenata sa 1500 ij. hCG, posle izvršenog ET, znatno povećava vrednost telenja (57,9%), u odnosu na ne tretirane recipijente (46,3%).

Transplantacija embriona koji su čuvani dubokim zamrzavanjem, rezultira nešto slabijom vrednošću telenja recipijenata, oko 40%. Posle presađivanja svežih embriona, vrednost koncepcije je iznosila 53,7%, a duboko zamrznutih/odmrznutih embriona 42,5%. Jedan od, takođe važnih, faktora koji utiče na vrednost telenja recipijenata, je i obučenosť i iskustvo operatora.

Posebno u pogledu njegove sposobnosti da izbegne traume endometriuma. Obezbeđenje sterilnih uslova unošenja embriona u uterus je jedan od važnih preduslova visokog stepena preživljavanja, odnosno postizanja visokog procenta telenja recipijenata. Naime, uslovi za infekciju su mnogo veći nedelju dana posle estrusa (kada se vrši transfer), nego u toku estrusnog perioda. Zbog toga se, u medijum za transfer, moraju dodati određene količine antibiotika (penicillin/streptomycin).

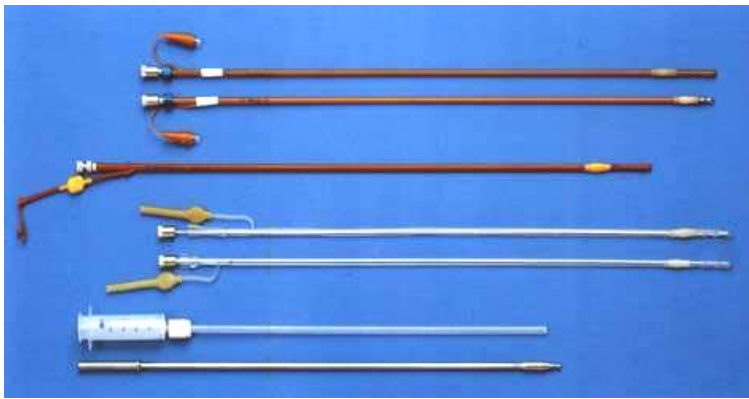


Slika 107. Osnovni postupci transplantacije embriona krave

1. Sinhronizacije estrusa donora i recipijenata, pri čemu se izvodi i hormonski tretman superovulacije donora; 2. Osemenjavanje donora; 3. Ispiranje embriona od donora; 4. Foliovi trožilni kateter za ispiranje embriona; 5. Pregled kvaliteta ispranih embriona; 6. Čuvanje embriona do transplantacije; 7a. Hirurška ili 7b. Transcervikalna (nehirurška) transplantacija embriona u donore; 8. Dijagnoza gravidnosti recipijenata; 9. Partus recipijenata.

Uspeh transplantacije veoma zavisi od stepena sinhronizacije donora i recipijenata. Cilj je da se postigne potpuna sinhronizacija estrusnih ciklusa. Ako su recipijenti u estrusu dan pre ili dan posle donora, to se može prihvatiti, ali je, u tom slučaju, vrednost telenja recipijenata nešto niža. Razlika u pojavi estrusa 2 i više dana, između donora i recipijenata se ne može prihvatiti. Ispitivan je uticaj sinhronizacije estrusa recipijenata i donora na vrednost telenja recipijenata.

U odnosu na donore, recipijenti su manifestovali estrus 48 i 24h pre, istog dana ili 24 i 48h posle donora. Postignuta vrednost telenja je iznosila: 23,8%, 52,2%, 58,2%, 49,5% i 44%.



A



B



C



D

Slika 108. Oprema za transplantaciju embriona krave

A-Folievi trokanalni kateteri za nehirurško (transcervikalno) ispiranje embriona; B-Dvokanalni katetri za nehiruršku (transcervikalnu) transplantaciju embriona; C-Mikroskop sa monitorom, za pregled kvaliteta embriona, D-Embriobus, pokretna laboratorija za transplantaciju embriona na farmama.

3.1.7.3. TRANSPLANTACIJA EMBRIONA OVACA I KOZA

A. OVCE

Klasična tehnika hirurške transplantacije embriona ovaca je razvijena polovinom 1950-ih godina, kada je *Averill (1958)* pokazao da se 80% transplantiranih embriona razvije do vitelne jagnjadi. Posljednjih dvadesetak godina se razvija tehnika nehirurške transplantacije i njena primena u praksi.

U praksi se ET ovaca primenjuje radi: (a) razmnožavanja genetski superiornih grla i (b) uvoza i izvoza ovaca u formi zamrznutih embriona, sa ciljem smanjenja rizika od prenosa zaraznih bolesti. Ova tehnologija, teoretski, može povećati genetski napredak za 100%, primenom programa multiple ovulacije i embriotransfera (tzv. MOET program). Međutim, ovaj program se, još uvek, slabo koristi zbog (a) potrebe primene hirurškog ispiranja i transplantacije embriona i (b) niskog stepena ponovljivosti superovulacije. Ipak, ovaj program nalazi primenu u čuvanju retkih i ugroženih rasa ovaca. Tako su, na primer, naučnici u Italiji

uspeli da dobiju embriona posle superovulacije Muflona i da ih uspešno transplatiraju u domaše ovce.

Tehnologija ET se koristi u naučnim istraživanjima brojnih aspekata reproduktivne fiziologije reprodukcije ovaca.

TEHNOLOGIJA TRANSPLANTACIJE EMBRIONA

Tehnika superovulacije. U osnovi, tehnika superovulacije ovaca je slična onoj koja se primenjuje kod goveda. Gonadotropni preparati (FSH ili eCG) se mogu aplikovati pri kraju normalnog estrusnog ciklusa (11. do 13. dana) ili na kraju progestagenog tretmana, koji se koristi za sinhronizaciju estrusa. Pretretman sa progestagenim intravaginalnim sundjerima se mora primeniti kod ovaca u toku sezonskog anestrusa.

Za izazivanje superovulacije se, naj češće, koristi preparat eCG u dozama od 700 do 2000 ij. Kod sezonski cikličnih ovaca, eCG se daje u folikularnoj fazi estrusnog ciklusa, a kod sezonski anestrličnih ovaca na dan vadjenja intravaginalnih sundjera. Povećanje doze eCG rezultira povećanjem vrednosti superovulacije, ali i povećanjem broja neovuliranih folikula. Smatra se da maksimalna doza eCG iznosi 2000 ij. Povećanje doze eCG sa 1500 ij. na 2000 ij. rezultiralo je povećanjem ovulacione vrednosti ovaca sa 3,8 na 5,8. Međutim, povećanje neovuliranih folikula je bilo znatno veće i iznosilo je 3,8 kod doze od 1500ij. i 20,5 kod doze od 2000ij. Tretman injekcijom 750ij. HCG, datom 48h posle injekcije 1500ij. PMSG, znatno povećava ovulacionu vrednost (7,3 ovulacija) i smanjuje broj neovuliranih folikula (4,0), u odnosu na tretman samo sa eCG, kada je ovulaciona vrednost iznosila 3,8 ovulacija, a prosečan broj neovuliranih folikula 17,0.

Izazivanje superovulacije. Ovce se tretiraju progestagenim sundjerima tokom 14 dana. Dva dana pre vadjenja sundjera, započinje se tretman sa 20mg FSH, raspoređenih u 6 injekcija. Ovulacija se događa oko 60h posle vadjenja sundjera.

Tabela 39. Uticaj doze PMSG na ovarijalno reagovanje ovaca (Stančić, 1988)

| Ovarijalno reagovanje | Doza eCG (ij) | | | |
|---|---------------|-------|-------|-------|
| | 1000 | 1500 | 2000 | 2500 |
| Prosečan broj ovulacija | 1,66 | 3,80 | 4,30 | 5,10 |
| Prosečan broj predovulatornih folikula ¹ | 2,00 | 2,80 | 20,50 | 12,10 |
| Prosečan broj folikularnih cista ² | 0,80 | 0,80 | 12,50 | 11,60 |
| Prosečan broj folikularnih cista ² | 4,46 | 7,40 | 37,30 | 28,80 |
| Ukupno ovarijalno reagovanje ³ | 37,22 | 51,35 | 11,53 | 17,71 |
| % ovulacije ⁴ | | | | |

¹Folikuli prečnika 6 do 8 mm; ²Folikuli prečnika >9 mm; ³Br. ovulacija + br. predovulat. folikula + br. folikularnih cista; ⁴Od ukupnog ovarijalnog reagovanja.

Ovulaciona vrednost i ukupno ovarijalno reagovanje se povećavaju sa povećanjem doze PMSG od 1000 ij do 2500 ij, ali se procentualni odnos ovulacione vrednosti i ukupnog ovarijalnog reagovanja povećava samo do 1500 ij eCG, posle toga ovaj odnos se znatno smanjuje. Iz ovoga proizilazi da nema smisla povećavati dozu eCG preko 1500 ij, bar što se tiče ovaca rase Cigaja. Primena preparata hipofizarnih gonadotropina (FSH-p) daje veću ovulacionu vrednost (8,24) od one dobijene primenom eCG (6,40). Vrednost superovulacije zavisi i od rase tretiranih ovaca. Tako je ustanovljeno da prosečna vrednost superovulacije, izazvane injekcijom 1000 ij eCG, iznosi 12,2 kod rase Finski landras, 11,2 kod rase Merino, 6,6 kod rase Soay i 4,2 kod rase Southdown. Na vrednost superovulacije utiču: rasa, sezona, ishrana, kondicija i starost.

Dobijanje embriona. Posle izvedene superovulacije, ovce davaoci se osemenjavaju. Pokazalo se, međutim, da prirodno osemenjavanje često rezultira nižom vrednošću oplodnje, ako je vrednost superovulacije veća od 10 ovulacija. Zbog toga se preporučuje direktno ubacivanje sperme u robove uterusu, primenom hiruruške metode (laparotomije) ili manje invazivne metode laparoskopije. U oba slučaja je veoma važno da se VO izvede što pre u estrusu. Osim toga, treba dobro paziti da se zahvat izvede sa što manje traumatizacije okolnog tkiva, posebno da se ne dodiruju jajnici i jajovodi. U suprotnom će doći do manje vrednosti koncepcije i do manjeg broja ispranih embriona. Optimalno vreme intrauterine inseminacije je 48 h do 60 h posle vadjenja intravaginalnih sundjera. Tada se postiže maksimalan stepen oplodnje i maksimalan procent ispranih embriona, računato od ovulacione vrednosti. Neki autori su ustanovili da je vrednost oplodnje veća kada se sperma ubaci direktno u ovidukt, u poredjenju sa intrauterinom inseminacijom. Ako se koristi konvencionalni način intracervikalne inseminacije, ona mora da se izvodi u 12-to časovnim intervalima, tokom estrusnog perioda. Takođe trajanje estrusa, kod superovuliranih ovaca, može biti duže, zbog povećane koncentracije estrogena kod stimuliranih ovaca. Sperma različitih ovnova ima uticaja na kvalitet dobijenih embriona. Bitno je ustanoviti da li je došlo do superovulacije, pre nego što se počne procedura ispiranja embriona. Merenjem koncentracije progesterona u krvnom serumu 4. dana posle estrusa, može se ustanoviti stepen izazvane superovulacije. Koncentracija progesterona u krvnom serumu je znatno veća (4,21 ng/ml) kod superovuliranih donora, u odnosu na recipijente (1,9 ng/ml).

Tabela 41. Sastav Dulbecco medijuma za ispiranje embriona*

| | |
|--------------------------------------|--|
| NaCl | 8,0 g |
| KCl | 0,2 g |
| Na ₂ HPO ₄ | 1,15 g |
| KH ₂ PO ₄ | 0,20 g |
| CaCl ₂ | 0,10 g ili CaCl ₂ ·6H ₂ O (0,1974 g) |
| MgCl ₂ ·6H ₂ O | 0,10 g |
| Na-pyruvat | 0,036 g |
| Glukoza | 1,0 g |
| BSA | 4,0 g (Bovini serum albumin, frakcija V) |
| Penicillin | 0,060 g |
| Streptomycin | 0,050 g |
| Kanamycin sulfat | 25 mg (Umesto Penicillina) |
| Phenol red | Streptomycina (1,0 ml) |

*Navedene količine komponenti se rastvore u 1 litru redestilovane i dejonizovane vode.

Ispiranje embriona ovaca se može izvesti hiruruškom metodom (laparotomijom), laparoskopijom ili nehiruruškim, transcervikalnim ispiranjem. Ispiranje embriona se vrši 5. ili 6. dana posle osemenjavanja, a vrednost (%) ispiranja (broj ispranih embriona od obroja ovulacija) zavisi od primenjene tehnike ispiranja i drugih faktora i kreće se između 50% i preko 75%.

Znatno manje traumatska tehnika ispiranja je transcervikalna. Ova tehnika se, u poslednje vreme, dosta razvila, tako da se postiže 80% do 90% uspešnih ispiranja (*Gobel i sar. 1995*). Ipak, ova tehnika se, još uvek, malo koristi u praksi. Za ispiranje embriona se koristi specijalan medijum (tečnost). U principu, embrioni ovce treba da se presade u recipijente što je moguće pre polse ispiranja. Nekoliko sati se embrioni mogu čuvati na sobnoj temperaturi (20°C), pri čemu se moraju zaštititi od kontaminacije infektima i drugim nečistoćama. Embrioni ovce se mogu dugotrajno čuvati i dubokim zamrzavanjem, ali se to slabo koristi u praksi. Prvo jagnje rodjeno posle transplantacije embriona čuvanih dubokim zamrzavanjem,

dobijeno je u Keimbridžu. Kao krioprotektanti se koriste dimethylsulphoxi (DMSO) i glicerol.

Ocena kvaliteta embriona. Pre transplantacije, neophodno je izvršiti ocenu kvaliteta ispranih embriona. Prva deoba oplodjene jajne ćelije ovce se događa 15 h do 18 h posle penetracije spermatozoida. Sledeća deoba se događa oko 12 h kasnije, tako da se embrioni u stadijumu 4 blastomere nalaze 48 h posle oplodnje, ili 3. dana posle pojave estrusa. Posle toga, blastomere se dele svakih 16 h do 24 h. Tipično je da se 5. dana većina embriona nalazi u stadijumu morule, sa 24 do 32 blastomere, dok je 6. dana većina embriona u stadijumu kompaktne kasne morule ili ranog blastocista.

Tehnika transplantacije embriona. Precizna sinhronizacija estrusa kod donora i recipijenata značajno utiče na uspeh transplantacije, meren brojem ojašnjanih od broja recipijenata kod kojih je izvršena transplantacija. Optimalan uspeh transplantacije se postiže ako su recipijenti manifestovali estrus 12 h pre do 12 h posle donora. U svakom slučaju, što je sinhronizacija donora i recipijenata preciznija, to je i uspeh transplantacije bolji. Kontrola estrusa kod redipijenata se može izvršiti produžavanjem lutealne faze (primenom progestagenih supstanci u vidu intravaginalnih sumpjera) ili skraćivanjem lutealne faze (primenom luteolitičkih supstanci).

Na bazi merenja koncentracije progesterona u krvnom serumu, moguće je izvršiti ocenu podobnosti recipijenata za transplantaciju. Pokazalo se, naime, da se najbolja vrednost koncepcije postiže kod redipijenata koji imaju više od 3 ng progesterona u 1 ml krvnog seruma.

Transplantacija embriona se može izvršiti klasičnom hirurškom metodom, laparoskopijom ili transcervikalnom metodom. Starost embriona, broj transplantiranih embriona po recipijentu, kao i mestu unošenja embriona u matericu, znatno utiču na uspeh transplantacije. Standardno se transplantira dva embriona po recipijentu, po jedan u svaki rog uterusa, mada i transplantacija jednog embriona daje prihvatljive rezultate. Primena metode laparoskopije, daje dobre rezultate transplantacije embriona ovce. Može se primeniti i transcervikalni metod transplantacije, ali rezultati transplantacije nisu zadovoljavajući.

Kako je već istaknuto, jedna od osnovnih primena ET kod ovaca je mogućnost razmene embriona između pojedinih zemalja. Međutim, veoma je važno sprečiti da dodje do kontaminacije embriona patogenim agensima, prilikom njihove *in vitro* manipulacije (ispiranje, kontrola kvaliteta, čuvanje i transplantacija). Zbog toga je važno znati koji patogeni mikroorganizmi mogu da se prihvate na ili da penetriju zonu pelucidu i, tako, izvrše kontaminaciju embriona.

B. KOZE

Osnovni principi transplantacije embriona koza su isti kao kod ovaca. Prvi izveštaj o jaretu rođenom posle ET dali su *Warwick i sar. (1934)*, ali se ova tehnologija masovnije počinje primenjivati od polovine 1970.-ih godina, prvo u Australiji i Novom Zelandu, a nešto kasnije u Francuskoj, Indiji i drugim zemljama. Prvo jare rođeno posle transplantacije embriona dobijenih posle *in vitro* maturacije folikularnih oocita (IVM) i *in vitro* fertilizacije (IVF), u Evropi su izveli *Pereira i sar. (1995)*.

Praktična primena ET je brže razmnožavanje retkih i skupih rasa koza. Tako se, u Francuskoj, ova metoda koristila za razmnožavanje Angora rase koza, uvezenih iz Novog Zelanda, Teksasa i Australije.

Izazivanje superovulacije. Kod koza se javlja problem znatno veće varijacije u vrednosti superovulacije, u odnosu na druge vrste životinja. Kao razlozi ove pojave se navode genetski faktori, starost grla, faza estrusnog ciklusa u kojoj je tretman izveden i vrsta korištenih gonadotropina.

Većina istraživanja pokazuje bolje rezultate superovulacije, dobijene posle tretmana sa FSH, u odnosu na one dobijene primenom eCG. Tako je, na primer, ustanovljeno prosečno 9,4 ovulacija posle tretmana sa FSH i 5,7 ovulacija posle tretmana sa eCG.

Tretman kombinacijom progestagena i gonadotropina, daje dobre rezultate sinhronizacije superovulacije, tokom i izvan sezone parenja koza. Izvan sezone parenja se vrši tretman progestagenim intravaginalnim sundefima (tokom 17 dana), a na dan pre vađenja sundefa, počinje se tretman sa ukupno 21mg FSH, podeljenih u 8 injekcija po: 4, 3, 3, 3, 2, 2, 2 i 2 mg. U sezoni parenja se može koristiti tretman kombinacijom progestagen + prostaglandin + gonadotropin. Progestageni sundefima se koze tretiraju 11 dana, injekcija prostaglandina (cloprostenol) se daje 9. dana od početka tretmana sundefima, a na dan injekcije cloprostenola, daje se prva od 4 injekcije p-FSH (ukupno 16mg), date u jednakim razmacima tokom 3 dana (4, 4, 2, 2, 2 i 2 mg).

Primena norgestomet ušnih potkožnih implantata, u kombinaciji sa FSH, daje dobre rezultate superovulacije.

Godišnja sezona, u kojoj se tretman izvodi, ima znatnog uticaja na postignutu vrednost superovulacije.

Dobijanje embriona. Osemenjavanje superovuliranih donora može biti izvedeno na prirodan ili veštački način. Za prirodno osemenjavanje se mogu koristiti samo jarčevi vrlo visokog fertilizacionog potencijala. Obično se parenje izvodi 12 h i 24 h posle pojave estrusa, ili tri puta (30 h, 48 h i 54 h) posle vađenja sundefa. Dobri rezultati fertiliteta se dobijaju i kada se koriste vasektomisani jarčevi probači za otkrivanje estrusa i kada se koze donori pripuštaju svakih 6h, tokom trajanja estrusnog perioda.

Niže vrednosti fertiliteta, posle VO, češće se dešavaju kod ovaca nego kod koza. Veruje se da je to povezano sa razikama u građi cerviksa između ovaca i koza. Naime, kod većine koza je moguće penetrirati cerviks inseminacionom pipetom, što je, kod ovce, dosta teško postići. Intrauterina inseminacija je posebno preporučljiva kod upotrebe zamrznute-otopljene sperme. Tretman injekcijom Gn-Rh, 24 h do 48 h posle progestagenog tretmana, znatno bolje sinhronizuje ovulaciju. Time se obezbeđuje znatno preciznije određivanje momenta VO. Osim toga, neki autori su pokazali da se, posle injekcije Gn-Rh, dobija znatno veća ovulaciona vrednost, kao i da su embrioni znatno ujednačenijih stadijuma razvoja u momentu ispiranja.

Ispiranje embriona se može izvesti hiruruški (laparotomijom ili laparoskopijom) i nehiruruški. Hirurško ispiranje se vrši u opštoj anesteziji, pri čemu koza treba da gladuje 24 h pre intervencije. Generalna anestezija se postiže i/v injekcijom Na-triopentala (8 mg po 1 kg telesne mase) ili Pentobarbitola (13 mg po 1 kg telesne mase).

Embrioni se ispiraju 6 do 8 dana posle početka estrusa. Koristi se oko 50 ml medijuma za ispiranje jednog roga uterusu. Za ispiranje se koristi standardni PBS-medijum, kome se dodaje 2% do 3% bovinog serum albumina (BSA) ili 10% fetalnog goveđeg seruma (FCS), zagrejan na 37°C. Primenom klasične hirurške metode (laparotomija), ispira se znatno više embriona (85%) u odnosu na ispiranje laparoskopijom (62%). Vrlo uspešno transcervikalno (ne-

hirurško) ispiranje embriona se postiže primenom hormonske dilatacije cerviksa. U tu svrhu se koza intracervikalno tretira sa PGE₂, sa ili bez dodavanja estradiol benzoata.

Razvoj embriona koze se razlikuje, u nekim detaljima, od razvoja embriona ovce. Prva deoba oplodjenog oocita se događa oko 24 h posle ovulacije, embrioni do stadijuma 16 blastomera se nalaze u jajovodu, a morule i blastocisti u uterusu. Rana morula (20 blastomera) sa nalazi petog dana, morula 6. dana, kompaktna morula i ekspanđovan blastocist 7. dana, dok se 8. dana posle početka estrusa, ispiraju embrioni u stadijumu ekspanđovanog blastocista i izvaljenog (bez zone pelucide) blastocista.

Embrioni koze se mogu čuvati na 4 do 5⁰C tokom 7 dana. Takvi embrioni su sposobni za razvoj u inkubatoru, kao i za razvoj posle transplantacije u recipijenta. Duboko zamrzavanje bolje podnose embrioni u stadijumu blastocista nego oni u stadijumu morule. Tako je vrednost koncepcije iznosila svega 11%, kada su transplantirane morule i 90% kada su transplantirani blastocisti.

Embrioni se mogu dobiti i posle *in vitro* dozrevanja i fertilizacije (IVM/IVF) folikularnih oocita. Ova tehnologija se sve više razvija i koristi za dobijanje identičnih blizanaca i transgenih životinja, kao i u naučnim istraživanjima.

Transplantacija embriona. U principu, transplantacija embriona se može izvršiti hirurškom i nehirurškom metodom. Danas se, sve više, razvija primena laparoskopije u transplantaciji embriona koze. Prednosti ove metode nad klasičnom hirurškom metodom se sastoje u tome što je brža (5 minuta prema 15 minuta) i znatno manje traumatizuje životinju.

Ako se ustanovi da recipijent ima jedno žuto telo, obično se ubacuju dva embriona (ili po jedan u oba roga, ili dva u jedan rog uterusa, na onoj strani gde se nalazi CL, tzv. ipsilateralni rog). U slučaju da se ubacuje tri embriona, dva se ubacuje u ipsilateralni, a jedan u kontralateralni rog uterusa. Može se očekivati oko 60% preživljavanja presađenih embriona.

Dosadašnja iskustva pokazuju da se vrednost jarenja recipijenata kreće između 45 i 80%, što zavisi od kvaliteta korištenih embriona, nutritivnog statusa recipijenta i iskustva operatora. U Danskoj je postignuto 88% koncepcije i 70% jarenja posle transplantacije svežih embriona, a 75% koncepcije i 55% jarenja posle transplantacije duboko zamrznutih-otopljenih embriona.

Za transplantaciju se mogu koristiti i embrioni dobijeni kloniranjem (resekcijom embriona ili transplantacijom nukleusa), kao i transgeni embrioni. Tako su neki autori dobili 72,9% uspešne koncepcije i 37,5% jarenja, sa 10,5% blizanaca, kod recipijenata kojima su presađene po dve polovine reseciranih embriona.



Slika 109. Hirurška transplantacija embriona ovce
Ispiranje embriona



Slika 109a. Hirurška transplantacija embriona ovce
kontrola kvaliteta embriona (*levo*) transplantacija embriona u recipijenta (*desno*)

3.1.7.4. TRANSPLANTACIJA EMBRIONA KONJA

Prva ždrebada, posle embrio transfera (ET), dobijena su u Japanu (1973) i na Kembridžu (1975). Vrednost ispiranja embriona se kreće između 55 i 80%, a vrednost ždrebljenja posle ET se kreće oko 70%. Embrioni konja se mogu uspešno čuvati tokom 24h na temperaturi 4-5⁰C. Vrlo rani embrioni se mogu čuvati i dubokim zamrzavanjem, dok duboko zamrznuti stariji embrioni (u stadijumu kapsule), daju loše rezultate koncepcije posle transplantacije. U poslednje vreme se razvija tehnologija dobijanja folikularnih oocita iz jajnika kobile, kao i njihova in vitro maturacija (IVM) i in vitro fertilizacija (IVF). To otvara dalje mogućnosti naučnih istraživanja i praktične primene ET u konjarstvu.

Značaj ET u savremenom konjarstvu se ogleda u sledećem: (1) mogućnost dobijanja većeg broja ždrebadi od starijih kobila, koje su već dali odlične potomke, tako što će se koristiti kao davaoci embriona ili folikularnih oocita, (2) pruža mogućnost brze provere fertiliteta sveže i duboko zamrznute sperme pastuva, (3) dobijanje većeg broja potomaka od genetski visoko vrednih i u praksi dokazanih kobila, (4) mogućnost dobijanja embriona od vrednih kobila koje, zbog različitih razloga (reproduktivnih poremećaja ili povreda), nisu sposobne za normalnu gravidnost, (5) mogućnost da se od mladih kobila, koje se još takmiče, dobiju embrioni, čime se povećava ukupan broj njihove ždrebadi i (6) mogućnost relativno jednostavne i jeftine međunarodne razmene embriona od genetski superiornih kobila, pri čemu se izbegava rizik transporta životinja i prenosa zaraznih bolesti, kao i problemi aklimatizacije i adaptacije grla.

Klasična procedura ET kod kobila obuhvata: (1) izazivanje superovulacije i osemenjavanje donora, (2) ispiranje embriona od donora, (3) sinhronizacija estrusa recipijenata i donora i (4) transplantacija embriona.

Superovulacija i osemenjavanje donora. Dosta davno je ustanovljeno da tehnologija izazivanja superovulacije, koja daje dobre rezultate kod goveda i ovaca, nije primenljiva kod

kobila. Takođe je dobro poznato da tretman kobila različitim preparatima hipofizarnog ekstrakta FSH, ne rezultira pokretanjem ovarijalne aktivnosti tokom sezonskog anestrusa.

Superovulacija se postiže višekratnom injekcijom preparata hipofizarnog ekstrakta FSH, počevši od 11. ili 12. dana posle ovulacije u spontanom ciklusu. Ustanovljeno je da se bolja folikularna aktivnost i veća vrednost superovulacije, postižu preparatom ekstrakta FSH iz konjske, u odnosu na FSH iz hipofize svinje.

Osemenjavanje donora se vrši po istoj tehnologiji, koja se primenjuje kod spontano cikličnih kobila. Preporuka je da se sa osemenjavanjem počne 2. dana estrusnog perioda i da se izvodi svakog drugog dana, sve do prestanka estrusa. Pri tome se koriste pastuvi proverene i visoke fertilizacione sposobnosti. Ako se izvodi VO, svaka inseminaciona doza mora da sadrži minimalno 250 miliona progresivno pokretnih spermatozoida. Dan osemenjavanja zamrznutom-odmrznutom spermom se mora predvideti na osnovu veličine predovulatornog folikula.

Ispiranje embriona. Prva deoba oplodene jajne ćelije kobile se događa 20 h do 24 h posle ovulacije, embrioni sa 4 do 6 blastomera se u jajovodu nalaze 48h, sa 8 do 10 blastomera 72 h, dok se stadijum morule nalazi 98 h posle ovulacije, a embrioni prelaze iz jajovoda u vrh roga uterusa 5. do 6. dana.

Hiruruška metoda ispiranja embriona se izvodi pod anestezijom, tako da kobilica leži na leđima, sa blago podignutim karličnim delom. Jajnik na kome se dogodila ovulacija i vrh roga uterusa sa iste strane, se izvlače iz abdomena kroz ventro-medijalni rez, načinjen između pupka i vimena. Zatim se, u vrh roga materice uvlači staklena ili polietilenska kanila, kroz mali rez na zidu materice, na koji se, kaudalno od reza, postavi ligatura. Ispiranje embriona se vrši tako što se kroz otvor infundibuluma jajovoda uvede tupa igla (18-gauge). Kroz nju se ubrizgava 30 ml do 50 ml medijuma za ispiranje. Embrioni se, preko kanile u rogu materice, ispiraju u epruvetu ili petrijevu kutiju.

Nehiruruška metoda se izvodi tako što se, specijalno dizajniranim instrumentom, zatvori cerviks, a ispira se ceo uterus sa 1.500 ml medijuma. Na ovaj način se može isprati 85 do 95% embriona, od kojih je 75 do 80% sposobno za transfer.

Za ispiranje se koristi Dulbecco posfatno-puforni medijum (PBS), u koji se dodaje 1% inaktiviranog seruma goveđeg fetusa (FCS). Posle ispiranja, mora se izvršiti kontrola kvaliteta dobijenih embriona. To se vrši na osnovu morfoloških parametara, kao što su ujednačenost veličine i oblika blastomera, oblika, boje i prečnika embriona, kao i na osnovu razvojnog stadijuma embriona, koji odgovara njegovoj starosti. Od kvaliteta upotrebljenih embriona značajno zavisi vrednost postignute koncepcije kod recipijenata. Tako vrednost koncepcije iznosi 69% ako su upotrebljeni embrioni 1. i 2. klase, a svega 18% kada su upotrebljeni embrioni 3. klase.

Sinhronizacija estrusa recipijenata i donora. Kao recipijenti se koriste kobile koje ne moraju biti visokog genetskog potencijala, ali potpuno zdrave, posebno u pogledu reproduktivnih funkcija, tako da su sposobne da uspešno održe gravidnost posle ET. Zbog toga se recipijenti, pre transplantacije, moraju podvrgnuti detaljnom pregledu.

Generalno je prihvaćeno da se maksimalna vrednost koncepcije postiže kod recipijenata koji su ovulirali jedan dan kasnije od donora. Postoje dve osnovne metode sinhronizacije estrusa donora i recipijenata: (a) tretman progestagenim preparatima (na primer altrenogest, Regumate) i (b) tretman preparatima PGF_{2α} ili njegovim sintetičkim analogima. Kod oba postupka, primenjuje se i injekcija hCG, radi bolje sinhronizacije ovulacije u recipijenata. Ovakav tretman se može uspešno koristiti samo kod cikličnih kobila, tokom pune sezone parenja.

Primena progestagena. Donori se tretiraju preparatom Regumate tokom 15 dana, a recipijenti tokom 16 dana. Sledećeg dana posle prestanka progestagenog tretmana, donori i recipijenti dobijaju injekciju PGF_{2α}. Većina donora i recipijenata manifestuje estrus unutar 4 do 6 dana posle injekcije prostaglandina. Kada se kod prve kobile (donora ili recipijenta) primete znaci prestanka estrusa, sve kobile se tretiraju jednokratnom injekcijom 3.000 iJ hCG, radi indukcije sinhronizovane ovulacije. Osemenjavanje se vrši po standardnoj shemi.

Primena prostaglandina. Donori i recipijenti se tretiraju injekcijom PGF_{2α} 6 do 11 dana posle njihove zadnje spontane ovulacije, ali tako da recipijenti budu tretirani prostaglandinom jedan dan kasnije od donora. Manifestacija estrusa se očekuje 4 do 6 dana posle injekcije prostaglandina. Sinhronizacija ovulacije sa HCG i osemenjavanje se izvode na prethodno opisan način.

Transplantacija embriona u recipijente se može izvesti hiruruškom i nehiruruškom metodom.

Hiruruška metoda se izvodi u opštoj anesteziji, tako što se jajovod i vrh roga uterusa izvuku kroz operacionu ranu, načinjenu ventro-medijalnom laparotomijom. Rani embrioni (u stadijumu 2 do 8 blastomera), dobijeni 2 dana posle ovulacije donora, ubacuju se u ovarijalni kraj ovidukta, malom kanilom u kojoj se nalazi mali volumen medijuma. Stariji embrioni (u stadijumu morule ili ranog blastocista), ubacuju se u vrh roga materice, blizu utero-tubalnog spoja. Iako je transuterina migracija ranih embriona konja veoma intenzivna, ipak je važno da se embrion ubaci u ipsilateralni rog materice (sa iste strane na kojoj se nalazi jajnik sa žutim telom). Pokazalo se, naime, da ipsilateralna transplantacija rezultira znatno većom vrednošću koncepcije (83%), u odnosu na kontralateralnu transplantaciju (54%). Ovi autori su ustanovili da je vrednost koncepcije (ustanovljena 50. dana gestacije) slična ili veća od one koja se postiže posle parenja kobilu u normalnom estrusnom ciklusu.

Nehiruruška metoda transplantacije embriona konja je opisana 1972 godine. Međutim, ni jedan recipijent nije ostao gravidan. Kasnijom modifikacijom ove metode, isti autori su transplantirali 79 embriona i postigli 42% koncepcije. Neki drugi autori su postigli 71% koncepcije, posle transplantacije embriona starih 6 do 8 dana, koje su jednostavno deponovali u telo materice, ne vodeći posebno računa da ih ubace u ipsilateralni rog sa CL. Glavni faktori koji utiču na uspeh transplantacije su: (1) primena zaštitnog omotača oko katetera za transfer, (2) visok nivo higijene i asepsa, (3) depozicija embriona u rog, a ne u telo materice, kao i (4) iskustvo operatora, te (5) kvalitet donora, recipijenata i uslova njihovog držanja, ishrane i zdravstvene zaštite.



Slika 111. Nehirurška transplantacija embriona kod kobile
Ispiranje embriona (*gore*) i kontrola kvaliteta embriona (*sredina levo*).
Dobar embrion, u stadijumu ekspandovanog blastocista, star 8 dana (*sredina desno*).
Transplantacija embriona u recipijenta (*dole*).

PROVERA ZNANJA

1. Definišite pojam transplantacije embriona (TE).
2. Nabrojte osnovne razloge za primenu transplantacije embriona u stočarstvu i veterini.
3. Navedite osnovne postupke u savremenoj tehnologiji TE.
4. Definišite pojam superovulacije. Kako se indukuje superovulacija kod donora?
5. Navedite osnovni razlog za preciznu sinhronizaciju estrusa i ovulacije kod donora i recipijenata.
6. Navedite osnovne metode ispiranja ranih embriona i donora.
7. U kojoj fazi razvoja treba da se nalaze embrioni u momentu ispiranja, odnosno transplantacije u recipijente? Koliko su takvi embrioni stari, računajući od momenta ovulacije donora?
8. Definišite pojmove: *in vitro* maturacija (IVM) i *in vitro* fertilizacija (IVF).
9. Kojim metodama se mogu dobiti oociti za tehnologiju *in vitro* fertilizacije?
10. Definišite pojam reproduktivnog kloniranja.
11. Kojim metodama se može dobiti veći broj genetski identičnih embriona?
12. Šta je transgeneza? Šta se dobija primenom ove tehnologije u svremenoj stočarskoj proizvodnji i veterinarskoj medicini? Da li stepn uspešnosti transgeneze zadovoljava njenu primenu u širokoj praksi?
13. Definišite pojam i opišite osnovne principe pojedinih metoda za determinaciju pola gameta i ranih embriona (tzv. sexsing).
14. Definišite pojam himere. Koja je primena formiranja himera u stočarstvu i veterinarskoj medicini?

3.2. BIOTEHNOLOGIJE ZA *IN VITRO* MANIPULACIJU SA GAMETIMA I EMBRIONIMA

(Dragin, S.)

Rezultati naučnih istraživanja u oblasti morfologije, fiziologije i genetike gameta i embriona, kao i razvoj novih tehnologija, pružaju mogućnosti različitih mikromanipulacija sa gametima i embrionima *in vitro*. Svrha ovih manipulacija je dobijanje većeg broja genetski poželjnih gameta i embriona, promena njihove genetske strukture, njihovo dugotrajno čuvanje *in vitro*, kao i različita naučna istraživanja.

Do sada su razvijene metode dobijanja gameta i embriona, njihove kultivacije i čuvanja *in vitro*, fertilizacije oocita i razvoja ranih embriona *in vitro* i *in vivo*, dobijanje većeg broja genetski identičnih embriona (tzv. kloniranje), stvaranje himera i transgenih životinja, mikroinjekcija oocita i određivanje pola spermatozoida i embriona.

3.2.1. DOBIJANJE GAMETA

Gameti su muške i ženske polne ćelije (spermatozoidi i oociti). Spermatozoidi se dobijaju relativno lako, u velikom broju, primenom poznatih metoda uzimanja sperme od priplodnjaka. Međutim, veći broj oocita je znatno teže dobiti. Za dobijanje oocita se koristi metoda superovulacije, ali se tako dobija dosta ograničen broj oocita. Osim toga, vrednost superovulacije znatno varira individualno, zavisno od rase i vrste životinja, njihove opšte telesne kondicije, starosti i zdravstvenog stanja, kao i od vrste, doze i kombinacije primenjenih hormonskih supstanci. Pored toga, primena hormonskih supstanci može izazvati i razne poremećaje funkcije jajnika, sve do sterilnosti.

Kod krava se može dobiti prosečno 8,7 ovulacija po jednom tretmanu, sa variranjem od 2 do 50 ovulacija. Kod ovce vrednost superovulacije varira od 1,9 do 14,4, a kod svinje se vrednost izazvane superovulacije kreće između 25 i 46.

Dobijanje folikularnih oocita. Ova metoda se naročito koristi kod svinja, jer se metodom superovulacije ne dobija značajno veći broj jajnih ćelija, od onog koji se dobija spontanom ovulacijom (10 do 15 oocita kod nazimica i 15 do 23 kod krmača). Za dobijanje znatno većeg broja oocita, koji se koriste za *in vitro* manipulaciju i dobijanje većeg broja embriona, koristi se metoda njihove ekstrakcije iz ovarijalnih folikula (tzv. *folikularni oociti*). Postoje dve metode dobijanja folikularnih oocita: (1) aspiracijom iz vidljivih antralnih folikula (prečnika 3 i više mm) i (2) totalnom resekcijom jajnika žrtvovanih nazimica ili krmača. Aspiracija antralnih folikula se može izvesti i na živim životinjama, primenom metode laparoskopije. Kod krave i kobile je moguće izvršiti i aspiraciju folikula transvaginalno, uz praćenje pomoću ultrazvuka. Prvom metodom se dobija prosečno 137 oocita, a drugom 13 do 16 oocita po nazimici. Kod krave, može se dobiti 8 do 14 oocita po jajniku.

Kvalitetni oociti su obavijeni sa 4 do 5 slojeva kumulusnih ćelija (tzv. kumulus-oocitarni kompleks) i nalaze se u stadijumu GV i nisu sposobni za neposrednu oplodnju. Zbog toga se mora izvršiti *in vitro* dozrevanje folikularnih oocita, što znači da njihov nukleus dostigne metafazu druge mejoze, jer su samo takvi oociti sposobni za normalnu oplodnju i embrionalni razvoj. Posle *in vitro* kultivacije, u trajanju 24 do 48 h, preko 80% oocita spontano dostiže Mf II.

Prednost dobijanja folikularnih oocita se sastoji u tome što se mogu koristiti jajnici velikog broja žrtvovanih životinja. Osim toga, ne koriste se skupe hormonske supstance i

izbegava se njihovo štetno dejstvo na životinju. Primena visokih doza hormonskih supstanci, radi izazivanja superovulacije, posebno eCG, često dovodi do dobijanja većeg broja degenerisanih oocita i do pojave većeg broja neovuliranih i/ili cističnih folikula na jajnicima tretiranih životinja.

Nedostatak ove metode se, međutim, sastoji u tome što folikularni oociti nisu sposobni za oplodnju, neposredno posle ekstrakcije iz folikula. Naime, ogromna većina folikularnih oocita (preko 95%), koji se nalaze u jajniku, imaju jedro inhibirano u stadijumu diplotena prve mejotičke deobe. To je stadijum germinativnog vezikula (GV). Tek pod uticajem delovanja endogenog LH, na predovulatorni folikul, dolazi do nastavka prve mejoze. To ima za rezultat tzv. raspad germinativnog vezikula (germinative vesicle breakdown - GVBD), kondenzaciju hromozoma, završetak prve mejoze, formiranje deobnog vretena sa hromozomima u ekvatorijalnoj ravni i izbacivanje prvog polarnog tela u perivitelusni prostor oocita. Tako nastaje oocit u metafazi druge mejoze (tzv. MfII-oocit), odnosno zreo oocit, sposoban za oplodnju. Takav oocit, u procesu ovulacije, biva ubačen u jajovod.

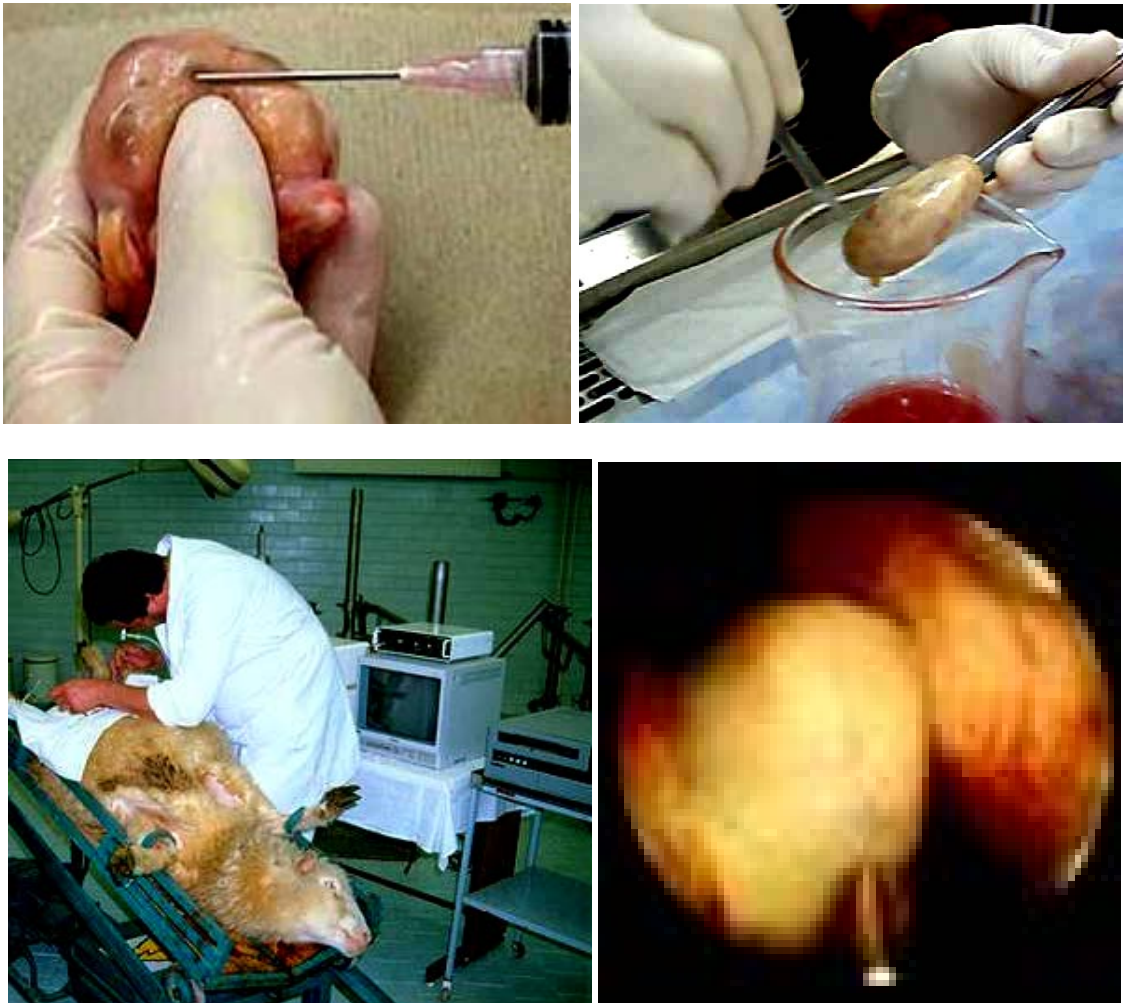
Inhibiciju nastavka prve mejotičke deobe intrafolikularnih oocita, vrše faktori koje sintetišu granulosa ćelije kumulusa ooforusa, tzv. OMI-faktori (oocyte maturation inhibitors). Ovulatorni talas LH inhibira sintezu i/ili transport ovih faktora iz ćelija kumulusa u oocit, što ima za rezultat nastavak prve mejoze i početak druge mejoze, tj. formiranje zrelog oocita. Ako se odstrane kumulusne ćelije sa površine oocita, dobijenog ekstrakcijom iz folikula, a oociti stave na kultivaciju *in vitro*, tokom 24 do 48h, preko 80% oocita dozreva do MfII, tj. postaju sposobni za oplodnju. Dodavanje hormona, kao što su p-FSH, FSH i LH, folikularne tečnosti, epidermalnog faktora rasta ili nekih drugih bioaktivnih supstanci, povećava uspeh *in vitro* kultivacije (dozrevanja) folikularnih oocita, mereno brojem (%) oocita koji su, tokom kultivacije, dostigli stadijum MfII nuklearnog dozrevanja.

Na uspeh kultivacije utiče i kvalitet dobijenih oocita. Oociti se ekstrahuju iz antralnih folikula prečnika 2 do 5 mm i moraju biti obavijeni sa kompaktnim kumulusom. Prema karakteru kumulusa ooforusa, oociti se dele u tri grupe: (a) oociti sa kompaktnim kumulusom (pet slojeva zbijenih kumulusnih ćelija), (b) oociti sa ekspanovanim kumulusom (najmanje 3 sloja kumulusnih ćelija, kod kojih je počelo odvajanje - ekspanzija) i (c) oociti sa parcijalnim kumulusom, ili bez kumulusa. Aspiracijom funkcionalnih antralnih folikula, dobija se oko 89% oocita sa kompaktnim kumulusom, kod nazimica i oko 70% oocita sa kompaktnim kumulusom kod junica.

Kvalitet kumulus-oocitarnog kompleksa je direktno povezan sa sposobnošću oocita da dovrše dozrevanje (do MfII), tokom *in vitro* kultivacije. Oociti sa kompaktnim i ekspanovanim kumulusom imaju jedro u stadijumu GV ili GVBD, dok su oociti sa parcijalnim ili bez kumulusa, najčešće, degenerisani. Posle 12 h kultivacije oocita goveda, može se dobiti 5,9% oocita u stadijumu GV i 50% u stadijumu GVBD, dok oocita u stadijumu MfII, obično, nema.

Tokom sledećih 12 h kultivacije, preko 92% oocita dozreva do stadijuma MfII. Prednosti dobijanja folikularnih oocita:

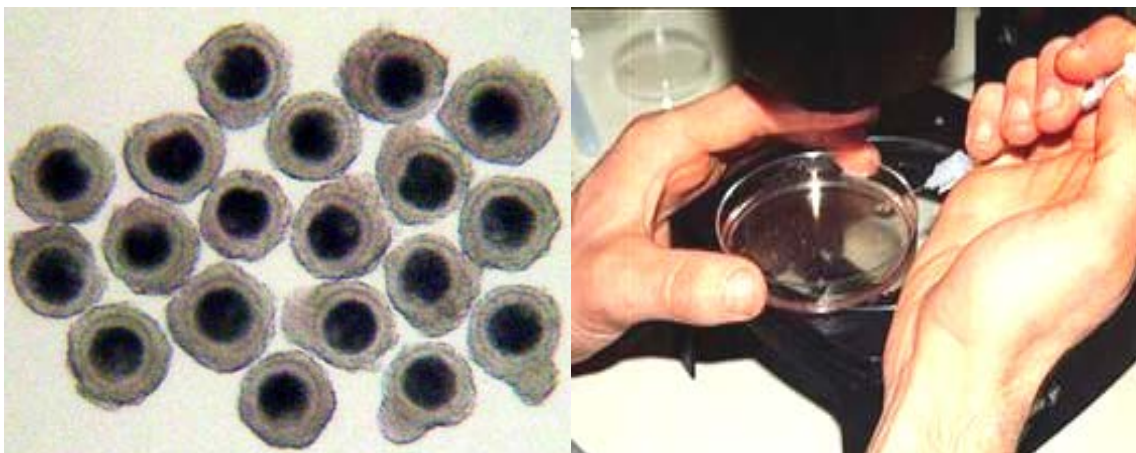
- Donori mogu biti odrasle i mlade jединke (nazimice, junice, šilježice, omice).
- Oociti se mogu prikupljati više puta, dva puta nedeljno.
- Svaka grupa oocita može biti *in vitro* oplodena spermom različitih priplodnjaka, tako da se dobiju embrioni od istog donora ali od različitih očeva, u vrlo kratkom vremenskom periodu.
- Nije potrebna primena hormona za superovulaciju, nema negativnih efekata ove primene (ovarijalne ciste, infertilitet, pad mlečnosti, traumatizacija životinje).



Slika 112. Metode ekstrakcija oocita iz folikula

Aspiracija folikula iz jajnika žrtvovane životinje (gore levo). Totalna resekcija jajnika (gore desno).

Aspiracija folikula iz jajnika in vivo, metodom laparoskopije (Dole. Desno je jajnik u vidnom polju laparoscopa).



Slika 113. Isprani folikularni oociti

Izgled ispranih oocita - kumulus-oocitarni kompleksi (levo). Kontrola kvaliteta embriona (desno). U momentu ekstrakcije, nukleus svih oocita se nalazi u stadijumu germinativnog vezikula (GV), membrana nukleusa je kompaktna, a deoba se nalazi u diplotenu prve mejoze.

3.2.2. PROIZVODNJA RANIH EMBRIONA *IN VITRO*

Embrioni za transplantaciju, stari 6 do 8 dana (kasna morula ili blastocist - rani embrioni), mogu se dobiti na dva načina: (1) ispiranjem iz plotkinja donora, koje su osemenjene u estrusu sa indukovanom superovulacijom ili (b) veštačkom *in vitro* fertilizacijom (IVF) oocita ispiranih iz superovuliranih donora ili fertilizacijom oocita dobijenih iz ovarijalnih folikula, tzv. folikulatni oociti. Prvi načiniona je opisan u poglavlju Transplantacija embriona (3.1.7.). Zbog toga će, u ovom poglavlju, biti opisana tehnologija proizvodnje ranih embriona *in vitro*.

Jedan od prvih pokušaja *in vitro* dozrevanih oocita (IVM) i *in vitro* fertilizacije (IVF) krave, izvršio je Sreenan (1970). On je koristio spermu bika preinkubiranu u medijumu koji je sadržao ferment α -amilazu. Prvo telenje, koje je usledilo posle transfera IVF embriona, postignuto je 1981. godine u SAD (Brackett i sar. 1982). Danas je dobro razvijena tehnologija *in vitro* dozrevanja i fertilizacije, kao i *in vitro* kultivacija ranih embriona goveda, ovaca, koza, konja, svinja i drugih životinja.

Ova tehnologija laboratorijske proizvodnje ranih embriona, predstavlja vrlo dobru mogućnost za bazična naučna istraživanja, kao i primenu u praktičnoj proizvodnji, za dobijanje većeg broja potomaka od genetski superiornih roditelja. Osim toga, ova tehnologija pruža osnove za razvoj drugih biotehnologija, kao što su određivanje pola, kloniranje, produkcija transgenih životinja i *in vitro* čuvanje oocita i ranih embriona, odnosno formiranje tzv. „banke gena“ pojedinih vrsta životinja.

Tehnologija *in vitro* produkcije embriona, ima praktičnu primenu u slučaju da, od neke genetski superiorne plotkinje (krave, krmače, kobile, ovce, koze i td.) nije moguće dobiti embrione putem superovulacije i/ili primenom klasične procedure ispiranja.

Osnovne procedure *in vitro* produkcije embriona su: (1) dobijanje oocita iz ovarijalnih folikula ili indukcijom superovulacije, (2) *in vitro* dozrevanje (maturacija) folikularnih oocita (IVM), (3) *in vitro* fertilizacija oocita (IVF) i (4) *in vitro* kultivacija embriona.

***In vitro* maturacija oocita (IVM).**

Dozrevanje, maturacija, primarnih (GV) folikularnih oocita *in vitro* se izvodi u inkubatoru, na 37°C, tokom 40h do 48h, u odgovarajućim medijumima (rastvorima) za inkubaciju (dozrevanje) oocita. Ovo dozrevanje se vrši da bi se nastavila prva i započela druga mejotička deoba. Tako su se nezreli folikularni oociti, čiji se nukleusi nalaze u fazi diplotena prve mejoze (tzv. germiantivni vezikul - GV), tokom perioda inkubacije, doveli do stadijuma metafaze druge mejotičke deobe (MfII). Takvi oociti su zreli, imaju redukovan (n – haploidan) broj hromozoma u pronukleusu i prvo polarno telašce (PtI) u perivitelusnom prostoru. Samo takav oocit je sposoban da reaguje na penetraciju spermatozoida, tj. da uspešno završi proces oplodnje.

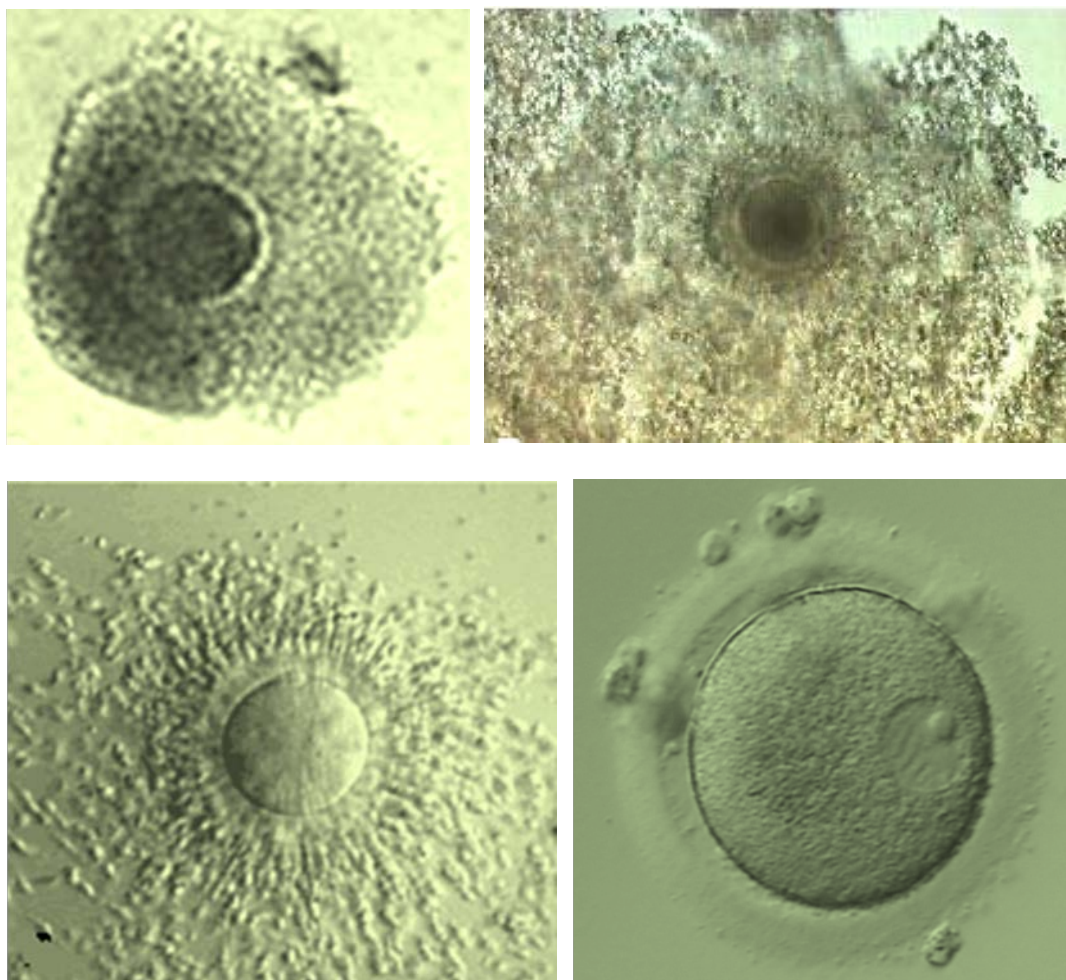
Neposredno po ispiranju iz folikula, svi oociti su obavijeni kumulusnim ćelijama (tz. kumulus-oocitarni kompleks – KOK). Ove ćelije inhibiraju raspad GV, odnosno nastavak redukcione deobe oocita. Zbog toga je potrebno da se kumulusne ćelije, pre inkubacije, skinu sa oocita. To se može izvesti mehanički (višekratnim pipetiranjem) ili preinkubiranjem KOK sa heparinom, koji razloži matriks (hijaluronsku kiselinu), koji povezuje kumulusne ćelije. Na taj način kumulusne ćelije spadnu sa oocita, tj. zone pelucide. Tako se dobiju ogoljeni (denudirani) oociti, koji se stavljaju u medijum za kultivaciju. Posle oko 40h kultivacije, većina oocita dostigne MfII (postanu tzv. zreli oociti), koji mogu da se podvrgnu procesu *in vitro* oplodnje.

Na uspeh kultivacije utiče i kvalitet dobijenih oocita. Oociti se ekstrahuju iz antralnih folikula prečnika 2 do 5 mm i moraju biti obavijeni sa kompaktnim kumulusom. Prema

karakteru kumulusa ooforusa, oociti se dele u tri grupe: (a) oociti sa kompaktnim kumulusom (pet slojeva zbijenih kumulusnih ćelija), (b) oociti sa ekspanovanim kumulusom (najmanje 3 sloja kumulusnih ćelija, kod kojih je počelo odvajanje - ekspanzija) i (c) oociti sa parcijalnim kumulusom, ili bez kumulusa. Aspiracijom funkcionalnih antralnih folikula, dobija se oko 89% oocita sa kompaktnim kumulusom, kod nazimica i oko 70% oocita sa kompaktnim kumulusom kod junica.

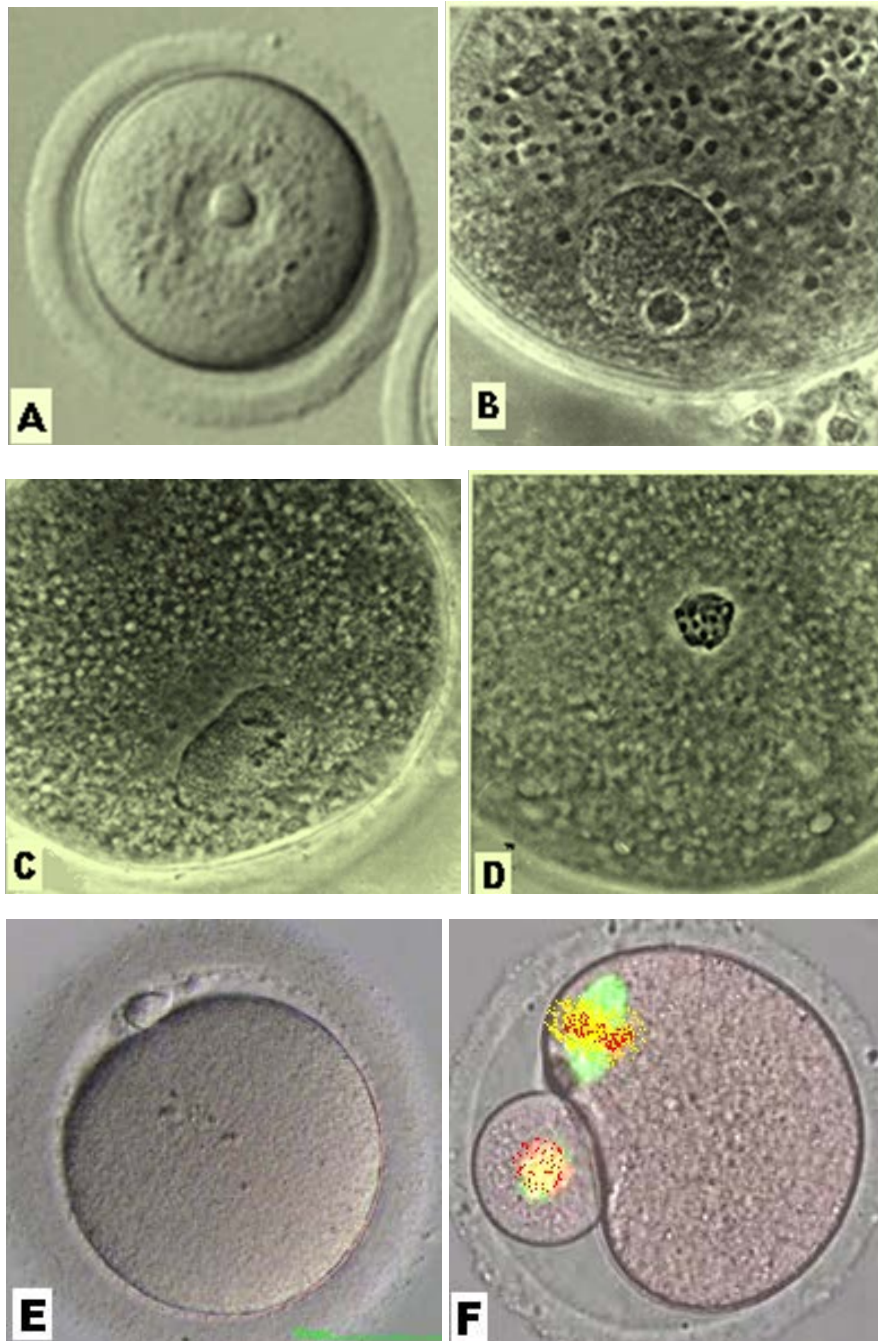
Kvalitet kumulus-oocitarnog kompleksa je direktno povezan sa sposobnošću oocita da dovrše dozrevanje (do MfII), tokom *in vitro* kultivacije. Oociti sa kompaktnim i ekspanovanim kumulusom imaju jedro u stadijumu GV ili GVBD, dok su oociti sa parcijalnim ili bez kumulusa, najčešće, degenerisani. Posle 12h kultivacije oocita goveda, može se dobiti 5,9% oocita u stadijumu GV i 50% u stadijumu GVBD, dok oocita u stadijumu MfII, obično, nema. Tokom sledećih 12h kultivacije, preko 92% oocita dozreva do stadijuma MfII.

Uspeh kultivacije oocita zavisi i od uslova kultivacije (temperatura, valžnost, koncentracija CO₂ u prostoru inkubacije, i, posebno, kvalitet (sastav) medijuma za kultivaciju. Tako se, na primer, pokazalo da je, kod konja, najefikasniji medijum TC-199. Uspeh maturacije oocita značajno se povećava, ako se osnovnom medijumu za kultivaciju (TC-199) doda krvni serum, dobijen od kobile prvog dana estrusa. Vrlo sličnu vrednost dozrevanja oocita do MfII dobija se kada se koristi medijum TC-199 sa dodatkom seruma estričnih kobila (82%) ili estričnih krava (87,5%). Većina oocita dostiže stadijum MfII posle 40 do 44h kultivacije *in vitro*. Neki rezultati pokazuju da oociti dobijeni od starijih kobila (15 i više godina), zahtevaju duži period IVM, da bi dostigli stadijum MfII.



Slika 114. Proces denudacije folikularnog oocita

Neposredno posle ekstrakcije iz folikula, kumulus-oocitarni kompleks je kompaktan, oocit je tamne boje, u sredini, sa tankim belim prstenom - zona pelucida (*gore levo*). U toku procesa denudacije, dolazi do ekspanzije (skidanja) kumulusnih ćelija (*gore desno i dole levo*). Denudiran oocit: vidi se zona pelucida, sa nekoliko zaostalih kumulusnih ćelija, veliki vitelus, sa kompaktnim jedrom, germinativnim vezikulom (GV), na poziciji „3 sata“ (*dole desno*).



Slika 115. Proces maturacije (dozrevanja) nukleusa oocita *in vitro*

A i B -Folikularni oocit u stadijumu Germinativnog vezikula (GV). *C* -Raspad Germinative vesikule, nastavak prve mejotičke deobe. *D* -Završena prva, redukciona, mejotička deoba (nukleus u telofazi). *E* -Započela druga mejotička deoba i stala u metafazi -MfII (prvo polarno telašće u perivitelusnom prostoru). *F* -Isti oocit, hromozomi obojeni crveno-žuto, histološkom bojom Histone H2B-mCherry. Vidi se prvo polarno telašće u perivitelusnom prostoru oocita i hromozomi u ekvatorijalnoj ravni deobnog vretena metafaze druge (redukcione) mejotičke deobe. To je zreo oocit. Takvi oociti se koriste za *in vitro* fertilizaciju.

***In vitro* fertilizacija zrelih oocita (IVF)**

Ovaj proces obuhvata: (1) *in vitro* kapacitaciju spermatozoida, (2) *in vitro* ko-kultivaciju spermatozoida sa zrelim, denudiranim, oocitima tokom koje se izvrši proces oplodnje oocita, (3) kontrola kvaliteta dobijenih oplodjenih oocita i (4) kultivacija ranih embriona do određenog stadijuma (morula ili rani blastocist), kada se vrši ponovna kontrola kvaliteta embriona. Ovako dobijeni embrioni se mogu odmah preneti u pripremljene recipijente ili se mogu pripremiti i čuvati u tečnom azotu, na -196°C , duže vreme.

Kapacitacija spermatozoida

Kapacitacija je povezana sa značajnim izmenama na površini spermatozoida, *In vitro* kapacitacija se odvija u hranljivom medijumu obogaćenom sa 3% goveđim serum-albuminom. Inkubacija spermatozoida bika, u medijumu kome je dodato $10\mu\text{g/ml}$ heparina, dovodi do uspešne kapacitacije. Međutim, dozu heparina treba povećati 10 puta u procesu *in vitro* kapacitacije spermatozoida pastuva. Prezervacija spermatozoida i brzina kapacitacije *in vitro* zavisi i od prisustva holesterola u medijumu (karakterističan gubitak holesterola iz plazme membrane tokom kapacitacije). Benoff i saradnici su (1993.) dokazali da se spermatozoidi mogu držati u nekapacitiranom stanju ako se u medijumu doda suspenzija zasićena holesterolom. Studije su pokazale da se tokom *in vitro* kapacitacije sadržaj holesterola u plazminoj membrani smanjuje za 20% do 50%, u zavisnosti od sastava rastvora. Treba napomenuti da je za proces kapacitacije izuzetno bitno održati naelektrisanje spoljne površine glave spermatozoida u fiziološkim okvirima, zbog osetljivosti i dinamične strukture gradivnih proteina i lipida odgovornih za kontrolu jonske popustljivosti.

Fertilizacija in vitro

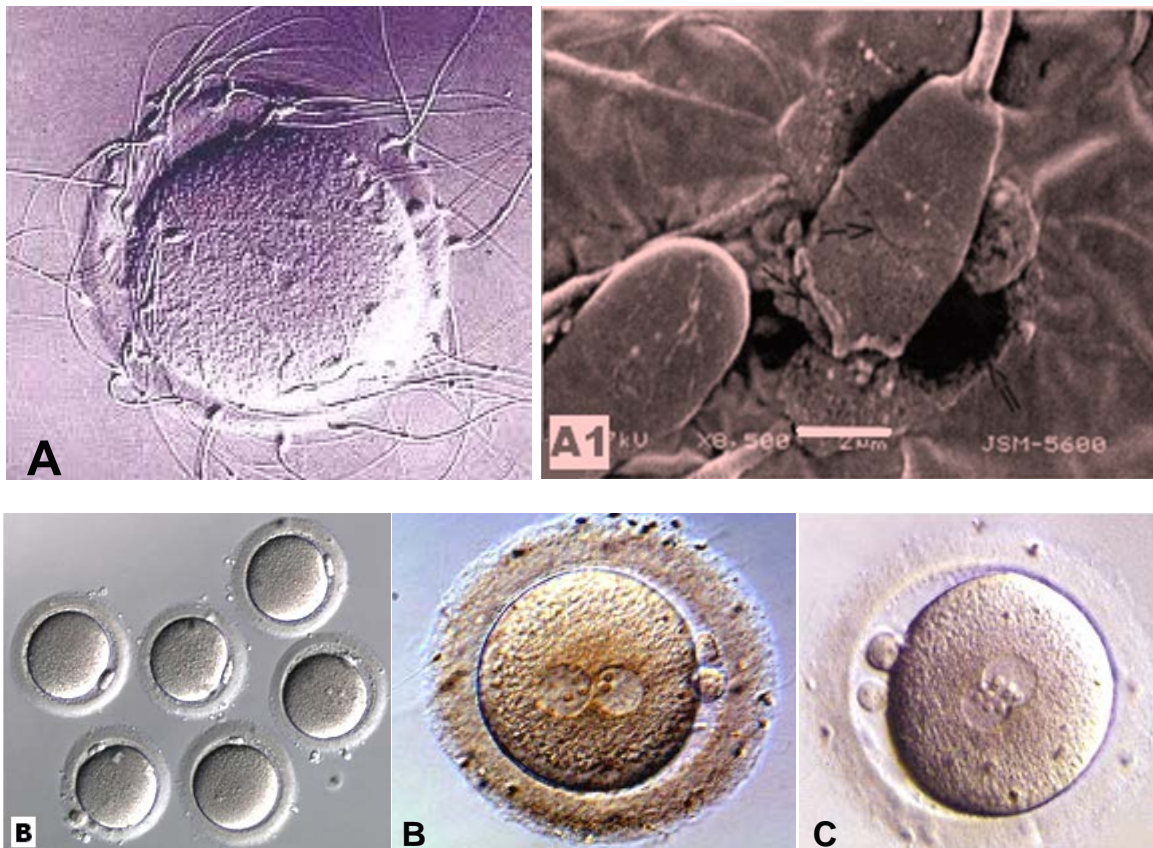
Za uspeh *in vitro* fertilizacije (IVF) je važno koristiti spermu visokog fertilizacionog potencijala, kao i odabrati efikasnu metodu *in vitro* kapacitacije spermatozoida. Međutim, uspeh IVF i vrednost brazdanja oplodjenih oocita konja su značajno niži od onih koji se postižu kod goveda. Vrednost IVF iznosi 12 do 33%, u zavisnosti od kvaliteta kumulus-oocitarnog kompleksa. Naime, više oplodjenih oocita je bilo kada su korišteni oociti sa delimično odvojenim kumulusom, u poređenju sa kompaktnim kumulus-oocitarnim kompleksom.

Primena tehnologije intracitoplazmatske injekcije spermatozoida (ICSI) može povećati vrednost IVF kod konja.

Primarni uslovi za uspeh *in vitro* fertilizacije su: kvalitetni zreli (MfII) oociti, kapacitirani spermatozoidi, adekvatni medijumi za IVF, kao i optimalni uslovi mikroklimata (temperatura, sastav i odnos gasova) kultivacije. Ipak, glavni faktor uspešne IVF su dobro kapacitirani spermatozoidi. Zbog toga se, još uvek, istražuju medijumi i optimalni uslovi za *in vitro* kapacitaciju spermatozoida. Ovi uslovi moraju omogućiti da spermatozoidi zadrže visok stepen fertilizacione sposobnosti. To predpostavlja zadržavanje visokog stepena progresivne pokretljivosti, uspešnu denudaciju i akrosomalnu reakciju spermatozoida.

Uspeh IVF se meri brojem (%) normalno, tj. monospermično penetriranih oocita, kao i brojem oplodjenih oocita, koji su se razvili do stadijuma 2 ili 4 blastomere. Kod goveda se dobija preko 72% monospermično i 4,2% polispermično oplodjenih oocita *in vitro*. Međutim, kod svinja IVF rezultira vrlo visokim procentom polispermično penetriranih oocita (oko 80 do 90%). Precizan uzrok ove pojave nije potpuno jasan, ali rezultati novijih istraživanja ukazuju na metode prekulivacije i kapacitacije spermatozoida, kao i njihove koinkubacije sa oocitima, koje smanjuju stepen polispermije kod IVF svinja. Broj kapacitiranih spermatozoida u koinkubaciji sa oocitima, takođe utiče na uspeh IVF. Obično je ovaj broj između 1 i 6 miliona po mililitru medijuma. Na uspeh IVF utiče i vrsta upotrebljenog medijuma, kao i trajanje

perioda koinkubacije oocita i spermatozoida. Većina autora smatra da koinkubacija treba da traje 6 časova, jer se tada dobija najveći broj monospermično penetriranih oocita.

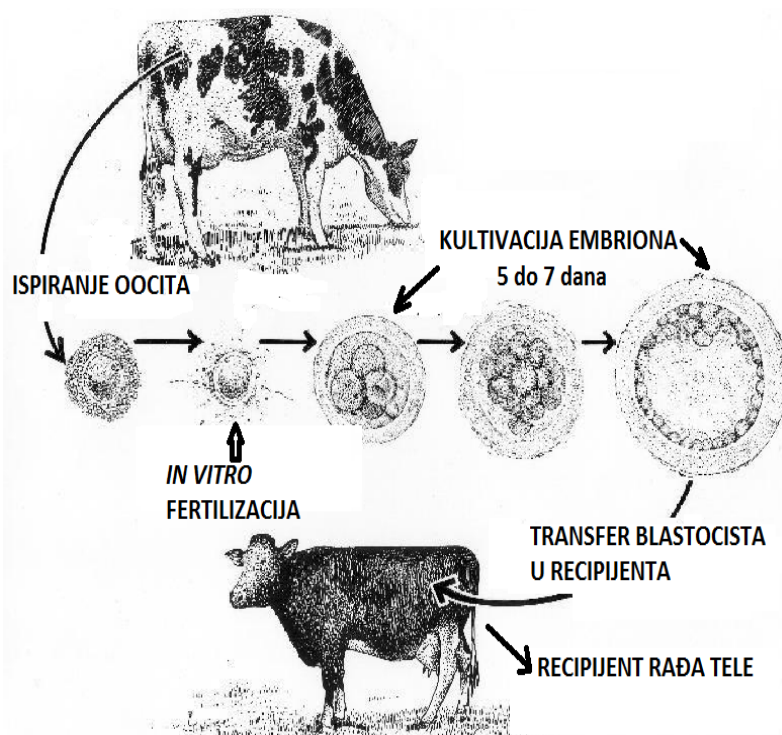


Slika 116. Fertilizacija oocita

A – Oocit sa brojnim spermatozoidima u i na zoni pelucidi. **A1** - Jedan spermatozoid probija zonu pelucidu oocita (elektronski mikroskop, bela crta je dužine 2 μ m). **B** – Oplođeni oociti. Vide se dva polarna telašca u perivitelusnom prostoru (prvo je rezultat završene prve, a drugo završene druge, redukcionne, mejotičke deobe nukleusa, koja se događa aktivacijom oocita penetracijom spermatozoida) i dva pronukleusa (muški i ženski) u vitelusu oocita. **C** – Singamija (spajanje homolognih hromozoma muškog i ženskog pronukleusa).



Slika 117. Razvojni stadijumu ranih embriona, kultivisani posle *in vitro* fertilizacije
Dve, četiri i osam blastomera (gore), morula, rani i kasni blastocist (sredina).
Morfološki dobri blastocisti, pripremljeni za transplantaciju (dole).



Slika 118. Osnovni postupci dobijanja oocita, in vitro maturacije i oplodnje, kao i transplantacije embriona u recipijenta

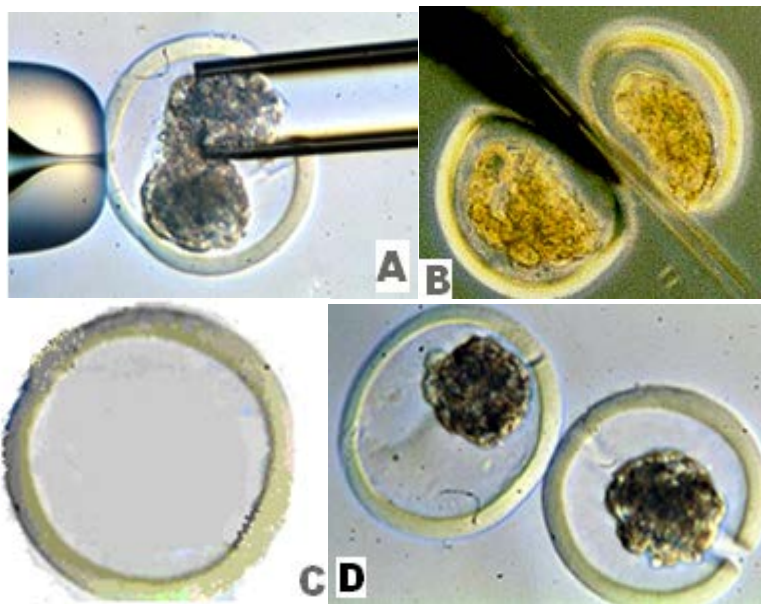
Oociti ili embrioni se mogu dobijati od svih genetski kvalitetnih ženki, a posebno od onih plotkinja: (a) koje imaju problema sa reprodukcijom, tj. poremećajem funkcije reproduktivnih organa, (b) koje imaju česte abortuse, (c) koje, iz bilo kog razloga, ne mogu da budu gravidne, (d) od kojih je veoma važno dobiti potomke. Prema nekim podacima (*IETS, 2013*), transplantacija embriona je sve češća biotehnologija za unapređenje stočarske proizvodnje, naročito govedarske. Tako je, na primer, 2000. godine izvršena transplantacija oko 30.000 govedih embriona, a 2012. godine, ovaj broj se uvećao za 10 puta (transplantirano je preko 300.000 embriona). Uspeh transplantacije embriona dobijenih tehnologijom IVM/IVF, meren procentom prašenja i veličinom legla recipijenata, je znatno manji od onog posle transplantacije embriona dobijenih *in vivo* (klasičnim ispiranjem donora). Primarni faktor koji značajno limitira širu primenu tehnologije IVM/IVF kod svinja, predstavlja visok procent polispermčno oplodjenih oocita. Razlog pojave ovog fenomena kod svinja nije poznat. Neki autori smatraju da se moraju izučavati uslovi koji vladaju u jajovodu, tokom perioda *in vivo* oplodnje, te da se uslovi IVF moraju što više približiti prirodnim. Osim toga, izgleda da oociti stiču konačnu sposobnost za uspešnu oplodnju i embrionalni razvoj, još dok se nalaze u folikulima, te da ovu sposobnost, iz nepoznatih razloga, ne mogu steći tokom *in vitro* dozrevanja. Zbog toga, identifikacija intrafolikularnih faktora, koji definišu kvalitet oocita, može doprineti poboljšanju *in vitro* produkciji embriona svinje. Pre početka procesa IVF, odnosno dokultivacije spermatozoida i zrelih (Mf II) oocita, spermatozoidi se moraju pripremiti, odnosno mora se izvršiti proces njihove kapacitacije.

3.2.3. REPRODUKTIVNO KLONIRANJE EMBRIONA

Naučna istraživanja, kao i praktična proizvodnja, sve češće, zahtevaju obezbeđenje velikog broja genetski identičnih embriona, odnosno odraslih jedinki. Ovo je moguće postići metodom kloniranja ranih embriona. Klonirani embrioni se mogu dobiti mikrodisekcijom embriona u stadijumu morule, ili mikrotransplantacijom nukleusa. Bisekcijom ranih embriona na dva ili četiri dela, dobija se dva ili četiri identična embriona, posle in vitro kultivacije ovih delova. Transplantacija kloniranih embriona ima za rezultat i preko 80% uspešnih gravidnosti. Međutim, ovom metodom kloniranja se, ipak, dobija ograničen broj identičnih embriona.



Slika 119. Mikromanipulator sa embrionima

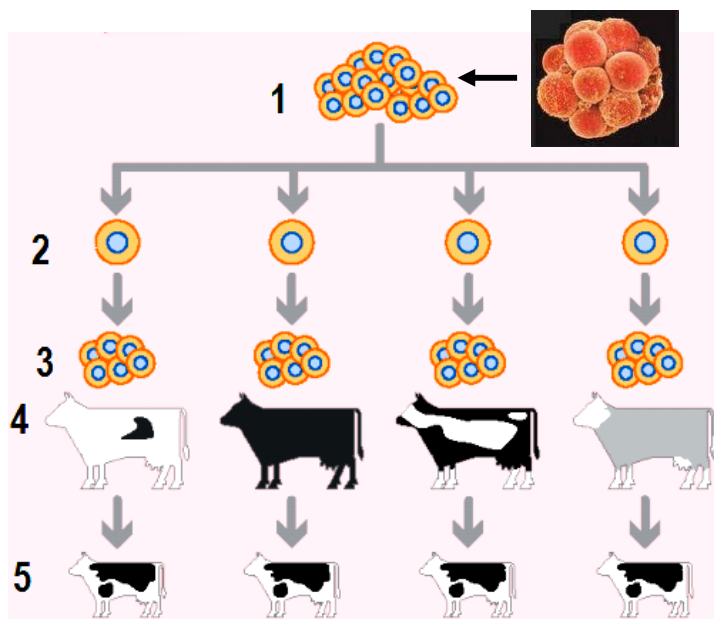


Slika 120. Uzimanje polovine blastocista mikropipetom (A) ili presecanje blastocista (B)
Svaka polovina blastocista se ubacuju u pripremljenu „praznu“ zonu pelucidu (C) oocita iz kojih je izvađen vitelus sa nukleusom. Tako se dobiju dva nova, identična, embriona (D)



Slika 121. Izolacija pojedinih blastomera iz rane morule

Metodom hemijske razgradnje zone pelucide (a, b i c) ili ekstrakcijom iz morule (d). Svaka blastomera se ubacuje u po jednu „praznu“ zonu pelucidu. Od svake ubačene blastomere, dobije se po jedan embrion. Svi embrioni su genetski identični. Crtica (slika „a“) označava dužinu 100μm.



Slika 122. Postupak reproduktivnog kloniranja

1-Iz morule se izdvoje pojedinačne blastomere; 2-Iz svake blastomere se, *in vitro*, razvije po jedna nova, genetski identična, morula; 3-Svaka nova morula se transplantira u jednu kravu recipijenta (4). Tako se dobiju genetski identični potomci (telad).

Dobijanje znatno većeg, teorijski neograničenog, broja identičnih embriona, postiže se metodom mikrotransplantacije nukleusa. Pokazalo se, naime, da nukleusi uzeti iz blastomera ranih embriona, posle transplantacije u enukleiran oocit, mogu nastaviti sa deoboma i dati nove embrione, identične onima iz čijih blastomera su uzeti nukleusi. Tako dobijeni embrioni, odnosno njihove blastomere, ponovo mogu poslužiti kao izvor nukleusa za transplantaciju u naredne oocite. Tako se, teorijski, može dobiti neograničen broj identičnih embriona,

odnosno jedinki. Ovaj način kloniranja je, u eksperimentalnim uslovima, postignut kod svih domaćih životinja, još u periodu između 1986. i 1990. godine. Važno je istaći da je, za sada, kloniranje životinja ograničeno samo na embrionalne ćelije, dok je kloniranje somatskih (telesnih) ćelija vrlo ograničenog uspeha i nema praktičnog značaja. Izuzimajući poznatu ovcu Dolly, koja je dobijena kloniranjem somatskih ćelija vimena.

3.2.4. TRANSGENEZA

Napredak genskog inženjeringa i biotehnologije omogućio je dizajniranje transgenih organizama čije su proizvodne sposobnosti mnogo šire od onih koje poseduje populacija sa standardnim genotipovima. U biljnoj proizvodnji manipulacija genskim materijalom se primenjuje dugi niz godina. Poliploidni hibridi se koriste u proizvodnji ratarskih, povrtarskih i voćarskih kultura.

Transgeneza predstavlja postupak kreiranja jedinke neke biljne ili životinjske vrste, koja u svom genomu poseduje i prenosi veštački unet ili promenjen gen, ili grupu gena.

Transgen predstavlja sekvencu genskog materijala izolovanog iz genoma jedne individue i prenešenog u genom druge individue (iste ili različite vrste).

Transgeni organizam podrazumeva organizam koji poseduje i/ili prenosi veštački unet novi ili promenjen gen za neko(a) svojstvo(a).

Prvi put je izvršeno uspešno unošenje strane DNK, mikroinjekcijom SV40 DNK, u blastocel miša i infekcijom mišijeg embriona retrovirusom Moloney leukemije. Za praktičnu primenu transgeneze, u animalnoj proizvodnji, primarna su tri aspekta ove tehnologije: (1) stepen integracije stranog gena u genom manipulisanog embriona, (2) fenotipska ekspresija promenjenog genoma kod dobijenih jedinki i (3) prenošenje promenjenog genoma na kasnije generacije. Na taj način je moguće poboljšati postojeća, ali i proizvesti nova poželjna genetska svojstva kod transgenih životinja i njihovih potomaka. Implementacija strane DNK u genom recipijenta je vrlo složen proces. Metodi na fizičko-hemijskom principu, poput elektroportacije, pomažu u većoj ili manjoj meri pri probijanju barijera poput ćelijske membrane i prolaz kroz citoplazmu ćelije, ali po cenu degradacije DNK materijala koji se prenosi, tako da u pronukleus embriona dospevaju samo kratki lanci genskog materijala koji se kasnije integrišu u genom domaćina. Više se koristi metoda direktnog mikroinjektiranja DNK u pronukleus embriona (*Gordon, 1980; Brem i sar., 1985; Bulla, 1993; Chrenek, 1997a*).

Metodi prenosa gena u embrion:

a) Mikroinjektiranje strane DNK u jedan pronukleus zigota

Ovom metodom je moguć prenos stranog gena u jedan od pronukleusa oplodnog jajašca.

b) Mikroinjektiranje strane DNK u oba pronukleusa zigota

Ova metoda je zasnovana na istom principu kao i prethodna i uspešno se koristi kod stvaranja transgenih miševa. Ovom metodom je moguć prenos stranog gena u oba pronukleusa oplodnog jajašca (*Kupriyanov i sar., 1998*). I pored duže mikromanipulacije i agresivnijeg tretmana embriona dupla mikroinjekcija ne prouzrokuje značajno veći procent degeneracije. Uspešnost integracije stranog gena u genom recipijenta, upotrebom ovog metoda je za 30 % veća od prethodne metode.

c) Upotreba retrovirusa kao prenosioca strane DNK

Da bi virus mogao da se koristi kao vektor za prenos izolovanog segmenta DNK prvo moraju da se uklone geni koji mogu da ugroze primaoca. Bitno je onemogućiti nekontrolisanu replikaciju i širenje virusa u recipijentu (*Hondebine, 1993*). Kada se to učini (najčešće pasažom virusa kroz otporna tkiva, ili organizme), ovako izmenjeni virusi postaju pogodni za ugradnju stranog gena u njihov genom, a zatim i unos cele genske konstrukcije u embrion. Limitacioni faktor ove metode je dužina genske konstrukcije. Infekcija nastaje posle mikroinjektiranja virusa ispod zone pelucide ili za vreme kultivacije embriona (kojima je prethodno odstranjena zona pelucida) u rastvoru izmenjenog virusa. Opšti princip upotrebe virusa za prenos genskog materijala iz jednog organizma u drugi ima svoje specifičnosti, koje zavise od tipa virusa koji se koristi za proces transgeneze:

Upotreba transpozona. Transpozoni su mobilni elementi genoma, prethodnici retrovirusa. Neki od njih nose samo sekvence odgovorne za integraciju i odgovarajuću sekvencu za enzim koji omogućava integraciju. Genske konstrukcije pripremljene na bazi transpozonskih nosača su mikroinjektirane ili fizičko-hemijskim metodama prenošene u embrion. Tipičan primer je transpozon P izolovan iz *Drosophila-e*.

Upotreba retrovirusa. Retrovirusni vektori su dobra opcija kada se proizvode transgene ptice. Nisu najpogodniji za embrione sisara zbog toga što ne mogu da izvrše potpunu infekciju embriona već u stadijumu *tetrada* (četiri ćelije). U eksperimentima se iz tog razloga javlja veliki postotak mozaicizma. Prenos strane DNK upotrebom retrovirusa omogućava ugrađivanje stranog gena na definisano mesto u hromozomu recipijenta po principu homologne rekombinacije. Genetska konstrukcija se sastoji od retrovirusnog vektora, u kojem je osim tuđeg gena (posmatrani gen) u isto vreme ugrađena i sekvenca DNK identična sa sekvencom genoma domaćina.

Upotreba adenovirusnih vektora. Adenovirusni vektori su takođe pogodni za gensku terapiju i za transgenezu kod sisara. Ovi vektori su smatrani za nestabilne jer se ne integrišu u genom domaćina. Pretpostavka je da se vektori korišćeni za eksperimente ne umnožavaju. Ovi vektori mogu uspešno da inficiraju embrione miševa, pacova i krava u jednoćelijskom stadijumu razvoja embriona. Iz dosada nepoznatih razloga, uspešnost ove tehnike je kod embriona miša veći nego kod ostalih vrsta. Kao i kod drugih tipova virusnih vektora i u ovom slučaju se u eksperimentima javlja veliki procenat mozaicizma, što znači da ne dolazi do integracije i ekspresije tuđe DNK u svim ćelijama embriona.

d) Upotreba embrionalnih (STEM) ćelija u transgenezi

U poslednje vreme se za prenos genske informacije često koriste embrionalne ćelije (*embryonic stem cells* - ESC) kako to navodi *Gardner* i saradnici (*1998*). Potencijalni izvori ESC mogu biti: embrionalne ćelije u stadijumu blastocite, ćelije ploda za vreme graviditeta, ćelije fetusa, ćelije ekstrahovane iz nekih organa. Ove ćelije potiču iz različitih izvora i imaju različite osobine, odnosno različit potencijal razvoja u tkivu. Teoretski i praktično, ESC izolovane iz unutrašnje ćelijske mase (*inner cell mass* – ICM) embriona u stadijumu blastocite mehaničkom metodom (mikropipeta) ili imuno metodama su po kvalitetu idealne (često se označavaju i kao pluripotentne, odnosno sa sposobnošću razvoja u više vrsta tkiva). Za ovakva istraživanja se traže ćelije sa prostranim i dobro vidljivim jedrom, koje se odlikuju sposobnošću ne diferenciranja tokom kultivacije u nekoliko generacija (pasaža) pri *in vitro* uslovima, kao i dobrom sposobnošću kolonizacije embriona domaćina u slučaju prenosa. Još jedna važna osobina ESC je prisutnost više površinski antiserumskih markera na osnovu kojih je moguće utvrditi da li se zaista radi o ESC materijalu. Upotreba ESC zavisi od sposobnosti ES ćelija: da budu uspešno izolovane i nasledno održane u nediferenciranom stanju u *in vitro* uslovima za određeno vreme, stvaranja potrebnih vrsta ćelija određenog tkiva u *in vitro* uslovima i sposobnosti za kolonizaciju embriona i njihovog

razvoja u uslovima *in vivo* bez rizika za kultivisano tkivo. Genom ESC se može izmeniti mikroinjektiranjem strane DNK u nukleus, retrovirusnim vektorima, ili nekom drugom tehnikom. Zatim se ćelije kultivišu i odabiraju pomoću selekcionih markera (npr. neogen, GFP–*green fluorescent protein*-gen, i dr.). Ovako pripremljene i odabrane embrionalne nediferencirane ćelije se koriste za prenos ili agregaciju sa embrionima u različitim stadijumima razvika (proizvodnja himera). Problem pri upotrebi embrionalnih ćelija je njihova limitiranost, jer je samo deo ćelija nekog tkiva transgenno izmenjen. Potomstvo se karakteriše visokim stepenom mozaicizma u posmatranom genu. Pogodnost upotrebe ESC ogleda se kroz mogućnost razdvajanja ESC sa stranim genom i onih ćelija u koje transgen nije inkorporiran, kao i umetanje gena na tačno, određeno mesto u hromozomu uz pomoć homologne rekombinacije.

e) Elektroportacija

Osnova ove metode je mešanje rastvora koji sadrži genetsku konstrukciju sa embrionima bez zone *pellucide* ili injektiranje genske konstrukcije ispod zone *pellucide*. Ugrađivanje strane DNK ostvaruje se uz pomoć pulsirajuće struje na osnovu povišene propustljivosti ćelijske membrane izazvane elektro šokom u izoosmotskoj sredini.

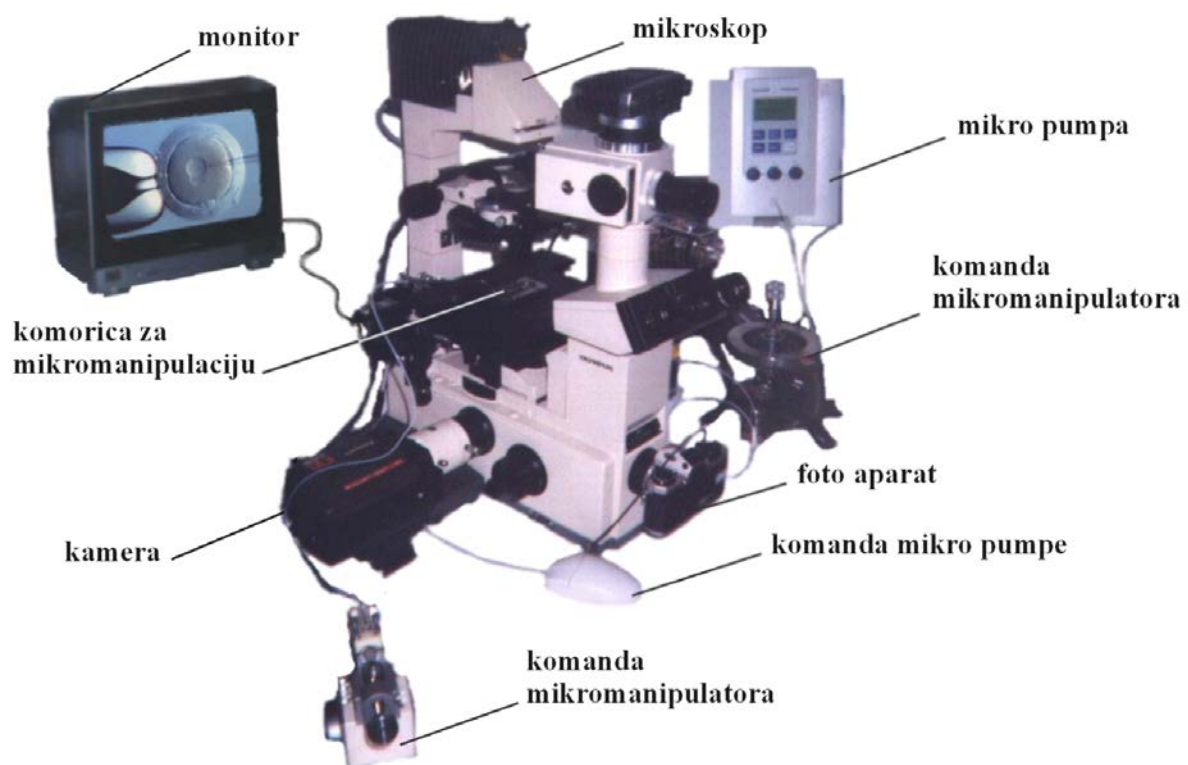
f) Genski top

Ova tehnika omogućava da se strana DNK veže za čestice teškog metala (najčešće zlata) i u električnom polju "ispucava" na ćelije (*gene bombardment*). Ova metoda se koristi pri pravljenu transgenih biljaka, gde je neophodno probijanje jakog ćelijskog zida (*Boubelik, 1993*). Princip ove tehnike se zasniva na mikroinjektiranju izolovanog segmenta strane DNK pripremljene u rastvoru poznate koncentracije u pronukleus embriona (najčešće u muški jer je veći i postavljen u centru embriona). Do sada razvijene tehnike, još uvek, ne daju zadovoljavajuće rezultate transgeneze, mereno brojem rođene transgene mladunčadi, brojem mladunčadi kod koje je došlo do integracije unetog gena u postojeći genom, brojem mladunčadi sa fenotipski ispoljenom novom osobinom, kao i brojem transgenih životinja, koje promenjeno ili novo svojstvo prenose na svoje potomke.

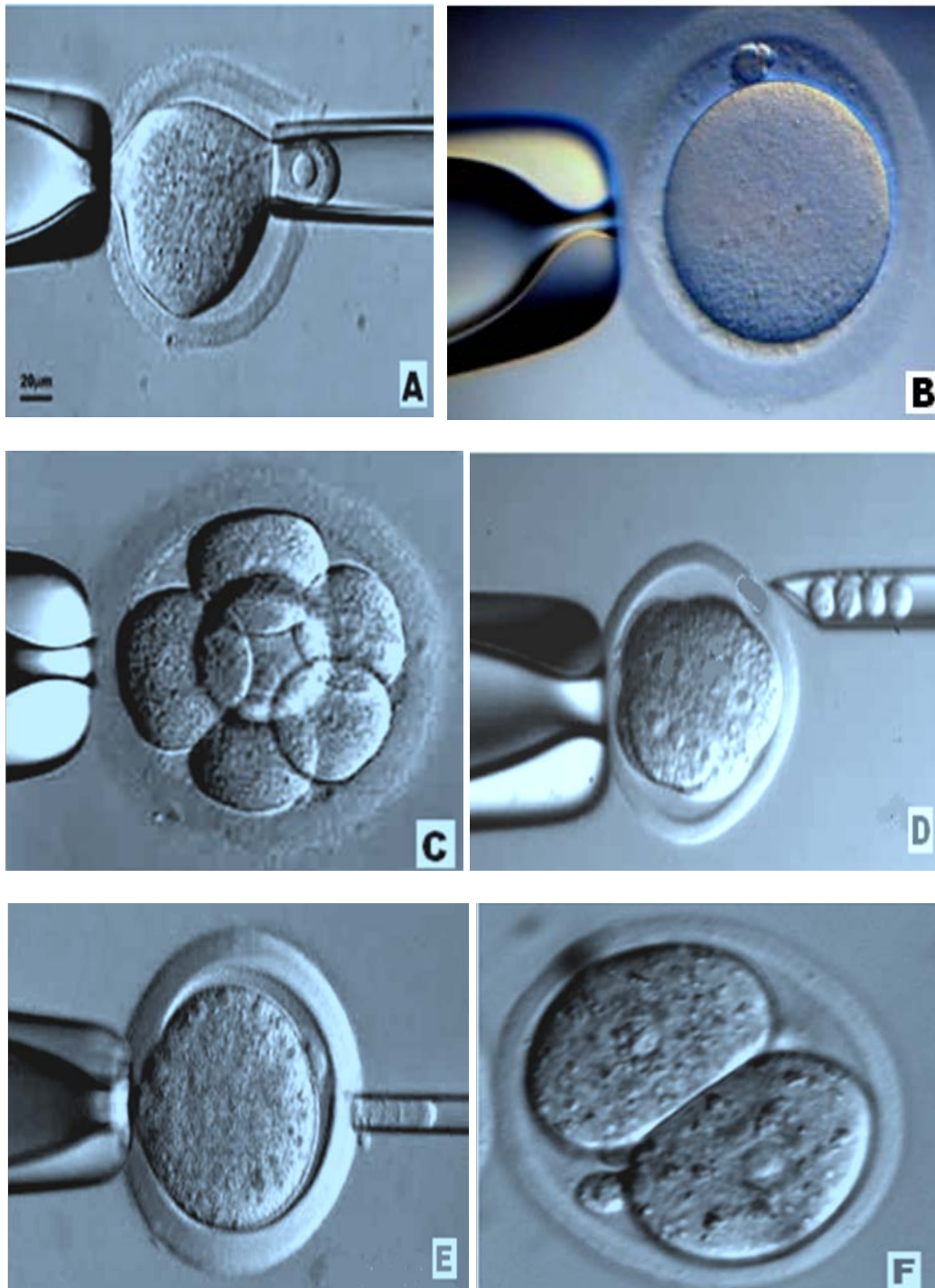
Dosadašnji rezultati pokazuju da transgeneza još nema velikog komercijalnog značaja, jer se dobija vrlo mali broj transgenih embriona, kod kojih je došlo do inkorporacije unesenog novog gena u genom embriona, a postupak transgeneze je dosta skup. Ipak, primena ove metode, u široj proizvodnji, jasno se vidi u narednom periodu. Naime, već su dobijene transgene jedinke sa modifikovanim genom za veću produkciju somatotropnog hormona (STH). To ima za rezultat znatno povećan intenzitet prirasta kod transgenih životinja. Transgenozom je moguće povećati i otpornost životinja na pojedine zarazne bolesti.

Tabela 42. Uspeh transgeneze kod domaćih sisara

| | Svinja | Ovca | Koza | Kobila |
|--|-----------|---------|------|---------|
| Broj rođenih mladunaca, posle transplantacije, od broja mikroinjektiranih embriona (%) | 5 - 10 | 10 - 15 | 15 | 10 - 15 |
| Broj transgenih, od broja rođenih (%) | 10 - 15 | 5 - 15 | 7 | 2 - 5 |
| Broj transgenih, od broja injektiranih (%) | 0,5 - 1,0 | 1 - 2 | 1 | 0,2 |

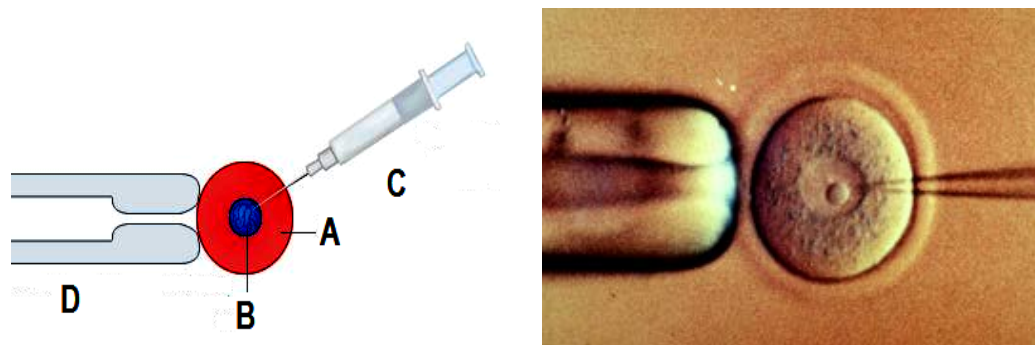


Slika 123. Mikroskop sa manipulatorima i pumpom za mikroinjektiranje



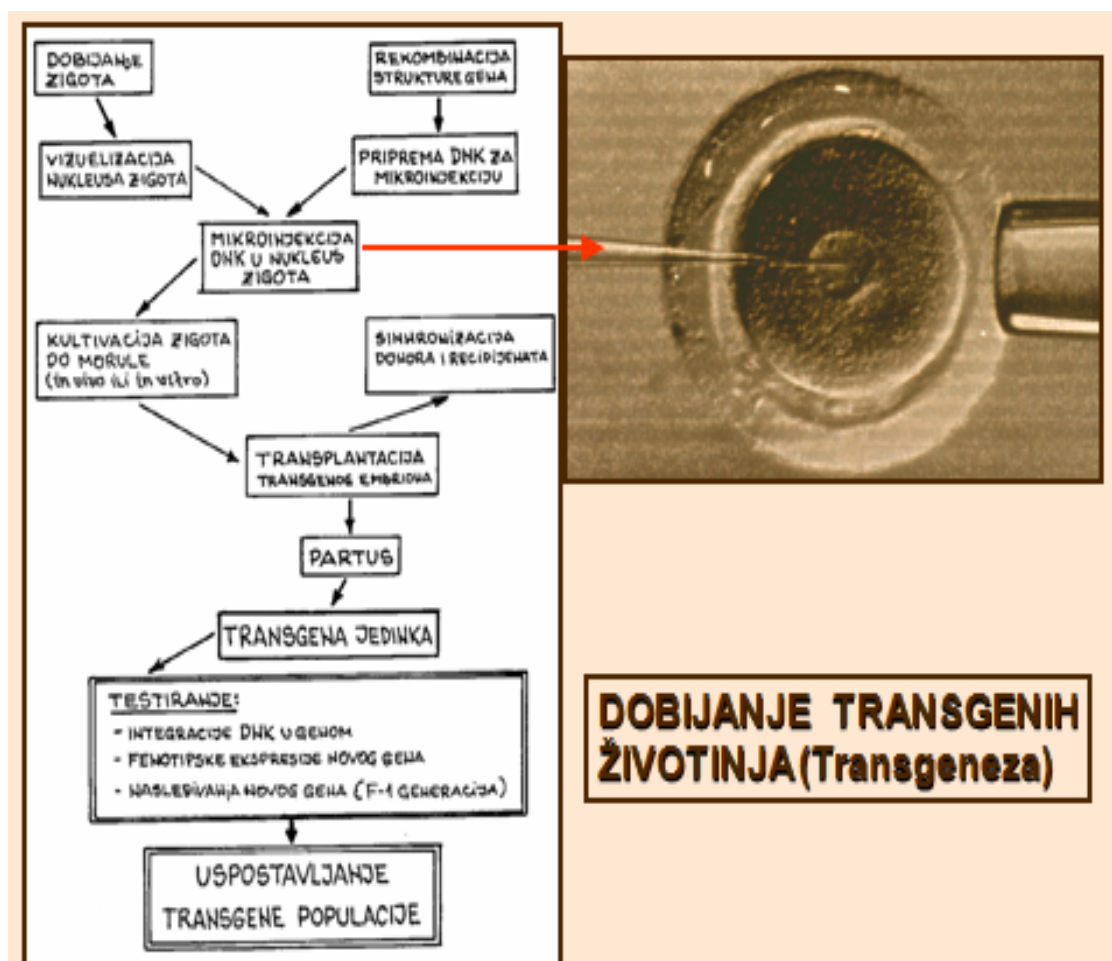
Slika 124. Transplantacija nukleusa

Eneukleacija zrelog (MfII) oocita recipijenta novog nukleusa (A); Pripremljen (enukleiran) oocit recipijent (B); Blastomere embriona iz kojih će se uzeti nukleusi za transplantaciju (C). Uzimanje nukleusa iz svake blastomere embriona poželjnog genotipa (D). Ubacivanje nukleusa poželjnog genotipa, iz svake blastomere, u po jedan enukleiran oocit (E). Novi embrion, u stadijumu 2 blastomere, sa poželjnim (izmenjenim) genotipom. Tako se dobija onoliko transgenih embriona, koliko je nukleusa izvađeno iz embriona donatora.



Slika 125. Unošenje stranog gena mikroinjekcijom u nukleusa oocita

A - Citoplazma oocita; B - Nukleus oocita; C - Injekcija sa stranim genom; D – Pipeta za pridržavanje.



Slika 126. Postupak produkcije transgenih životinja

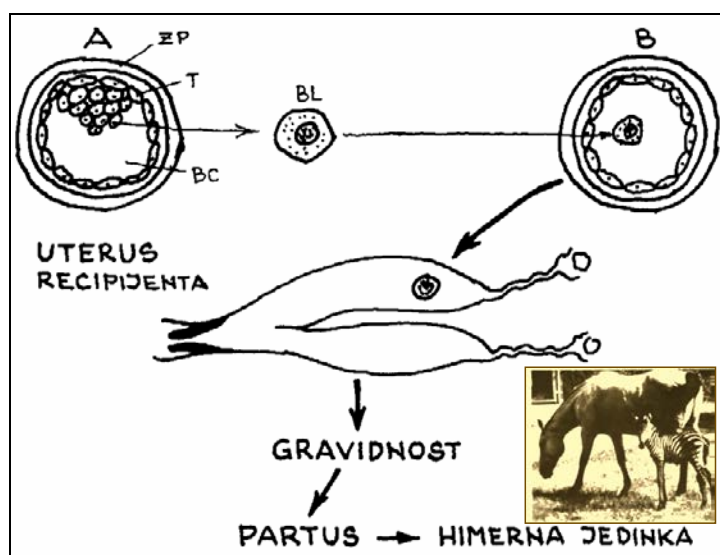
Dosadašnji rezultati pokazuju da transgeneza još nema velikog komercijalnog značaja, jer se dobija vrlo mali broj transgenih embriona, kod kojih je došlo do inkorporacije unesenog novog gena u genom embriona, a postupak transgeneze je dosta skup. Ipak, primena ove metode, u široj proizvodnji, jasno se vidi u narednom periodu. Naime, već su dobijene transgene jedinice sa modifikovanim genom za veću produkciju somatotropnog hormona (STH). To ima za rezultat znatno povećan intenzitet prirasta kod transgenih životinja. Transgenezom je moguće povećati i otpornost životinja na pojedine zarazne bolesti.

Tabela 42. Uspeh transgeneze kod domaćih sisara

| | Svinja | Ovca | Koza | Kobila |
|--|-----------|---------|------|---------|
| Broj rođenih mladunaca, posle transplantacije, od broja mikroinjektiranih embriona (%) | 5 - 10 | 10 - 15 | 15 | 10 - 15 |
| Broj transgenih, od broja rođenih (%) | 10 - 15 | 5 - 15 | 7 | 2 - 5 |
| Broj transgenih, od broja injektiranih (%) | 0,5 - 1,0 | 1 - 2 | 1 | 0,2 |

3.2.5. FORMIRANJE HIMERA

Pojam himere označava jedinku nastalu kombinacijom dva ili više različitih genoma. Himere se mogu dobiti tako što se blastomere jednog ili više ranih embriona (obično u stadijumu morule), ubace u aktiviranu zrelu jajnu ćeliju, u embrion iz koga su, prethodno, izvađene njegove blastomere, ili u šupljinu blastocista (blastocel) intaktnog embriona (*Besenfelder i sar. 1998*). Himere nisu sposobne za dalje razmnožavanje, pa njihova proizvodnja nema praktičnog značaja. One se koriste za naučna istraživanja, u oblasti diferencijacije i razvoja embrionalnih ćelija, kao i kod transplantacija jedne, u recipijente druge životinjske vrste (*Pedersen, 1994*). Na taj način se prevazilazi problem imunog odbacivanja presađenog embriona, od strane recipijentne životinje, jer ne dolazi do imunoinkompetencije između embriona i recipijenta. Naime, imunu reakciju odbacivanja izazivaju ćelije trofoblasta embriona, koje stupaju u direktan kontakt sa endometrijumom recipijenta. Ako se iz embriona, koji pripada istoj vrsti kao i recipijent, izvade blastomere, a u njega ubace blastomere embriona druge vrste, tako nastala himera neće izazvati imunoinkompatibilnost sa recipijentom, jer ćelije trofoblasta himere pripadaju embrionu iste vrste kao i recipijent (*McDonald, 1989*).



Slika 127. Dobijanje himere

A - Blastocist jedne vrste (na primer Zebre), iz koga se uzimaju blastomere; B - Blastocist druge vrste (na primer Konja), iz koga je izvađena unutrašnja ćelijska masa, u čiju šupljinu (blastocel) se stavljaju blastomere, uzete iz blastocista A. Tako formirana himera se ubacuje u uterus kobile, koja će oždrebiti Zebriu.

zp - zona pelucida; T - trofoblast; BC - blastocel; BL - blastomera.

3.2.6. ODREĐIVANJE POLA GAMETA I EMBRIONA (*Sexing*)

U intenzivnoj animalnoj proizvodnji, kao i u naučnim istraživanjima, sve se više javlja potreba određivanja (determinacije) pola spermatozoida i ranih embriona. Tako je, na primer, poznato da muška grla, u tovu, imaju znatno bolju konverziju hrane i bolji dnevni prirast od ženskih. S tim u vezi, znatno veći broj muških potomaka bi se mogao obezbediti, ako se plotkinje osemenjavaju inseminacionim dozama, koje sadrže samo Y-spermatozoide, izdvojene iz ejakulata primenom metoda razdvajanja Y od X-spermatozoida (tzv. metoda *sexing-a*). Isto se može postići i u tehnologiji transplantacije embriona, kada se postojećim metodama izvrši određivanje pola ranih embriona. Na taj način je moguće značajno povećati proizvodnju mesa. Sa druge strane, za proizvodnju genetski superiornih jedinki, potrebno je obezbediti veoma značajno veći broj genetski superiornih ženki, u odnosu na mužjake. U tom slučaju, osemenjavanje se majki treba izvršiti dozama u kojima se nalaze samo "ženski", X-spermatozoidi, ili transplantaciju treba izvesti samo embrionima za koje je ustanovljeno da su ženskog pola.

Postoji nekoliko savremenih metoda, manje ili više preciznih i/ili jednostavnih za praktičnu upotrebu, za određivanje pola spermatozoida i ranih embriona.

ODREĐIVANJA POLA SPERMATOZOIDA

Kao što je poznato, pol jedinke, kod sisara, određuje mužjak, jer proizvodi dve vrste polnih hromozoma u svom genomu. Spermatozoidi sa Y-hromozom određuju formiranje jedinke muškog pola, a spermatozoidi sa X-hromozomom, određuju formiranje jedinke ženskog pola. Odnos broja Y- i X-hromozoma u ejakulatu je oko 50% : 50%. Ženska polna ćelija (oocit) uvek sadrži samo X-hromozom.



Slika 128. X - i Y - hromozom (A), Lanac DNK (B) i njegova građa (C).

Do sada je razvijeno nekoliko metoda za razdvajanje X- i Y-spermatozoida, ali ni jedna od njih nije potpuno (100%) precizna.

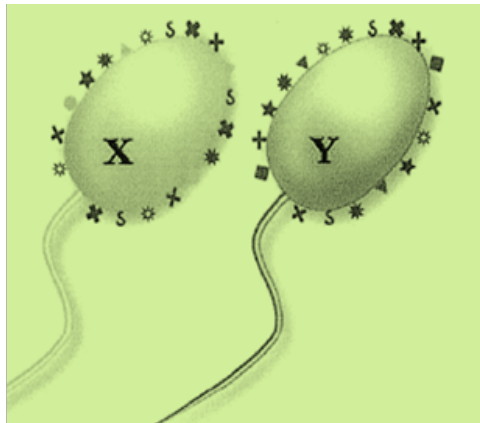
U poslednje vreme se koriste dosta precizne metode razdvajanja muških i ženskih spermatozoida: (a) metoda protočne citometrije i (b) metoda detekcije muškog specifičnog antigena.

Protočna citometrija se zasniva na merenju razlike ukupnog sadržaja DNK (dezoksiribonukleinske kiseline) u genomu Y- i X-spermatozoida. Ovo merenje se vrši posebnim aparatom, koji meri intenzitet fluorescentne emisije spermatozoida, koji su, prethodno, obojeni DNK-specifičnom bojom (fluorochrome, Hoechst 33342). Tehnika se

sastoji u tome da se, ovako obojeni spermatozoidi, pojedinačno propuštaju kroz mikrokolonu aparata, u kojoj laserski zrak određuje količinu obojene DNK u svakom spermatozoidu. Y-spermatozoidi imaju manje ukupne DNK (Y-hromozom je manji od X-hromozoma). Na taj način se Y-spermatozoidi, posle prolaska kroz kolonu sa laserskim zrakom, odvajaju u jedan, a X-hromozomi u drugi sud. Tako se ispitivana količina sperme razdvaja na frakciju sa Y-spermatozoidima i X-spermatozoidima. Ova metoda ima stepen preciznosti od 85% do 95%. Tačnost određivanja pola spermatozoida zavisi od razlike u količini DNK u X- i Y-hromozomu. Što je ona veća, veća je i tačnost određivanja pola. Na primer, X-hromozomi svinje imaju 3.6% više DNK od Y-hromozoma, dok X-hromozomi goveda imaju 3.8% više DNK od Y-hromozoma.

Detekcije muškog specifičnog antigena. Prisustvo maškog specifičnog antigena (H-Y antigen) u Y-spermatozoidima je ustanovljeno još polovinom 20. veka. Metoda razdvajanja Y- od X-spermatozoida se zasniva na upotrebi monoklonalnih H-Y antitela. Na taj način se određuje pozitivna ili negativna antigen-antitelo reakcija spermatozoida.

Spermatozoidi, koji daju pozitivnu reakciju su Y-spermatozoidi (muški), jer imaju H-Y antigen, a oni sa negativnom reakcijom su X-spermatozoidi (ženski), jer nemaju H-Y antigen. Ova metoda je neinvazivna, jer ne izaziva oštećenja spermatozoida.

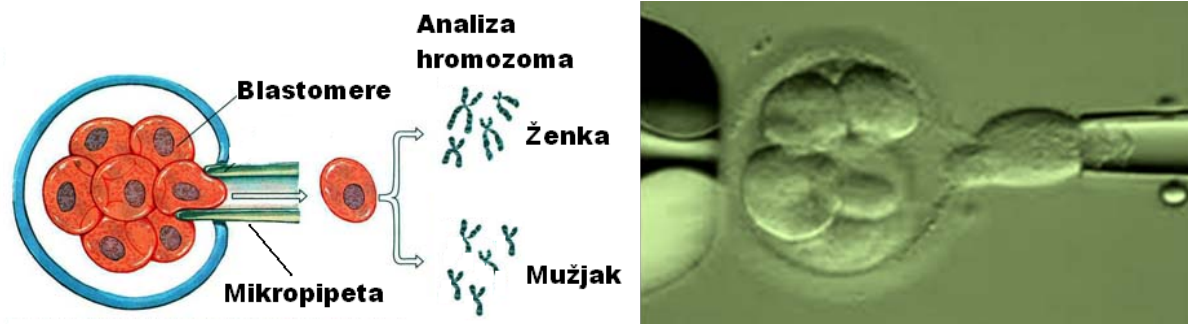


Slika 129. Imunološka metoda određivanja pola spermatozoida

ODREĐIVANJA POLA RANIH EMBRIONA

Određivanju pola ranih embriona se poklanja sve veća pažnja, zbog primene u tehnologiji embriotransplantacije i dugotrajnog čuvanja embriona *in vitro*.

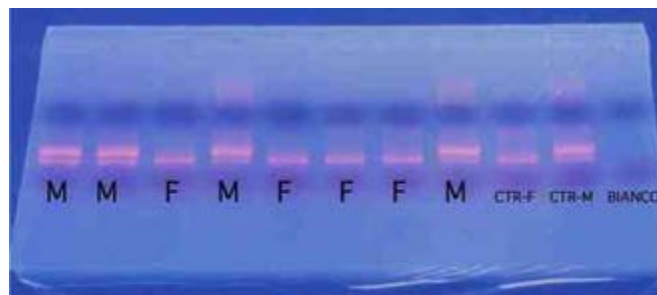
Citološka metoda određivanja pola embriona je dosta praktična, a vrši se tako što se, iz morule ili blastocista, uzme jedna ili više blastomera i u njima se, citološki, ustanovi da li poseduju Y-hromozom. Osnovni nedostatak ove metode je potreban veći broj blastomera iz morule ili blastocista, a takvom manipulacijom se vrši fizičko oštećenje ćelija. Time se smanjuje broj embriona sposobnih za dalji razvoj, posle njihove transplantacije.



Slika 130. Citološka metoda određivanja pola ranog embriona

Imunološka detekcija antigena specifičnih za muške ćelije je mnogo efikasnija metoda, koja se zaniva na detekciji H-Y antigena. Ovaj antigen se nalazi na površini blastomera embriona muškog pola, a nema ga kod blastomera ženskog pola. Ova metoda daje preko 80% tačnosti determinacije pola embriona i nema značajnijeg uticaja na sposobnost daljeg razvoja embriona, kod kojih je izvršena determinacija.

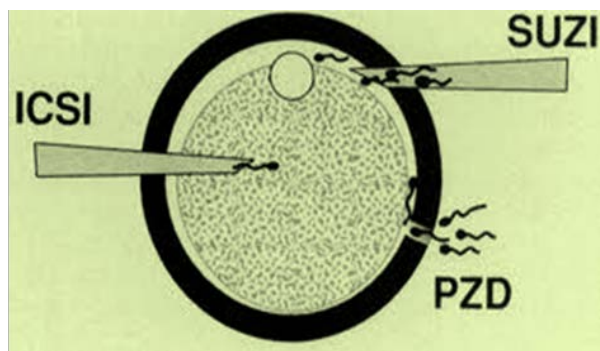
Elektroforeza embrionalne DNK, na agarosa gelu je, takođe, moguća metoda određivanja pola embriona. Ako se na elektroforezi dobju dve vidljive fluorescentne grupe, radi se o embrionu muškog pola. Kada je vidljiva samo jedna fluorescentna grupa, radi se o embrionu ženskog pola.



Slika 131. Elektroforeza embrionalne DNK na agarosa gelu

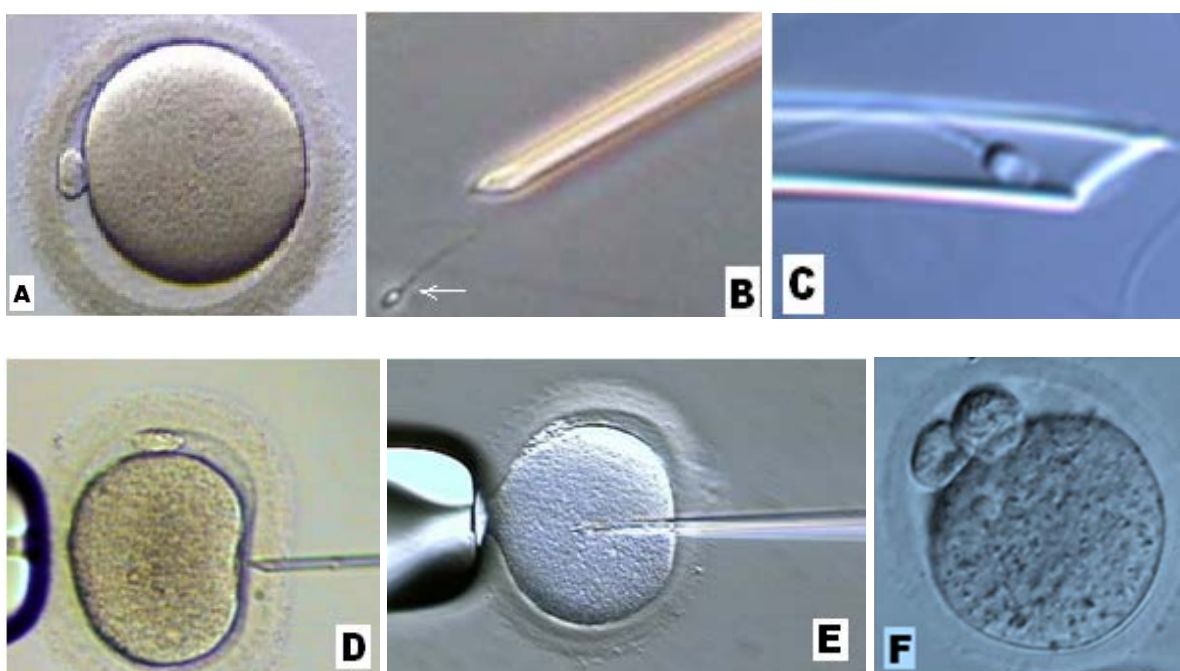
Radi se o embrionu muškog pola, jer su vidljive dve fluorescentne grupe.

Subzonalna mikroinjekcija spermatozoida. Pol budućeg embriona se može unapred definisati, tako što se izvrši mikroinjekcija samo jednog spermatozoida (poznatog pola, X ili Y) u perivitelusni prostor zrelog oocita (tzv. subzonalna, ispod zone pelucide oocita, mikroinjekcija). Tehnika mikroinjekcije spermatozoida može biti značajna i kod in vitro fertilizacije (IVF), radi izbegavanja polispermije penetracije oocita, naročito kod svinja. Neka istraživanja pokazuju da oko 94% oocita uspešno preživi mikroinjekciju, dok ih, svega, oko 12 do 13% bude uspešno oplodeno i nastavi embrionalni razvoj.



Slika 132. Moguća mesta mikroiinjkcije spermatozoida u oocit

SUZI – Subzonalna injekcija (mikroiinjkcija spermatozoida ispod zone pelucide, u perivitelusni prostor oocita); ICSI – Intracitoplazmatična mikroiinjkcija spermatozoida; PZD – Prirodan način penetracije spermatozoida kroz zonu pelucidu.



Slika 133. Faze mikroiinjkcije spermatozoida u oocit

A - Pripremljen zreo (MfII) oocit za mikroiinjkciju spermatozoida (sptz); B - Uvlačenje jednog sptz u mikroiinjkcionu pipetu (tanja od dlake ljudske kose); C - Sptz u mikroiinjkcionoj pipeti; D - Subzonalna mikroiinjkcija jednog sptz u perivitelusni prostor oocita; E - Intracitoplazmatična mikroiinjkcija jednog sptz; F - Oplođen oocit (vide se dva polarna telašca u perivitelusnom prostoru).

3.2.7. ČUVANJE GAMETA I EMBRIONA *IN VITRO*

Intenzivna animalna proizvodnja, sve više, zahteva dugotrajnije čuvanje gameta i embriona *in vitro*. Na taj način se formiraju zalihe genetski visoko vrednih genoma (tzv. banke gena, genetski resursi), koji se mogu koristiti u daljem genetskom unapređenju domaćih životinja. Sa druge strane, stvaranjem banke gena, moguće je očuvati i proširiti

biodiverzitet, kao osnovni preduslov preživljavanja pojedinih vrsta, rasa i linija domaćih životinja.

Uspešno dugotrajno čuvanje gameta, embriona ili reproduktivnih tkiva (na primer tkivo jajnika), zahteva njihovu specifičnu obradu u različitim medijumima i na određenoj temperaturi. Cilj je da se zadrži njihov funkcionalni i razvojni kapacitet, tokom perioda in vitro čuvanja, sve do momenta upotrebe. Metode koje se koriste za obradu, primarno zavise od vrste ćelija ili tkiva koja se pripremaju za čuvanje, kao i od trajanja i uslova čuvanja. Tako se kratkotrajno čuvanje (nekoliko dana) može obavljati u pogodnim tečnim medijumima, a dugotrajno čuvanje (više meseci ili godina) dubokim zamrzavanjem, tz. krioprezervacijom.

Čuvanje spermatozoida in vitro. Sve šira primena VO u intenzivnoj animalnoj proizvodnji, zahteva efikasno čuvanje spermatozoida, tokom dužeg ili kraćeg perioda in vitro. Kratkotrajno čuvanje spermatozoida (nekoliko dana) se obavlja tako što se nativna sperma razredi, pogodnim razređivačem, i čuva u tečnom stanju na temeperaturi od 15 do 18⁰C. Posle kratkotrajnog čuvanja, spermatozoidi zadržavaju visok stepen progresivne pokretljivosti, odnosno fertilizacionog kapaciteta. Zbog toga su i parametri fertiliteta plotkinja, osemenjenih kratkotrajno čuvanom spermom, vrlo visoki.

Dugotrajno čuvanje spermatozoida zahteva maksimalno snižavanje njihove metaboličke aktivnosti, što se postiže njihovim rashlađivanjem na temperature ispod 0⁰C. Međutim, veoma niske temperature oštećuju ćelijsku membranu spermatozoida. Zbog toga je uspešno duboko zamrzavanje spermatozoida započelo tek oko 1946. godine, kada su C. Polge i saradnici, u Keimbridžu, počeli sa dodavanjem krioprotektivnih materija (glicerol) u razređivače za spermu. Prvo uspešno duboko zamrzavanje sperme bika su izveli *Polge i Rowson (1952)*, upotrebom glicerola, kao krioprotektanta. Proceduru pripreme, zamrzavanja i odmrzavanja sperme pastuva su razradili *Cochran i sar. (1984)*.

Duboko zamrzavanje sperme bika. Danas se duboko zmrznuta sperma bika čuva u minutubama, zapremine 0,25 ml, u tečnom azotu, na temperaturi - 196⁰C. Otapanje duboko zmrznutih doza sperme se vrši brzo, na temeraturi oko 35⁰C. Posle otapanja, oko 50 do 60% spermatozoida zadržava progresivnu pokretljivost.

Postupak dubokog zamrzavanja sperme bika:

1. Kontrola kvaliteta nativnog ejakulata, neposredno posle uzimanja.
2. Razređivanje ejakulata.
3. Ekvilibracija razređene sperme, na +5⁰C, tokom 1 do 2h.
4. Dodavanje krioprotektanta (obično glicerol), u koncentraciji 7 do 8%, na +5⁰C.
5. Formiranje inseminacionih doza (minitube).
6. Zamrzavanje doza sperme, tokom 10 minuta, sa +5⁰C na - 100⁰C.
7. Utapanje doza u tečni azot. Temperatura čuvanja je - 196⁰C.

Duboko zamrzavanje sperme pastuva. Kod dubokog zamrzavanja sperme pastuva se javlja problem smanjenog procenta progresivne pokretljivosti spermatozoida, posle otapanja i velikog variranja ovog parametra između pojedinih pastuva. Uspeh veštački osemenjenih kobila spermom čuvanom dubokim zamrzavanjem, iznosi 56% ždrebnosti, u poređenju sa oko 65% ždrebnosti, koja se postiže osemenjavanjem tečnom razređenom spermom (*Cristianelli i sa. 1984*).

Duboko zamrzavanje sperme ovna. Spermaozoidi ovna slabije podnose uslove dubokog zamrzavanja, jer ispod 50% spermatozoida zadržava progresivnu pokretljivost posle odmrzavanja (*Colas, 1979*). Ipak, u poslednje vreme, ima izveštaja o postizanju prihvatljivih vrednosti jagnjenja, posle osemenjavanja ovaca spermom čuvanom dubokim zamrzavanjem (*Gordon, 1997*).

Duboko zamrzavanje sperme nerasta. Još je *Polge (1956)* ustanovio da su spermatozoidi nerasta vrlo osetljivi na delovanje glicerola i/ili na rashlađivanje ispod $+15^{\circ}\text{C}$. Tako manipulirani spermatozoidi, značajno redukuju stepen preživljavanja. Zbog toga je broj (%) uspešno osemenjenih krmača, spermom čuванom dubokim zamrzavanjem, znatno manji od onog koji se postiže osemenjavanjem sa tečnom razređenom spermom i kreće se oko 50 do 60%.

Pri tome je i veličina rezultirajućeg legla nešto niža, oko 8 do 9 prasadi. Iako precizni razlozi smanjenog fertiliteta krmača osemenjenih duboko zmrznutom spermom, još nisu ustanovljeni, smatra se da to može biti posledica: (a) znatno redokuvanog stepena preživljavanja i progresivne pokretljivosti duboko zamrzvanih spermatozoida, (b) povećane senzitivnosti sperme nekih nerastova na krioprezervaciju i (c) neadekvatnog manipulisanja sa spermom prilikom njenog otapanja i inseminacije. Možda će razumevanje molekularne prirode oštećenja ćelijske membrane spermatozoida nerasta, pomoći u formulisanju efikasnijih krioprotektanata. Neka istraživanja pokazuju da čuvanje sperme nerasta, na sobnoj temperaturi, tokom 16h, pre početka procedure dubokog zamrzavanja, povećava otpornost spermatozoida na negativan uticaj dubokog zamrzavanja.

Postupak zamrzavanja sperme nerasta (Beltsville - metod, *Pursel i Johnson, 1978*):

1. Kontrola kvaliteta nativnog ejakulata, neposredno posle uzimanja.
2. Ekvilibracija na $+20^{\circ}\text{C}$, tokom 2h.
3. Odvajanje semene plazme centrifugiranjem.
4. Razređivanje sperme BTS_5 - razređivačem.
5. Rashlađivanje na $+5^{\circ}\text{C}$.
6. Dodavanje razređivača sa glicerolom.
7. Formiranje inseminacionih doza.
8. Rashlađivanje doza na suvom ledu.
9. Utapanje doza u tečni azot ($t -196^{\circ}\text{C}$).

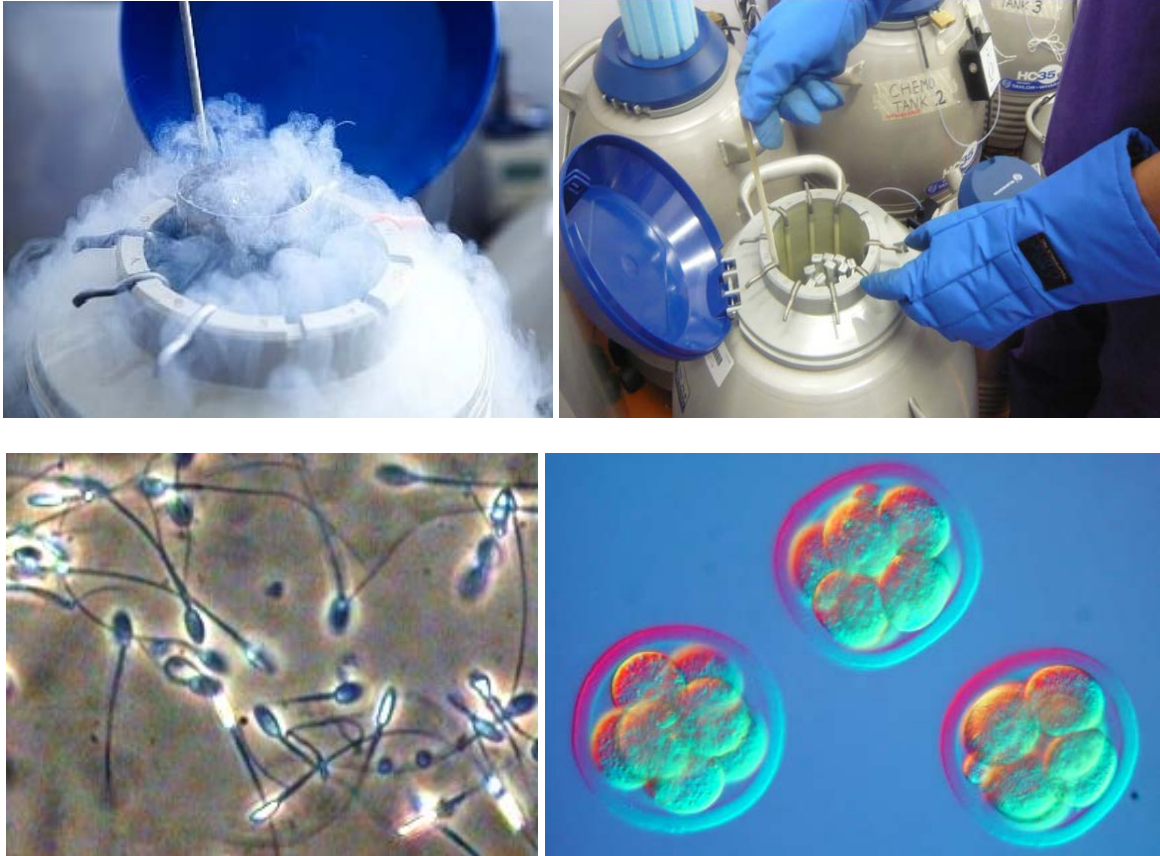
Čuvanje oocita *in vitro*. Dugotrajno čuvanje oocita sisara, primenom dubokog zamrzavanja, može imati primenu u održavanju biodiverziteta, kao i u čuvanju genoma sa poželjnim genetskim svojstvima. Međutim, do sada nije postignut zadovoljavajući uspeh krioprezervacije oocita, jer je stepen fertilizacione sposobnosti, posle odmrzavanja, dosta nizak.

Stepen preživljavanja duboko zmrznutih oocita, voma zavisi od stadijuma zrelosti njihovog nukleusa, u momentu pre zamrzavanja. Najbolje rezultate preživljavanja postižu oociti koji su zmrznuti u stadijumu germinativnog vezikula, a najslabije oociti zmrznuti u metafazi druge mejoze (MfII), tzv. zreli oociti. Ustanovljeno je, naime, da su mikrotubuli deobnog vretena, u metafazi, jako osetljivi na duboko zamrzavanje. Oni se kidaju, pa dolazi do disperzije hromozoma. Takvi oociti, naravno, nisu sposobni za uspešnu oplodnju posle odmrzavanja.

Čuvanje embriona *in vitro*. Prvi pokušaj čuvanja embriona *in vitro*, na subfiziološkim temperaturama, opisao je *Chang (1947)*. On je uspeo da održi embrione kunića na $+10^{\circ}\text{C}$, tokom 144h. Prve žive embrione miša, posle dubokog zamrzavanja i otapanja, dobio je *Whittingham (1971)*. Dve godine kasnije, *Wilmot i Rowson (1973)* su dobili prvu telad, posle hiruruške transplantacije embriona, čuванih dubokim zamrzavanjem. Od tada se postižu sve bolji rezultati dubokog zamrzavanja embriona mnogih vrsta životinja. Postupak dubokog zamrzavanja embriona životinja zahteva upotrebu skupe i sofisticirane opreme, kao i vrlo precizno kontrolisanih uslova zamrzavanja i otapanja. Danas su razvijena dva metoda dubokog zmrzavanja embriona: (a) postepeno zamrzavanje i (b) brzo zamrzavanje.

Metoda postepenog zamrzavanja obuhvata: (1) ekvilibraciju embriona u medijumu za zamrzavanje, koji sadrži krioprotektante, (2) rashlađivanje na -7°C , tokom 10 do 15 minuta, (c) rashlađivanje embriona na -30 do -80°C , pri čemu se temperatura snižava za po 1°C , svakog minuta, (3) naglo zamrzavanje na temperaturu čuvanja (-196°C), u tečnom azotu.

Metoda brzog zamrzavanja. Embrioni se prvo tretiraju sa 1,5 do 2,0 M Me_2SO , a zatim se drže na -20°C , tokom 10 do 15 minuta. Posle toga se, ili odmah stave u tečni azot, ili se prvo drže na -100°C , tokom 10 minuta, i potom stave u tečni azot. Otapanje embriona mora biti brzo i na temperaturi između 30 i 40°C .



Slika 134. Čuvanje spermatozoida i embriona dubokim zamrzavanjem

3.2.8. FORMIRANJE BANKE GENA I BIODIVERZITET

Biodiverzitet (biološki diverzitet, biološka raznovrsnost) je kompleksan pojam, koji pokriva mnoge aspekte biološkog variranja. Najčešće se reč biodiverzitet koristi da opiše sve vrste organizama koje žive u određenoj oblasti. Gledano sa nivoa planete, biodiverzitet se može deinisati kao „život na zemlji“, odnosno kao raznovrsnost života na zemlji na svim njegovim nivoima, od gena do ekosistema, i kao ekološki i evolutivni procesi koji ga stvaraju (diverzitet vrsta). Biodiverzitet se samoodržava u prirodi i da nije delovanja čoveka, stanje biodiverziteta bi ostalo u stanju izbalansiranosti i bilo bi značajno bolje.

Čovek je svojim delovanjem narušio sve prirodne izvore, životno važne za čoveka: vodu, vazduh i zemljište. Različite vrste kontaminenata su štetno delovale i ugrozile biodiverzitet. Radi sprečavanja dalje erozije biodiverziteta, potrebno je smanjiti sve štetne uticaje na njega.

Problem nije sadržan samo u nestanku divljih vrsta, već i u smanjenju broja rasa i varijeteta domaćih životinja kao posledice intenzivnog procesa selekcije na uzak broj proizvodnih osobina. U tom kontekstu, biodiverzitetni program i održavanje programa, održavanje i korišćenje genetičkih resursa iziskuju po stepenu rizika da obezbede njihovu zaštitu. Nove i objektivne procene genetičkog diverziteta donele su metode molekularne

genetike u oblasti programa sekveniranja DNK za mapiranje i genetske markere tipa mikrosatelita. Cilj je da se definišu genetske vrste, stanovništvo i jedinke na osnovu genetičke informacije koje se nalaze u DNK.

Žive životinje mogu biti prihvatljive za čuvanje u nekim situacijama. Krioprezervacija sperme, ovarijuma ili embriona je moguća kod mnogih vrsta, a i tehnologija kulture tkiva može biti prihvatljiva. U skladu sa navedenim karakteristikama programa biodiverziteta u održavanju i korišćenju genetičkih resursa nameću se sledeće mogućnosti (Groeneveld, 2005.):

1. odgoj i uzgoj živih životinja u malim populacijama;
2. spermatozoida i jajnih ćelija;
3. krioprezervacija embriona;
4. kombinacija prve tri opcije
5. formiranje takozvanog „gene pool“-a;

Iz terminološkog i metodološkog stanovišta, prva i peta alternativa predstavljaju zaštitu *in situ*, a druga i treća alternativa *ex situ* koristeći krioprotektivne metode:

– *in situ* konzervacija, koja podrazumeva konzervaciju, odnosno gajenje živih životinja, u proizvodnim sistemima gde su nastale ili se nalaze, a koja podjednako uključuje intenzivne i ekstenzivne proizvodne sisteme;

– *ex situ* konzervacija, koja podrazumeva konzervaciju izvan proizvodnih sistema, uglavnom u bankama gena, primenom laboratorijskih metoda. Uključuje *in vivo* i *in vitro* metod konzervacije, kao i konzervaciju u zoološkim vrtovima ili drugim institucijama. Krioprezervacija podrazumeva, skladištenje živih ćelija, semena, jajnih ćelija i embriona na veoma niskim temperaturama, obično na -196°C u tečnom azotu. Ovaj metod obezbeđuje bezbedno, dugoročno čuvanje germplazme, uz nepromenjenu genetičku strukturu. On je za pojedine vrste životinja veoma podoban i eikasan, mada postoje vrste životinja, kod kojih ovaj metod nije do kraja razvijen ili je neodgovarajući.



Slika 135. Čuvanje uzoraka u tečnom azotu
(izvor: therapak.com)



Slika 136. Tube za prikupljanje uzoraka DNK
(izvor: biw.kuleuven.be)

Sprovedene studije o čuvanju matičnih ćelija u takozvanim krioprezervacionim tankovima pokazale su da bez ikakvog oštećenja ćelije mogu da ostanu u tečnom azotu i do 37 godina (što ne znači da im je to gornja granica). DNK kolekcije, predstavljaju noviji način čuvanja genetičkih resursa. S obzirom na to, da je metoda čuvanja DNK materijala relativno nova, potrebno ju je usavršavati, a i posedovati obučeni kadar.

Izbor životinja za konzervaciju i genetički resursi

Kriterijum za odabir pojedinih životinja za potrebe očuvanja genetičkih resursa obično se vrši prema fenotipskim karakteristikama. Fenotipske razlike postoje između različitih vrsta životinja i u okviru rasa jedne vrste životinja.

Međutim, mogu postojati ograničenja u genetičkim varijacijama, u okviru bilo koje vrste. Pripitomljavanje životinja je dovelo do razvoja određenih rasa, u procesu povećanja razlika unutar vrsta. Životinje su se često kretale u velikim grupama, što je dovelo do indirektno selekcije na otpornost na bolesti i prilagođenost staništu.

Čuvale su se u različitom okruženju, što je rezultiralo u izboru različitih karakteristika na različitim lokacijama. Izbor životinja se vršio i prema nameni, na primer, goveda za meso i mleko, živine za jaja i meso, ovce za meso, vunu i mleko. Vrednosti koje definišu najvažnije osobine životinjskih genetičkih resursa, koje ih opredeljuju za konzervaciju, definisao je *Mendelsohn (1999)*, a to su povećanje potražnje za proizvodima poreklom od životinja, povećanje produktivnosti životinja sa gazdinstva, inputi za stvaranje novih rasa u budućnosti, kao i estetska vrednost. *Gandini (1999)*, navodi citirajući *Ruane (1999)*, da postoje različiti kriterijumi za odabir rasa za konzervaciju. Kao kriterijum se može uzeti stepen ugroženosti životinja, adaptacija na specifične uslove životne sredine, jedinstvene osobine koje su specifične za rasu, kulturne i istorijske vrednosti rase, genetička vrednost rase itd. Životinjska populacija mora biti okarakterisana fenotipski i genotipski, uz pomoć novih tehnologija, na

odgovarajući način Mapiranje gena, testiranje polimorizma jednog nukleotida (SNP), može pomoći da se prati i da se utvrdi poreklo životinje i genetička udaljenost jedinke iz određene grupe. Fenotipska evaluacija, mora biti standardizovana i sprovedena u okruženju u kojem životinje žive.

Povećanjem javne svesti, na nacionalnom nivou, kao i svih zainteresovanih subjekata o potencijalnom gubitku genetičkog diverziteta domaćih životinja, rezultiraće mnogobrojnim inicijativama, u cilju zaštite, konzervacije, upravljanja i održivog korišćenja ovih resursa. Lokalne rase, predstavljaju garanciju za opstanak malih poljoprivrednih gazdinstava u marginalnim područjima, u kojima sistemi sa visokim nivoom ulaganja nisu primenljivi, a ove rase se mogu koristiti u proizvodnji lokalnih proizvoda, sa ekološkom slikom.

Očuvanje i konzervacija životinjskih genetičkih rasursa u Republici Srbiji

Stočarstvo Republike Srbije u strukturi poljoprivredne proizvodnje učestvuje sa blizu 30 %, dok preostali deo pripada biljnoj proizvodnji, koja između ostalog predstavlja i osnov za razvoj stočarstva. U strukturi stočarstva u Srbiji najviše je zastupljeno govedarstvo, zatim svinjarstvo, živinarstvo, ovčarstvo i pčelarstvo. Sa stanovišta očuvanja životinjskih genetičkih resursa, značaj domaćih životinja potiče upravo od njihove sposobnosti, da pretvaraju kabasta hraniva sa oranica, livada i pašnjaka i nuz proizvode ratarske proizvodnje i prerade prehrambenih proizvoda, u visoko kvalitetnu hranu za ljude i od njihove uloge kao lokalno raspoloživog izvora hrane, vune, krzna, kože, vučne snage i drugih stočnih proizvoda (đubrivo, gorivo itd.). Organizovan rad na očuvanju životinjskih genetičkih resursa u Srbiji, započeo je krajem 1994. godine, identifikovanjem i inventarisanjem postojećih rasa i sojeva gajenih životinja. U tom periodu ukupno je identifikovano i opisano 35 rasa stoke, a podaci o njima su prosleđeni u FAO, u Rim, u centralnu bazu podataka. U isto vreme, započelo se sa konzervacijom autohtonih rasa i sojeva (*Gajić i sar., 1997*). Predviđeno je, da se za svaku rasu, koja je obuhvaćena programom konzervacije, oforme po tri zapata, što je u skladu sa programom FAO. Najznačajnije vrste domaćih životinja su goveče, bivo, konj, magarac, svinja, ovca, koza, kokoš, patka, guska i ćurka, sa velikim brojem rasa.

Analiza vrsta i rasa domaćih životinja, koje se sreću u Republici Srbiji, kada je u pitanju veličina populacije, pokazuje, da su mnoge ugrožene i da mogu nestati (podolsko goveče, buša, domaći bivo, domaći-brdski konj, nonius, balkanski magarac, mangulica, moravka, resavka, pirotska pramenka, bardoka, krivovirska ovca, karakačanska ovca, lipska ovca, vlaško-vitoroga ovca, čokanska cigaja, balkanska koza, svrljiška kokoš, banatski gološijan, somborska kaporka) (*Stojanović, 2003*).



Slika 137. Mangulica



Slika 138. Podolsko goveče



Slika 139. Cigaja



Slika 140. Nonius



Slika 141. Domaći magarac



Slika 142. Banatski gološijan

PROVERA ZNANJA

1. Nabrojte načine dobijanja oocita.
2. Šta su prednosti i mane pojedinih načina dobijanja oocita?
3. Opišite osnovne postupke maturacije i fertilizacije oocita *in vitro*.
4. Navedite osnovne probleme u tehnologiji *in vitro* maturacije i fertilizacije oocita.
5. Opišite osnovne postupke dugotrajnog čuvanja oocita, spermatozoida i ranih embriona.
6. Navedi osnovne materije koje čine medijum za kapacitaciju spermatozoida *in vitro*?
7. Navedite osnovne probleme u tehnologiji dugotrajnog čuvanja gameta i embriona.
8. Nabrojte metode određivanja pola (tzv. sexing) gameta i embriona.
9. Koja metoda određivanja pola daje najpreciznije rezultate?
10. Navedite neke osnovne zootehničke i veterinarsko-medicinske razloge za primenu određivanja pola gameta i embriona u intenzivnoj stočarskoj proizvodnji.
11. Definišite pojam himere.
12. Koji je značaj formiranja himera kod domaćih životinja?
13. Definišite pojam transgeneze.
14. Koje metode kreiranja transgenih organizama poznajete?
15. Koji je praktičan značaj transgeneze u intenzivnoj stočarskoj proizvodnji?
16. Koji se problemi javljaju u sadašnjoj tehnologiji transgeneze i njenoj primeni u stočarstvu?
17. Šta predstavlja biodiverzitet?
18. Šta su banke gena?
19. Na koji način možemo čuvati i skladištiti genetske resurse?
20. Navedi autohtone rase domaćih životinja u programu očuvanja genetskih resursa Srbije.

4. ODABRANA LITERATURA

1. Benoff S, Hurley I, Cooper GW, Mandel FS, Rosenfeld DL, Hershlag A.: **Head-specific mannose-ligand receptor expression in human spermatozoa is dependent on capacitation-associated membrane cholesterol loss.** *Human Reproduction.*, 8(12), 2141-54., Dec. 1993.
2. Besenfelder U., Muler M., Brem G.: **Transgenics and modern reproductive technologies.** In: *Rothschild M.F., Ruvinsky A.: The genetic of the pig.* CAB Int., 345-374, 1998.
3. Betteridge, J.K.: **A history of farm animal embryo transfer and some associated techniques.** *Animal Reproduction Sciences, Elsevier, 2003.*
4. Boboš, S., Vidić, B.: **Mlečna žlezda preživara – morfologija, patologija, terapija.** *Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet, Naučni institut Novi Sad, 2005*
5. Boubelik M.: **Genetické manipulace na úrovni organizmu.** In: *Molekulárna biologie a genetika VI, Praha, s. 47-61, 1993.*
6. Bradford, E.G., Spearow, L.J., Hanrahan, P.J.: **Genetic Variation and Improvement in Reproduction.** In: *Reproduction in Domestic Animals (P.T. Cupps, ed.). Acad. Press, Inc. San Diego, Pp.605-636, 1991.*
7. Brem G., Brenig B., Goodman H.M., Selden R.C., Graf F., Kruff B., Springmann K., Hondele J., Meyer J., Winnacher E.L., Krausslich H.: **Production of transgenic mice, rabbits and pigs by microinjection into pronuclei.** *Zuchthygiene, 20, 251-252, 1985.*
8. Bulla J.: **Produkcia transgénnych jedincov mikroinjekciou DNA do prvojadra zygot.** *Záver. spr. rezortného výskumného grantu 1991-1993. Nitra: VÚŽV, 1993.*
9. Chrenek, P., Makarevich A., Vašíček D., Bauerova M., Rafay J., Bulla J.: **Influence of microinjection on developmental potential of rabbit embryos in vitro.** *Biotechnologija u stočarstvu, 407-410, 1997 a.*
10. Chrenek, P.: **Geneticke manipulacie s embryami.** *VUŽV, Nitra, 2002.*
11. Crighton, B.D.: **Immunological Aspects of Reproduction in Mammals.** *Butterworths, London, Boston, 1983.*
12. Dragin, S., Stančić, I., Erdeljan, M.: **Reprodukcija životinja (paktikum za studente stočarstva i veterinarske medicine).** *Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet, Novi Sad, 2011.*
13. Feldman, E., Nelson, R. (2003): **Canine and Feline Endocrinology and Reproduction.** *Saunders, Elsevier- Amsterdam.*
14. Gajić, Ž., J. Belić, M. Pušić, R. Radivojević, S. Bakić.: **Genetički resursi i stočarska proizvodnja u Jugoslaviji.** *Savrem. Poljopr., Novi Sad, 1-2, 47-57, 1997.*
15. Gandini, G.: **Economic valuation of farm animal genetic resources, Review of AnGR valuation work to date.** *Proc. FAO/ILRI Workshop., Rome, 1999.*
16. Gardner RL.: **The origin and efficient derivation of embryonic stem (ES) cells in the mouse.** *Pathol Biol (Paris), Nov.46(9), 676-677, 1998.*
17. Gordon J.W., Scangos G.A., Plotkin D.J., Barbosa J.A., Ruddle F.H.: **Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 7380-7384, 1980.*
18. Gordon, I.: **Controlled Reproduction in Farm Animals.** *CAB International, Oxon, UK, 1997.*
19. Groeneveld, E.: **A world wide emergency programme for the creation of national genebanks of endangered breeds in animal agriculture.** *Anim. Gen. Resources Inf., Rome, 36, 1-6. 2005.*

20. Hafez, E.S.E.: **Reproduction in Farm Animals (third edition)**. Lea & Febiger, Philadelphia, 1974.
21. Haresign, W.: **Sheep Production**. Butterworths, London, 1983.
22. Henderson, C. D.: **The Veterinary Book for Sheep Farmers**. Old Pond, Ipswich, UK, 2002.
23. Herman, A.H., Madden, W.F.: **The Artificial Insemination and Embryo Transfer of Dairy and Beef Cattle – A Handbook and Laboratory Manual**. The Interstate Printers and Publishers, Inc. Davis, Illinois, USA, 1987.
24. Houdebine L.M.: **Expression de proteines recombinantes dans le lait d'animaux transgeniques**. *Rev. Fr. Transfus. Hemobiol.*, 36, 49-72, 1993.
25. International Embryo Transfer Society, Newsletter December 2013, www.iets.org
26. James, M.G., Kjersten, D.: **Veterinary Guide to Horse Breeding**. Horse Book House (publ. Wiley Publishing Inc., Hoboken, New Jersey), 1998.
27. Karow, M.A. and Critser, K. J.: **Reproductive Tissue Banking: Scientific Principles**. Academic Press, USA, 1997.
28. König, E.H., Liebich, G-H.: **Veterinary Anatomy of Domestic Mammals (Textbook and Colour Atlas)**. Schattauer, Stuttgart, New York, 2004.
29. Kupriyanov S., Zeh K., Baribault H.: **Double pronuclei injection of DNA into zygotes increase yields of transgenic mouse lines**. *Transgenic Res.*, 7, 223-226, 1998.
30. McDonald, E.L.: **Veterinary Endocrinology and Reproduction (forth edition)**. Lea & Febiger, Philadelphia, London, 1989.
31. Mendelsohn, R. **Economic valuation of farm animal genetic resources, Framework for the economic valuation of AnGR**. *Proc. FAO/ILRI Workshop, Rome, (1999)*.
32. Miljković, V., Veselinović, S.: **Porodiljstvo, sterilitet i veštačko osemenjavanje domaćih životinja**. Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine, 2000.
33. Miljković, V.: **Veštačko osemenjavanje životinja**. Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine, 1996.
34. Miljković, V.: **Reprodukcija i veštačko osemenjavanje goveda**. Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine, 1990.
35. Noakes, E.D., Parkinson, J.T., England, W.C.G.: **Veterinary Reproduction and Obstetrics (eight edition)**. SOUNDERS, Edinburgh, London, New York, Oxford, Philadelphia, St. Louis, Sidney, Toronto, 2002.
36. Paters, R.A., Ball, H.J.P.: **Reproduction in Cattle**. Butterworths, London, 1987.
37. Petrujkić, T.: **Reprodukcija i veštačko osemenjavanje svinja**. Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine, 2000.
38. Petrujkić, T., Bojkovski, J., Petrujkić, B.: **Reprodukcija svinja**. Naučni institut za veterinarstvo Srbije, 2012.
39. Pivko, J., Grafenau, P., Sokol, J.: **Prenos raných embryi zvierat**. Výskumný ústav živočišnej výroby, Nitra, Slovakia, 2000.
40. Pivko, J.: **Morfogeneza oocytov a raných embryi niektorých živočíchov**. Ustav reprodukcie a embryologie zvierat, VUŽV, Nitra. Slovak Academic Press, Bratislava, 1995.
41. Pivko, J.: **Regulation and evaluation of ovarian function and embryogenesis in normal and transgenic animals in vitro and in vivo**. RIAP, Nitra, 2003.
42. Ruane, J. A. Sonnino.: **The role of biotechnology in exploring and protecting agricultural genetic resources**. Food Agr. Org., Rome, 2006.
43. Salisbury, W.G., VanDemark. L.N., Lodge, R.J.: **Physiology of Reproduction and Artificial Insemination of Cattle**. Freeman and Comp., San Francisco, 1978.
44. Soltner, D.: **Zootechne Generale. Tome 1.: La Reproduction des animaux d'élevage**. Angers, France, 1989.

45. Stančić, B.: **Fiziologija reprodukcije i veštačko osemenjavanje ovaca.** *Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet, 1987.*
46. Stančić, B., Šahinović, R.: **Biotehnologija u reprodukciji svinja.** *Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet, 1998.*
47. Stančić, B., Veselinović, S.: **Biotehnologija u reprodukciji domaćih životinja.** *Poljoprivredni fakultet, Novi Sad, 2002.*
48. Stančić, B., Veselinović, S.: **Reprodukcija domaćih životinja (drugo, dopunjeno izdanje).** *Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet, Novi Sad, 2002.*
49. Stančić, B., Kovčín, S., Gagrčín, M.: **Nazimica za priplod – Fiziologija i tehnologija proizvodnje.** *Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet, Novi Sad, 2003.*
50. Stančić, B.: **Reprodukcija svinja.** *Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet, Novi Sad, 2005.*
51. Stančić, B.: **Tehnologija veštačkog osemenjavanja svinja.** *Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet, Novi Sad, 2006.*
52. Stančić, B.: **Reprodukcija ovaca.** *Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet, Novi Sad, 2006.*
53. Stančić, B., Košarčić, D.: **Reprodukcija goveda.** *Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet, Novi Sad, 2007.*
54. Stančić, B.: **Reprodukcija domaćih životinja (treće, prerađeno i dopunjeno izdanje).** *Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet, Novi Sad, 2008.*
55. Stančić, I.: **Reprodukcija pasa i mačaka (udžbenik).** *Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet, Departman za veterinarsku medicinu, Novi Sad, 2012.*
56. Stančić, I., Dragin, S.: **Modern technology of artificial insemination in domestic animals (a review).** *Contemporary Agriculture, 60(1-2)204-214, 2011.*
57. Stojanović, S., Suzana Đorđević-Milošević. **Autochthonous breeds of domestic animals in Serbia and Montenegro.** *Fed. Secret. Environ. Prot., Belgrade, Serbia and Montenegro, 250., 2003.*
58. Vajta, G., Gjerris, M.: **Science and Technology of Farm Animals Clonig – Sate of the Art (Review article).** *Animal Reprod. Sci., 92:211-230, 2006.*
59. Veselinović, S., Miljković, V., Veselinović Snežana, Stančić, B.: **Fiziologija i patologija reprodukcije konja.** *Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet, Novi Sad, 2003.*
60. Wattiaux, A.M.: **Reproduction and Genetic Selection.** *University of Wisconsin, Madison, USA, 1996.*
61. Wolf, P.D., Bavister, D.B., Gerrity, M., Kopf, S.G.: **In vitro Fertilization and Embryo Transfer: A Manual of Basic Techniques.** *Plenum Press, New York & London, 1988.*

