POTPOMOGNUTA OPLODNJA – MOGUĆNOST PRIMJENE U ZAŠTITI UGROŽENIH VRSTA

Plačković, Jelena

Undergraduate thesis / Završni rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Department of biology / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za biologiju**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:181:292545

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-21**

ODJEL ZA BIOLOGIJU
Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Repository / Repozitorij:

Repository of Department of biology, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Odjel za biologiju

Preddiplomski sveučilišni studij Biologija

Jelena Plačković

Potpomognuta oplodnja – mogućnost primjene u zaštiti ugroženih vrsta

Završni rad

Mentor: Dr. sc. Dubravka Čerba, doc.

Osijek, 2019.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA **Završni rad**
Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Odjel za biologiju
Preddiplomski sveučilišni studij Biologija
Znanstveno područje: Prirodne znanosti
Znanstveno polje: Biologija

POTPOMOGNUTA OPLODNJA – MOGUĆNOST PRIMJENE U ZAŠTITI UGROŽENIH VRSTA

Jelena Plačković

Rad je izrađen na Zavodu za ekologiju voda, Odjel za biologiju

Mentor: Dr. sc. *Dubravka Čerba*, **doc.**

Kratak sažetak završnog rada:

Brojne životinjske vrste na Zemlji su životno ugrožene. Napretkom industrije i tehnologije čovjek negativno djeluje na okoliš pa tako i na ubrzani nestanak pojedinih vrsta životinja iz prirode. Međutim, novi znanstveni napretci u području biotehnologije mogu riješiti taj problem. U ovom završnom radu predloženo je i objašnjeno nekoliko metoda potpomognute oplodnje koje uključuju umjetnu oplodnju i *in vitro* oplodnju, ali i nekoliko dodatnih metoda kao što su mikromanipulacije gameta i embrija, *sexing* metode određivanja spola potomka i metoda kloniranja. Spomenute tehnike potpomognute oplodnje pokazale su se uspješnima u zaustavljanju negativnog trenda povećanja broja životinjskih vrsta koje se nalaze na rubu izumiranja.

Broj stranica: 22

Broj slika: 10

Broj tablica: 3

Broj literaturnih navoda: 15

Web izvor: 11

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: umjetna oplodnja, *in vitro* oplodnja, mikromanipulacija, kloniranje

Rad je pohranjen: na mrežnim stranicama Odjela za biologiju te u Nacionalnom repozitoriju završnih i diplomskih radova Nacionalne i sveučilišne knjižnice u Zagrebu.

BASIC DOCUMENTATION CARD **Bachelor thesis**

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek
Departmant of Biology
Undergraduate university study programme in Biology
Scientific Area: Natural sciences
Scientific Field: Biology

ASSISTED FERTILIZATION – THE POSSIBILITIES OF ITS APPLICATION IN THE PROTECTION OF ENDANGERED SPECIES

Jelena Plačković

Thesis performed at the Subdepartment of Water Ecology, Department of Biology

Supervisor: Dr.sc. Dubravka Čerba, **Assist. Prof.**

Short abstract:

Numerous animal species on Earth are endangered. By advancing industry and technology, humans have a negative impact on the environment and so on the rapid disappearance of some animal species from their natural habitats. However, new scientific advances in biotechnology can solve this problem. Several methods of assisted fertilization, including artificial fertilization and in vitro fertilization, as well as several additional methods, such as gamete and embryo micromanipulation, sexing the progeny method and the cloning method, are suggested and explained in this bachelor thesis. This assisted fertilization techniques have proven to be successful in stopping the negative trend of increasing the number of animal species on the margins of extinction.

Number of pages: 22

Number of figures: 10

Number of tables: 3

Number of references: 15

Web source: 11

Original in: Croatian

Key words: artificial insemination, *in vitro* fertilization, micromanipulation, cloning

Thesis deposited: on the Department of Biology website and the Croatian Digital Theses Repository of the National and University Library in Zagreb.

SADRŽAJ

1. UVOD 1
2. UMJETNA OPLODNJA 3
2.1. Općenito o metodi umjetne oplodnje 3
2.2. Prikupljanje sperme 4
2.3. Obrada sperme 4
2.4. Produžavanje životnog vijeka spermija 5
2.4.1. Hlađenje i hladni šok 5
2.4.2. Krioprezervacija 6
2.4.3. Obustavljanje metaboličkih funkcija spermija 7
2.5. Poticanje ovulacije i oplodnja 7
2.5.1. Indukcija ovulacije 7
2.5.2. Oplodnja 7
2.6. Primjena metode umjetne oplodnje 8
2.6.1. Primjena umjetne oplodnje na velikoj pandi (*Ailuropoda melanoleuca*) 8
3. *IN VITRO* OPLODNJA (IVF) 9
3.1. Općenito o metodi *in vitro* oplodnje 9
3.2. *In vitro* sazrijevanje jajnih stanica (IVM) 9
3.3. Postupak IVF metode 10
3.4. Prijenos embrija 11
3.5. Primjena IVF metode 12
3.5.1. Primjena IVF metode na azijskom muflonu (*Ovis orientalis*) 12
4. MIKROMANIPULACIJE GAMETA I EMBRIJA 12
5. *SEXING* – METODA ODREĐIVANJA SPOLA POTOMKA 14
6. KLONIRANJE – SCNT metoda 16
6.1. Općenito o metodi kloniranja 16
6.2. Postupak metode kloniranja 16
6.3. Uspješnost SCNT metode kloniranja 18
7. ZAKLJUČAK 19
8. LITERATURA 20

1. UVOD

Brojne životinjske vrste na našem planetu se kategoriziraju kao ugrožene. Zagađivanje okoliša, uništavanje staništa i pretjerani izlov životinja ili držanje u zatočeništvu, samo su neki od faktora koji dovode do smanjivanja broja i raznolikosti životinjskih vrsta (Paulson i Comizzoli, 2018). Izumiranje je proces koji se prirodno odvija od postanka života kroz proces evolucije i irevezibilan je, no danas se odvija mnogo brže i učestalije pod utjecajem antropogenih aktivnosti (Andrabi i Maxwell, 2007). Izravan ili neizravan, ljudski utjecaj na prirodu ima snažan utjecaj na gotovo svaki aspekt koji je doveo do izumiranja životinja (Wagler, 2018). Glavni cilj konzervacije životinjskih vrsta je očuvanje bioraznolikosti budući da izumiranje samo jedne vrste može poremetiti čitav ekosustav (Paulson i Comizzoli, 2018). Od postanka Zemlje odvilo se pet masovnih izumiranja koja su bila okarakterizirana ogromnim gubitkom biološke raznolikosti u veoma kratkom vremenu (Wagler, 2018). Potaknut dobivenim informacijama o povećanju broja životno ugroženih vrsta, Wagler (2018) navodi kako smo ušli u novo – šesto masovno izumiranje. Podaci Međunarodne unije za očuvanje prirode i prirodnih resursa, prikazani u Tablici 1 i Tablici 2, pokazuju povećanje broja ugroženih i kritično ugroženih vrsta (Web 1).

Tablica 1. Prikaz broja ugroženih vrsta životinja od 1996. do 2019. godine (preuzeto i prilagođeno s mrežne stranice: Web 1).

	Ugrožene vrste				
Godina	Sisavci	Ptice	Gmazovi	Vodozemci	Ribe
2019	491	469	514	924	678
2018	482	469	515	903	674
2017	476	461	484	869	676
2016	464	448	421	852	660
2015	481	416	361	810	614
2014	477	419	356	789	587
2013	447	397	329	783	530
2012	446	389	296	767	494
2011	447	382	284	764	477
2010	450	372	200	758	400
2009	449	362	150	754	298
2008	448	361	134	755	269
2007	349	356	139	737	254
2006	348	351	101	738	237
2004	352	345	79	729	160
2003	337	331	78	37	144
2002	339	326	79	37	143
2000	340	321	74	38	144
1996/1998	315	235	59	31	134

Tablica 2. Prikaz broja kritično ugroženih vrsta životinja od 1996. do 2019. godine (preuzeto i prilagođeno s mrežne stranice: Web 1).

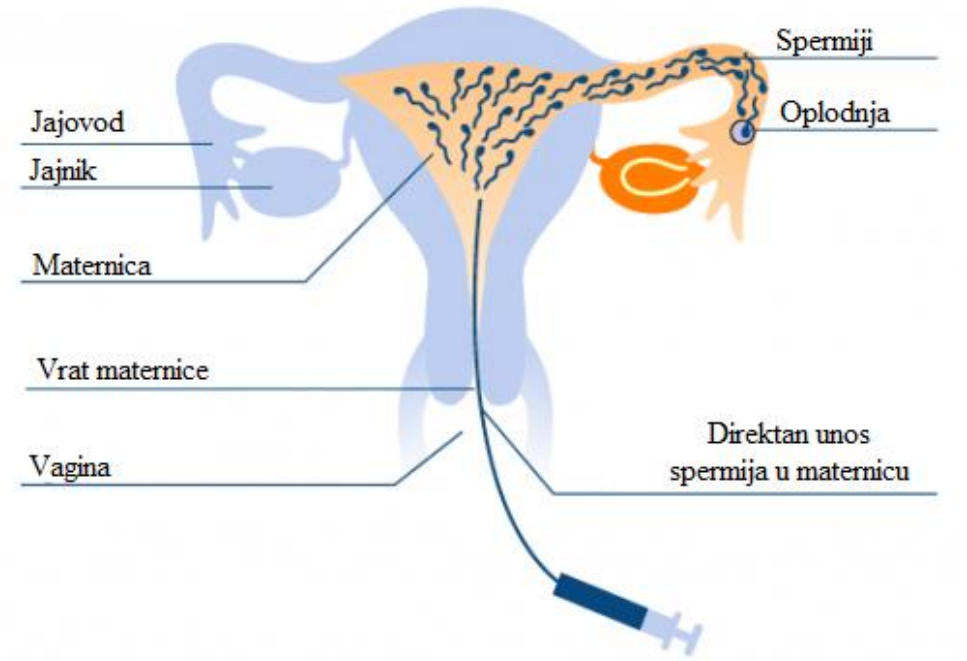
Kritično ugrožene vrste					
Godina	Sisavci	Ptice	Gmazovi	Vodozemci	Ribe
2019	202	224	293	567	489
2018	201	224	287	550	486
2017	202	222	266	552	468
2016	204	225	237	546	461
2015	209	218	180	528	446
2014	213	213	174	518	443
2013	196	198	164	520	413
2012	196	197	144	509	415
2011	194	189	137	498	414
2010	188	190	106	486	376
2009	188	192	93	484	306
2008	188	190	86	475	289
2007	163	189	79	441	254
2006	162	181	73	442	253
2004	162	179	64	413	171
2003	184	182	57	30	162
2002	181	182	55	30	157
2000	180	182	56	25	156
1996/1998	169	168	41	18	157

Metoda potpomognute oplodnje je način kojim se umjetno nastoji potaknuti oplodnja jedinke (Pergament, 2019). *In situ* metoda oslanja se na zaštitu životinja u njihovom prirodnom staništu, njegovim očuvanjem ili zaštitom jedinki od predatora. Iako može predstavljati napredak u pogledu povećanja životinjskih populacija, ovaj način očuvanja bioraznolikosti ne osigurava zadovoljavajuću brojnost mladih i njihovu genetičku raznolikost. Moderne tehnologije potpomognute oplodnje uključuju: umjetnu oplodnju, *in vitro* oplodnju i prijenos embrija u maternicu; zatim dodatne metode mikromanipulacije gameta i embrija, skladištenje genetičkih materijala te djelovanje na spermu i embrij prije unosa u maternicu. Još jedan od predloženih načina očuvanja ugroženih vrsta, a stvoren kao rezultat napretka biologije i tehnologije, je kloniranje somatskim staničnim nuklearnim transferom. Moderne metode potpomognute oplodnje mogu pravilnim odabiranjem roditeljskih jedinki postići stvaranje većeg broja potomaka i osigurati njihovu genetičku raznolikost. Na taj način metode potpomognute oplodnje imaju primjenu u zaštiti ugroženih vrsta (Andrabi i Maxwell, 2007).

2. UMJETNA OPLODNJA

2.1. Općenito o metodi umjetne oplodnje

Jedan od načina potpomognute oplodnje je umjetna oplodnja za čiju se uspješnu primjenu moraju zadovoljiti tri uvjeta: prvo, potrebno je točno utvrditi plodno razdoblje ženke u vremenu kada su njene oocite potpuno zrele i spremne za oplodnju; drugo, spermiji u određenom broju te morfološkoj i fiziološkoj kvaliteti moraju preživjeti izvan tijela mužjaka; i treće, spermiji se pravilno trebaju uvesti u spolni sustav ženke kako bi se ostvarila prihvatljiva stopa začeća (Slika 1). Ovisno o stupnju zadovoljenja tih uvjeta, ovisi i uspješnost metode koja varira od vrste do vrste. Tako se i metoda umjetne oplodnje na pojedinoj životinjskoj vrsti koristi više ili manje ovisno o uspješnosti oplodnje (Parkinson i Morrell, 2019). Prilikom određivanja plodnog razdoblja i unosa sperme, utjecaj i modifikacija prirodnog ciklusa i djelovanje na hormone ženke nije nužno. Budući da oocite sazrijevaju i oplođuju se unutar ženke te embriji nisu podvrgnuti *in vitro* uvjetima, izostavljeno je moguće djelovanje epigenetskih učinaka na ženske gamete (Durrant, 2009).



Slika 1. Pojednostavljen prikaz metode umjetne oplodnje
(preuzeto i prilagođeno s mrežne stranice: Web 2).

Normalan ciklus uključuje kretanje jajne stanice do jajovoda, a do oplodnje dolazi ukoliko je do oocite stigao dovoljan broj zdravih spermija. Daljnje premještanje u maternicu ovisi o interakcijama majke i potomka te njihovih odgovara na novonastale kemijske signale

uslijed oplodnje. Zbog toga se mogući izostanak gravidnosti nakon primjene ove metode pripisuje genetičkim poremećajima embrija ili neoptimalnim nutritivnim, anatomskim i fiziološkim uvjetima prisutnim za vrijeme oplodnje, a isključuje utjecaj metode umjetne oplodnje na embrij. Ova metoda primjer je najmanje invazivne reproduktivne tehnike kojom se nastoji povećati broj potomaka i pospješiti prijenos gena u populaciji. Kao takva, metoda se primjenjuje, među ostalim životinjama, i kod ugroženih vrsta (Durrant, 2009).

2.2. Prikupljanje sperme

Prvi i esencijalni korak ove metode je prikupljanje sperme zadovoljavajuće brojnosti i kvalitete spermija. Može se obaviti ručno, uključujući kloakalnu ili rektalnu masažu te masturbaciju i elektroejakulaciju, ali i korištenjem modela ženskog reproduktivnog sustava. Ručno prikupljanje ejakulata je osjetljiv proces gdje je mužjaka potrebno fizički ukrotiti i smiriti pa se zbog toga ugroženim životinjama u ovom koraku pristupa na visokoj razini opreza. Metoda je najuspješnije primjenjivana na vrstama velikih kopitara, morskih sisavaca, zmija i ptica. Ovaj korak može biti osjetljiv za sve vrste životinja budući da je ljudski kontakt i blizina neophodan dio procesa (Durrant, 2009). Elektroejakulacija je metoda kojom se elektrodama podražuju centri za ejakulaciju te je smišljena kao moguće rješenje ovog problema, a primjenjuje se uspješno kod velikog broja sisavaca, nekih vrsta ptica i zmija. Interakcija čovjeka i životinje se smanjuje, a stres i bol uzrokovani procesom umanjuju se korištenjem hormona, anestetika i sedativa (Abril-Sánchez i sur., 2019). Sjeme je moguće prikupiti i nakon smrti jedinke, a sama njegova kvaliteta ovisi o vremenskom periodu koji je prošao od smrti do uzimanja uzorka iz tijela, zdravstvenom stanju mužjaka u trenutku smrti i načinu skladištenja sjemena. Uzorak se uzima iz pasjemenika, a način skladištenja se razlikuje od skladištenja sjemena dobivenog ejakulacijom (Durrant, 2009).

2.3. Obrada sperme

U većini slučajeva, prije direktnog unosa sperme u ženku, provode se procjene kvalitete spermija koje uključuju provjeru njihovog broja, morfologije i pokretljivosti. Često sperma sadrži mnogo više spermija nego što je potrebno za začeće pa je razrjeđivanje jedan od koraka koji se provodi prije početka oplodnje. Tako razrijeđena sperma se može primijeniti na više ženki. Postupak razrjeđivanja nije posve jednostavan budući da spermiji postavljeni u osnovna sredstva za razrjeđivanje pokazuju smanjenu pokretljivost. Taj fenomen je poznat kao „učinak razrjeđivanja“ i dovodi do gubitka vijabilnost stanice spermija. To je

posljedica ispiranja strukturnih komponenti njegove stanične membrane (Parkinson i Morrell, 2019). Osmotski tlak i pH vrijednost su parametri koje također treba uzeti u obzir prilikom obrade sperme. Budući da su spermiji stanice koje imaju uski raspon tolerancije na pH, puferski agensi glavne su komponente razrjeđivača. Osmotski tlak bitan je faktor koji utječe na vijabilnost spermija, gdje je uvaženo da hiperosmotski razrjeđivači imaju povoljniji utjecaj na samu stanicu. Uz puferske agense i ionske komponente razrjeđivača, proteini i šećeri važni su dodaci koji osiguravaju hranu i pružaju zaštitu spermijima prilikom zamrzavanja. Kao i sve što nas okružuje, spermiji su izloženi bakterijama pa se prilikom obrade sperme ubacuju i antibiotici kao preventivna mjera prijenosa patogenih bakterija i njihovog štetnog djelovanja na kvalitativno i kvantitativno stanje spermija. Ukoliko se oplodnji i unosu sjemena u ženku ne pristupa odmah, sjeme se podvrgava hlađenju na nižim temperaturama. U tom slučaju unošenje dodatnih makromolekula nije potrebno (Parkinson i Morrell, 2019).

2.4. Produžavanje životnog vijeka spermija

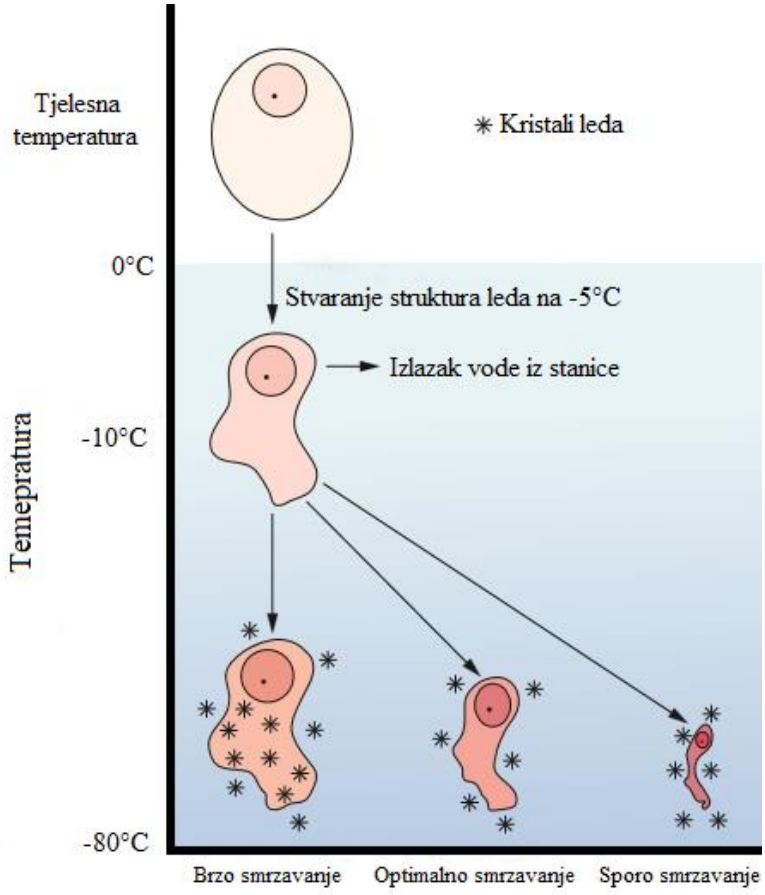
Uspješnost oplodnje najveća je uslijed korištenja svježe prikupljene sperme, ali zamrzavanje sjemena neposredno nakon uzorkovanja omogućuje njegovu primjenu u oplodnji i kasnije (Durrant, 2009). Životni vijek spermija može se produžiti na tri osnovna načina (Parkinson i Morrell, 2019). Svaka životinjska vrsta i njen genetički materijal ima različite zahtjeve i potrebe prilikom skladištenja sjemena pa se svaki dio procesa mora prilagoditi određenoj vrsti. Dugotrajno skladištenje sjemena postao je važan dio plana za uzgoj i zaštitu ugroženih životinja (Durrant, 2009).

2.4.1. Hlađenje i hladni šok

Prva metoda uključuje očuvanje spermija u tekućem obliku hlađenjem na temperaturu znatno ispod temperature okoliša, odnosno, s normalne tjelesne do temperature od 5°C. Niže temperature imaju ulogu smanjiti metaboličke aktivnosti stanice gdje se ni pri opreznijem i sporijem načinu snižavanja temperature štetan učinak „hladnog šoka“ ne može potpuno izbjeći. Šok nanosi štetu staničnoj membrani, a posljedica je istjecanje važnih unutarstaničnih iona i proteina. Najučinkovitiji način zaštite od štetnih učinaka hlađenja je dodavanje komponenti s makromolekulama koje sprečavaju oštećenje membrane. Takve makromolekule stvaraju dodatni ovoj oko membrane ili produciraju dodatne fosfolipide koji se oštete djelovanjem niskih temperatura (Parkinson i Morrell, 2019).

2.4.2. Krioprezervacija

Zamrzavanje ili krioprezervacija je primjer dugotrajnog skladištenja sjemena (Slika 2). Metoda održava život spermija gotovo neograničeno. Kemikalije koje se dodaju u postupku sadrže inače za spermije štetan glicerol ili manje štetan etilen koji pružaju zaštitu od nastajućih kristala leda za koje se zapliću dugački repovi spermija. Postupak preživljava manje od 50% spermija prisutnih prije krioprezervacije, dok se kod onih preživjelih mogu pojaviti morfološke promjene koje utječu na trajanje njihovog preživljavanja u spolnom sustavu ženke. Još jedna metoda krioprezervacije, vitrifikacija, pokazala se uspješnom i kod stanica koje ne preživljavaju standardne metode dugoročnog zamrzavanja jer tekućinu pretvara u krutinu bez stvaranja kristala leda. Standardno upotrebljavana metoda koja održava plodnost spermija neoštećenom je zamrzavanje u tekućem dušiku na -196°C (Parkinson i Morrell, 2019).



Slika 2. Smanjivnje stanice spermija postupkom krioprezervacije (preuzeto i prilagođeno prema: Parkinson i Morrell, 2019)

2.4.3. Obustavljanje metaboličkih funkcija spermija

Obustavljenje metaboličkih aktivnosti spermija na sobnim ili nižim temperaturama je izrazito bitna metoda kod spermija životinjskih vrsta koji ne podnose niske temperature. Metoda se ostvaruje na različite načine: smanjenjem pH do vrijednosti 5,5; dodatkom dušika koji inhibira pokretljivost spermija ili dodatkom posebne kombinacije pufera, glukoze i antibiotika koji održavaju stanice na životu nekoliko dana (Parkinson i Morrell, 2019).

2.5. Poticanje ovulacije i oplodnja

2.5.1. Indukcija ovulacije

Ovulacija je jedinstven i biološki precizan proces koji je prilagođen svakoj životinjskoj vrsti, a određen je otpuštanjem zrele jajne stanice iz jajnika ženke. Kao esencijalan dio oplodnje, ovaj proces je ključno pratiti prilikom unošenja sjemena u reproduktivni sustav ženke (Richards, 2018). Kako bi se stimulirao rast folikula jajnika i inducirala ovulacija, hormon gonadotropin i gonadotropin otpuštajući faktor se unose u organizam ženke. Lutenizirajući hormon (LH) i humani korionski gonadotropin (hcG) se također koriste u indukciji ovulacije. Ovaj kontrolirani način induciranja ovulacije jednostavniji od praćenja istog procesa u *in vivo* uvjetima (Durrant, 2009).

2.5.2. Oplodnja

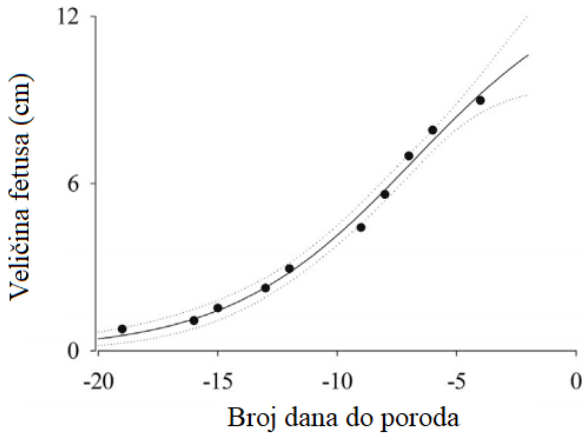
Neovisno o načinu izvođenja metode, prikupljanje sjemena i indukcija ovulacije, najproduktivniji su nakon spolnog sazrijevanja i aktivnog stvaranja spolnih stanica. Odvijanje bioloških procesa u svakoj jedinki ovisi o njenom okruženju, stoga se ovulacijski procesi jedinke u prirodnom staništu i jedinke u zatočeništvu ne moraju podudarati. Za svaku vrstu i jedinku potrebno je posebno utvrditi tijek prirodnih ciklusa kako bi se ostvarila očekivana stopa začeća. Unos sjemena u ženku mora biti usklađen s vremenom ovulacije budući da je život spermija u reproduktivnom sustavu ženke ograničen, kao i životni vijek otpuštene jajne stanice. Tijek ciklusa moguće je odrediti ultrazvučnom vizualizacijom ili manje invazivnim metodama koje uključuju praćenje koncentracija luteinizirajućeg hormona (LH) i steroidnih hormona (estrogena i progesterona) u urinu i fecesu (Durrant, 2009).

2.6. Primjena metode umjetne oplodnje

Najuspješnija primjena umjetne oplodnje u pogledu broja živorođenih jedinki bila je na životinjskim vrstama kao što su: leopard (*Panthera pardus*), azijski slon (*Elephas maximus*), afrički slon (*Loxodonta africana*), velika panda (*Ailuropoda melanoleuca*), orka (*Orcinus orca*) i crnonogi tvor (*Mustela nigripes*) (Andrabi i Maxwell, 2007). U portugalskom centru za uzgoj životinja 2017. godine ova metoda potpomognute oplodnje se prvi put počela primjenjivati na izrazito ugroženoj vrsti iberijskog risa (*Lynx pardinus*). Međutim, zbog nedovoljno informacija o konačnim rezultatima istraživanja, uspješnost primjene ove metode na iberijskom risu se sa sigurnošću ne može utvrditi. Umjetna oplodnja se kod ove vrste, ali i kod ostalih ugroženih životinja, nastoji primijeniti kako bi se ponovno potaknuo njihov život u divljini (Web 3).

2.6.1. Primjena umjetne oplodnje na velikoj pandi (*Ailuropoda melanoleuca*)

Kersey i sur. (2016) navode da je 2010. godine Zoološki vrt Atlanta proveo uspješnu primjenu metode umjetne oplodnje što je dovelo do rođenja mladunčeta ugrožene vrste - velike pande. Nakon imobilizacije anesteticima, postavljanja u dorzalni položaj i sterilizacije reproduktivnih organa, ženke su bile spremne za osjemenjivanje. Intrauterini set za osjemenjivanje im je postavljen kroz cervikalni kanal kroz koji je mješavina svježe i zamrznute elektroejakulacijom prikupljene sperme umetnuta u maternicu ženke (Kersey i sur., 2016). Kersey i sur. (2016) ističu da su promjene u morfologiji i ponašanju gravidnih ženki (nemir, izgradnja gnijezda, smanjen apetit) nastupile nakon snižavanja razina progesterona koji je važan za vezanje embrija i njegov rast (Slika 3).



Slika 3. Grafički prikaz porasta veličine fetusa u odnosu na broj dana do poroda (preuzeto i prilagođeno prema: Kersey i sur., 2016).

3. *IN VITRO* OPLODNJA (IVF)

3.1. Općenito o metodi *in vitro* oplodnje

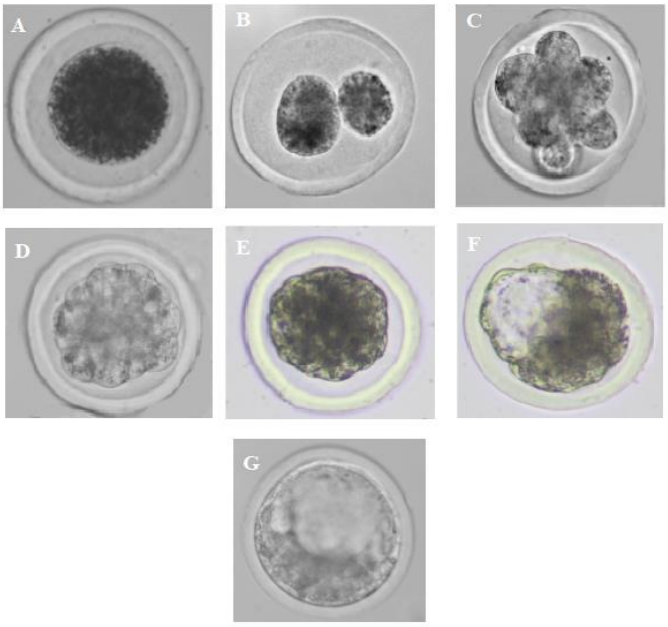
Izraz *in vitro* znači u staklu ili u umjetno stvorenim uvjetima, a IVF implicira na oplodnju oocite spermom koja se ne odvija u maternici ženke, nego izvan nje na održavanim umjetnim uvjetima. Takvi uvjeti oponašaju optimalno stanje za život i razvoj jajne stanice. Nestajanje životinjskih vrsta podrazumijeva smanjenje populacije u pogledu snižavanja njihove stope nataliteta, odnosno broja rođenih jedinki. Primjerice, jedinka koja normalnom reprodukcijom može proizvesti 4 do 5 potomaka u svom životu, upotrebom ove metode može proizvesti mnogo više. Povećanje broja potomaka i genetičkog fonda populacije glavni su ciljevi ove metode koja je promijenila i poboljšala područje biotehnologije kod ugroženih životinja (Web 4). *In vitro* oplodnja je jedan od primjera tehnologije potpomognute oplodnje koja se koristi za liječenje neplodnosti i sprječavanje prijenosa genetičkih bolesti na potomke. IVF metoda se sastoji od niza koraka, a ključne čine prikupljanje jajne stanice (obično nakon kontrole ovulacijskog ciklusa ženke) i prikupljanje sjemena mužjaka. Oba koraka nužna su za oplodnju jajne stanice izvan tijela ženke i razvijanje embrija u *in vitro* kulturi pod određenim uvjetima. Proces završava prijenosom embrija u maternicu ženke kako bi započelo razdoblje gravidnosti (Fanchin, 2018).

3.2. *In vitro* sazrijevanje jajnih stanica (IVM)

Još jedna od mogućih primjena ove metode na ugroženim vrstama divljih životinja je *in vitro* sazrijevanje oocita ili IVM. Glavna razlika u odnosu na temeljnu IVF metodu je ključan korak uzimanja jajne stanice. U ovom slučaju oocita se uzorkuje iz ženke koja neočekivano ili slučajno umire te je zbog toga tehnika nazvana „genetski oporavak“. Cilj je očuvanje genetičkih informacija jedinke u smislu očuvanja jajne stanice i njenog sazrijevanja u *in vitro* uvjetima te daljnjeg korištenja u *in vitro* oplodnji stvaranja embrija (Andrabi i Maxwell, 2007). Inkubacija nezrelih oocita *in vitro* provodi se radi njihovog sazrijevanja, međutim, nezrele jajne stanice unutar svog folikula ne mogu sazrijevati te degeneriraju, stoga se moraju izvaditi iz svog folikula. U većini slučajeva dolazi do degeneracije folikula koji ne postižu svoju zrelost pa se puni potencijal ovulacije i zrelosti jajnih stanica postiže IVF metodom. Zbog toga, IVM tehnologija pogodan je pristup za oplodnju kod jedinki koje umiru i ne mogu dovršiti svoj normalan ciklus (Web 4).

3.3. Postupak IVF metode

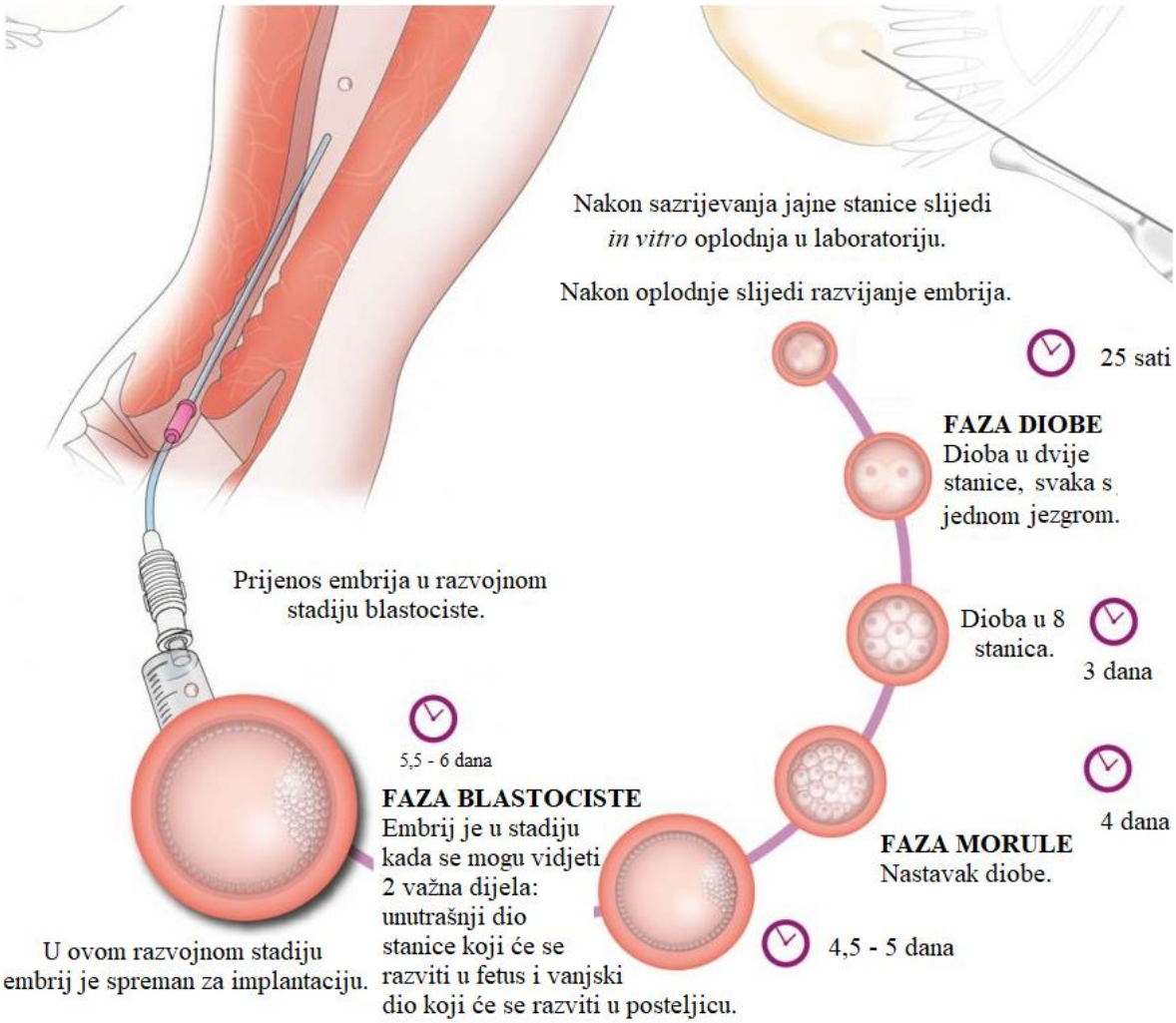
IVF metoda prije samog prijenosa embrija uključuje regulaciju hipofize, stimulaciju jajnika, iniciranje ovulacije i uzimanje oocita kod ženke te prikupljanje sperme kod mužjaka. Dodatkom kemikalija i hormona djeluje se na prirodan ciklus jedinke kako bi se postigao potpuni razvoj jajne stanice u trenutku pogodnim za oplodnju. Neposredno prije ovulacije djelovanjem hipofize povećava se koncentracija luteinizirajućeg hormona (LH). Kako bi se regulirao ciklus i stvorilo pogodno vrijeme te izbjegla pretjerana ovulacija, smanjuje se rad te žlijezde i hormona kojeg luči. Daljnja stimulacija jajnika i iniciranje ovulacije postiže se korištenjem gonadotropnih hormona. Nakon ovulacije, folikularna tekućina prikupljena iglom se analizira u potrazi za jajnim stanicama. Pronađene oocite se dalje prebacuju u mediji odgovarajućih uvjeta. Uzimanje jajne stanice odvija se pod općom anestezijom na načine koje je potrebno prilagoditi pojedinoj životinjskoj vrsti (Ramalingam i sur., 2016). Prikupljanje spreme se izvodi na slične načine kao kod metode umjetne oplodnje. Konačni korak je oplodnja jajne stanice spermijima u zajedničkom mediju i prijenos embrija u ženku (Fanchin, 2018). Medij je potrebno nadopuniti penicilaminom, hipotaurinom i epinefrinom jer olakšavaju prodiranje spermija u oocite. Nekoliko dana zametak se zadržava u *in vitro* uvjetima kako bi se razvio u stadij blastociste do kojeg se razvija embrij u mnogim laboratorijima (Slika 4) (Web 4).



Slika 4. Prikaz razvojnog stadija oplođene jajne stanice sisavaca: A – neoplođena jajna stanica, B – dvije stanice, C – 4 do 8 stanica, D – nezrela morula, E – morula, F – nezrela blastocista, G – blastocista (preuzeto i prilagođeno prema: Phillips i Jahnke, 2016).

3.4. Prijenos embrija

Neposredno prije transfera embrija u ženku provode se njegove morfološke analize. Potrebno je razlikovati neoplođenu jajnu stanicu od embrija, utvrditi kvalitetu i njegove moguće abnormalnosti te utvrditi je li stupanj razvoja embrija u skladu s njegovom starosti. Razvojem tehnologije omogućen je prijenos više nego jednog embrija, a transfer se obavlja kroz nekoliko dana od oplodnje, ovisno o vrsti životinje. Optimalan prijenos smješta embrije kroz vrat maternice u središnju materničku šupljinu s minimalnom količinom tekućine za prijenos, a postupak je u većini slučajeva bezbolan (Slika 5). Preostale zdrave embrije koji nisu preneseni u ženku moguće je sačuvati tehnikama krioprezervacije (Fanchin, 2018). Ukoliko se embrij unosi u ženku koja nije donor jajne stanice, druga primateljica embrija djeluje kao surogat majka ili udomiteljska majka. Jedinka zamjenske majke ne mijenja genetički materijal embrija i donosi potomke nakon normalnog fiziološkog razdoblja gravidnosti (Web 4).



Slika 5. Prikaz razvojnog stadija embrija sisavaca (preuzeto i prilagođeno s mrežne stranice: Web 5).

3.5. Primjena IVF metode

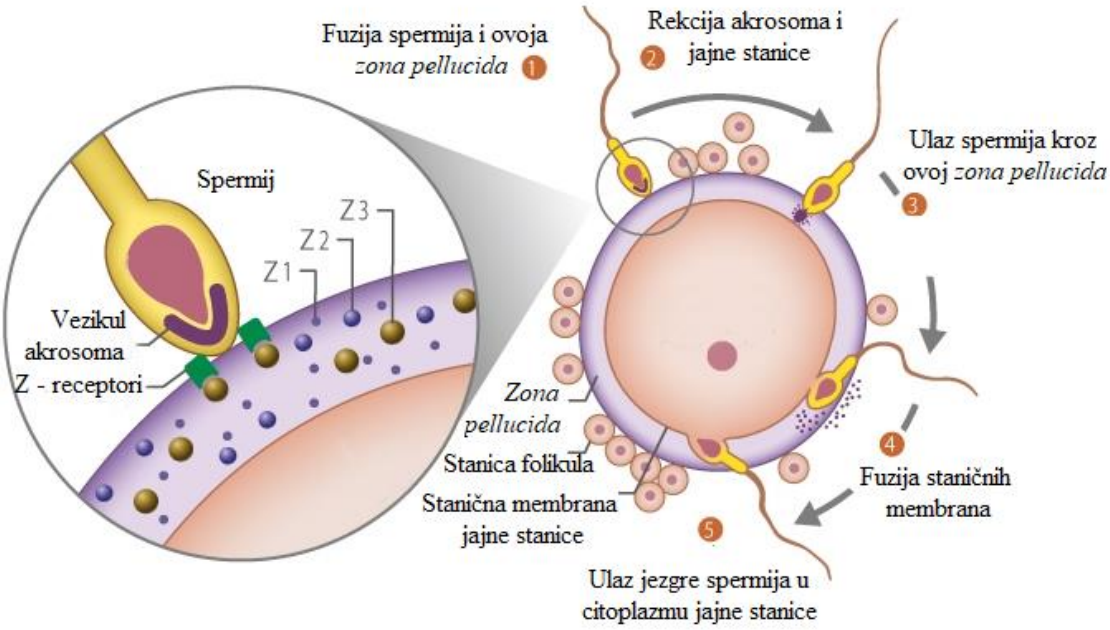
Prvi primjeri uspješnosti ove metode bili su razvoj azijskog muflona (*Ovis orientalis*) u domaćoj ovci i iberskog kozoroga (*Capra pyrenaica*) u domaćoj kozi (Andrabi i Maxwell, 2007).

3.5.1. Primjena IVF metode na azijskom muflonu (*Ovis orientalis*)

Povećanje stope proizvodnje embrija ugrožene vrste azijskog muflona omogućeno je primjenom IVF/IVM metode u kombinaciji s prijenosom embrija u domaću ovcu (Coonrod i sur., 1994). Autori Coonrod i sur. (1994) navode kako je u istraživanju sudjelovalo sedam ženki azijskog muflona. Folikuli jajnika ženki bili su vizualizirani laproskopski što je omogućilo prijenos folikularne tekućine u epruvete. Nakon sazrijevanja folikula u medij je dodana sperma čuvana na niskim temperaturama. Nakon tri do četiri dana *in vitro* kulture, razvijeni embriji bili su prebačeni u maternice primateljica. Od ukupno 7 ženki prikupljeno je 62 oocite. Nastala tri embrija prenesena su u dvije ženke muflona, ali nijedna primateljica nije ostvarila stadij gravidnosti. Preostalih 16 embrija preneseno je u 6 ženki domaće ovce, od kojih je kod tri primateljice dijagnosticirana gravidnost te je svaka od njih rodila jedinku azijskog muflona (Coonrod i sur., 1994). Ovo istraživanje je, kako navode Coonrod i sur. (1994), pokazalo kako odabir kompatibilne vrste primateljice embrija može dovesti do stvaranja željenog potomstva.

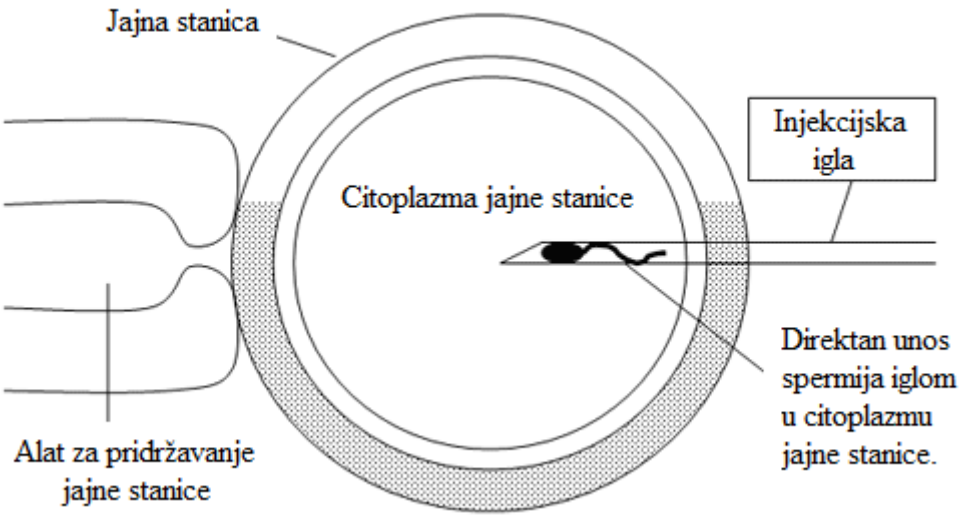
4. MIKROMANIPULACIJE GAMETA I EMBRIJA

Fuzija jajne stanice i spermija (Slika 6) nije jednostavan proces te u većini slučajeva stvara probleme tijekom prirodne, ali i potpomognute oplodnje. Usavršavanjem metoda fertilizacije, razvile su se tehnike poput mikromanipulacija koja nastoje eliminirati moguće problematične interakcije spolnih stanica. Odskočna daska razvijanju ovih metoda bila je ideja kontroliranog i direktnog ubacivanja spermija u jajnu stanicu. Jedna strategija ovih istraživanja bila je probijanje ovoja zona pellucida na jajnoj stanici tehnikom „hidrauličnog bušenja“ kiselom otopinom. Ova metoda je pokazala dobre rezultate u pogledu povećane stope oplodnje zbog lakšeg ulaska spermija i jedan je od načina poboljšanja *in vitro* fertilizacije (Malter, 2016). Druga strategija je bila ubacivanje spermija ispod razine ovoja zona pellucida, poznata i kao subzonalna inseminacija (SUZI) (Andrabi i Maxwell, 2007).



Slika 6. Prikaz fuzije spermija i jajne stanice prilikom oplodnje
(preuzeto i prilagođeno s mrežne stranice: Web 6).

Jedna od najčešće korištenih metoda je intracitoplazmatska injekcija sperme (ICSI) (Slika 7). Korištenjem mikroskopa odabire se spermij idealne kvalitete, a zatim iglom direktno ubacuje u citoplazmu pipetom fiksirane jajne stanice (Web 7).



Slika 7. Prikaz direktnog unosa spermija u jajnu stanica (preuzeto i prilagođeno s mrežne stranice Web 8).

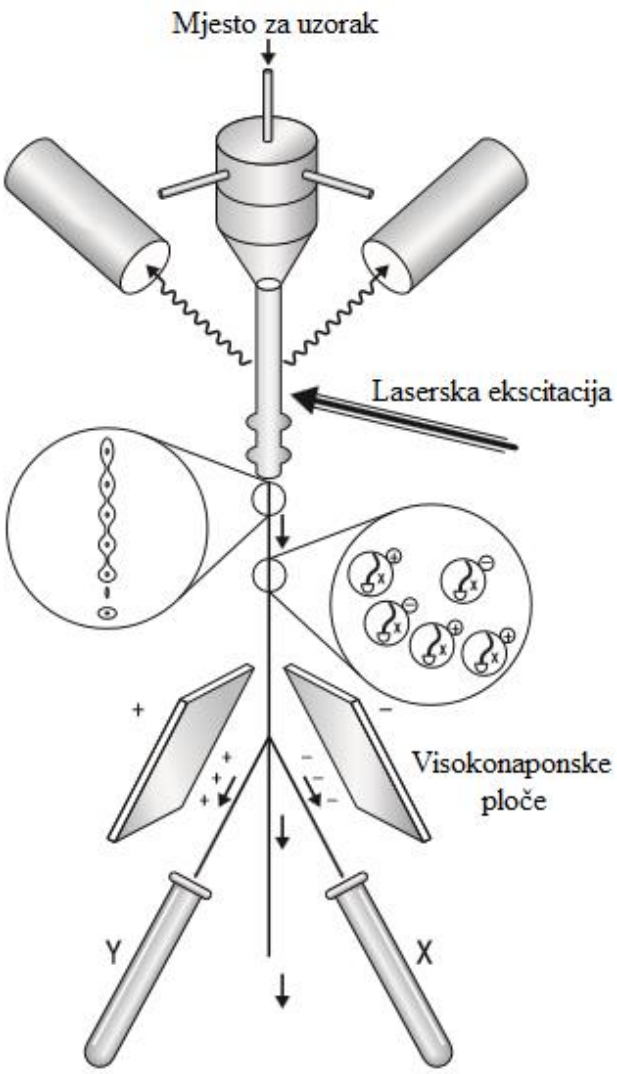
Važnost primjene ove metode kod ugroženih životinja je neprocjenjiva. Njeno dodatno unapređivanje prvobitno se provodi na vrstama iste porodice kojima ne prijeti opasnost od

izumiranja. Tek nakon pozitivnih rezultata metode se izvode na ugroženim životinjama kao način povećanja njihove stope oplodnje. ICSI metoda redovno se koristi na porodici mačka i vrstama poput oblačastog leoparda (*Neofelis nebulosa*) i geparda (*Acinonyx jubatus*) budući da ove životinje često pokazuju abnormalnosti sperme, bilo u smanjenoj kvaliteti ili u broju (Andrabi i Maxwell, 2007). Spomenuta zona pellucida predstavlja čvrstu opnu iz koje se embrij u stadiju razvoja blastociste mora izvući kako bi nastavio svoj razvoj i implantaciju. Ona ponekad zna otvrdnuti i stvoriti problem zbog uzgoja embrija u krivom hranjivom mediju ili zbog hormonalne stimulacije ovarija. Metoda mikromanipulacije koja se koristi za uspješno oslobađanje embrija je probijanje čvrstog ovoja laserskim zarezivanjem (Web 9).

5. *SEXING* – METODA ODREĐIVANJA SPOLA POTOMKA

Spol se određuje genetički, kombinacijom X i Y spolnih kromosoma. Ženke obično imaju dva X kromosoma, dok mužjaci imaju X i Y kromosom. Oocite i spermiji su spolne stanice (gamete) koje sadrže haploidan broj kromosoma, za razliku od somatskih stanica s diploidnim brojem. Ženske gamete sadrže jedan X kromosom, a muške gamete sadrže također jedan kromosom koji kod jedne polovice spermija može biti X, a kod druge polovice Y kromosom. Do određivanja spola dolazi u trenutku oplodnje, a ovisno o varijabilnosti spermija i njihovog spolnog kromosoma, potomak će biti muškog ili ženskog spola (Web 10). Određivanje spola prije same oplodnje ili implantacije važna je strategija kojom se nastoji potaknuti povećanje ugroženih jedinki određenog spola. Neuravnotežen omjer spolova u populacijama, a posebice veliki broj mužjaka naspram ženki, može ostaviti negativan trag na čitavu populaciju (Andrabi i Maxwell, 2007). Kako bi se utjecalo na spol potomka, razvile su se metode koje mogu odvojiti spermij koji nosi X kromosom od spermija koji nosi Y kromosom. Metoda protočne citometrije pokazala se uspješnom u određivanju spola potomka i uspješno se koristi prilikom izvođenja nekih od tehnika potpomognute oplodnje (Slika 8). Glavna razlika između spermija s različitim spolnim kromosomima je masa njihove DNA gdje spermij s X kromosomom ima do 4% više DNA od spermija s Y kromosomom. DNA se obilježava fluorescentnom bojom i prolazi kroz dodatne obrade, a nakon toga pušta kroz protočni citometar gdje se na temelju razlika u fluorescenciji pravilno odjeljuju spermiji s X od spermija s Y kromosomom. Otopina protočnog citometra odjeljuje se u sitne kapljice gdje veliki dio njih sadrži samo jedan spermij s jednim kromosomom. Dovođenjem napona, kapljice spermija sa ženskim X

kromosomom poprimaju pozitivan napon, dok one s muškim Y kromosomom poprimaju negativan napon. Nakon propuštanja kroz elektromagnetsko polje dolazi do konačnog odvajanja spermija (Parkinson i Morrell, 2019).



Slika 8. Prikaz rada protočnog citometra (preuzeto i prilagođeno prema: Parkinson i Morrell, 2019).

Sexing metoda se koristi i kod razvojnog stadija embrija. Prije implantacije, spol embrija može se utvrditi ili biopsijom uzorka ili PCR metodom koja umnaža samo DNA sekvencu Y kromosoma (Web 11).

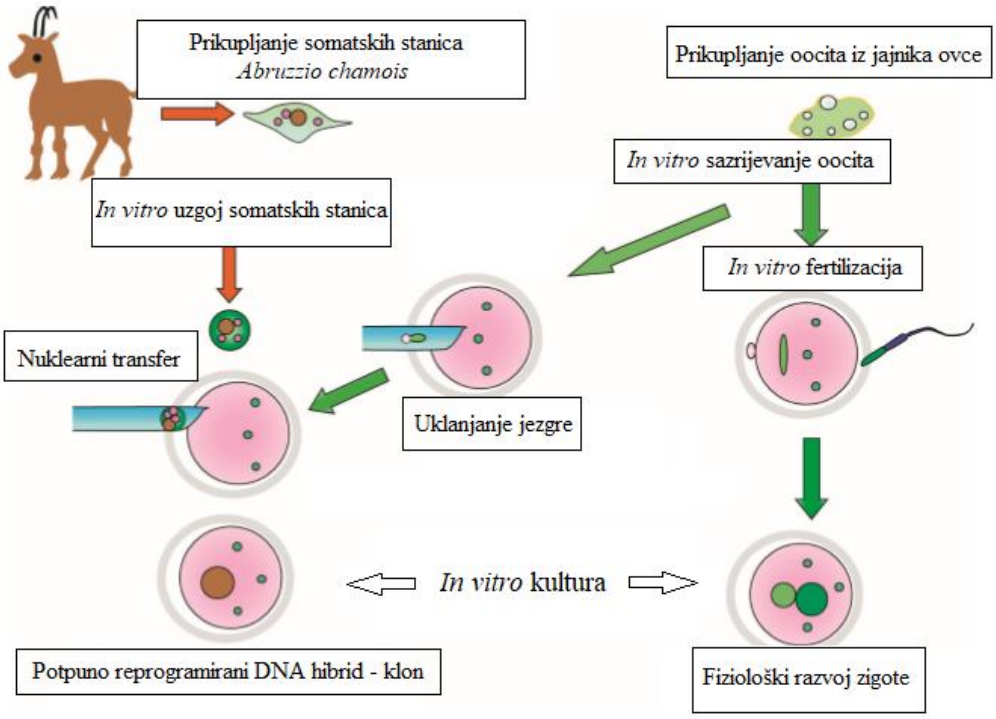
6. KLONIRANJE – SCNT metoda

6.1. Općenito o metodi kloniranja

Somatski nuklearni stanični transfer (SCNT) uključuje prijenos jezgre i njezinog genetičkog materijala (DNA) iz stanice donora u stanicu primatelja blisko srodne vrste ili podvrste. Ukoliko je prijenos uspješan i omogućen je razvoj embrija, on ima isti genetički materijal kao i onaj stanice donora, osim mitohondrijske DNA koja je podrijetlom iz stanice primatelja (Andrabi i Maxwell, 2007). SCNT se obično izvodi injekcijom ili fuzijom somatskih stanica u oocitu primatelja kojoj je uklonjena jezgra. Takav način oplodnje oocite primatelja s diploidnom jezgrom donora omogućuje „brisanje“ genetičkih informacija akumuliranih tijekom diferencijacije i uspostavlja normalan embrionalni i fetalni razvoj posredstvom genetičkog materijala donora (Loi i sur., 2014). Metodom kloniranja omogućeno je očuvanje ugroženih životinjskih vrsta, posebice onih čije je razmnožavanje siromašno u uvjetima zatočeništva. Tijekom oporavka njihovog prirodnog staništa i povratka u uobičajene ekološke sustave, tehnika somatskog nuklearnog staničnog transfera im omogućuje uspostavu i očuvanje stabilne populacije. Ukoliko je pravilno očuvano odgovarajuće životinjsko tkivo, ova metoda može biti korisna vrstama izumrlih životinja i njihovom potencijalnom „povratku u život“ (Andrabi i Maxwell, 2007). Interspecijski model SCNT metode (ISCNT) čini idealan instrument za povećavanje populacija sisavaca i drugih kralježnjaka, kao što su ptice, ribe i vodozemci na rubu izumiranja (Loi i sur., 2014). Nedostatak informacija o fiziološkim procesima ugroženih životinja predstavlja glavni problem ove metode, ali je zasigurno najsnažnija tehnika potpomognute oplodnje za širenje ugroženih populacija (Loi i sur., 2014; Andrabi i Maxwell, 2007).

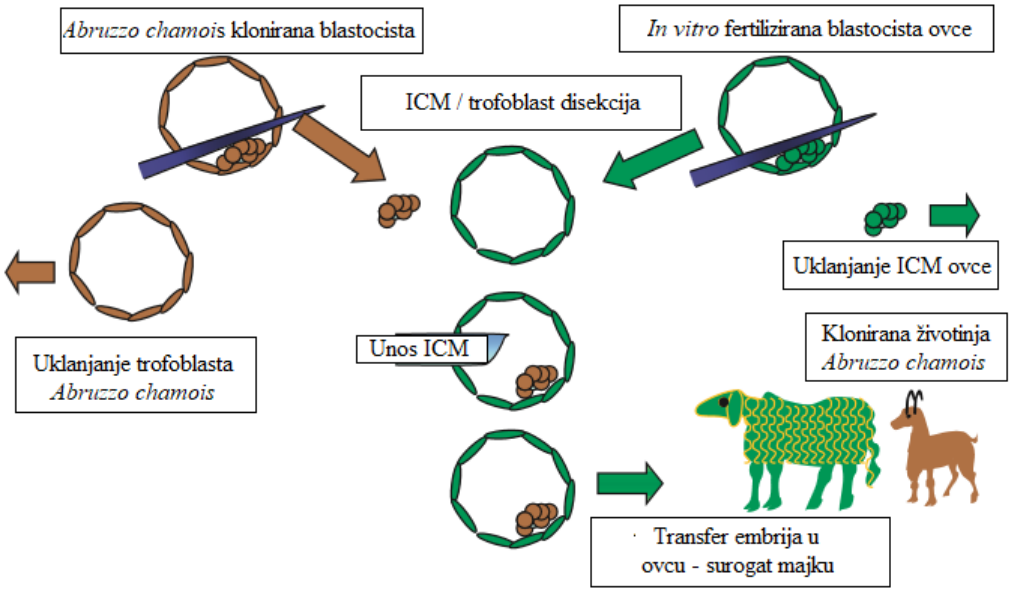
6.2. Postupak metode kloniranja

Postupak kloniranja je objašnjen na primjeru ugrožene vrste divokoze (*Abruzzo chamois*), a započinje prikupljanjem njenih somatskih stanica i to obično stanica fibroblasta koje se nakon toga tretiraju u *in vitro* uvjetima. Istovremeno se prikupljaju i oocite domaće životinjske vrste, ovce, koja je filogenetski bliska ugroženoj vrsti te u postupku služi kao surogat majka. Prikupljene jajne stanice se razdvajaju u dvije grupe. U jednoj grupi jajna stanica se oplodi sjemenom ovna, dok se u drugoj grupi uklone jezgre iz jajnih stanica i unesu prikupljene somatske stanice. Nakon toga obje grupe oocita se uzgajaju u *in vitro* kulturi do razvojnog stadija blastociste (Slika 9) (Loi i sur., 2014).



Slika 9. Prikaz postupka prikupljanja i *in vitro* uzgoja stanica za SCNT metodu (preuzeto i prilagođeno prema: Loi i sur., 2014).

Unutarstanična masa (ICM) ili embrioblast blastociste hibridnog klona divokoze, prebacuje se u vezikule trofoblasta koje je proizvela blastocista ovce, a nakon toga se takva kimerna blastocista presađuje u zamjensku ili surogat majku ovce radi daljnjeg razvoja (Slika 10) (Loi i sur., 2014).



Slika 10. Prikaz završnog postupka kloniranja (preuzeto i prilagođeno prema: Loi sur., 2014).

6.3. Uspješnost SCNT metode kloniranja

Od kloniranja prve ovce SCNT metodom, klonirane su i mnoge druge životinje. Primjenom ove metode uočene su gestacijske i neonatalne razvojne abnormalnosti kod potomaka. Ostale tehnike potpomognute oplodnje također mogu pokazivati abnormalnosti najčešće u pogledu sindroma velikog potomstva, no učestalost i ozbiljnost sindroma je mnogo veća primjenom metode kloniranja (Andrabi i Maxwell, 2007). Kloniranje i dalje ne pruža realnu mogućnost da se koristi kao sredstvo za očuvanje biološke raznolikosti, no predstavlja obećavajući pristup u rješavanju problema ugroženih vrsta (Loi i sur., 2014). Uspješnost metode varira kod različitih tipova ugroženih životinjskih vrsta (Tablica 3).

Tablica 3. Prikaz uspješnosti metode kloniranja kod različitih tipova ugroženih životinjskih vrsta (preuzeto i prilagođeno prema Loi i sur., 2014).

Donor stanice	Primatelj stanice	Uspješnost - razvojni stadij
Crnonožna mačka, *Felis nigripes*	Domaća mačka, *Felis sylvestris catus*	potomak
Europski muflon, *Ovis orientalis musimon*	Ovca, *Ovis aries*	potomak
Argali (divlja) ovca, *Ovis ammon*	Ovca, *Ovis aries*	~ 50 dana star fetus
Crveni (mali) panda, *Ailurus fulgens O. Carnivora*	Zec, *Oryctolagus cuninculus O. Lagomorpha*	blastocista (23%)
Veliki panda, *Ailuropoda melanoleuca O. Carnivoras*	Zec, *Oryctolagus cuninculus O. Lagomorpha*	blastocista (18,5%)

7. ZAKLJUČAK

Napretkom znanosti napreduje i razvitak metoda potpomognute oplodnje čime se nastoji povećati stopa začeća i očuvanje populacija ugroženih životinja. Svaku od predloženih metoda potrebno je prilagoditi pojedinoj životinjskoj vrsti i jedinki. Nezadovoljavajući rezultati najčešće su rezultat nedovoljnog poznavanja vrste na kojoj se provodi oplodnja, stoga se prije svega potrebno detaljno upoznati s fiziologijom i anatomijom vrste jedinki koje se koriste u istraživanju. Budući da njihovo izvođenje zahtjeva fizički kontakt i kratko narušavanje uobičajenog života ugrožene životinje, metode je neposredno prije potrebno provesti na blisko srodnim neugroženim vrstama. Najmanje invazivna metoda potpomognute oplodnje je umjetna oplodnja. *In vitro* oplodnja zahtjeva korak prijenosa embrija i dodatan kontakt s ugroženom životinjom, ali pruža dobre rezultate u pogledu uspješne stope začeća. Metode mikromanipulacije i određivanja spola pružaju dodatnu pomoć u što boljoj izvedbi metoda potpomognute oplodnje. Kloniranje somatskim staničnim nuklearnim transferom zasigurno je najuspješnija tehnika potpomognute oplodnje za pomoć u povećanju brojnosti populacija ugroženih vrsta te njihovom širenju u prirodnom staništu, ali su potrebna dodatna istraživanja kako bi se postigla željena uspješnost na različitim vrstama životinja. Predložene i objašnjene metode potpomognute oplodnje zasigurno imaju mogućnost upotrebe u zaštiti ugroženih vrsta. Primjenom objašnjenih metoda potpomognute oplodnje već je pružena potrebna pomoć životinjama poput leoparda (*Panthera pardus*), azijskog slona (*Elephas maximus*), afričkog slona (*Loxodonta africana*), velike pande (*Ailuropoda melanoleuca*), azijskog muflona (*Ovis orientalis*), divokoze (*Abruzzo chamois*) i mnogih drugih ugroženih vrsta. Svaku od metoda potrebno je dodatno usavršiti kako se ugrožene životinjske vrste ne bi nalazile na rubu nestanka, nego i dalje ostvarivale svoju prirodnu ulogu u različitim ekosustavima.

8. LITERATURA

Abril-Sánchez, S., Freitas-de-Melo, A., Giriboni, J., Santiago-Moreno, J., Ungerfeld, R. (2019) Sperm collection by electroejaculation in small ruminants: a review on welfare problems and alternative techniques. Animal Reproduction Science. 205: 1–9.

Andrabi, S.M.H., Maxwell, W.M.C. (2007) A review on reproductive biotechnologies for conservation of endangered mammalian species. Animal Reproduction Science. 99 (3–4): 223–243.

Coonrod, S.A., Flores-Foxworth, G., Moreno, J.F., Westhusin, M., Byrd, S.R., Kraemer, D.C. (1994) Birth of armenian red sheep (Ovis Orientalis) lambs to domestic sheep (Ovis Aries) following interspecific transfer of IVM-IVF derived embryos. Theriogenology. 41 (1): 182.

Durrant, B.S. (2009) The importance and potential of artificial insemination in CANDES (companion animals, non-domestic, endangered species). Theriogenology. 71 (1): 113–122.

Fanchin, R. (2018) In Vitro Fertilization (IVF). U: Encyclopedia of Endocrine Diseases. Elsevier, 595–598.

Kersey, D.C., Aitken-Palmer, C., Rivera, S., Willis, E.L., Yu Liang, L., Snyder, R.J. (2016) The birth of a giant panda: tracking the biological factors that successfully contribute to conception through to postnatal development. Theriogenology. 85 (4): 671–677.

Loi, P., Modlinski, J., Pta, G. (2014) Cloning Endangered Species. U: Principles of Cloning. Elsevier, 353–365.

Malter, H.E. (2016) Micromanipulation in assisted reproductive technology. Reproductive BioMedicine Online. 32 (4): 339–347.

Parkinson, T.J., Morrell, J.M. (2019) Artificial Insemination. U: Veterinary Reproduction and Obstetrics. Elsevier, 746–777.

Paulson, R.J., Comizzoli, P. (2018) Addressing challenges in developing and implementing successful in vitro fertilization in endangered species: an opportunity for humanity to “give back. Fertility and Sterility. 109 (3): 418–419.

Pergament, D. (2019) Reproductive Technologies, Assisted. U: Encyclopedia of Biomedical Engineering. Elsevier, 677–685.

Phillips, P.E., Jahnke, M.M. (2016) Embryo Transfer (Techniques, Donors, and Recipients). Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice. 32 (2): 365–385.

Ramalingam, M., Durgadevi, P. Mahmood, T. (2016) In vitro fertilization. Obstetrics, Gynaecology & Reproductive Medicine. 26 (7): 200–209.

Richards, J. S. (2018) Ovulation. U: Encyclopedia of Reproduction. Elsevier, 92–98.

Wagler, R. (2018) 6th Mass Extinction. U: Encyclopedia of the Anthropocene. Elsevier, 9–12.

WEB IZVORI

Web 1. https://www.iucnredlist.org/resources/summary-statistics#Summary%20Tables - preuzeto 2.6.2019.

Web 2. http://www.cpma.ch/en/treatments/aid.html - preuzeto 1.6.2019.

Web 3. https://www.wilder.pt/english/15-iberian-lynx-cubs-were-born-this-year-at-the-portuguese-breeding-centre/ - preuzeto 11.6.2019.

Web 4. https://biocyclopedia.com/index/biotechnology/animal_biotechnology/manipulation_of_reproduction_and_transgenic_animals/biotech_in_vitro_fertilization_technology.php - preuzeto 10.6.2019.

Web 5. https://www.eugin.co.uk/transferring-embryos-blastocyst-stage/ - preuzeto 9.6.2019.

Web 6. http://csls-text3.c.u-tokyo.ac.jp/inactive/18_07.html - preuzeto 11.6.2019.

Web 7. https://vivaneo-ivf.com/hr/klinike-zelje-za-dijetetom-klagenfurt/dijagnostika-lijecenje/lijecenje/icsi/ - preuzeto 1.6.2019.

Web 8. http://www.sisuhospital.org/icsi.php - preuzeto 1.6.2019.

Web 9. https://www.wunschbaby.at/hr/uzroci-i-metode/ivf-in-vitro-fertilizacija.html - preuzeto 1.6.2019.

Web 10. https://www.livescience.com/27248-chromosomes.html - preuzeto 1.6.2019.

Web 11. https://biocyclopedia.com/index/biotechnology/animal_biotechnology/manipulation_of_reproduction_and_transgenic_animals/biotech_embryo_transfer.php#dd - preuzeto 1.6.2019.