

Umjetno osjemenjivanje kuja

Balaban, Martina

Master's thesis / Diplomski rad

2013

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:178:284537>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-24**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
VETERINARSKI FAKULTET

UMJETNO OSJEMENJIVANJE KUJA

DIPLOMSKI RAD

MARTINA BALABAN

Zagreb, 2013.

Ovaj diplomski rad izrađen je na Klinici za porodništvo i reprodukciju Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod stručnim vodstvom Doc. dr. sc. Nine Maćešića i Doc. dr. sc. Martine Lojkić.

PREDSTOJNIK: Prof. dr. sc. Marko Samardžija

MENTORI: Doc. dr. sc. Nino Maćešić

Doc. dr. sc. Martina Lojkić

Članovi povjerenstva za obranu diplomskog rada:

1. Prof. dr. sc. Goran Bačić
2. Doc. dr. sc. Martina Lojkić
3. Doc. dr. sc. Nino Maćešić
4. Prof. dr. sc. Tugomir Karadjole (zamjena)

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. POLUČIVANJE EJAKULATA PASA I POSTUPAK SA SPERMOM	2
2.1. Duboko smrznuto i ohlađeno sjeme	2
2.1.1. Ohlađeno sjeme	3
2.1.2. Duboko smrznuto sjeme	3
2.2. Ocjena ejakulata i spermija	4
3. FIZIOLOGIJA REPRODUKCIJE KUJA	7
3.1. Faze spolnog ciklusa	7
3.1.1. Proestrus	7
3.1.2. Estrus	7
3.1.3. Dioestrus	8
3.1.4. Anoestrus	8
4. ODREĐIVANJE OPTIMALNOG VREMENA ZA OSJEMENJIVANJE	9
4.1. Klinički pregled kuje	9
4.2. Vaginalna citologija	9
4.3. Vaginalna endoskopija	11
4.4. Određivanje koncentracije LH i progesterona u serumu	13
4.5. Ultrazvučni pregled jajnika	13
4.6. Split estrus	14
5. METODE UMJETNOG OSJEMENJIVANJA KUJA	15
5.1. Intravaginalno osjemenjivanje kuja	15
5.2. Intrauterino osjemenjivanje kuja	15
5.2.1. Intrauterino osjemenjivanje upotrebom Norveško/Skandinavskog katetera	15
5.2.2. Transcervikalno endoskopsko osjemenjivanje	16

5.2.3. Operativna tehnika - laparotomija.....	17
6. ETIČNOST UMJETNOG OSJEMENJIVANJA.....	19
7. ZAKLJUČCI.....	20
8. SAŽETAK	21
9. SUMMARY	22
10. LITERATURA	23
11. ŽIVOTOPIS.....	25

1. UVOD

Umjetno osjemenjivanje (UO) je zahvat kojim spermije unosimo u spolne organe ženki. Pri tom postupku oplodnja se zbiva prirodno, unutar jajovoda, a umjetan je jedino način unosa spermija u tijelo ženke.

Umjetno osjemenjivanje kuja omogućuje korištenje vrhunskih rasplodnih pasa na većem broju kuja čime se potiče kvalitetna pasminska selekcija, a pritom se sprečava širenje spolno prenosivih bolesti. To se postiže uporabom svježeg, ohlađenog ili duboko smrznutog sjemena pasa.

Umjetno osjemenjivanje najčešće se primjenjuje u vrijednih čistokrvnih kuja koje, zbog različitih razloga, ne mogu začeti nakon koitusa. Umjetno osjemenjivanje je metoda izbora u slučajevima kada ženka ne prihvaća mužjaka, kada partner visokovrijednih pasmina ne može obaviti koitus zbog fizičkih razloga, kada su partneri međusobno vrlo udaljeni, a vlasnik želi osjemeniti kuju iz uzgojnih razloga, kod mladih i neiskusnih partnera te kod stečenih malformacija na vagini.

Umjetno osjemenjivanje obuhvaća dobivanje ejakulata od psa, ocjenu ejakulata, određivanje optimalnog vremena za osjemenjivanje kuje i unos spermija u spolne organe kuje.

Zahvaljujući sve boljem razumijevanju reproduktivne fiziologije pasa, napredovanju tehnika te povećanju osviještenosti o prevencijama spolnih bolesti, interes uzgajivača za UO diljem svijeta brzo raste.

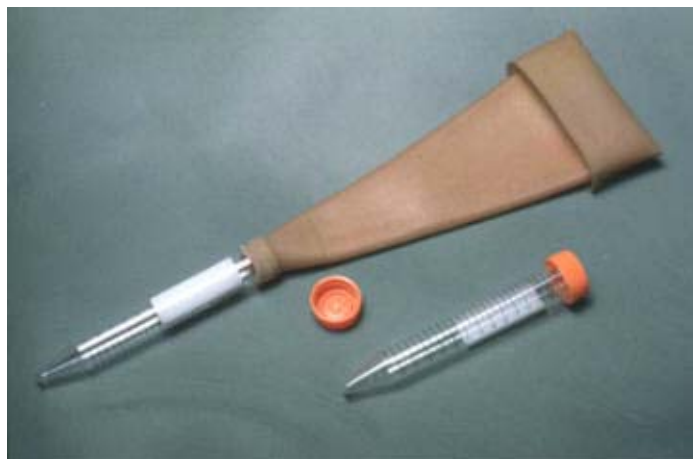
Uspjeh umjetnog osjemenjivanja je u odabiru točnog vremena za osjemenjivanje, upotrebi kvalitetnog sjemena, pravilnom rukovanju sa sjemenom te ispravnom odabiru tehnike UO.

U ovom radu opisati ću postupak sa sjemenom pasa, kako odrediti optimalno vrijeme za umjetno osjemenjivanje, metode umjetnog osjemenjivanja kuja te njihove prednosti i mane.

2. POLUČIVANJE EJAKULATA PASA I POSTUPAK SA SPERMOM

Ejakulat pasa polučuje se manualnom fiksacijom ili masažom penisa, a ejakulat se hvata u steriliziranu staklenu ili plastičnu posudicu ili spermohvatač. Za uzbuđivanje mužjaka najčešće se koristi ženka u estrusu. Mužjak se približuje ženki i njušenje njene stidnice dovodi do erekcije. Osoba koja polučuje spermu treba izvuci penis, gurajući prepucij dorzalno preko bulbosa. Pritskom na penis, posebno na područje iznad bulbosa, erekcija se pojačava i pas počinje ejakulirati. Psi ejakuliraju frakcionarno, u 3 međusobno odvojene frakcije. Prva frakcija sadrži svega nekoliko kapi, druga 0.5 – 3 ml, a treća 4-50 ml, ovisno o pasmini. Prvu i treću frakciju čini tekućina iz prostate i prozirna je, dok je druga spermom bogata frakcija mliječno bijele boje. Za UO svježim ejakulatom koriste se prva, druga i 1-2 ml treće frakcije, dok se za UO ohlađenim ili duboko smrznutim sjemenom koristi samo druga, spermom bogata frakcija. Sjeme pasa uglavnom se primjenjuje nerazrijeđeno i odmah po polučivanju se ocjenjuje, za što se koristi prva i druga frakcija (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.).

Slika 1. Spermohvatač



2.1. Duboko smrznuto i ohlađeno sjeme

Kod upotrebe svježeg sjemena, osim što je postupak UO jednostavniji za izvedbu, uspješnost osjemenjivanja i broj štenadi su jednaki kao kod prirodnog pripusta. Upotrebom duboko smrznute sperme, osim zahtjevnije tehnike i skupljeg zahvate, postotak oplodnje i broj

štenadi nešto je niži (FARSTADT, 1984.; LINDE – FORSBERG, 2000.). No, prednost duboko smrznutog sjemena je što se ono može pohraniti na neodređeno vrijeme, čime se pruža mogućnost dobivanja potomstva i nakon uginuća rasplodnjaka. Isto, upotreba duboko smrznutog sjemena omogućuje dobivanje potomstva od jedinki koje žive u različitim krajevima svijeta, bez troškova i stresa koje izaziva putovanje životinje na parenje.

2.1.1. Ohlađeno sjeme

Ohlađeno sjeme čuva se na temperaturi od 4-5°C i ovisno o vrsti razrjeđivača, ostaje upotrebljivo 2-10 dana. Razrjeđivači štite membranu spermija od temperaturnog šoka i mehaničkih trauma tijekom transporta, a osiguravaju stabilan pH. Za osjemenjivanje se uzima druga, spermom bogata frakcija ejakulata. Prednosti korištenja ohlađenog sjemena, osim već spomenutih, su jednostavnost postupka, niski troškovi opreme i zadovoljavajući postotak koncepcije nakon intravaginalnog osjemenjivanja. Vaginalnim osjemenjivanjem ohlađenim sjemenom dobre kakvoće postiže se koncepcija od oko 80%, dok se kod ejakulata slabije kakvoće preporuča transcervikalno osjemenjivanje (TCI) kako bi se povećao postotak koncepcije. Ohlađeno sjeme nakon polaganja u spolne organe kuja preživljava 24-72 sata (LOJKIĆ i sur., 2012.).

2.1.2. Duboko smrznuto sjeme

Pseće sjeme se tijekom dubokog smrzavanja hladi na temperaturu tekućeg dušika od -196 °C. Klasičan protokol za smrzavanje psećeg sjemena sastoji se od fracioniranog polučivanja ejakulata, razrjeđivanja druge frakcije razrjeđivačem, hlađenja na 4°C kroz 1-2 sata, punjenja u pajete i hlađenja u aparatu za smrzavanje ili u parama tekućeg dušika (LOJKIĆ i sur., 2012.). Na kvalitetu odmrznutog sjemena utječe način postupanja sa sjemenom te uvjeti pripreme i smrzavanja. Također treba imati na umu i individualnu predispoziciju pojedinih pasa, odnosno ejakulata koji su otporniji ili osjetljiviji na oštećenja uzrokovana dubokim smrzavanjem (SCHAFER-SOMI i sur., 2006.). Koncentracija spermija u dozi i volumen isto tako utječu na uspješnost koncepcije nakon umjetnog osjemenjivanja. Najčešće korištena koncentracija je 100-200x10⁶ spermija/ml, uz 70% progresivno pokretljivih spermija i manje od 20% morfoloških abnormalnost .

Odmah po odmrzavanju sperma se stavlja na zagrijanu podlogu (37°C) te se ocjenjuje pokretljivost te morfologija spermija svjetlosnim mikroskopom. Ukoliko je progresivna

pokretljivost preko 50%, sperma se smatra dobrom, oko 50 % se smatra prosječnom, a ispod 50% se smatra losom. Loša je i ukoliko je postotak abnormalnih spermija veći od 20%, bez obzira na pokretljivost (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.).

2.2. Ocjena ejakulata i spermija

Sperma se ocjenjuje kako bi se odredila svojstava dobivenog ejakulata, za kontrolu preživljavanja spermija nakon pohrane, konzerviranja ili prije osjemenjivanja te za ocjenjivanje plodnosti, odnosno utvrđivanje neplodnosti rasplodnjaka (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.).

Razlikujemo sanitarnu i makroskopsku ocjenu ejakulata te ocjenu kvalitete spermija.

Sanitarna ocjena ejakulata, osim pregleda, obuhvaća i ocjenu zdravlja rasplodnjaka (kliničke pretrage). Životinja koja se koristi za UO mora biti potpuno zdrava, a njezin ejakulat bez primjesa ili vanjskih nečistoća.

Makroskopskim pregledom bilježimo volumen, boju, konzistenciju i miris ejakulata. Volumen ejakulata pasa iznosi 1-50 ml i ovisan je o pasmini, odnosno veličini psa. Boja je vodenasto-bijela i ovisna je o koncentraciji spermija u ejakulatu. Frakcioniranim uzimanjem ejakulata primjećujemo da su prva i druga frakcija fiziološki prozirne, dok je druga frakcija mliječno-bijela. Konzistencija je slična konzistenciji mlijeka, a miris je specifičan. Ocjenjuje se i pH koji je kod pasa 6,0-7,0. Vrijednost pH utvrđujemo indikator papirom ili pomoću tekućine univerzalnog indikatora koji pomiješan sa spermijima, mijenja boju, ovisno o stupnju pH.

Mikroskopska ocjena služi za ocjenu pokretljivosti spermija, udjela živih spermija u ejakulatu te ocjenu morfologije.

Prilikom određivanja pokretljivosti spermija važno je koristiti zagrijane predmetnice te zagrijan stolić mikroskopa. Može se primijetiti da se neki spermiji kreću pravocrtno naprijed – progresivnim gibanjem, neki se vrte u krug – manježnim ili kružnim gibanjem, a neki se kreću u smjeru suprotnom od glave – retrogradnim gibanjem. Neki spermiji se gibaju sporije od ostalih, a neki su nepomični i oni su, kao i svi koji se ne kreću progresivno naprijed, nesposobni za oplodnju. Kod pasa mogu koristiti ocjene 4,3,2,1,0, za vrstu pokretljivosti (npr. 4 - brzo progresivno kretanje; 3 - umjereno progresivno kretanje, 2 – sporo kretanje; 1 –pokretni, neprogresivni, 0 – nepokretni).

U svakom ejakulatu, kada ga mikroskopski pregledamo, naći ćemo spermije koji nisu normalnog oblika i nas zanima da li je broj takvih teratoloških oblika u dopuštenim granicama

jer su takvi spermiji manje plodni. Prema nastanku, razlikujemo primarne i sekundarne patološke oblike spermija (BLOM, 1950.). Primarni nastaju tijekom spermatogeneze, a sekundarni nakon spermijacije tj. u epididimisu ili kasnije. Uzrok primarnih mogu biti degenerativne i upalne promjene u testisima, poremećaji termoregulacije u testisima, avitaminoza E i deficitarna prehrana te urođene anomalije. Sekundarni su najčešće uzrokovani hipotonijom i hipertonijom. Češća je podjela abnormalnosti spermija prema mjestu nastanka i tu razlikujemo abnormalnosti glave, akrosome, vrata, spojnog dijela i repa. Teratomni oblici spermija imaju višestruke glave i repove, samo repove, višestruke repove poput meduze, a tu ubrajamo i razvojne stadije spermija (spermatocite, spermatide). U ejakulata psa je dozvoljeno naći samo 2 % nezrelih spermija s protoplazmatskom kapicom (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.). Postoji nekoliko metoda pripreme i bojenja preparata za određivanje morfologije spermija. Metoda po Bloomu praktična je jer se ujedno procjenjuje i broj živih i mrtvih spermija, no postoje i druge metode poput bojenja po Giemsi i Papanicolau. Primjenjuje se i bojenje spermija po Diff-Quick metodi te Spermac metodi, dok se moderni centri za UO za morfološku ocjenu spermija koriste i kompjuterskom obradom ejakulata (CASA).

Osim toga važno je odrediti koncentraciju spermija u ejakulatu. Klasična metoda za ocjenu broja spermija u određenoj zapremini ejakulata je brojanje u komorici po Thoma-i (služi za brojanje krvnih stanica). Komorica ima 16 velikih kvadrata razmještenih u 4 reda, a svaki od 16 kvadrata, podijeljen je na 16 manjih kvadratića. Spermiji se broje u četiri velika kvadrata dijagonalno, odozgo prema dolje te u petom koji se nalazi u suprotnom lijevom ili desnom kutu. Spermije za brojanje pripremamo u melanžerima za brojanje leukocita, a prije brojanja ih je potrebno usmrtiti. Ejakulat pasa sadrži 0,004 – 0,400 milijardi, u prosjeku 0,125 milijardi spermija po mL. U novije vrijeme se koriste i elektronski aparati (CASA) koji automatski razrjeđuju ejakulat i daju precizne podatke o njegovoj gustoći (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.).

Bilježi se i broj bijelih krvnih stanica u ejakulatu koji upućuju na mogući upalni proces i zahtijevaju bakteriološku obradu ejakulata. Isto je važna i koncentracija alkalne fosfataze podrijetlom iz epididimisa koja ukazuje na moguću opstrukciju sjemenovoda ili nepotpunu ejakulaciju.

Važna je i ocjena integriteta stanične membrane spermija i akrosome spermija te ocjena morfologije. Za određivanje integriteta membrane najčešće se koriste HOS test i bojenje po Bloom-u koje nam daju broj živih i mrtvih spermija u ejakulatu. Kroz ovojnicu mrtvog spermija prolazi crvena boja eozin, dok kroz ovojnicu živog spermija ne prolazi pa će se mrtvi spermiji obojati, a živi će ostati bijeli. Kod supravitanog bojanja po Bloom-u koristi se 5%-tna vodena

otopina eozina i 10%-tna otopina nigrozina, koja služi kao kontrastna boja razmaza. Na zagrijanu predmetnicu se stavlja kap ejakulata, a pored nje se stavlja kap eozina i dvostruko veća kap nigrozina. Odmah se pomješa kap eozina i ejakulata, a zatim se umješa i kap nigrozina te se napravi razmaz. Cijeli postupak ne smije trajati više od 15 sekundi i izvodi se na sobnoj temperaturi (oko 20 °C). Za ocjenu rezultata se koristi fazno – kontrastni mikroskop. U svakom vidnom polju se bilježi koliko ima crvenih i bijelih spermija, dok se oni čija je glava napola obojana u bijelo, a napola u crveno, smatraju mrtvima. Broji se ukupno 200 spermija. Supravitalnim bojanjem najčešće se služimo prilikom ocjene svježeg ejakulata, no može se primijeniti i za ocjenjivanje razrijeđenog sjemena, dok za ocjenjivanje smrznutog – odmrznutog sjemena, nije prikladna. U preparatima također možemo zabilježiti i teratološke oblike spermija (više glava, više repova, deformacija repa) te postotak nezrelih spermija s protoplazmatskom kapičicom.

Test hiposomatskog bubrenja ili HOS test koristi se za ocjenu funkcionalnosti membrane spermija i značajni je pokazatelj njihove sposobnosti za oplodnju. Promjene na spermijima nakon izlaganja hipoosmotskoj otopini mogu se koristiti za predviđanje kvalitete sperme. Promjene su vidljive pomoću fazno - kontrastnog mikroskopa. Nabubreni spermiji ili HOS pozitivni (HOS +) imaju funkcionalno intaktnu membranu, dok spermiji s oštećenom membranom ne bubre. Mikroskopom se broji najmanje 200 spermija i razvrstava u 5 skupina, od slova A do E. Tip A predstavlja maksimalno bubrenje, B i C predstavlja srednji stadij, tip D predstavlja početni stadij i tip E neaktivni, ne nabubreni spermiji (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.).

3. FIZIOLOGIJA REPRODUKCIJE KUJA

3.1. Faze spolnog ciklusa

Pubertet u kuja javlja se u dobi od 6 do 23 mjeseca starosti, u prosjeku od 10 do 14 mjeseca starosti. Kuja je monoestrična životinja, sa međuestrusnim intervalom od 4 do 13 mjeseci, u prosjeku 7 mjeseci. Faze spolnog ciklusa kuja su proestrus, estrus, diestrus i anestrus (EDENS i HEATH, 2003.).

3.1.1. Proestrus

Proestrus traje od 3 do 17 dana, u prosjeku 9 dana. U ovoj fazi kuja je seksualno atraktivna, ali odbija mužjaka. Stidnica je otečena, prisutan je serozno krvavi iscjedak koji potječe iz endometrija maternice. Razvoj folikula uzrokuje povećanu koncentraciju estrogena, čija koncentracija dostiže svoj vrhunac 2 do 3 dana prije estrusa, a tada u fazi estrusa naglo pada. Povećanje estrogena dovodi do hiperplazije i orožnjavanja vaginalnih epitelnih stanica. U ranom proestrusu kada je koncentracija estrogena niska u vaginalnom obrisku najviše ima parabazalnih i intermedijalnih stanica. Kasnije, kako koncentracija estrogena raste prevladavaju superficijalne stanice, tako da na kraju estrusa superficijalnih stanica ima više od 80% svih epitelnih stanica. Eritrociti su brojni u početku proestrusa, a kasnije se njihov broj smanjuje. Koncentracija progesterona u serumu tijekom proestrusa je manja od 2 ng/ml (EDENS i HEATH, 2003.).

3.1.2. Estrus

Estrus traje od 3 do 21 dan, u prosjeku oko 9 dana. Estrus počinje onda kada kuja dozvoljava koitus. Stidnica je edematozna, mekane konzistencije, a vaginalni iscjedak je smanjen. U endokrinološkom smislu estrus obično počinje u vrijeme vala luteinizirajućeg hormona (LH), koji traje 24 do 48 sati. Istovremeno dolazi do smanjivanja koncentracije estrogena i rasta koncentracije progesterona. Vaginalni obrisak sadrži više od 90% superficijalnih epitelnih stanica, mali broj eritrocita, a neutrofili nisu prisutni. Koncentracija progesterona kreće se u rasponu od 5 do 8 ng/ml za vrijeme ovulacije i od 4 do 20 ng/ml u fertilnom periodu (EDENS i HEATH, 2003.). Kuje ovuliraju oocite u nezrelom obliku kao primarne oocite i one ne mogu

odmah biti oplodjene. Do oplodnje dolazi nakon maturacije primarne oocite, koja traje oko 48 sati i dolazi do formiranja sekundarne oocite. Ovulaciju izaziva val luteinizirajućeg hormona (LH) u plazmi. Do ovulacije dolazi 2 dana nakon vala LH. Oocite unutar jajovoda ostaju sposobne za oplodnju oko 4 do 5 dana (ENGLAND i CONCANNON, 2002.).

3.1.3. Dioestrus

Trajanje diestrusa je 56 do 58 dana od ovulacije. U tom periodu kuja ne dozvoljava parenje. Stidnica više nije edematozna. Unutar 24 do 36 sati mijenja se nalaz vaginalne citologije. Vaginalni obrisak sadrži oko 60% intermedijalnih stanica. Prisutan je velik broj neutrofila. Koncentracija progesterona ostaje povišena kroz cijeli diestrus. (EDENS i HEATH, 2003). Anestrus traje od 2 do 9 mjeseci. To je period involucije maternice. Za potpunu involuciju potrebno je 70 dana u negravidnih kuja i 90 dana u kuja nakon poroda. Vaginalna citologija otkriva nam prisustvo parabazalnih i intermedijalnih epitelih stanica. Koncentracija progesterona pada (EDENS i HEATH, 2003.).

3.1.4. Anoestrus

Anestrus traje od 2 do 9 mjeseci. To je period involucije maternice. Za potpunu involuciju potrebno je 70 dana u negravidnih kuja i 90 dana u kuja nakon poroda. Vaginalna citologija otkriva nam prisustvo parabazalnih i intermedijalnih epitelih stanica. Koncentracija progesterona pada (EDENS i HEATH, 2003.).

4. ODREĐIVANJE OPTIMALNOG VREMENA ZA OSJEMENJIVANJE

Postoji nekoliko metoda za određivanje optimalnog vremena parenja, koje uključuje određivanje koncentracije progesterona u plazmi, vaginalnu citologiju i vaginalnu endoskopiju. Neuspjeh određivanja optimalnog vremena parenja predstavlja značajan problem i najčešći je uzrok neplodnosti kuja (ENGLAND i CONCANNON, 2002.). Poznajući faze spolnog ciklusa, kliničke znakove i fiziologiju spolnog ciklusa možemo poboljšati postotak koncepcije.

4.1. Klinički pregled kuje

Kod kuje su vanjski znakovi estrusa očiti i traju razmjerno dugo. Potrebno je pratiti promjene na spolnim organima te vladanje kuje. Rade se inspekcija i palpacija stidnice i perineuma. Za vrijeme proestrusa, stidnica se povećava i otvrdne te se pojavljuje krvavi iscjedak. Početkom estrusa stidnica postaje mekša, smanjuje se edem i prestaje krvavi iscjedak iz rodnice. Također, kada je kuja spremna za oplodnju, prisutni su i spolni refleksi: dizanje repa, širenje nogu i podizanje stidnice. Kuja stoji mirno kada ju pas zaskoči i odmiče rep pri njuškanju stidnice (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.).

4.2. Vaginalna citologija

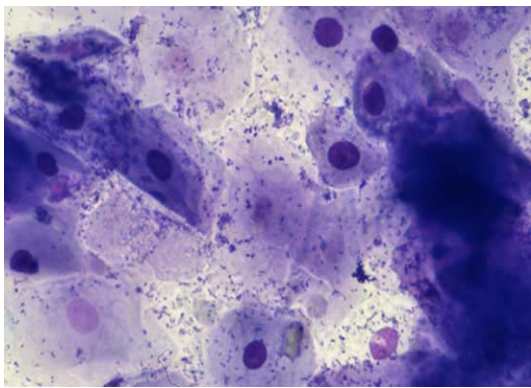
Vrhunac razdoblja plodnosti je od prvog do šestog dana od LH vala, odnosno od drugog dana prije, do četvrtog dana nakon ovulacije. Istraživanja govore da nema razlike u broju štenadi bez obzira da li se radi se o jednom ili o više parenja tokom navedenog perioda. Ista istraživanja pokazuju da parenje prije ili nakon navedenog perioda rezultira manjim postotkom graviditeta, dok parenje nakon navedenog perioda uglavnom rezultira i manjim brojem štenadi. Najpovoljnije razdoblje za rasplod je 4 do 6 dana po otpuštanju LH vala. Kada je moguće osigurati višekratno parenje, prvo parenje treba biti jedan do dva dana prije drugoga.

No, kada se primjenjuje duboko smrznuto sjeme, kuju treba osjemenjivati isključivo tijekom fertilizacijskog perioda.

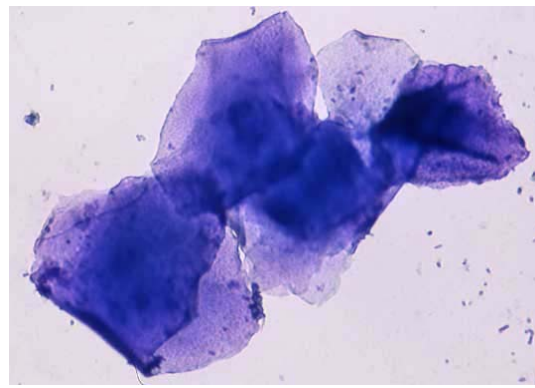
Mikroskopski pregled oljuštenih epitelnih vaginalnih stanica je jednostavna metoda za kontroliranje faze spolnog ciklusa. Vaginalne stanice se mogu uzeti pomoću pamučnih štapića za bris ili aspiracijom plastičnim kateterom. Tijekom proestrusa porast koncentracije estrogena uzrokuje zadebljanje sluznice rodnice te povećanje broja slojeva stanica. Epitel sluznice mijenja

se iz niskog kvadratičastog u slojeviti pločasti keratinozni epitel. Površinske stanice mijenjaju oblik, veličinu i boju. Prvo postaju veće, nepravilne i pločaste s jezgrom i kao takve se nazivaju „intermedijarne stanice“. Kasnije prelaze u orožnjale pločaste stanice bez jezgre i nazivaju se „superficianlne stanice“ (CONCANNON i DIGREGORIO, 1986.). Praćenjem promjena može se odrediti u kojoj je fazi ciklus, a osjemenjivati treba kada je više od 80% stanica superficijalnog tipa, koje su karakteristične za fertilizacijsko razdoblje.

Slika 2. Proestrus



Slika 3. Estrus



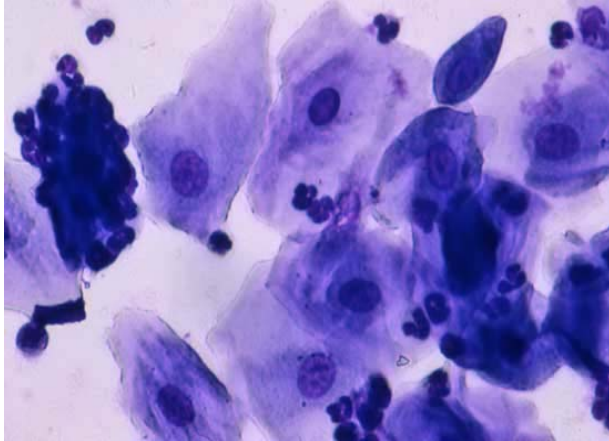
Preuzeto: Vaginalna citologija (www.ivis.com).

Pojava stanica superficijalnog tipa je moguća od devetog do drugog dana prije ovulacije, a postotak im može doseći čak i 90-100 % (LINDSAY i CONCANNON, 1986.), tako da se ova metoda ne može s potpunom sigurnošću koristiti za određivanje vremena za oplodnju. Na kraju fertilizacijskog razdoblja, koncentracija estrogena pada, a progesterona raste. Zbog toga se vaginalni epitel ljušti i broj slojeva stanica se smanjuje. Polimorfonuklearni leukociti koji nisu bili prisutni tijekom plodnog perioda sada se pojavljuju u velikom broju. Stanice koje u tom periodu dominiraju su intermedijarne i parabazalne stanice te polimorfonuklearni leukociti. One označavaju kraj estrusa te početak metestrusa ili diestrusa (CONCANNON i DIGREGORIO, 1986.).

Određivanje optimalnog vremena za parenje može se odrediti utvrđivanjem vremena porasta LH, a izravnim kliničkim metodama može se procijeniti vrijeme ovulacije te razdoblja

plodnosti i fertilizacije. Kliničke metode uključuju: palpaciju stidnice, vaginalni bris, vaginalnu endoskopiju te mjerenje razine hormona tijekom proestrusa i estrusa.

Slika 4. Diestrus



Preuzeto: Vaginalna citologija (www.ivis.com)

4.3. Vaginalna endoskopija

Vaginalnom endoskopijom se pregledava površina mukoze rodnice, a postupak se temelji na promatranju nabora, kontura i boje, promjena koje uslijede prilikom prijelaza proestrusa u estrus kao i prisustva iscjetka. Uglavnom se koriste rigidni endoskopi s optičkim vlaknom no možemo koristiti i fleksibilne endoskope (ENGLAND i CONCANNON, 2002.).

Slika 5. Oprema za vaginoskopiju



Preuzeto: Folnožić, 2009.

Tokom anestrusa, sluznica je relativno ravna, suha i ružičaste boje, veoma tanka, krhka i izrazito osjetljiva na traumu (LINDSAY i CONCANNON, 1986.)

Za vrijeme estrusa nabori postaju veći, edematozni i ružičasto – bijele boje, a između nabora se primjećuje serozno krvavi iscjedak, porijeklom iz maternice. Za nastanak promjena zaslužan je porast estrogena. Za vrijeme LH vala dolazi do naglog pada estrogena i posljedične dehidracije sluznice, gubitka edema te sluznica poprima naborani izgled (WILSON, 2005), dok su 3-4 dana nakon ispuštanja LH nabori potpuno stisnuti i angularnog oblika, zadržavajući kremasto bijelu boju. Za fertilizacijsko razdoblje su karakteristični duboki nabori po cijeloj mukozi sa karakterističnom zavojima dok se prestanak fertilizacijskog perioda očituje smanjivanjem naboranosti te otanjivanjem mukoze i “išaranošću” iste (LINDSAY i CONCANNON, 1986.), što znači da je ona na nekim područjima i dalje bjelkasta i zadebljala, a na drugim postaje tanka i crvenkasta. Navedeno je karakteristično za period metestrusa ili diestrusa.

Slika 6. Estrus



Slika 7. Diestrus



Preuzeto : Wilson, 2005.

4.4. Određivanje koncentracije LH i progesterona u serumu

LH test

Mjerenje koncentracije LH u plazmi je pouzdana i točna metoda za određivanje optimalnog vremena za rasplod. No, u većini zemalja ne postoji gotov komercijalni test i za mjerenje je potreban radioimunološki test (RIA), a to je metoda koja zahtjeva vrijeme, novac a rezultati se ne dobivaju odmah.

U prodaji postoji nekoliko komercijalnih ELISA kit za mjerenje LH u serumu koji su provjereni (ROOT-KUSTRIZ, 2001.) i uspješno se koriste. Nedostatak je što se mora upotrebljavati svakodnevno kako bi se odredio porast LH. Sa ispitivanjima je dovoljno početi 7 dana od početka proestrusa. Jednom kada se zna točan dan, oplodnja ili UO se planiraju za 4-6 dan nakon ispuštanja LH vala.

Progesteron u plazmi i progesteron test

Koncentracija progesterona počinje rasti 2 tjedna prije ovulacije. Od početka njegovog rasta, potrebno je uzimati uzorke krvi svaki dva do tri dana te mu mjeriti koncentraciju.

Na dan otpuštanja LH vala, sa početne razine od < 1.5 ng/ml, koncentracija progesterona raste do 0.9 do 3 ng/ml, za vrijeme ovulacije on iznosi 2 do 8 ng/ml, a šestog dana nakon otpuštanja LH vala postiže maksimum i iznosi 8 do 20 ng/ml. Osjemenjivanje treba planirati za 4 – 6 dana nakon ispuštanja LH vala, odnosno 2 do 4 dana nakon ovulacije.

I koncentracija progesterona također se može mjeriti pomoću radioimunološkog testa (RIA) te ELISA kita, a točnost im je u dan do dva u većini slučajeva.

4.5. Ultrazvučni pregled jajnika

Redovitim pregledom je moguće pratiti rast folikula i odrediti vrijeme ovulacije. U početku i sredinom proestrusa folikuli su veličine 2-3 mm, u kasnom proestrusu 5 mm, a u periodu poslije otpuštanja LH vala i ovulacije veličina iznosi 7-10 mm.

4.6. Split estrus

U kuja sa lažnim estrusom, u kojih izostaje LH val i zbog čega posljedično izostaje i ovulacija, sve ostale promjene, fizičke, kliničke i promjene ponašanja su prisutne, iako početak estrusnog ponašanja može biti slabije izražen i intermitentan. Jedini način za razaznavanje, da li je posrijedi *split estrus* jest određivanje koncentracije progesterona nakon ovulacije. Koncentracija bi trebala rasti do 10 ng/ml u periodu od 2 do 3 tjedna. Također, *split estrus* često karakterizira ponavljanje proestrusa za 1-10 tjedana.

5. METODE UMJETNOG OSJEMENJIVANJA KUJA

Za umjetno osjemenjivanje kuja se koriste dvije osnovne metode, intravaginalno i intrauterino umjetno osjemenjivanje. Kod intrauterinog osjemenjivanja postoji nekirurška tehnika upotrebom *Norveško/Skandinavskog katetera* sa ili bez endoskopa te kirurška, odnosno laparoscopska tehnika.

5.1. Intravaginalno osjemenjivanje kuja

Intravaginalno se osjemenjuje upotrebom plastičnog katetera (npr. goveđi uterinog katetera odrezan na određenu dužinu) na koji je pričvršćena jednokratna plastična brizgalica (FARSTAD, 2010.). Pipeta se uvodi u rodnicu dok kuja stoji i umeće se pažljivo do baze paracerviksa, pazеći da se izbjegne ulaz u uretru. Sjeme se aplicira duboko intravaginalno. Pipetu treba navlažiti ejakulatom ili razrjeđivačem te nježno uvesti u vaginu po dorzalnoj stijenci. Pritom je preporučljivo pipetu rotirati lagano lijevo – desno. Smjer uvlačenja je prvo dorzokranijalan, a poslije usporedan sa kralježnicom. Kada prilikom guranja osjetimo čvršći otpor, prestanemo s guranjem i počnemo sa polaganom aplikacijom sjemena. Ako je pipeta na pravom mjestu i kuja spremna na osjemenjivanje, negativan tlak pomagać će istjecanju sjemena (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.). Za vrijeme postupka osjemenjivanja i kroz sljedećih 10 minuta kuja se drži u položaju sa podignutim stražnjim dijelom tijela i spuštenom glavom, da ne bi došlo do istjecanja sjemena. Prilikom osjemenjivanja može se koristiti balon kateter koji ima dio koji se napuhuje i zadaća mu je da oponaša bulbus penisa kod erekcije (FARSTAD, 2010.).

5.2. Intrauterino osjemenjivanje kuja

Glavne indikacije za intrauterino osjemenjivanje su slaba gustoća svježeg sjemena te upotreba smrznutog – otopljenog sjemena

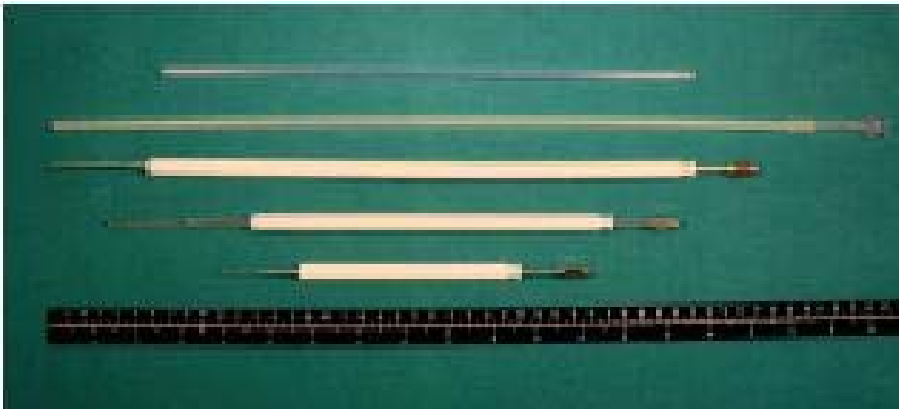
5.2.1. Intrauterino osjemenjivanje upotrebom Norveško/Skandinavskog katetera

Da bi se olakšao postupak palpacije cerviksa, kuja mora imati prazan želudac i ispražnjen mokraćni mjehur. Uvođenje katetera je olakšano ako je stidnica kuje podignuta do

ispod anusa, u položaju kao kad se priprema za parenje. Sjeme se aplicira izravno u maternicu bimanualnom metodom. Jednom rukom se fiksira cerviks preko abdomena a drugom rukom se uvodi skandinavski kateter intracervikalno u maternicu (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.). Skandinavski kateter se sastoji od 1-2 mm širokog čeličnog katetera čiji je vrh širok 0.75 – 1 mm, a dužina mu može biti 20, 30 ili 40 cm. Oprema za osjemenjivanje se sastoji od skandinavskog katetera i plastične vodiljne cijevi koji služi sa zaštitu i stabilnost katetera, za širenje vagine i za zaštitu sluznice vagine tokom umetanja katetera.

To je ne kirurška metoda koja zahtjeva praksu, no kada se jednom savlada omogućava UO u ne sediranih kuja koje stoje kroz nekoliko minuta. Ova metoda je jednostavna i jeftina (FARSTAD, 2010.).

Slika 8. Tri veličine Norveško – Skandinavskog za intrautrino UO i dvije veličine rigidnog plastičnog katetera za intravaginalno UO



Preuzeto: LINDE – FORSBERG, 2010.

5.2.2. Transcervikalno endoskopsko osjemenjivanje

Tehnika uključuje palpaciju cerviksa preko trbušne stjenke, vizualizaciju cerviksa koristeći rigidni endoskop i prolaz plastičnog katetera kroz cervikani kanal. Prednost endoskopske tehnike je mogućnost vizualizacije cerviksa i cervikalnog kanala (WILSON, 2003). Za transcervikalno osjemenjivanje koristi produženi cistouretroskop dužine 29 cm i 22 Fr promjera. Vaginoskop se sastoji od rigidnog teleskopa sa kutom gledanja od trideset stupnjeva, izvora hladnog svjetla i kamere. Endoskop može biti korišten i bez kamere ali bez sumnje njezina prisutnost olakšava cijeli zahvat. Kateterizaciju cerviksa izvodimo urinarnim

kateterom promjera 6-8 Fr (WILSON, 2003). Kuje u vrijeme trajanja estrusa mogu biti jednostavno obuzdane na specijalno dizajniranom postolju, tako da ne mogu sjesti. Endoskop uvodimo kroz dorzalnu komisuru stidnih usana da izbjegnemo klitoris koji se nalazi unutar ventralnih komisura. Kut uvođenja moramo prilagoditi nagibu vestibuluma i osigurati lagan prolaz preko ruba zdjelice izbjegavajući orificij uretre. Kad lociramo cervikalnu os, vrh katetera uvodimo u os zajedničkom manipulacijom cisouretroskopa i katetera te apliciramo sjeme. Kateter pomičemo pažljivim okretanjem (WILSON, 2003). Ovaj postupak zahtjeva upotrebu skupe opreme, no prednosti su što vlasnik može pratiti cijeli postupak na ekranu i što ova oprema omogućuje pregled reproduktivnog trakta kao i mogućnost njegove biopsije (FARSTAD,2010.). Ovom tehnikom je moguće osjemeniti širok spektar pasmina, iako velike i pretile pasmine mogu predstavljati problem.

Slika 9. Rigidni endoskop



Preuzeto: LINDE – FORSBERG, 2010.

5.2.3. Operativna tehnika - laparotomija

Ova tehnika je potrebna ukoliko postoje anatomske prepreke u vagini ili cerviksu koje mogu sprječavati umetanje katetera ili endoskopa. Postupak zahtjeva anesteziju i laparotomiju. Sjeme se može položiti pomoću igle i brizgalice ili pomoću katetera nakon zarezivanja maternice skalpelom. (FORSTAD, 2010.). Ova tehnika nije u potpunosti etički prihvaćena.

Obzirom da je lumen maternice malen, kod intrauterinog UO, da ne bi došlo do njegovog povratka u rodnicu, ukupni volumen sjemena koji se koristi za oplodnju, ne bi trebao biti veći od 1 ml za male pasmine, 2 ml za srednje i 3 do 4 ml za velike pasmine (FARSTAD, 2010.). Kod intravaginalnog osjemenjivanja količina iznosi 3 do 5ml, također ovisno o veličini kuje. Intravaginalno UO sa svježim i sa smrznutim sjemenom zahtjeva 10% više spermija za dobivanje istih rezultat u broju legala u odnosu na intrauterno osjemenjivanje (TSUTSUI 1989, LINDE - FORSBERG i sur., 1999).

Postotak štenjenja prilikom upotrebe krioprezerviranog sjemena i njegove intrauterine aplikacije iznosi 75 – 90%, dok je kod intravaginalne aplikacije svježeg sjemena 50 %. Osjemenjivanjem intrauterinom metodom dobiva se veći broj legala nego kod intravaginalnog UO , bilo da se koristi smrznuto (51%), ohlađeno (44%) ili svježe (30%) sjeme. Broj štenadi u leglu kod osjemenjivanja intrauterinom metodom je također znatno veći nego kod intravaginalnog osjemenjivanja (LINDE – FORSBERG i FORSBERG 1993., LINDE FORSBERG i sur. 1999, LINDE – FORSBERG 2002.).

Ukoliko je moguće, postupak UO treba ponoviti nakon 24 - 48 i to uvelike pridonosi postotku oplodnje te broju plodova (LINDE - FORSBERG, 2000.).

6. ETIČNOST UMJETNOG OSJEMENJIVANJA

Nema sumnje da UO ima mnoge prednosti kao što su: mogućnost korištenja ženki ili mužjaka koji se zbog anatomskih ili patoloških razloga ne mogu pariti, sakupljeno sjeme se može upotrijebiti za oplodnju više ženki, jednostavno je za korištenje sa ciljem genetičkih unapređenja, omogućava kontroliranje spolno prenosivih zaraznih bolesti, omogućava pregled kvalitete sjemena, krioprezervacija omogućava čuvanje vrijednih gena mužjaka i nakon njegovog uginuća, nije potrebno transportiranje životinja, a to umanjuje mogućnost stresa i bolesti, itd.

No, umjetno osjemenjivanje ima i svoje mane, a neke od njih mogu biti: uzrokovanje psihičke ili fizičke traume tokom UO, mogućnost prenošenja nasljednih bolesti ili abnormalnosti, mogućnost prekomjernog iskorištavanja mužjaka, mogućnost zamjene sjemena i posljedično ne imanje spoznaje o očinstvu.

Zbog navedenih razloga protivnici UO postavljaju mnoga pitanja vezana uz etičnost UO kuja, posebice vezanih uz operativnu tehniku UO.

Da bi olakšala odluka i da bi se smanjio etički rizik vezan uz tehnologiju trebalo bi bolje objasniti kliničke razloge za korištenje UO, dati više informacija klijentima o postupku kao i dati više informacija o mogućim posljedicama UO.

7. ZAKLJUČCI

1. Kuju treba osjemenjivati u vrijeme fertilizacijskog perioda, odnosno od četvrtog do šestog dana nakon otpuštanja LH vala, odnosno dva do četiri dana nakon ovulacije
2. Upotreba krioprezerviranog sjemena zahtjeva primjenu intrauterine metode umjetnog osjemenjivanja, dok kod primjene svježeg sjemena može se primjenjivati intravaginalna metoda osjemenjivanja.
3. Primjena krioprezerviranog sjemena i intrauterine metode osjemenjivanja rezultira većim postotkom štenjenja.
4. Primjena intrauterine metode osjemenjivanja rezultira većim brojem legala i većim brojem štenadi u odnosu na intravaginalnu metodu osjemenjivanja.

8. SAŽETAK

Umjetno osjemenjivanje je postupak unošenja spermija u spolne organe ženki nakon čega se oplodnja unutar jajovoda odvija prirodnim putem. Prednosti UO pasa su brojne i iz tog razloga interes uzgajivača za UO diljem svijeta brzo raste. Postupak umjetnog osjemenjivanja obuhvaća dobivanje ejakulata od psa, ocjenu ejakulata, određivanje optimalnog vremena za osjemenjivanje kuje i unos spermija u spolne organe kuje. Sjeme koje se koristi za UO može biti svježe, ohlađeno ili duboko smrznuto. Postoje dvije osnovne metode UO, intravaginalno i intrauterino, dok kod intrauterinog postoje dvije tehnike, ne kirurška, upotrebom *Norveško/Skandinavskog katetera* sa ili bez endoskopa te kirurška, odnosno laparoscopska tehnika. Uspjeh umjetnog osjemenjivanja ovisi o odabiru točnog vremena za osjemenjivanje, upotrebi kvalitetnog sjemena, pravilnom rukovanju sa sjemenom te ispravnom odabiru tehnike UO.

Ključne riječi: kuja, umjetno osjemenjivanje, intravaginalno UO, intracervikalno UO

9. SUMMARY

Artificial insemination is the procedure of depositing of sperm in the female reproductive organs, after which fertilization naturally takes place inside the fallopian tubes. Benefits of AI are numerous and therefore the interest of breeders for the AI worldwide is growing rapidly. The procedure is artificial insemination includes obtaining semen from a dog, semen evaluation, determination of the optimal time for insemination of bitches and election of the method of depositing of semen into the reproductive organs of bitches. Semen which is used for artificial insemination can be fresh, chilled or frozen. There are two basic methods of AI , vaginal deposition and transcervical intrauterine artificial insemination, while for the intrauterine there are two techniques, non-surgical, while using a Norwegian / Scandinavian catheter with or without an aid of endoscope, and surgical or laparoscopic techniques . The success of artificial insemination depends on choosing the correct time for insemination, use of quality seeds, proper handling and proper election of the AI method.

Key words: bitch, artificial insemination, vaginal AI, transcervical AI

10.LITERATURA

1. BLOM, E. (1950): Interpretation of spermatic cytology of bulls. *Fert. Steril.* 1, 223–238.
2. CERGOLJ M., M. SAMARDŽIJA (2006): Ocjene ejakulata i spermija, Umjetno osjemenjivanje pasa. U: *Veterinarska andrologija.* (Samardžija M. Ur.). Veterinarski fakultet, Zagreb. 83 – 101, 138 – 142.
3. CONCANNON P. W., G. B. DIGREGORIO (1986): Canine vaginal cytology. U: *Small Animal Reproduction and Infertility.* (Burke T, Ur.). Philadelphia Lea and Febiger, 96-111.
4. EDENS, M. S. D., A. M. HEATH (2003): *Breeding Management in the Bitch and Queen.* U: *Small Animal Theriogenology.* (Margaret V. Root Kustritz Ur.) Elsevier Science. 33 – 61.
5. ENGLAND, G., P. W. CONCANNON (2002): Determination of the Optimal Breeding Time in The Bitch: Basic Considerations. U: *Recent Advances in Small Animal Reproduction.* (Concannon P. W., G England, J. Verstegen, C. Linde-Forsberg, Ur.). International Veterinary Information Service, Ithaca, New York. 1 - 12.
6. FOLNOŽIĆ, I., T. KARADJOLE, G. BAČIĆ, N. MAČEŠIĆ, M. KARADJOLE, M. SAMARDŽIJA, I. GETZ (2009): Vaginoskopija kuja. *Vet. Stn.* 40, 27 - 36.
7. FORSTAD, W. F. (2010): Artificial insemination in dogs. U: *Bsava Canine and Feline Reproduction and Neonathology.* (England, G , A. von Heimendahl, Ur.). 80 – 89.
8. LINDE – FORSBERG, C. (2010): Canine artificial insemination: State of the Art. *Proceedings of 7th EVSSAR Congress.* Louvain-La-Nueve, Belgium, 114-125.
9. LINDSAY F. E .F.,P. W. CONCANNON. Normal canine vaginoscopy. U: *Small Animal Reproduction and Infertility.* (Burke T, Ur.). Philadelphia Lea and Febiger, 1986, 112 – 120.
10. LOJKIĆ, M., N. MAČEŠIĆ, G. BAČIĆ, T. KARADJOLE, M. SAMARDŽIJA, I. GETZ, I. FOLNOŽIĆ, M. CERGOLJ, T. DOBRANIĆ, B. ŠKRLIN, Z. VRBANAC (2012) : Uporaba duboko smrznute i ohlađene pseće sperme na Klinici za porodništvo i reprodukciju Veterinarskog fakuleta Sveučilišta u Zagrebu. *Zbornik radova 5. Hrvatskog veterinarskog kongresa s međunarodnim sudjelovanjem.* 10. - 13. listopada 2013., Tuheljske toplice, Zagreb. 423 - 429.
11. WILSON, M. S. (2003): Endoscopic Transcervical Insemination in the Bitch. U: *Recent Advances in Small Animal Reproduction.* (Concannon P. W., G. England., J. Verstegen, C. Linde-Forsberg, Ur.). International Veterinary Information Service, Ithaca, New York. 1 – 6.

12. WILSON, M. S. (2005): Vaginoscopy and Endoscopic Transcervical Insemination in the Bitch. U: Veterinary endoscopy for the Small Animal Practitioner. (Timothy C. McCarthy, Ur.). Elsevier Saunders. 413-423.

11.ŽIVOTOPIS

Rođena sam 13.10.1982 u Zagrebu. Osnovnu školu sam pohađala u Zaprešiću. Završila sam Srednju veterinarsku školu u Zagrebu 2001. godine i te sam iste godine upisala Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Apsolvirala sam 2009. godine.