Primjena biotehnologije u rasplođivanju kobila

Dukarić, Pamela

Undergraduate thesis / Završni rad

2014

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of agriculture / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Poljoprivredni fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:151:017341

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek - Repository of the Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek

zir.nsk.hr

Image not found or type unknown

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
POLJOPRIVREDNI FAKULTET U OSIJEKU

Pamela Dukarić
Sveučilišni preddiplomski studij
Smjer: Zootehnika

Primjena biotehnologije u rasplođivanju kobila

ZAVRŠNI RAD

Osijek, 2014.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
POLJOPRIVREDNI FAKULTET U OSIJEKU

Pamela Dukarić
Sveučilišni preddiplomski studij
Smjer: Zootehnika

Primjena biotehnologije u rasplođivanju kobila

ZAVRŠNI RAD

Povjerenstvo za obranu završnog rada:

1. prof. dr. sc. Boris Antunović, predsjednik
2. prof. dr. sc. Mirjana Baban, mentor
3. prof. dr. sc. Pero Mijić, član

Osijek, 2014.

SADRŽAJ

1. Uvod.....1

2. Građa ženskih spolnih organa.....2

3. Funkcija ženskih spolnih organa.....4

3.1. Spolna zrelost.....4

3.2. Spolni ciklus.....6

3.3. Sezonska obilježja spolnog ciklusa.....8

4. Indukcija i sinkronizacija estrusa.....9

5. Temeljne postavke umjetnog osjemenjivanja.....10

6. Organizacija umjetnog osjemenjivanja.....11

6.1. Korištenje umjetne vagine.....12

6.1.1. Pripremanje umjetne vagine.....13

6.1.2. Dobivanje ejakulata.....14

6.3. Razrjeđivanje ejakulata.....15

6.4. Pripremanje razrijeđivača.....16

6.5. Čuvanje i prijenos ejakulata.....17

6.5.1. Uvjeti čuvanja i prenošenja ejakulata.....17

6.6. Osjemenjivanje kobile.....18

6.6.1. Tehnike u postupku U.O…….....19

6.6.2. Postotak koncepcije.....20

6.6.3. Broj spermija u dozi i broj osjemenjivanja.....21

7. Zakonski okvir umjetnog osjemenjivanja u Republici Hrvatskoj.....22

8. Umjetno osjemenjivanje u Hrvatskoj.....23

9. Embriotransfer.....25

9.1. Prednosti embriotransfera.....25

9.2. Nedostaci embriotransfera.....26

10. Proizvodnja zametaka in vitro.....27

11. Kloniranje.....28

12. Seksiranje embrija i spermija.....29

13. Zaključak.....30

14. Literatura.....31

15. Sažetak.....33
16. Summary.....34
17. Popis slika.....35
TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA.....36

1. Uvod

Konjogojstvo je stočarska grana koja se bavi držanjem odnosno uzgojem konja. Tijekom povijesti imalo je različito značenje i doživjelo je veće promjene od drugih grana stočarstva. Tijekom prošlosti konji su bili upotrebljavani za prijevoz i teške fizičke poslove, te proizvodnju mesa i mlijeka. U današnje vrijeme se konji drže većinom zbog sporta i rekreacije. Upravo zbog konja, koji se koriste u različitim sportskim disciplinama i donose veliku zaradu svojim uzgajivačima, došlo je do velikih promjena u načinu rasplođivanja konja.

Zadnjih 50-tak godina razvijaju se različite biotehnologije. Biotehnologija rasplođivanja podrazumijeva zahvate kojima pod kontroliranim uvjetima vršimo rasplođivanje životinja i utječemo na genetsku selekciju širenjem poželjne genetike, kao na primjer visine grebena. Prva generacija biotehnologije bila je umjetno osjemenjivanje, druga je embriotransfer, treća proizvodnja zametaka in vitro, a četvrta manipulacija genomom uz pomoć transgeneze i kloniranja. U ovom radu je cilj prikazati najzastupljeniju biotehnologiju u Republici Hrvatskoj, odnosno umjetno osjemenjivanje.

2. Građa ženskih spolnih organa

Spolni organi kobile su:

- dva jajnika (ovarium),
- dva jajovoda (tuba uterina),
- dvorožna neseptirana maternica s maternično grlićem (uterus bicornis non subseptus; cervix uteri),
- ženski kopulacijski organ kojeg čini rodnica s rodničkim predvorjem (vagina; vestibulum vagiane),
- stidnica (vulva) s dražicom (clitoris)

Jajnici su primarni organi rasplođivanja i imaju dvojaku ulogu:

- rast, zrenje i oslobađanje zrelih jajnih stanica,
- endokrinu funkciju u izlučivanju ženskih spolnih hormona (Makek i sur., 2009.)

Ženski spolni organi su složenije građe jer mu je uloga složenija.

Jajnici predstavljaju spolne žlijezde u kojima se stvaraju spolne stanice – jajne stanice. Jajnici su smješteni u sublumbalnoj regiji abdomena, te leže za šaku kaudalno od bubrega te isto toliko lateralno od medijalne ravnine. Kod kobile u anestrusu jajnici su bubrežastog oblika, dužine 4-5 cm, širine 2,5-4 cm i teški 40-70 g. Jajnici u ciklusu mijenjaju svoj oblik i veličinu zbog prisustva cikličkih tvorbi, a dužina im je obično 6-8 cm, širina 3-4 cm. Kod kobile su jajnici većinom prekriveni peritoneumom (osim u ovulacijskoj jami). Ovulacijska jama je u anestrusu široka 0,5 cm, u estrusu 1-2 cm. Graafovi folikuli ovuliraju samo u ovulacijskoj jami (Makek i sur., 2009.).

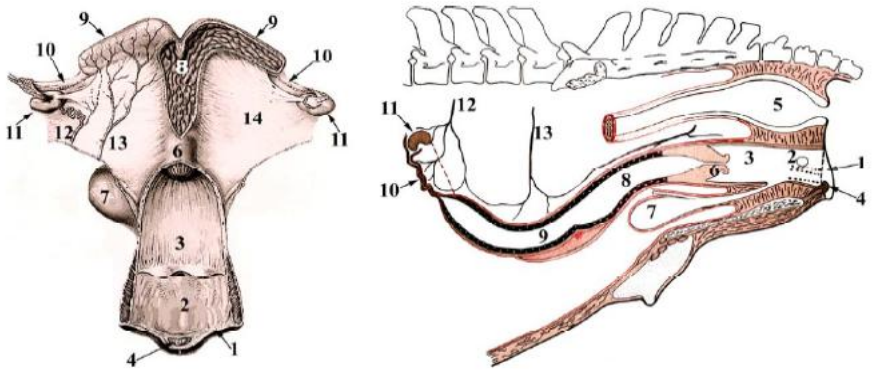
Jajovod kobile je tanka zavijena cjevčica. U jajovodima se osiguravaju optimalni uvjeti za oplodnju i rani razvoj zametka. Dužine je 25-30 cm. Slobodni kraj jajovoda je ljevkasto proširen, a u sredini mu je abdominalni otvor. Jajovod se sastoji od dva dijela: širi, koji je promjera 5-10 mm, on je bliži abdominalnom ulazu i uži, promjera 2-3 mm, koji je bliži rogu maternice. Ampula zauzima više od polovice dužine jajovoda, te se u njoj odvija oplodnja zrele jajne stanice. Kod kobile spoj ampule i isthmusa ima važnu ulogu jer služi kao „kontrolna točka“ koja samo oplođenim jajnim stanicama dopušta ulazak u isthmus te dalje u maternicu.

Maternica omogućava prijenos spermija na mjesto oplodnje, ranu embriogenezu te stvaranje feto-placentarnog spoja koji ima važnu ulogu u održavanju gravidnosti (Makek, 2009.). Maternica se sastoji od tijela, rogova i grlića. Tijelo maternice je široko, ravno i dugačko 13-15 cm. Prednji kraj tijela maternice se lagano spušta u trbušnu šupljinu. Iz tijela izlaze desno i lijevo dva roga. Dužina rogova je 20-30 cm, savinuti su, a njihova izbočena strana okrenuta je naniže i naprijed. Grlić maternice se nalazi iznad mokraćnog mjehura, dužine je 6-8 cm (Paršutin, 1949.).

Rodnica se kaudalno nastavlja na maternicu, a njen grkljan leži ventralno od rektuma, dorzalno od mokraćnog mjehura, uretre, stidne kosti i sjedne kosti. Ona kaudalno prelazi u rodničko predvorje, koje je uže. Od predvorja rodnicu dijeli djevičanska opna, koja je u omica dobro razvijena. Rodnica je s predvorjem duga 30-32 cm, a stijenka je debela 6-8 mm. Stijenka rodnice ima tri sloja: vanjski, srednji i unutarnji sloj.

Stidnica je vanjski spolni organ. Sastoji se od dvije debele stidne usne.

Dražicu čine dva kavernozna tijela. Slobodan kraj klitorisa strši te tvori glavić dražice koji je obavijen prepucijem. Na glaviću dražice nalazi se medijano oko 1 cm duboki *sinus clitoridis*, a postrane su dvije manje duboke udubine (Makek, 2009.).



Slika 1. Spolni organi kobile

Izvor:

http://www.vef.unizg.hr/org/porodnistvo/studenti/materijali/Anatomija_zenskih_spolnih_organa.pdf

3. Funkcija ženskih spolnih organa

3.1. Spolna zrelost

Spolna zrelost počinje kod hladnokrvnjaka otprilike u drugoj godini, a kod toplokrvnjaka u trećoj ili četvrtoj godini. Tjeranje je nagon za parenjem, a očituje se nemirom kobile, razdražljivošću, rzanjem, učestalim mokrenjem, a najčešći znak je otvaranje i zatvaranje stidnice. Iz rodnice dolazi do istjecanja sluzi, stidnica je otečena, prilikom čega je njezina sluznica crvenija.

Razmak između dva tjeranja traje oko tri tjedna, a tjeranje pet do sedam dana. Pripuštanje se treba provesti dva dana prije kraja tjeranja. Pripust bi se trebao obaviti pravovremeno kako bi došlo do uspješne oplodnje. Uspješan pripust je sedmi dan tjeranja, jer Graafovi folikuli pucaju te ovulacija najčešće počne sedmog dana tjeranja od prvih znakova tjeranja. Nakon toga je jajna stanica spremna za oplodnju 8-12 sati nakon ovulacije, a spermatozoidi u ženskom spolnom organu 36 sati. Tijekom jednog tjeranja kobile se pripuštaju tri puta, trećeg, petog i sedmog dana od početka tjeranja. Ukoliko kobila ne ostane bređa, spolni žar se ponovno javlja nakon 19 do 23 dana.

Redovitost seksualnog ciklusa i intenzitet tjeranja ovisi o više faktora, te mogu čak i izostati. Jedan od bitnijih utjecaja je način držanja. Nepovoljne su zagušljive i mračne staje. Nedostatak ugljikohidrata (bjelančevine, vitamini, minerali) u krmi također znatno utječe kao i preforsiranje u radu, treningu i utrkama (Brinzej, 1980.).

Prije pripusta potrebno je ustvrditi da li se kobila zaista tjera, jer postoje kobile koje su mirnog temperamenta te nemaju tipičnih znakova, što se zove tiho tjeranje.

Spolni žar utvrđujemo na pokušalištu. Kao pokušalište koristi se ograda od čvrstih dasaka koje su dobro zaobljene te 2,50 duge i 1,40 do 1,50m visoke. Treba i pripaziti da na daskama nema izbočenih čavala kako se životinja ne bi ozljedila. S druge strane pokušališta dovodimo pastuha te mjesto mora biti obloženo slojem slame ili sijena kako se pastuh ne bi ozlijedio. Zatim kobilu privedemo s jedne strane a pastuha s druge, glavama okrenuti jedno drugome. Nakon što se malo onjuše kobila se okrene bokom prema ogradi da ju pastuh onjuši. Ako je prilikom toga kobila mirna, to je siguran znak da se životinja tjera, inače se kobile žestoko ritaju i vrište. Kobile se inače same okrenu prema pastuhu, tj. okrenu stražnji dio, te zauzimaju položaj kao da će mokriti, rep se podiže, a stidnica se otvara i zatvara (Brinzej, 1980.).



Slika 2. Pokušalište

Izvor: http://i.ytimg.com/vi/O3LtX7AJ1DY/maxresdefault.jpg

3.2. Spolni ciklus

Spolni ciklus je vremensko razdoblje između dva estrusa. Temeljni čimbenici koji utječu na cikličku spolnu aktivnost kobila su utjecaj okoliša i hormonalna regulacija, te hranidba, prisustvo mužjaka (feromoni), pojava bolesti i genetika. Bitna značajka kod spolnog ciklusa kobila je vrlo dugi estrus koji je varijabilan i traje nekoliko dana što ovisi o sezoni u kojoj se javlja. Kod kobile u sezoni parenja, ukoliko ne postoje reproduktivne smetnje, interval između dvije sukcesivne ovulacije iznosi 21 - 22 dana, te postoji velika razina varijabilnosti. Primjećeno je da je trajanje ciklusa duže u proljetnoj sezoni. Ukoliko dolazi do pojave kraćeg ciklusa od 18 ili dužeg od 24 dana je posljedica funkcionalnih poremećaja. Kod ciklusa dužeg od 24 dana (prolongirani diestrus) uzrok je većinom izostanak regresije žutog tijela. Reprodukcijsko razdoblje kobile dijeli se na šest faza:

- proestrus
- estrus
- metaestrus
- diestrus
- anestrus
- tranzicija

Od tih šest faza dvije (anestrus, tranzicija) se javljaju u fazi spolne inaktivnosti dok ostale četiri faze se ponavljaju unutar spolnog ciklusa.

Anestrus je razdoblje inaktivnosti jajnika, a uglavnom se događa u vrijeme zime i proljeća, ponekad ljeti, a redovito kod kobila u laktaciji. Dužina anestrusa je individualna, a značajno ovisi o sustavu držanja konja. Tijekom anestrusa blokirana je sinteza gonadotropin rilising hormona (GnRH), što dovodi do blokiranja gonadotropne aktivnosti hipofize, odsutnosti FSH i LH hormona te potpunim mirovanjem jajnika (odsutnost žutog tijela). Mirovanje jajnika je rezultat niskog sadržaja progesterona i estrogena u krvi. Rektalnom palpacijom može se zamjetiti mala veličina i tvrdoća jajnika. Ultrazvučnom pretragom jajnika zamjećuje se odsutnost žutog tijela i veći broj malih folikula (manjih od 1,5 cm u promjeru). Stijenka uterusa je labava i tanka, cerviks je mek i nezamjetljiv (Ivanković, 2004).

Tranzicija je prijelazno razdoblje iz spolnog mirovanja (anestrusa) u fazu cikličke aktivnosti jajnika. Nešto prije ulaska kobile u tranzicijsku fazu povećava se sekrecija GnRH, što inducira povećanu gonadotropnu aktivnost hipofize (povećana koncentracija

FSH). Povećana koncentracija FSH stimulira razvoj Graafovih folikula koji se razvijaju ali ne ovuliraju, nego se događa njihova regresija. Odmicanjem tranzicijske faze (tijekom prelaska u fazu estrusa) dolazi do razvoja Graafovih folikula. Uterus je labav, bez tonusa, cerviks je mekan i neuočljiv pri palpiranju.

U fazi *proestrusa* (ranog estrusa) dolazi do regresije *corpus luteuma* i početka rasta novih folikula. Ukoliko ne dođe do oplodnje *corpus luteum* prelazi u *corpus luteum spurium* i potpuno nestaje s jajnika nakon 17 dana. Tijekom proestrusa dolazi do vanjskih promjena kao što je oticanje stidnice i pojava tragova sluzi iz cervikalnog kanala.

Estrus je faza u kojoj dolazi do razvoja Graafovih folikula, čijim se sazrijevanjem i prskanjem u narednoj fazi oslobađaju jajne stanice (ovulacija). Prvog dana estrusa zamjetan je veći broj folikula promjera 2 do 3 cm, nakon čega se izdvaja jedan (primarni) folikul koji intenzivnije raste, promjera 3 do 6 cm neposredno prije ovulacije. Uterus se u ovoj fazi počinje nabirati, debljati, ali ne naglašeno, cerviks postaje mekši, otvoreniji i kraći u odnosu na fazu diestrusa.

U *metaestrusu* (kasnom estrusu) dolazi do oslobađanja jajne stanice prskanjem primarnog Graafovog folikula (ovulacije). Ovulacija se uvijek događa iznad "ovulacijske jame", a oslobođena jajna stanica uz pomoć folikularne tekućine i resica jajovoda postaje usmjerena u jajovod. Nakon ovulacije na jajnicima dolazi do regresije nerazvijenih (sekundarnih) folikula, a na mjestu prskanja Graafova folikula formira se *corpus heamorrhagicum*, koji kasnije postaje žuto tijelo (*corpus luteum*).

Diestrus je vrijeme između dva tjeranja. Obično traje 14 do 16 dana, ali dužina ovisi o godišnjem dobu. Tijekom diestrusa vagina je suha i blijedo ružičaste boje. *Corpus luteum* je potpuno razvijen te intezivno luči progesteron. Uterus je zadebljan i spreman za prijem oslobođenog embrija, ukoliko dođe do pravodobne oplodnje jajne stanice. Nakon uspješne oplodnje žuto tijelo nastavlja s lučenjem progesterona koji štiti i plod u maternici.

Spolni ciklus kod kobile kontroliran je interakcijom nekoliko glavnih hormona: folikulo-stimulirajući hormon (FSH), luteinizirajući hormon (LH), progesteron (PG), prostaglandin F2α (PGF2α), estrogen i gonadotropin rilising hormon (GnRH) (Ivanković, 2004.).

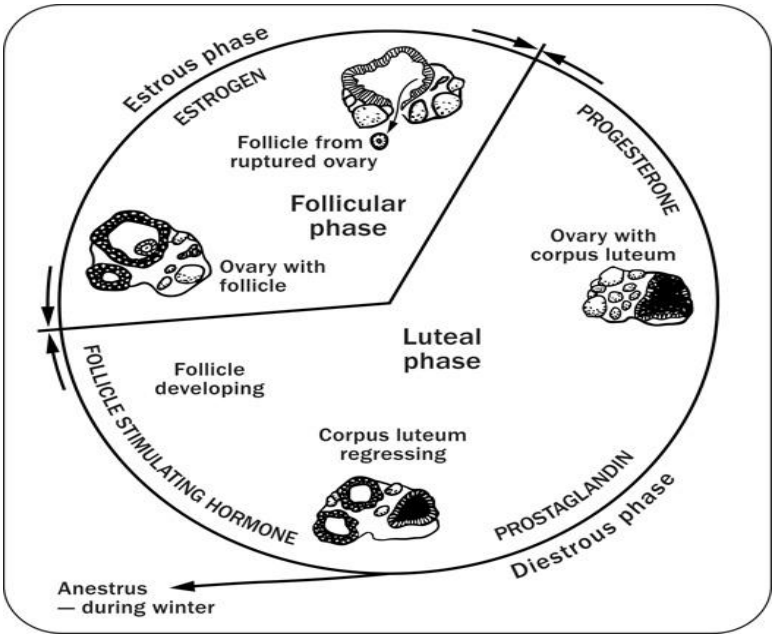
3.3. Sezonska obilježja spolnog ciklusa

Kobile su sezonski poliestrične životinje te im zbog toga spolni ciklus ovisi o godišnjem dobu. Cikličke aktivnosti počinju krajem zime i početkom proljeća. S obzirom na godišnju dob i cikličnost ciklusa spolna aktivnost kobila se može podijeliti na 4 razdoblja:

1. proljetni prijelazni period
2. puna sezona
3. jesenski prijelazni period
4. zimski anestrus

S obzirom na ovu podjelu, imamo 4 važna datuma za spolnu aktivnost kobila:

- proljetni ekvinocij (21. Ožujak); kraj proljetnog prijelaznog perioda, početak pune sezone,
- ljetni solsticij (21. Lipanj); vrhunac pune sezone,
- jesenski ekvinocij (23. Rujan); početak jesenskog prijelaznog perioda,
- zimski solsticij (21. Prosinac); anestrus (Prvanović i sur., 2009).



Slika 3. Ciklus estrusa

Izvor: http://www.omafra.gov.on.ca/english/livestock/horses/facts/10-099.htm

4. Indukcija i sinkronizacija estrusa

Indukcija i sinkronizacija estrusa je vrlo značajna biotehnička metoda u reprodukciji, naročito sportskih konja (kasača i galopera), jer omogućuje planirano dobijanje potomstva u određeno godišnje doba, što je vrlo bitno kod sportskih natjecanja. Osim toga, ova metoda je bitna i za poboljšanje plodnosti.

Anestrije nastale usred prolongiranog diestrusa su poslije endometritisa najčešći uzrok neplodnosti kobila. Anestrije uzrokovane produženjem litealne funkcije jajnika, zapravo se nadovezuju na oboljenje ili promjene nastale u endometriju, koje spriječavaju stvaranje i lučenje tkivnog luteolitičkog agensa, što je praćeno zadržavanjem žutog tijela te kraćim ili dužim izostankom estrusa. Ovo pokazuje na funkcionalnu povezanost maternice i jajnika, odnosno na značajnu ulogu u održanju ili regresiji žutog tijela u kobila (Vaselinović, 2001.).

Prije odabira metode za indukciju estrusa kod kobile, vrlo je važno prethodno utvrditi reproduktivni status kobile (prijelazni period ili puna sezona).

Indukcija estrusa u prijelaznom razdoblju primjenjuje se kod sportskih grla (galopera i kasača). Indukcija estrusa tijekom pune sezone primjenjuje se kod kobila s nepravilnim ciklusima i za skraćenje razdoblja između ždrijebećeg i prvog idućeg estrusa.

Kod indukcije i sinkronizacije estrusa dvije su osnovne metode, a zasnivaju se na:

1. Skraćivanju lutealne faze ciklusa primjenom prostaglandina i njihovih analoga
2. Produživanje lutealne faze ciklusa primjenom gestagena

Kod oba slučaja često se, radi poboljšavanja koncepcije, usporedno inducira ovulacija s pomoću humanog korionskog gonadotropnog hormona (Makek, 2009.).

5. Temeljne postavke umjetnog osjemenjivanja kobila

Selekcijskim radom čovjek je oblikovao mnoge životinjske vrste. Uzgojni cilj prilikom uzgoja konja mijenjao se vremenom te razlikovao od uzgoja drugih domaćih životinja, no ipak jedna stvar je ostala ista. Kod konja se većinom provodilo razmnožavanje najboljih, superiornih primjeraka. Poslušnost konja, inteligencija te izdržljivost su vrlo bitni prilikom preživljavanja jahača odnosno čovjeka. U današnje vrijeme konj je izgubio svoju primarnu namjenu u životu čovjeka. Uzgoj konja nije namijenjen proizvodima, već isključivo kao životinje za visokoprofilirani sport te osobno zadovoljstvo uzgajivača. Zbog takvog načina korištenja konja postoji potreba i želja za najvišom razinom selekcije, znači u rasplod idu isključivo najuspješniji primjerci rasplodnih kobila i pastuha, koji imaju iznad prosječne rezultate u sportu, u eksterijernim kvalitetama te koji su zadovoljavajućeg temperamenta i ćudi. Pošto takve životinje i nisu idealne za rasplod većinom je potrebno intervenirati primjenom različitih metoda asistirane reprodukcije. Najvažnije od njih su umjetno osjemenjivanje (U.O.), embriotransfer, seksiranje spermija i kloniranje. Od navedenih se najviše primjenjuje U.O. jer je najjednostavnija te zahtijeva najmanje sredstava i opreme. Primjena U.O. zapravo ubrzava postupke oplemenjivanja pasmina i uzgojnih tipova te ubrzava selekcijski učinak jer najkvalitetniji pastusi kroz umjetno osjemenjivanje ostavljaju znatniji uzgojni trag. Jednim skokom pastuh opasuje jednu kobilu, dok se spermom ejakulata može osjemeniti više od deset kobila, odnosno preko 600 kobila godišnje. Duboko smrznuto sjeme pastuha može se i nakon njegova uginuća koristiti u rasplodu.

Prednosti umjetnog osjemenjivanja:

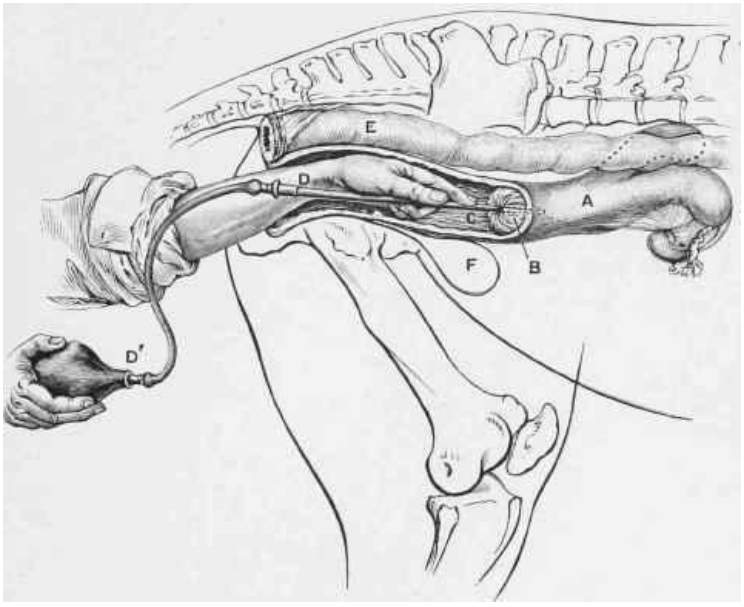
- spriječavanje prijenosa spolno zaraznih, nametničkih i drugih bolesti,
- smanjuje se rizik od raznih povreda,
- uklanjaju se tzv. «profesionalne» bolesti usko vezane s pojačanom seksualnom aktivnosti, poput impotencije i psihičkih problema,
- olakšava distribuciju genetskog materijala čime se izbjegava stres uvjetovan transportom rasplodnih grla (Prvanović Babić, 2012.).

6. Organizacija umjetnog osjemenjivanja

Umjetno osjemenjivanje je postupak u kojem se polučeni ejakulat pastuha (razrijeđen ili ne u više doza) polaže u maternicu kobile u estrusu s ciljem da ostane gravidna. Na taj način jedan ejakulat je dovoljan da se osjemeni više kobila, a ejakulacija je odvojena od osjemenjivanja.

Umjetno osjemenjivanje se u svijetu provodi godinama. Neke konjogojske udruge dozvoljavaju osjemenjivanje samo sa svježom razrijeđenom spermom na mjestu polučivanja ejakulata, dok druge dozvoljavaju i uporabu svježeg transportiranog sjemena i duboko smrznutog sjemena. Pojedine elitne udruge, primjerice engleskih punokrvnjaka, uopće ne dozvoljavaju U.O. čak niti kada je to medicinski indicirano, npr. kod stečenih malformacija vanjskih genitalija. Idu čak do takvih mjera da postupkom umjetnog osjemenjivanja dobivenu ždrebad odbijaju registrirati.

Razlika između umjetnog osjemenjivanja konja od drugih vrsta domaćih životinja je važnost priznavanja podrijetla odnosno mogućnost izdavanja pravovaljanog pedigrea odnosno rodovnice. U tu je svrhu važno imati dokaziv trag od polučivanja ejakulata, sustava pohrane i smrzavanja, transporta, osjemenjivanja i u konačnici rođenja ždrebeta (Prvanović Babić, 2012.).



Slika 4. Postupak U.O.
Izvor: http://chestofbooks.com/animals/horses/Health-Disease-Treatment-4/images/Artificial-Insemination-Passing-the-Inseminator-into-the-Ut.jpg

6.1. Korištenje umjetne vagine

Da bismo dobili od pastuha čistu spermu, u potpunoj količini treba primjeniti način koji osigurava sve uvjete potrebne za normalnu ejakulaciju.

U današnje vrijeme najrasprostranjeniji način dobivanja sperme je pomoću umjetne vagine. Ona je načinjena tako da simulira uvjete prave vagine te da potakne pastuha na ejakulaciju (Ivanković, 2004.).

Prva konjska umjetna vagina je razvijena od strane Japanaca prije kraja Drugog svjetskog rata. Nedugo nakon što je japanska verzija umjetne vagine došla na tržište, istraživači sa Sveučilišta u Missouriju su objavili rezultate uspjeha sa svojim dizajnom, koji je postao poznat kao Missouri model.

Skoro svi modeli dostupni danas se temelje na jednom od ova dva prototipa. Umjetne vagine su slične, jer obje imaju središnju šuplju gumenu cijev u koju dolazi pastuhov spolni organ. Na kraju cijevi je ljevkasti dodatak koji utječe u posudu za prikupljanje sjemena. Kod Colorado modela, koji je adaptacija japanskog dizajna, izolacijski sloj se obloži oko boce za sakupljanje; druga cijev, koja se treba napuniti vodom, okružuje prvi sloj, i svi su smješteni unutar krute šuplje cijevi. Missouri Model jednostavno stavlja podatnu kožnu torbicu oko gumene cijevi.

Obje izvedbe imaju ventil koji se nalazi na strani šuplje gumene cijevi, koji omogućuje ulazak vode i zraka. Manipulacija tih elemenata je potrebna za uspješno prikupljanje sjemena pastuha (McCall, 2007.).



Slika 5. Uzimanje ejakulata umjetnom vaginom

Izvor: http://i.ytimg.com/vi/MG-6O_rMcMI/0.jp

6.1.1. Pripremanje umjetne vagine

Prije dobivanja sperme umjetna vagina se mora dezinficirati. Za tu svrhu kliještima, propaljenim na vatri uzima se tampon od vate koji je namočen u 3% hidrogen, otopinu karboksilne kiseline ili alkohola (96°) i trlja se unutrašnja površina umjetne vagine, unutarnji dio sakupljača spermija i površina umjetne vagine na koju se postavlja sakupljač sperme. Zatim se kroz otvor ulijeva voda. Topla voda je ključni sastojak koji pretvara opuštenu cijev u strukturu koja sliči vagini kobile. Stupanj topline i tlaka koji se koristi ovisi o pastuhu. Voda zagrijana na 38°C (temperatura kobilje vagine) se upumpava u umjetnu vaginu, no ta temperatura nije impresionirala pastuhe te su odbili umjetnu vaginu. Tek kada je temperature vode povećana na između 43-46°C uspjeh je postajao češći. Istraživači su naučili da je volumen vode manje kritičan od temperature - činjenica koja je dovela do smanjenja u veličini i težini umjetne vagine (McCall, 2007.).

Stoga je vrlo bitno znati da je temperatura još uvijek najkritičniji čimbenik poticanja pastuha na korištenje umjetne vagine. Neki konji su toliko izbirljivi o temperaturi da će koristiti umjetnu vaginu samo kada je temperatura vode unutar jednog do dva stupnja njihove željene temperature.

Jedno istraživanje je započeto zbog mnogobrojnih pitanja o plodnosti jednog starog Thoroughbred pastuha. Dok je bio u u svojim dvadesetima imao je veliki libido i služio bi se umjetnom vaginom bez problema ali je proizvodio samo malu količinu ejakulata (manje od 25ml). Prva reakcija im je bila da je reproduktivni sustav tog pastuha ugrožen zbog dobi, no kasnije su došli do saznanja da ono što su prikupljali je bio pred ejakulat. Podizanje temperature vode do gotovo 60°C pastuh je ejakulirao 250 ml visoko kvalitetnog sjemena. Taj pastuh je nastavio praviti ždrebad do zrele dobi od 28 godina, no ukoliko je temperatura umjetne vagine bila manja od 57°C on ju ne bi koristio. Ta temperatura većini pastuha postane neugodna. Na kraju istažitelji nikada nisu vidjeli pastuha koji je preferirao umjetnu vaginu hladniju od 43°C, no srećom mnogi pastusi nisu tako izbirljivi kao stari "pro" te će koristiti umjetnu vaginu s temperaturom između 43 i 48°C (McCall, 2007.).

Unutrašnja strana umjetne vagine se pomoću kliješta ili jakog staklenog štapića dobro namaže po cijeloj dužini vazelinom. Treba upotrebljavati samo očišćeni bijeli ili žuti, lakotopljivi vazelin (Paršutin, 1949.).

Vrlo bitan je i tlak u umjetnoj vagini. Tlak se može mijenjati dodavanjem ili uklanjanjem vode u zatvorenoj komori i povećanjem ili smanjenjem količine zraka. Svaki pastuh ima osobni ukus koji određuje koliko zraka i vode treba koristiti.
Nekim pastusima se ne sviđa što ne postoji kraj cjevčice; cerviks nije prisutan kao kod prave vagine te nemaju za što da se prime dok nasrću. Da bi se to zadovoljilo, kraj cijevi se stegne do ejakulacije, čime pastuhu da osjećaj da cijev ima jedan kraj.



Slika 6. Umjetna vagina
Izvor: http://www.valleyvet.com/group_images/38959_A.jpg

6.1.2. Dobivanje ejakulata

Kod skakanja pastuha na "fantoma" onaj koji prima ejakulat odvodi lijevom rukom spolni ud pastuha na stranu (desno od pastuha) upravljajući ga u umjetnu vaginu, dok desnom rukom drži umjetnu vaginu za ručku (McCall, 2007.).
Nakon stimulacije i skoka pastuha na "fantoma", na spolni ud pastuha se navlači umjetna vagina koja pastuha stimulira i dovodi do ejakulacije (Ivanković, 2004.).
Nakon ejakulacije spermohvatač se spušta postepeno malo niže kako sperma ne bi istekla iz umjetne vagine. Umjetnu vaginu se treba držati do kraja erekcije, te se mora paziti da pastuh u potpunosti ejakulira (Paršutin, 1949.).
Ejakulat se zatim pregleda i ocjenjuje. Ocjenjuje se količina, konzistencija, boja, miris i čistoća. Makroskopskim pregledom se određuje njen pH (normalan pH sperme je od 6,8-7,5), te se potom vrši mikroskopska pretraga (broj, koncentracija, pokretljivost i izgled spermija) (Ivanković, 2004.). Nakon završene ejakulacije iz umjetne vagine se treba odmah izliti voda te komoru temeljito oprati od ostataka vazelina i sperme, zatim obrisati čistim ručnikom i osušiti (McCall, 2007.).

6.1.3. Razrijeđivanje ejakulata

Normalna ždrebnost kobila se postiže ako se u maternicu unese ne manje od 20 ml sperme. Kod osjemenjivanja kobila tolikim dozama nerazrijeđene sperme moguće je od jednog skoka pastuha osjemeniti mali broj kobila (3-7 grla). Ako se uzmu manje doze sperme (5-10 ml) smanjuje se ždrebnost. Ukoliko se te doze razrijede razrijeđivačima koji povisuju životnu sposobnost spermija i ako se unese u maternicu u količini od 20-30 ml ždrebnost kobila se ne umanjuje već dozvoljava da se od jednog skoka pastuha može osjemeniti 15-25 kobila (Paršutin, 1949.).

Glavni ciljevi pri izradi doza ejakulata su:

1. Sačuvati sposobnost oplodnje sjemena tako da se skrati vrijeme koje sperma provede na +35°C; smanjiti štetni utjecaj sjemene plazme razrijeđivanjem i filtriranjem (1 udio sperme s najmanje 2 udjela razrijeđivača); izbjegavati termički šok.
2. Osjemenjivanje kobile s dozom koja zadovoljava brojem spermija i volumenom – ukupni broj spermija u dozi svježeg sjemena treba biti 200 milijuna, a za smrznuto sjeme 400 milijuna; volumen treba biti do 20 ml.

Nakon dobivanja ejakulata on se mora procijediti kroz sterilnu gazu kako bi ga se odijelilo od želatinozne faze. Zatim je potrebno odrediti koncentraciju spermija (spektroforometrijski) – broj spermija/ml i volumen ejakulata. Za osjemenjivanje kobila prosječna doza iznosi 200 milijuna spermija u ukupnom volumenu doze od nekih 15 ml. Na osnovu toga se izračuna koliko je doza moguće napraviti od pojedinog ejakulata, a zatim se u dobiveni ejakulat ulije mliječni ekstender od unaprijed izračunatog ukupnog volumena.

Formula: C (milijuni/ml) x V (ml ejakulata) = xy / 200 milijuna = broj doza/ejakulat

Ukoliko pastuh daje ejakulate niske koncentracije, a visoko je vrijedan te ga se želi koristiti u rasplodu, tada ejakulat mora biti koncentriran centrifugiranjem i evakuiranjem sjemene plazme.

Mogu se koristiti različiti razrijeđivači na bazi mlijeka ili vrhnja, koji su se pokazali boljima od onih na bazi šećera i žutanjka. Kao standardni razrijeđivač koristi se Kenney-ev razrijeđivač na osnovi mlijeka u prahu, glukoze i pufera.

Sjeme pastuha, ukoliko ga se kvalitetno zaštiti od temperaturnog šoka, može dobro podnijeti hlađenje na +4°C (Makek, 2009.).

Posljedice temperaturnog šoka su ireverzibilne promjene membrane i gubitak progresivnog motiliteta. Utvrđeno je da je sjeme pastuha na bazi mlijeka najosjetljivije na temperaturni šok pri temperaturama od 19 do 8 °C, dok je pohrana bila bolja na temperaturama od 4-6°C, nego na 0-2°C.

Kod svježeg sjemena se razrijeđivači baziraju na polumasnom mlijeku, fiziološkoj otopini ili se koristi razrijeđivač po Kenneyu (mlijeko u prahu, glukosalina). Ukoliko je razrijeđivač bez ATB, tada se umjetno osjemenjivanje treba izvesti u roku od 30 minuta od dobivanja. ATB se koristi ako se sjeme želi konzervirati.

Kod ohlađenog sjemena koriste se razrijeđivači na bazi polumasnog mlijeka, fiziološke otopine ili Kenney te drugi komercijalni diluenti (+ATB).

Kod zamrzavanja sjemena koriste se razrijeđivači na bazi obranog mlijeka, fiziološke otopine te pufera +ATB uz dodatak žutanjka i glicerola (Makek, 2009.).

U nerazrijeđenoj spermi životni vijek spermija je kratak. Već nakon 3-4 sata nakon dobivanja sperme potpuno se prekida njihovo kretanje. Kod razrijeđene sperme spermiji žive izvan organizma 3-4, a katkada 7-8 dana (Paršutin, 1949.).

6.2. Pripremanje razrijeđivača

Kod pripremanja razrijeđivača najbolje je koristiti destiliranu vodu. Za destiliranje vode služe specijalni uređaji za destilaciju koji se obično nalaze u ljekarnama i veterinarskim stanicama. Može se koristiti i obična voda ali se mora obavezno prokuhati. Soli i drugi sadržaj koji se nalaze u vodi kuhanjem se pretvaraju u talog. Kako bi se talog uklonio prokuhanu vodu treba filtrirati kroz vatu ili papir za filtriranje. Prokuhavanje i filtriranje ne očiste vodu do kraja od soli stoga treba provjeriti vodu ako u razrijeđivaču spremljenom iz prokuhane vode dužina spermija nije manja nego u razrijeđivaču koji je spremljen iz destilirane vode. Za spremanje razrijeđivača treba sterilnom bočicom za mjerenjem točno odmjeriti količinu vode i izvagati odgovarajuću količinu glukoze ili šećera. Šećer ili glukozu treba staviti u vodu i sterilnim staklenim štapićem miješati, dok se potpuno ne otopi. Razrijeđivač se treba pripravljati svaki dan svjež (Paršutin, 1949.).

6.3. Čuvanje i prijenos ejakulata

Uspjeh osjemenjivanja kobila prenesenom spermom ovisi ne samo od uvjeta držanja nego i o kakvoći same sperme. Stoga pripremanje pastuha za sezonu opasivanja, od koga će se dobivati sperma za prenošenje od velikog je značenja. Za vrijeme sezone opasivanja treba dobro paziti na pokazatelje sperme. U slučaju da se oni umanjuju potrebno je poboljšati prehranu i dozvoliti pastuhu dopunski odmor od opasivanja (Paršutin, 1949.).

Kvaliteta sperme za prenošenje

Za prenošenje sperma treba imati ovakve pokazatelje:

- Koncentracija spermija ne smije biti manja od 100-150 miliona u ml
- Aktivnost ne smije biti manja od 0,5 bodova
- Preživljavanje ne manje od 1,5-2 dana

6.3.1. Uvjeti čuvanja i prenošenja ejakulata

Spermu pastuha treba prenositi samo u razrijeđenom stanju. Razrijeđivanje sperme za prijenos treba biti 3-4 puta, jer se kod takvoga razrijeđivanja postiže duže preživljavanje spermija. Veliko značenje ima temperatura pri kojoj se čuva sperma. U praksi spermiji koji najduže zadržavaju svoju sposobnost oplodnje su oni pri temperaturi od 10°C. Ohlađivanje sperme do te temperature treba vršiti polagano u vremenu od 2-3 sata. Kod takvog načina ohlađivanje sperme nastaje postepeno i oni se bezbolno navikavaju na život u nižim temperaturama. Pri prevođenju na temperaturu tijela oni ponovno postaju aktivni i sposobni da se samostalno kreću i da oplode jajnu stanicu (Paršutin, 1949.).

Sperma se prenosi u staklenim bočicama sadržaja od 50-150 ml ili specijalnim staklenim ampulama sadržaja 20-30 ml. Prije ulijevanja sperme bočice, ampule i njihove gumene glavice treba dezinficirati ispirući ih u 3%-tnom alkoholu ili otopini karboksilne kiseline. Poslije dezinfekcije posuđe se ispire 2-3 puta kipućom vodom i jedanput razrijeđivačem. Za prenošenje sperma se ulijeva u sterilne posude ili ampule. U bočice se sperma ulijeva do samog čepa, kako pri prenošenju ne bi bilo mučkanja. Bočice se zatvaraju odgovarajućim čepom i učvršćuju zavojem ili širokim pojasom od iskorištene gumene komore. Kod punjenja ampule sa spermom na njezin se kraj stavlja gumena cijev od 15-20 cm sa staklenom cjevčicom i pritiskivačem. U staklene cjevčice se stavlja vata. Široki se

kraj ampule stavlja u bočicu za mjerenje gdje se nalazi sperma, otvara se pritiskivač i pomoću gumene cijevi sperma se napuni u ampulu. Kada se ampula napuni, pritiskivač se zatvara, a na otvor ampule se stavlja gumena kapica te se sa drugoga kraja ampule skida gumena cijev i također postavlja kapica. Za čuvanje i prenošenje sperme koristi se metalni termos sa dvije stijenke. Bočice i ampule se stavljaju u vrećicu, koja je od platna i sloja vate, u debljini od 0,5 cm. Vrečica od vate čuva bočice i ampule od udara i od dodira sa hladnim stijenkama termosa čime se isključuje mogućnost brzog hlađenja. Među stijenke termosa ulije se voda sa temperaturom od 5-8°C čime dolazi do hlađenja sperme na do 10-15°C (Paršutin, 1949.).

6.4. Osjemenjivanje kobile

Inseminacija kobile vrši se apliciranjem sperme u reproduktivni sustav kobile u intervalu njenog spolnog ciklusa između 12 sati prije i 6 sati nakon ovulacije (Ivanković, 2004.).

Kod postupka izvođenja umjetnog osjemenjivanja bitno je:

- u spolne organe uvoditi samo sterilan pribor,
- Betadinom oprati perinealnu regiju (vulvu, anus i okolinu te područje ispod dražice) kako bi se smanjila mogućnost kontaminacije (Prvanović Babić, 2012.)

Kobilu je potrebno prilikom umjetnog osjemenjivanja smjestiti u stojnicu. Prije pregleda i umjetnog osjemenjivanja potrebno je rep umotati u najlonsku navlaku (napravi se od plastične rukavice za rektalnu pretragu) i fiksirati. Na ruku se navuče sterilna (jednokratna) plastična rukavica na koju je potrebno staviti malo sterilnog parafinskog ulja kako bi se njome lakše ušlo u vaginu. Zatim se rukom na kojoj je rukavica unosi plastični kateter za umjetno osjemenjivanje u vaginu. On mora biti zaštićen tankom «sanitarnom» košuljicom koju neposredno pred cerviksom probijamo kateterom te tako sterilan kateter uvodimo kroz cerviks u tijelo maternice. Prilikom uvođenja katetera u vaginu vrh katetera treba držati u zatvorenoj šaci kako bi ga maksimalno zaštitili od kontaminacije (Grizelj, 2008.).



Slika 7. Dva tipa katetera za UO kobila svježim sjemenom te brizgalica od 20mL

Izvor: http://www.hsul.hr/sites/default/files/edukacija/Grizelj_-_Umjetno_osjemenjivanje_kobila___ogledan_primjer_suradnje_veterinara_i_uzgajivaca_0.pdf

Kateter se uvodi u uterus tako da prvo kažiprstom prođemo kroz cijeli cerviks te zatim na isto mjesto počnemo uvlačiti kateter do tijela maternice. Kobilji cerviks je kratak, a u estrusu izrazito mekan te cervikalni kanal jasno otvoren. Doza za umjetno osjemenjivanje je priređena u brizgalicama (svježe i ohlađeno sjeme) ili pajetama (smrznuto) (Grizelj, 2008.).

6.4.1. Tehnike u postupku U.O.

Tehnike u postupku U.O. kod konja koje se danas koriste su:

1. Osjemenjivanje sa svježim sjemenom u roku od 30 minuta od dobivanja, osjemenjivanje rashlađenim sjemenom 30 minuta pa do 12 (24) sati nakon dobivanja kod kojega se sjeme hladi na +4°C kako bi se čuvalo na licu mjesta ili transportiralo
2. Umjetno osjemenjivanje smrznutim sjemenom kojeg je moguće čuvati neodređeno vrijeme u tekućem dušiku na temperaturi -196°C u obliku paleta (0,1 ml), ampula, pajeta
3. Osjemenjivanje seksiranom spermom, svježa ili duboko smrznutim sjemenom (postupkom odvajanja ženskih X, od muških Y gameta u protočnom citometru)

Umjetno osjemenjivanje smrznutim sjemenom se može provesti na dva načina.
Za oba je potrebno prethodno otopiti pajete u vodenoj kupelji na 37°C kroz 30 sekundi. Sadržaj otopljenih pajeta prebacimo u jednu sterilnu kušalicu uronjenu u kupelj tako da odrežemo zamotani kraj pajete, stavimo pajetu iznad kušalice te odrežemo tvornički čep nakon čega sadržaj pajete iscuri u epruvetu. Zatim koristimo istu sondu za umjetno osjemenjivanje kao i za svježe sjeme. Prvo se u brizgalicu navuče oko 4 ml zraka (ne

previše, jer nije dobro za uterus) te zatim aspiriramo sadržaj epruvete. Ovim načinom je teže prodrijeti duboko u rog i izvesti duboko osjemenjivanje u vrh roga maternice.

Drugi način je korištenje katetera za umjetno osjemenjivanje smrznutim sjemenom (tanji je od katetera za umjetno osjemenjivanje svježim ejakulatom) čiji je sastavni dio i metalni mandren za istiskivanje sadržaja pajete. Kod ovog načina se provodi duboko umjetno osjemenjivanje na način da se otvori pajeta sa zamotane strane te ju gurnemo u kateter. U drugi kraj pajete se gurne metalni mandren kojim pajetu gurnemo do vrha katetera. Kateterom ulazimo u cerviks, a drugom rukom se ide u rektum kako bi kateter prodro što dublje u ipsilateralni rog maternice. Nakon dolaska katetera u vrh roga, asistent ispražnjava sadržaj pajete, vadi praznu pajetu, na njeno mjesto se stavlja nova pajeta i tako ponavlja radnju do ispražnjenja svih predviđenih pajeta (Grizelj, 2008.).



Slika 8 i 9. Vrh katetera za UO svježim sjemenom s zaštitnom košuljicom i vrh katetera za UO smrznutim/otopljenim sjemenom s košuljicom i mandrenom

Izvor: http://www.hsul.hr/sites/default/files/edukacija/Grizelj_-_Umjetno_osjemenjivanje_kobila___ogledan_primjer_suradnje_veterinara_i_uzgajivaca_0.pdf

6.4.2. Postotak koncepcije

Prosječna plodnost kobila iznosi 50% pri skoku «iz ruke» ili osjemenjivanjem svježim sjemenom neposredno nakon polučivanja. Sa konzerviranjem pada uspješnost osjemenjivanja. Tako za sjeme ohlađeno na +4ºC i korišteno unutar 8h od polučivanja iznosi 40-45%. Isto sjeme konzervirano tijekom 24 sata će imati uspješnost od samo 25%. Pri korištenju smrznutih doza prosječna uspješnost iznosi 35%, po nekim izvorima ne prelazi 40% pri čemu uspješnost varira najviše sa dobi kobile. U kobila do 8 godina starosti taj postotak može prelaziti 40%, a sa starosti pada, rapidno na manje od 30% za kobile preko 13 godina. Plodnost kobila jako pada nakon 15 godina starosti te bi ih tada trebalo isključiti iz reprodukcije (iznimka vrlo vrijedne kobile).

Znači da stopa plodnosti mladih kobila nije drastično niža nakon osjemenjivanja smrznutim sjemenom u odnosu na osjemenjivanje svježim sjemenom.

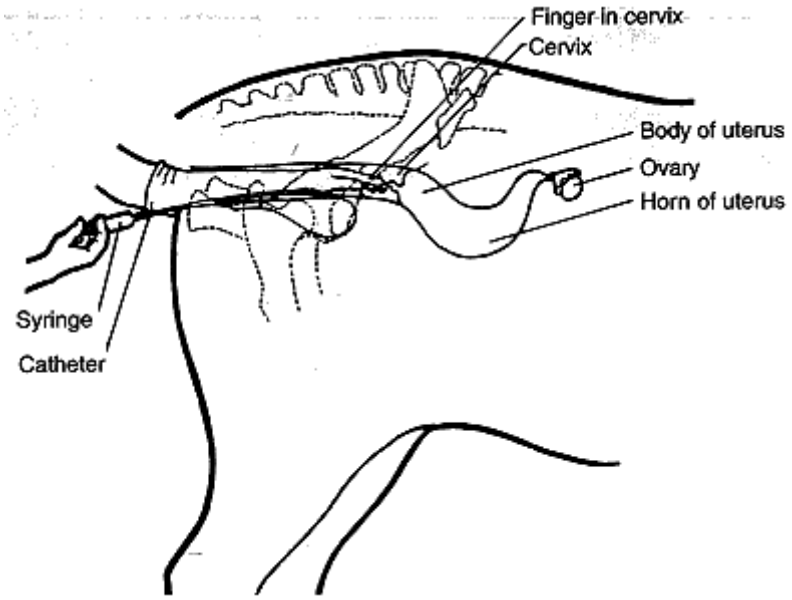
Pri osjemenjivanju smrznutim sjemenom potrebno je vrlo frekventno pratiti folikularni razvoj obzirom na skupoću i ograničeni broj doza koje bivaju isporučene u jednoj pošiljci te je preporučljivo hormonalno inducirati ovulaciju te osjemenjivati svako 24 sata od indukcije do ovulacije (Grizelj, 2008.).

6.4.3. Broj spermija u dozi i broj osjemenjivanja

Kod svježih doza te kod doza sperme konzerviranih na 4ºC tijekom 8 ili 24h broj od 200 milijuna spermija dovoljan je za osjemenjivanje, iako mnogi centri koriste 400 milijuna, pa čak i 800 milijuna spermija po dozi.

Glede smrznutog sjemena pokazalo se kako doza od 400 milijuna ima bolju plodnost. U svakoj pajeti od 0,5mL ima 50 milijuna spermija, što znači da se za jedno osjemenjivanje koristi 8 pajeta. Ipak u praksi se pri osjemenjivanju zdravih, a posebice mlađih kobila, zadovoljavajući rezultati postižu već korištenjem 200 milijuna spermija tj. otapanjem samo 4 pajeta (Grizelj, 2008.).

Utvrđena je viša plodnost svježe i smrznute sperme ako se kobila osjemeni 2 puta u razmaku 24 ili 48 sati, u usporedbi sa jednokratnom inseminacijom (Grizelj, 2008.).



Slika 10. Metoda osjemenjivanja kobila
Izvor: http://nongae.gsnu.ac.kr/~cspark/teaching/chap17.html

7. Zakonski okvir umjetnog osjemenjivanja u Republici Hrvatskoj

Umjetno osjemenjivanje, stavljanje u promet i izvoz sjemena kopitara iz RH regulirani su Zakonom o veterinarstvu (NN 41/2007. i NN 155/2008.) i pravilnicima kojima se zakonodavstvo RH usklađuje sa zakonodavstvom Europske Unije:

• Pravilnik o zdravstvenim zahtjevima za stavljanje u promet i uvoz životinja, sjemena, jajnih stanica i zametaka koji ne podliježu zahtjevima propisa iz dodatka A dijela i pravilnika o veterinarskim i zootehničkim pregledima određenih životinja i proizvoda u prometu s državama članicama Europske Unije (NN85/09.).

• Pravilnik o obrascu veterinarskog certifikata za stavljanje u promet sjemena kopitara kojim se određuju uvjeti za izdavanje certifikata za izvoz sjemena kopitara u države članice Europske Unije (NN 110/09.).

Zakonske odredbe regulirane su i:

• Pravilnikom o mjerama kontrole arteritisa konja (NN 62/09.).

• Pravilnikom o veterinarskim uvjetima za premještanje kopitara i uvoz iz trećih zemalja (NN154/2008.).

• Pravilnikom o veterinarsko zdravstvenim uvij etima za uvoz i provoz određenih živih papkara i kopitara (NN 41/2009.).

Ovi će pravilnici u potpunosti ili dijelom stupiti na snagu prilikom ulaska RH u EU (Prvanović, 2012.).

8. Umjetno osjemenjivanje u Hrvatskoj

U Hrvatskoj je veliki interes uzgajivača i držatelja konja, pogotovo sportskih grla, te stoga, kako bi imali što bolje rezultate tih visokokvalitetnih jedinki je vrlo bitno da je i plodnost dobra, što u Hrvatskoj i nije tako, već je vrlo nezadovoljavajuća.

Prema Prvanović Babić, (2014.) Republika Hrvatska bi, koja je sad već članica EU, trebala više gledati na prevenciju smanjene plodnosti, odnosno neplodnosti. Trebala bi bolje regulirati provedbu mjera kontrole plodnosti konja pošto u razvijenim zemljama postoji vrlo dobar sustav praćenja potencijalnih problema sa plodnošću, neplodnošću, spolnim prenosivim bolestima te drugo. Centar u Križevcima je jedino mjesto u kojemu se do sada sakupljalo i skladištilo sjeme pastuha. Veliki broj udruga uzgajivača uz poticaj Ministarstva poljoprivrede i Državnog savjeta za konjogojstvo u budućnosti planira da se poveća broj centara u kojemu bi se polučivao ejakulat pastuha te distribuiranje doza sjemena za umjetno osjemenjivanje. Pored toga bi koordinaciju, edukaciju te stručnu potporu pružala Klinika za porodništvo i reprodukciju Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Na Državnu ergelu lipicanaca Đakovo i Lipik planira se, također, uvođenje umjetnog osjemenjivanja gdje bi se isto tako polučivao ejakulat te distribuirao. Na Klinici za reprodukciju Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu se umjetno osjemenjivanje sa svježom, rashlađenom i duboko smrznutim ejakulatom iz uvoza vrlo uspješno provodi. Isto tako je provođenje vrlo uspješno i u manjem broju privatnih veterinarskih stanica te ambulanti, kao što su u Karlovcu i Vrbovcu. Umjetno osjemenjivanje, koje se provodi u Hrvatskoj, ima uspjeh koji se može usporediti sa ostalim zemljama EU i SAD. Postotak plodnosti iznosi 70%.

Kako većina veterinarskih stanica posjeduje ultrazvučne aparate te provode i ginekološke preglede kobila, uz minimalnu edukaciju, umjetno osjemenjivanje se ne bi moralo raditi u specijaliziranim ustanovama (no samo što se tiče rashlađenog ejakulata). Umjetno osjemenjivanje s duboko smrznutom spermom bi se ipak trebalo raditi u specijaliziranim ustanovama, pošto je postupak složeniji te iziskuje veću razinu znanja.

Što se tiče razvoja umjetnog osjemenjivanja u Republici Hrvatskoj on se može usmjeriti u dva smjera. Može se uvoziti sperma kvalitetnih rasplodnih pastuha određenih pastuha, što je vrlo značajno za oplemenjivanje i osvježavanje krvi naših rasplodnih kobila, te se tako može stvoriti dobra baza za kvalitetnije jedinke.

U cilju boljeg kontroliranja sjemena kvalitetnih pastuha te povećanja dostupnosti kvalitetnog sjemena u svim dijelovima Hrvatske te mogućnosti izvoza, razvoj umjetnog osjemenjivanja se može odvijati i u smjeru stvaranja „banke sperme“ naših autohtonih pasmina. U okviru Hrvatske poljoprivredne agencije tim stručnjaka je već smislio plan pohrane genetskog materijala naših autohtonih pasmina.

Edukacija uzgajivača, stočarske selekcijske službe te veterinara je iznimno nužna kako bi uvođenje umjetnog osjemenjivanja u uzgoje kopitara bilo što kvalitetnije.

9. Embriotransfer

Embriotransfer (ET) predstavlja postupak reprodukcije u kojemu se zametak davateljice 7 dana nakon ovulacije prenosi (transferira) u maternicu sinkronizirane primateljice koja će gravidnost iznijeti sve do poroda (Makek i sur. 2009.).

ET je koristan ukoliko želimo povećati godišnju reproduktivnu stopu kobila. Postoje neke pasminske udruge koje omogućuju registraciju više ždrebadi godišnje po donorici kobile. To bi omogućilo da mlada kobila (2 godine) ima potomstvo iako mnogi to smatraju lošom idejom. Kobile koje imaju manju plodnost, te pogotovo one koje imaju probleme s maternicom, pomoću ET mogu imati potomstvo. No, uzgajivači prije nego što se odluče za ET, smatraju ga prilično skupim i dugotrajnim procesom, sa niskom stopom uspjeha (Hopkins i Meadows, 2003.).

Embriotransfer možemo podijeliti u 5 faza:

1. sinkronizacija estrusa,
2. indukcija superovulacije,
3. sakupljanje embrija,
4. ispitivanje i manipulacija embrijima,
5. transfer embrija

9.1. Prednosti embriotransfera

a) Omogućenje dobivanja potomaka kobila koje same ne mogu održavati trudnoću, zbog bolesti maternice ili ozljeda (upala jajovoda, raniji pobačaji i sl.). Najčešće se to javlja kod kobila koje se tijekom ždrijebljenja ozljede te nisu u mogućnosti više nositi ždrijebe.
b) Dobivanje više trudnoća po sezoni.
c) Stjecanje trudnoće od 2 ili 3 godine starih kobila. To omogućava dobivanje ždrijebadi godinu dana ranije od uobičajenog.
d) Stjecanje trudnoće od kobila koje se natječu. Vrijedna športska grla u tom slučaju izlaze iz natjecanja samo onoliko vremena koliko je potrebno da se od nje dobije zametak.
e) Dobivanje trudnoća kod kobila koje su se kasno ždrijebile u sezoni te na taj način omogućiti ranije ždrijebljenje tijekom sljedeće sezone.

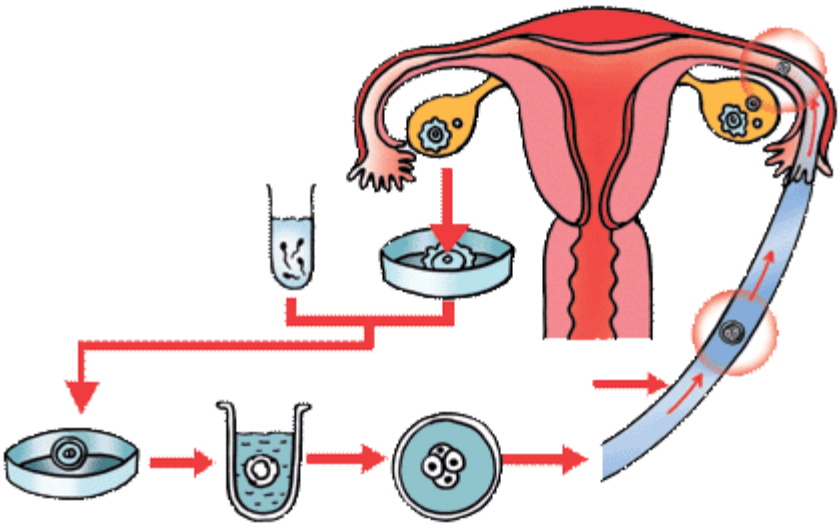
f) Povećana produkcija zametaka od strane iznimnih kobila koje na taj način imaju veći genetski utjecaj u rasplodu
g) ET je moguć i za ugrožene vrste kopitara (magarce)
h) Pruža šansu starim kobilama, koje su već dale odlično potomstvo, da nastave, odnosno da ostanu nešto duže u priplodu.
i) Omogućuje da se na brz način provjeri vrijednost i plodnost (svježeg i dubokog) sjemena određenog pastuha.
j) Omogućuje da se na relativno jednostavan i jeftin način izvrši međunarodna razmjena vrhunskog genetskog materijala, bez rizika od prenošenja određenih zaraznih bolesti i spolnih bolesti.

9.2. Nedostaci eumbriotransfera

a) Glavni nedostatak su troškovi. Održavanje kobila primateljica, potrebno ih je dobro hraniti te zbrinuti tijekom cijele godine i voditi brigu o njezinom zdravlju.
b) Stopa ispiranje maternice kod kobila sa malom plodnošću je niska, uspješnost ispiranja maternice zdravih kobila je 50 %, dok kod starijih kobila je vrlo niska, do 20 %
c) Tehnike s kojim bi se povećala stopa ovulacije u kobila su uglavnom neuspješna. Kobile obično mogu dati jedno jaje ili dva jaja za oplodnju po ciklusu. Mnoga istraživanja su usredotočena na to, no to je vrlo skupo i neuspješno, a obično rezultira samo s jednim pomoćnim embrijem.
d) Ograničenje predstavljaju pasminske udruge koje nisu dopuštale provođenje ET i produkciju više ždrebadi godišnje od iste kobile, no danas je to u većine pasmina dopušteno. Jedino ograničenje koje danas udruge postavljaju je da se dopušta registracija samo jednog ždrebeta godišnje po kobili (Sellers, 2001.).

10. Proizvodnja zametaka in vitro

Proizvodnja zametaka in vitro predstavlja treću generaciju biotehnologije. In vitro oplodnja je postupak u kojem je jajna stanica oplođena ejakulatom izvan tijela životinje. Pojam in vitro (lat. u staklu) koristi se jer su rani biološki eksperimenti kultiviranja tkiva izvan živućeg organizma od kojeg potječu, bili provođeni u staklenim posudama – čašama, epruvetama ili petrijevim zdjelicama. Danas se pojam in vitro koristi da označi biološku proceduru koja se odvija izvan organizma u kojem bi se normalno odvijala. Razvoj ove biotehnologije ima veliki potencijal za temeljna istraživanja te za njihovu primjenu u komercijalnom uzgoju te genetskom napretku. Osim toga omogućuje razvoj drugih biotehnologija poput kloniranja.



Slika 11. Shema oplodnje In Vitro

Izvor:

http://www.hlede.net/studentski_radovi/smotra_2003/slike_smotre_2003/emb_tran_cro.gif

Razvoj ove biotehnologije ima fantastične potencijale kako za temeljna istraživanja tako i za njihovu primjenu u komercijalnom uzgoju konja i genetski napredak stada. Polučivanje jajnih stanica od živih visoko kvalitetnih kobila, bez ikakve posljedice za davateljicu, i oplodnja in vitro s odgovarajućim pastuhom za proizvodnju ždrijebadi s pedigreom je jasna prednost. Ključni aspekti su: mogućnost dobivanja jajnih stanica od visokokvalitetnih kobila i oplodnja sa spermom različitih pastuha, tako da se dobije jedan

faktorijalni dizajn kojim se ne povećava toliko inbreeding. Postotak gravidnosti nakon transfera svježih zametaka kreće se od 50 do 60%, a kod transfera zamrznutih/odmrznutih zametaka taj je postotak znatno niži te ne prelazi 35% (Ohlweiler, 2012.). Učinkovita proizvodnja zametaka in vitro preduvjet je za primjenu biotehnologije četvrte generacije: kloniranja, transgeneze, određivanja spola potomstva i dr.

11. Kloniranje

Kloniranje uvrštavamo u nove reproduktivne tehnike kojom dolazi do proizvodnje genetski identične jedinke. Postoje dvije osnovne metode kloniranja: kloniranje rasijecanjem zigote te kloniranje zamjenom jezgre stanice jezgrom somatske stanice. Kloniranje rasijecanjem zigote je jednostavna metoda ukoliko se pravilno pripreme kobile donori i recipijenti. Kod kloniranja zamjenom jezgre jajne stanice jezgrom somatske stanice jedinka koja nastane je potpuno identična donoru jezgre. Tehnika je vrlo napredovala posljednjih godina, ali se ne koristi u praksi radi tehničkih problema te etničkih dvojbi. Kloniranje bi veliku korist moglo donijeti malim i ugroženim populacijama konja (Ivanković, 2004.).

Prvi klonirani konj je bio Prometea kojeg su 2003. klonirali u Italiji (Bhattacharya, 2003.). Dok je prvi klonirani konj Latinske Amerike kloniran 2010. godine. Daniel Salamone, jedan od sudionika, rekao je da je napravljen od stanica kože odraslog konja te da je savršenog zdravlja. Laboratorij američkog sveučilišta u Kaliforniji potvrdio je da su genetski profili ždrijebeta i donora potpuno identični. Ždrijebe pripada vrsti Nandubay i zove se BS Nandubay Bicentenary. Znanstvenici su uzeli uzorak kože drugog Nandubaya i spojili jajašcem donora kojem su prije otklonili sav genetski materijal. Embrio koji je nastao injektiran je u maternicu kobile.

12. Seksiranje embrija i spermija

Metodama genetskog testa lančane reakcije polimeraze (PCR testa), kojim se utvrđuje prisutnost spolnog kromosoma, seksiranje embrija u današnje vrijeme je moguće u vrlo ranoj fazi razvoja. Seksiranje spermija omogućava dobivanje željenog spola potomka.

Bitna spoznaja kod seksiranja spermija je da spermiji s X-kromosomom imaju 3,8% više DNK nego Y-spermiji, što im daje veću masu. U postupku razdvajanja spermiji se propuštaju kroz usku ¨kolonu¨ pri čemu im se u prolazu automatski računalno procjenjuje masa te se nakon toga laserski razdvajaju. Kod ove tehnike razdvajanja spermija bitno je znati da je vrlo spora te skupa, stoga zasad nema praktičnu širu primjenu.

Spektrofotometrija je druga tehnika seksiranja spermija. Zapaženo je da kod X i Y kromosoma dolazi do različitog reflektiranja određene valne dužine laserskog osvjetljenja. Nakon propuštanja kroz kolonu, detektira ih se te se razdvajanjem postiže čistoća doze 85 do 90%.

13. Zaključak

Primjena suvremenih biotehničkih metoda u reprodukciji kobila doprinosi bržem razvoju i unapređenju genetske osnove, povećanju proizvodnje i poboljšanju plodnosti konja. Prva generacija biotehnoloških metoda bila je umjetno osjemenjivanje, druga generacija embriotransfer, treća proizvodnja zametaka in vitro i srodne tehnologije, a četvrta manipulacija genomom uz pomoć transgeneze. U Republici Hrvatskoj najzastupljenija je prva generacija, odnosno umjetno osjemenjivanje.

Određivanje rane dijagnoze gravidnosti doprinosi smanjenju intervala između dva porođaja i uštedi hranidbenih dana po dobijenom potomstvu. Zbog takvih prednosti koje donosi umjetno osjemenjivanje sve se više vlasnika konja odlučuje za takav pripust. Umjetno osjemenjivanje ima i svoje nedostatke, najveći nedostatak je u ekonomskom smislu. Sjeme vrlo kvalitetnih pastuha dostižu velike cijene, također može doći do problema prilikom apliciranja sjemena zbog nestručnog rada, zbog toga je vrlo važno da to obavlja veterinar a ne vlasnik ili neka druga osoba. Zbog prednosti koje donosi umjetno osjemenjivanje važno je da se vlasnike konja o tome poduči putem raznih okupljanja, izlaganjima seminara i druženja, kako bi se Hrvatsko konjogojstvo razvilo što bolje, te kako bi imali kvalitetne konje za razna natjecenja, također pomoću umjetno osjemenjivanja možemo spasiti naše tri autohtone pasmine konja.

14. Literatura

1. Brinzej, M.; Caput, P.; Čaušević, Z.; Jurić, I.; Kralik, G.; Mužic, S.; Nikolić, M.; Petričević, A.; Srećković, A.; Steiner, Z. (1991): Stočarstvo, Zagreb.
2. Bhattacharya, S. (2003): World's first cloned horse is born. Dostupno na: http://www.newscientist.com/article/dn4026-worlds-first-cloned-horse-is-born.html#.VAMwivl_v4Y
3. Brinzej, M. (1980): Konjogojstvo, Školska knjiga, Zagreb.
4. Getz, I.: Spolni ciklus kobila. Dostupno na: 6. http://www.vef.unizg.hr/org/porodnistvo/studenti/materijali/SPOLNI_CIKLUS_KOBILA.pdfhttp://www.vef.unizg.hr/org/porodnistvo/nastava/seminari/SPOLNI_CIKLUS_KOBILE.pdf
5. Grizelj J.; Grizelj A.; Getz I.; Prvanović N.;, Vince S.; Turmalaj L.; Gjino P.; Samardžija M.; Belić M.; Lipar M.; Dobranić T. (2008): Umjetno osjemenjivanje kobila - ogledan primjer suradnje veterinara i uzgajivača, 2. Hrvatski simpozij o lipicanskoj pasmini, Đakovo.
6. Gverić, A. (2005): Porodništvo domaćih životinja, Školska knjiga, Zagreb.
7. Hopkins F.; Meadows D. (2003): Embryo transfers in Mares. The University of Tennessee Agricultural Extension Service, Equifacts,THN-1003.
8. Ivanković A. (2004): Konjogojstvo, Hrvatsko agronomsko društvo, Zagreb.
9. Makek, Z.; Getz, I.; Prvanović, N.; Tomašković, A.; Grizelj, J. (2009): Rasplođivanje konja, Zagreb.
10. McCall, J. (2007): Stallion management. Dostupno na: http://www.horsecoursesonline.com/college/stallion/lesson_seven_164.html
11. Ocjene ejakulata i spermija. (2011) Dostupno na: http://porodnistvo.vef.unizg.hr/wpcontent/uploads/2011/04/ocjena_ejakulata_i_spermija_I.pdf
12. Paršutin, G.V.; Skatkin, P.N. (1949): Veštačko osemenjivanje i opasivanje kobila, Poljoprivredno izdavačko poduzeće - Beograd, Beograd.
13. Prvanović, N.; Franko, P.; Orak, A.; Getz, I.; Dobranić, P.; Grizelj, J.; Folnožić, I.; Bačić, G.; Karadjole, T.; Samardžija, M. (2012): Analiza postojećeg stanja i mogućnosti primjene umjetnog osjemenjivanja konja u Republici Hrvatskoj, Veterinarska stanica, Zagreb.

14. Prvanović Babić, N., Getz, I., Grizelj, J., Bačić, G., Mačešić, N., Karadjole, T., Baban, M., Korabi, N., Samardžija, M., Dobranić, T. (2014.): Primjena metoda asistirane reprodukcije u hrvatskih autohtonih i sportskih pasmina konja. 7. Međunarodni znanstveno-stručni skup, Poljoprivreda u zaštiti prirode i okoliša, 28. – 30. svibnja, Vukovar, 122 – 126.
15. Scherzer, J. (2011): Artificial Insemination and Embryo Transfer in Mares. Dostupno na: https://www.vetlearn.com/_preview?_cms.fe.previewId=1d0ecee0-ac91-11e0-8712-0050568d3693
16. Sellers, F. (2011): Advantages of Embryo Transfer for Both Mare and Owner. Dostupno na : http://equimed.com/health-centers/reproductivecare/articles/advantages-of-embryo-transfer-for-both-mare-and-owner
17. Veselinovič, S.; Miljković, V.; Ivančev, N.; Ivančev, A.; Veselinović, S.; Medić, D.; Petrujkić, T.; Mićić, R. (2001.): Povećanje plodnosti krava i kobila, Simpozijum - Banja Luka, Srbija.

15. Sažetak

Biotehnologija rasplođivanja podrazumijeva zahvate kojima pod kontroliranim uvjetima vršimo rasplođivanje životinja i utječemo na genetsku selekciju širenjem poželjne genetike. Prva generacija biotehnologije rasplođivanja je umjetno osjemenjivanje, druga je embriotransfer, treća proizvodnja zametaka in vitro dok je četvrta manipulacija genomom uz pomoć transgeneze i kloniranja. Danas se konje ne uzgaja ponajprije s namjenom proizvoda, nego kao životinje za visokoprofilirani sport te užitak i osobno zadovoljstvo uzgajivača. Upravo zbog toga postoji potreba i želja za najvišom razinom selekcije odnosno u rasplod idu isključivo najuspješniji primjerci rasplodnih kobila i pastuha, iznad prosječnih rezultata u sportu, u eksterijernim kvalitetama, zadovoljavajućeg temperamenta i ćudi. Kako takve životinje nerijetko nisu i idealne za rasplod, često je potrebno intervenirati primjenom različitih metoda asistirane reprodukcije.

Ključne riječi: konj, reprodukcija, biotehnologija, umjetno osjemenjivanje

16. Summary

Reproductive biotechnologies implies controlled conditions in which we perform reproduction of animals and affect gene selection by expanding desirable genetics. First generation of biotechnology is artificial insemination, second is embryotransfer, third is in vitro embryo production and fourth is manipulation of the genome with the help of transgenesis and cloning. The horses are not grown primarily for the purpose of the product, but as animals for high-profiled sport and personal satisfaction breeders. Because of its value in use, there is a need and desire for the highest level of selection and breeding, where goes relatively the most successful examples of breeding mares and stallions, above average results in sport, exterior qualities, satisfactory temperament and temper. As such animals are often not ideal for breeding and it is often necessary to intervene by applying various methods of assisted reproduction.

Key words: horse, reproduction, biotechnology, artificial insemination

17. Popis slika

Slika 1. Spolni organi kobile…….....…...3
Slika 2. Pokušalište 5
Slika 3. Ciklus estrusa.....8
Slika 4. Postupak U.O.....11
Slika 5. Uzimanje ejakulata umjetnom vaginom.....12
Slika 6. Umjetna vagina 14
Slika 7. Dva tipa katetera za UO kobila svježim sjemenom te brizgalica od 20mL.....19
Slika 8. Vrh katetera za UO svježim sjemenom s zaštitnom košuljicom.....20
Slika 9. Vrh katetera za UO smrznutim/otopljenim sjemenom s košuljicom i mandrenom.....20
Slika 10. Metoda osjemenjivanja kobila.....21
Slika 11. Shema oplodnje In Vitro.....25

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište J.J. Strossmayera u Osijeku
Poljoprivredni fakultet u Osijeku
Završni rad

Primjena biotehnologije u rasplođivanju kobila
Assisted reproductive technologies applied to the horse industry
Pamela Dukarić

Sažetak
Biotehnologija rasplođivanja podrazumijeva zahvate kojima pod kontroliranim uvjetima vršimo rasplođivanje životinja i utječemo na genetsku selekciju širenjem poželjne genetike. Prva generacija biotehnologije rasplođivanja je umjetno osjemenjivanje, druga je embriotransfer, treća proizvodnja zametaka in vitro dok je četvrta manipulacija genomom uz pomoć transgeneze i kloniranja. Danas se konje ne uzgaja ponajprije s namjenom proizvoda, nego kao životinje za visokoprofilirani sport te užitak i osobno zadovoljstvo uzgajivača. Upravo zbog toga postoji potreba i želja za najvišom razinom selekcije odnosno u rasplod idu isključivo najuspješniji primjerci rasplodnih kobila i pastuha, iznad prosječnih rezultata u sportu, u eksterijernim kvalitetama, zadovoljavajućeg temperamenta i ćudi. Kako takve životinje nerijetko nisu i idealne za rasplod, često je potrebno intervenirati primjenom različitih metoda asistirane reprodukcije.

Ključne riječi
konj, reprodukcija, biotehnologija, umjetno osjemenjivanje

Summary
Reproductive biotechnologies implies controlled conditions in which we perform reproduction of animals and affect gene selection by expanding desirable genetics. First generation of biotechnology is artificial insemination, second is embryotransfer, third is in vitro embryo production and fourth is manipulation of the genome with the help of transgenesis and cloning. The horses are not grown primarily for the purpose of the product, but as animals for high-profiled sport and personal satisfaction breeders. Because of its value in use, there is a need and desire for the highest level of selection and breeding, where goes relatively the most successful examples of breeding mares and stallions, above average results in sport, exterior qualities, satisfactory temperament and temper. As such animals are often not ideal for breeding and it is often necessary to intervene by applying various methods of assisted reproduction.

Key Words
horse, reproduction, biotechnology, artificial insemination

Datum obrane: