

# UPRAVLJANJE RASPLOĐIVANJEM I KONTROLA RASPLODNE SPOSOBNOSTI PASTUHA TOPLOKRVNIH PASMINA

---

Jagušt, Margareta

Master's thesis / Diplomski rad

2022

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:178:635522>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-10**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
VETERINARSKI FAKULTET

Margareta Jagušt

**UPRAVLJANJE RASPLOĐIVANJEM I KONTROLA  
RASPLODNE SPOSOBNOSTI PASTUHA TOPLOKRVNIH  
PASMINA**

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, 2022.

Sveučilište u Zagrebu  
Veterinarski fakultet  
Klinika za porodništvo i reprodukciju

Predstojnik: prof. dr. sc. Marko Samardžija

Mentorice: izv. prof. dr. sc. Martina Lojkić  
prof. dr. sc. Nikica Prvanović Babić

Članovi Povjerenstva za obranu diplomskog rada:

1. izv. prof. dr. sc. Ivan Folnožić
2. prof. dr. sc. Nikica Prvanović Babić
3. izv. prof. dr. sc. Martina Lojkić
4. doc. dr. sc. Branimira Špoljarić (zamjena)

Datum obrane diplomskog rada: 11. ožujka 2022.

**ZAHVALA**

*Zahvaljujem se svojim mentoricama izv. prof. dr. sc. Martini Lojkić i prof. dr. sc. Nikici Prvanović Babić, na pruženoj prilici za pisanje ovog diplomskog rada. Hvala Vam na uloženom trudu, vremenu i svakom savjetu kojim ste mi olakšali pisanje istog.*

*Najveće hvala mojoj obitelji, posebno mojoj majci Božani i bratu Eugenu što su uvijek bili uz mene i pružali mi podršku tijekom studiranja.*

*Hvala Tajo i baka Zlata.*

*Hvala Luki i svim mojim prijateljima.*

*Hvala i mojim četveronožnim ljubimcima Elmu, Beniju, Mukiju, Koniju i Ziggyu.*

## **POPIS PRILOGA**

### **POPIS SLIKA:**

Slika 1. Shematski prikaz spolnih organa pastuha (KÖNIG i LIEBICH, 2009.).

Slika 2. Umjetna vagina, model Hanover (HURTGEN, 2009.).

Slika 3. Shematski prikaz spermija (SJAASTAD i sur., 2017.).

Slika 4. Prikaz fantoma i stojnice za kobilu (IZVOR:

<http://www.redheartappaloosas.co.uk/artificial-insemination-semen-collection-redheart-appaloosa-stud/> ).

### **POPIS TABLICA:**

Tablica 1. Minimalni standardi koje treba zadovoljavati ejakulat kako bi s mogao koristiti za umjetno osjemenjivanje (SIEME, 2009.).

Tablica 2. Cijepljenje protiv influence (<https://inside.fei.org/fei/your-role/veterinarians/biosecurity-movements/vaccinations>).

**SADRŽAJ**

|   |    |
|---|----|
| <b>1. UVOD</b> .....  | 1  |
| <b>2. PREGLED LITERATURE</b> .....  | 2  |
| 2.1. ANATOMIJA SPOLNIH ORGANA PASTUHA.....  | 2  |
| 2.2. NEUROHORMONALNA REGULACIJA RASPLOĐIVANJA PASTUHA .....                         | 8  |
| 2.3. EJAKULAT.....  | 12 |
| 2.4. POLUČIVANJE EJAKULATA.....   | 16 |
| 2.5. OCJENA EJAKULATA I SPERMIJA.....   | 21 |
| 2.6. SPOLNO PONAŠANJE PASTUHA.....  | 28 |
| 2.7. UPRAVLJANJE RASPLodom PASTUHA TOPLOKRVNIH PASMINA I<br>UZGOJNIH TIPOVA.....    | 32 |
| 2.8. NAJČEŠĆE BOLESTI SPOLNOG SUSTAVA PASTUHA .....                                 | 37 |
| 2.9. BIOSIGURNOST U UPRAVLJANJU RASPLOĐIVANJEM PASTUHA<br>TOPLOKRVNIH PASMINA ..... | 45 |
| <b>3. RASPRAVA</b> .....  | 47 |
| <b>4. ZAKLJUČAK</b> .....   | 49 |
| <b>5. LITERATURA</b> .....  | 50 |
| <b>6. SAŽETAK</b> .....   | 56 |
| <b>7. SUMMARY</b> .....   | 57 |
| <b>8. ŽIVOTOPIS</b> .....   | 58 |

## 1. UVOD

Konj (*Equus caballus*) je sisavac iz reda *Perissodactyla*, porodice *Equidae*, roda *Equus*. Smatra se da je domaći konj (*Equus caballus*) pripitomljeni divlji konj (*Equus ferus*), a pripitomljavanje je započelo oko 4000 godina pr. Kr. na području Euroazije. Oko 3500. godina pr. Kr. počeo se koristiti za jahanje te u mnoge druge svrhe kao što su rad, transport i vojska.

Mnogobrojne pasmine konja su podijeljene u dvije skupine: toplokrvne i hladnokrvne pasmine. Konji toplokrvnih pasmina su temperamentni i inteligentni. Imaju dugačak i mišićav vrat, izražen greben, duža mišićava bedra, blago oborene i zaobljene sapi, vitke i duge noge, prosječne visine u grebenu 150-180 cm i težine od 400-500 kg. Konji toplokrvnih pasmina danas se najčešće koriste kao sportski, jahači konji.

U drugoj polovici XX. stoljeća značaj u uzgojnom smislu dobivaju toplokrvne pasmine konja te razvoj konjičkog sporta nameće potrebu za kvalitetnim sportskim pasminama. Uvažavajući gospodarske, sportske, turističke, ekološke, kulturološke i druge utjecaje konjičkog sektora na život društva, odnosno zajednice, evidentan je interes razvoja i unaprjeđenja ove djelatnosti. Prema podacima Središnjeg registra kopitara kojeg vodi Ministarstvo poljoprivrede, broj kopitara u RH u posljednjih 20-ak godina kontinuirano raste, a raste i interes uzgajivača za nabavu grla za sport i rekreaciju te njihovo uključivanje u uzgojne programe. Razvijena konjička industrija traži različite tipove konja, od onih pogodnih za vrhunska sportska natjecanja do onih koji su pogodni za edukaciju i uključivanje djece u jahaće aktivnosti. Kako bi uzgojili vrhunske sportske i jahaće konje nužno je posezati za kvalitetnim uzgojnim materijalom (ANONIMUS, 2021.a).

Cilj ovog diplomskog rada je iznijeti ključne parametre nužne za uspješno upravljanje rasplodivanjem pastuha toplokrvnih pastuha s obzirom na to da je njihova uloga u rasplodivanju čak veća i od uloge kobila. Rasplodni pastusi odabiru se temeljem svojih rezultata, eksterijera i podrijetla (PRVANOVIĆ BABIĆ i sur., 2019.). Mnogo čimbenika ima utjecaj na rasplodnu sposobnost pastuha te svaki odmak od homeostaze predstavlja ugrozu plodnosti te utječe na reproduktivnu učinkovitost.

## 2. PREGLED LITERATURE

### 2.1. ANATOMIJA SPOLNIH ORGANA PASTUHA

Muški spolni sustav sastoji se od parnih muških spolnih žlijezda, sjemenika (*testis*, *orchis*) koji su smješteni u mošnji (*scrotum*), pasjemenika (*epididymis*), sjemenovoda (*ductus deferens*), mokraćnice (*urethra*), akcesornih spolnih žlijezda (*glandulae genitales accessoriae*), muškog kopulacijskog organa (*penis*) i prepucija ili puzdre (*praeputium*) (ČERVENY i sur., 2009.).

#### MOŠNJA (*scrotum*)

Mošnja pastuha nalazi se visoko u ingvinalnoj regiji. U mošnji se nalaze testisi, epididimis, sjemeno uže i *m.cremaster*. Zadaća mošnje je zaštita navedenih struktura te termoregulacija testisa. Testisi se nalaze u mošnji kako bi održavali temperaturu koja je nekoliko stupnjeva niža od temperature tijela, što je neophodno za odvijanje spermatogeneze (CHENIER, 2009.). Na hladnoći se mošnja skraćuje kako bi se testisi približili trbušnoj šupljini i time spriječili hlađenje. Na vrućini se izdužuje, a testisi se udaljuju od tijela kako bi održavali nižu temperaturu. Mošnja se sastoji od četiri sloja: kože, *tunicae dartos*, *fasciae scroti* i parijetalnog lista *tunicae vaginalis* (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.). Koža mošnje je tanka, glatka, lojasta i opskrbljena lojnim i znojnim žlijezdama koje pomažu u termoregulaciji. Razdijeljena je longitudinalnom prugom, *raphe scroti* (CHENIER, 2009.; CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.). *Tunica dartos* prijanja uz kožu i sastoji se od glatkih mišića i fibroelastičnog tkiva. Duž *raphe scroti* tvori medijalni razdjel, *septum scroti* (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.). Stupanj kontrakcije odnosno relaksacije ovog sloja omogućuje promjene u veličini, obliku i položaju mošnje u odnosu na tijelo i tako pomaže u regulaciji temperature testisa. *Fascia scroti* je labavo vezivno tkivo između *tunicae dartos* i parijetalnog lista *tunicae vaginalis*, a omogućuje testisima i pridruženim strukturama slobodno kretanje u mošnji. Parijetalni list *tunicae vaginalis* je evaginacija parijetalnog peritoneuma koja se formira za vrijeme spuštanja testisa, oblaže mošnju i naslonjena je na visceralni list *tunicae vaginalis* koji oblaže testise. Šupljina *tunicae vaginalis* je prostor između parijetalnog i visceralnog lista *tunicae vaginalis*, uobičajeno sadrži malu količinu tekućine koja omogućava slobodno kretanje testisa (CHENIER, 2009.).



## SJEMENICI, TESTISI (*testis, orchis*)

Testisi su glavni parni muški spolni organi u kojima se sintetiziraju zametne stanice (spermiji). Nastaju i razvijaju se tijekom ontogeneze u abdominalnoj šupljini (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.). Testisi pastuha su ovalni, položeni horizontalno u skrotumu, otprilike jednake veličine (CHENIER, 2009.). Osim skrotuma, testisi su obloženi s *tunica albuginea*, slojem od fibroznog tkiva i glatkih mišićnih vlakana, te sadrži *a.* i *v. testicularis*. *Tunica albuginea* prodire u parenhim testisa i dijeli ga na režnjiće (*lobuli testis*). S vanjske strane na nju naliježe visceralni list *tunicae vaginalis* koja predstavlja visceralni list peritoneuma (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.; ČERVENY i sur., 2009.; CHENIER, 2009.).

Parenhim testisa grade savijeni sjemeni kanalići *tubuli seminiferi contorti*, ravni sjemeni kanalići *tubuli seminiferi recti* i odvodni kanalići *ductuli efferentes testis*. U savijenim sjemenim kanalićima se odvija spermatogeneza te se u njihovoj epitelnoj stijenci nalaze potporne (Sertolijeve) stanice i stanice zametnog epitela. Savijeni sjemeni kanalići oblikovani su kao omče čiji završni ravni dijelovi *tubuli seminiferi recti* prelaze u *rete testis*. Iz *rete testis* izlaze odvodni kanalići koji probijaju *tunicu albugineu* i ulaze u glavu pasjemenika. U intersticiju koji ispunjava prostor između kanalića nalaze se *Leydigove intersticijske stanice*, odgovorne za proizvodnju muških steroidnih spolnih hormona (ČERVENY i sur., 2009.).

Položaj testisa u odnosu na skrotum možemo lako odrediti palpacijom fibroznog ligamenta epididimisa koji se nalazi na kaudalnom polu testisa. Veličina testisa varira ovisno o dobi pastuha, godišnjem dobu, pasmini, dnevnoj proizvodnji sjemena, reproduktivnom statusu itd. (LITTLE i HOLYOAK, 1992.). Testis pastuha teži od 150 do 300 g, širine 50-80 mm, visine 60-70 mm i dužine 80-140 mm (CHENIER, 2009.).

## PASJEMENICI (*epididymis*)

*Epididymis* pastuha je jako zavijen kanal, duljine oko 70 m (CHENIER, 2009.), a sastoji se od glave (*caput epididymis*), tijela (*corpus epididymis*) i repa (*cauda epididymis*). Glava epididimisa nalazi se dorzomedijalno na kranijalnom polu testisa, tijelo epididimisa nalazi se dorzolateralno, a rep epididimisa dorzalno na kaudalnom polu testisa. Sve tri strukture su palpabilne, ali radi napetosti i debljine *m.cremastera* teže je razlikovati i palpirati glavu i tijelo epididimisa (LITTLE i HOLYOAK, 1992.). Glava epididimisa sastoji se od desetak ili više izvodnih kanalića (*ductuli efferentes*) koji izlaze iz *rete testis* i sjedinjuju se u glavni kanal (*ductus epididymis*) koji tvori tijelo i rep epididimisa (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.). Rep je pričvršćen za kaudalni kraj sjemenika pomoću vlastitog ligamenta testisa (*ligamentum*

*testis proprium*), a za *processus vaginalis* pomoću ligamenta repa pasjemenika (*ligamentu caudae epididymidis*). *Lig. caudae epididymidis* pruža vlakna u duboki sloj skrotuma te su ona naročito dobro razvijena u pastuha i čine ligament mošnje (*ligamentum scroti*). *Ductus epididymis* nastavlja se medijalno na repu pasjemenika u sjemenovod (*ductus deferens*) (ČERVENY i sur., 2009.). Zadaća epididimisa je transport spermija, koncentracija i zrenje spermija, skladištenje zrelih i na oplodnju sposobnih spermija te pri spolnom aktu regulira izlučivanje spermija (ejakulaciju) (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.).

#### SJEMENOVOD (*ductus deferens*)

Sjemenovodi su parni, tanki mišićni kanali koji odvođe sjeme od pasjemenika do uretre. Pružaju se od repa odgovarajućeg epididimisa dorzalno zajedno s odgovarajućim žilama, živcima i mišićima kroz sjemeno uže kroz ingvinalni kanal i ulijevaju se u početni dio mokraćnice na *colliculus seminalis* (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.; CHENIER, 2009. ). *Colliculus seminalis* se nalazi na ventromedijalnom zidu uretre oko 5 cm kaudalno od mjesta gdje se uretra spaja s mokraćnim mjehurom. To je također zadebljanje gdje se i akcesorne spolne žlijezde ulijevaju u uretru (CHENIER, 2009.). Prije samog ušća u uretru sjemenovod je spojen s odvodnim kanalićem mjehurićastih žlijezda (*ductus excretorius*) u zajednički *ductus ejaculatorius* (ČERVENY i sur., 2009.). U pastuha sjemenovod je dužine 50-60 cm, promjera 5 mm (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.).

#### SJEMENSKO UŽE I VASKULARIZACIJA I INERVACIJA SJEMENIKA I NJEGOVIH OVOJNICA

Sjemensko uže obavijeno je parijetalnim slojem *tunicae vaginalis* koja se proteže distalno od unutarnjeg ingvinalnog prstena. Unutar svakog sjemenskog užeta nalazi se odgovarajući sjemenovod, *a.testicularis*, *v.testicularis*, limfne žile i živci. *M.cremaster* je smješten kaudolateralno u svakom sjemenskom užetu (CHENIER, 2009.).

*A.testicularis* grana se iz *a.abdominalis*, spušta se kroz ingvinalni prsten i daje ogranke za opskrbu pasjemenika (*rami epididymales*) i za sjemenovod (*rami ductus deferentis*). Na testisu se grane *a. testicularis* nalaze u tuniki albuginei.

Vene napuštaju testis tvoreći mrežoliki pletor (*plexus pampiniformis*) oko zavoja arterije. Iz *plexus pampiniformis v.testicularis* se ulijeva u *v.cava caudalis* (CHENIER, 2009.; ČERVENY i sur., 2009.).

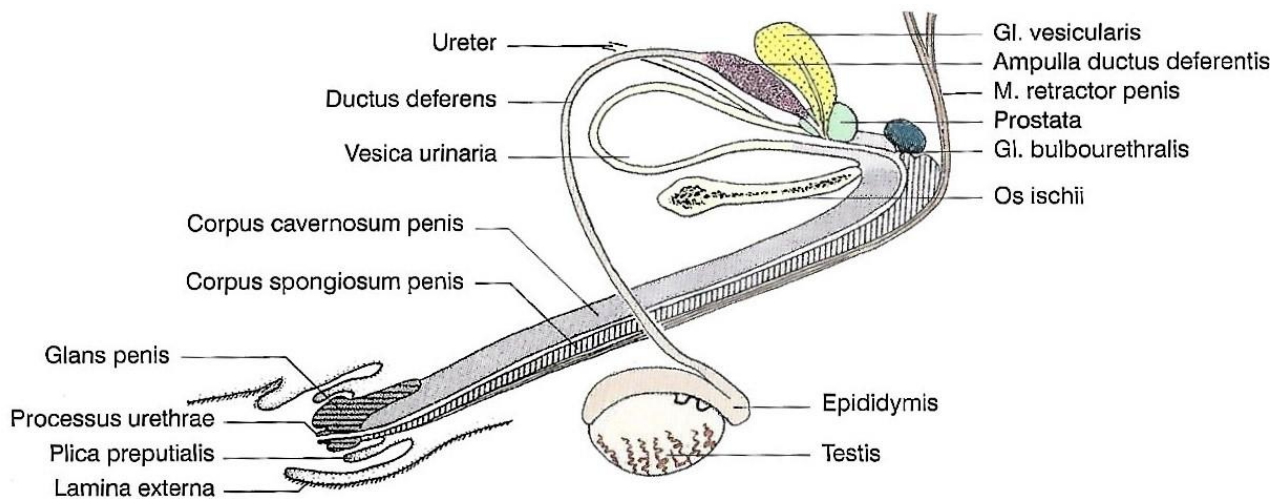
Limfne žile ulijevaju se u *lymphonodi lumbales aortici* i *lymphonodi iliaci mediales*. One imaju važnu ulogu u prijenosu hormona proizvedenih u testisu (ČERVENY i sur., 2009.).

Testis i epididimis inervira autonomni živčani sustav. Parasimpatička vlakna dolaze iz *n.vagus* i *plexusa pelvinus*, a simpatička iz *plexusa mesentericus caudalis* i *plexusa pelvinus* (ČERVENY i sur., 2009.).

*A. i v. pudenda externa* vaskulariziraju skrotum. Limfne žile odlaze u *lymphonodi scrotales* s. *lymphonodi inguinales superficiales*. U inervaciji skrotuma sudjeluju *n. iliohypogastricus*, *n. ilioinguinalis* i *n. genitofemoralis* (ČERVENY i sur., 2009.).

### MOKRAĆNICA (*urethra*)

Muška mokraćnica (*urethra masculina*) je dugačka mišićno-sluznička cijev koja se proteže od kaudalnog kraja vrata mokraćnog mjehura unutarnjim otvorom (*ostium urethrae internum*) i završava na slobodnom kraju penisa vanjskim otvorom (*ostium urethrae externum*). Na njoj možemo razlikovati dva dijela: zdjelčni dio (*pars pelvina*) i penisni dio (*pars penina*). *Pars pelvina* možemo podijeliti u dva dijela: *pars preprostatica*, koji vodi samo mokraćnicu te njena sluznica tvori dorzalno u lumenu greben (*crista urethralis*), koji završava zadebljanjem *culliculus seminalis*, na kojem su otvori oba sjemenovoda i *pars prostatica*, koji je spojen s odvodnim kanalima akcesornih spolnih žlijezda (ČERVENY i sur., 2009.; CEGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.).



Slika 1. Shematski prikaz spolnih organa pastuha (KÖNIG i LIEBICH, 2009.).

## AKCESORNE SPOLNE ŽLIJEZDE (*glandulae genitales accessoriae*)

Kod pastuha od akcesornih spolnih žlijezdi nalazimo: prostatu, mjehuričastu žijezdu, bulbouretralnu žlijezdu i žlijezde ampule sjemenovoda. Mješavina sekreta akcesornih spolnih žlijezdi naziva se sjemena plazma te se sastoji od proteina, ugljikohidrata, mliječne kiseline, glicerilfosforilkolina i drugih supstrata koji sudjeluju u metabolizmu i funkciji spermija (CHENIER, 2009.).

### Prostata (*prostata*)

Prostata pastuha sastoji se od dva lateralna režnja koja povezuje isthmus. U odraslog pastuha svaki režanj je širok otprilike 4-6 cm i deo 2-4 cm. Nalazi se na kranijalnom kraju *m. urethralis*. Iz svakog režnja izlazi veći broj izvodnih kanalića koji se ulijevaju lateralno na *colliculus seminalis* (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.; CHENIER, 2009.). Sekret prostate je lužnat što je značajno za metabolizam spermija, posebno za njihovu pokretljivost (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.).

### Mjehuričasta žlijezda (*glandula vesicularis*)

Mjehuričaste žlijezde su parne žlijezde, oblikom izduženog mjehura (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.). Njihova odvodna cijev (*ductus excretorius*) spaja se sa sjemenovodom (*ductus deferens*) neposredno prije njegova završetka te se njihov zajednički odvod opisuje kao *ductus ejaculatorius* (ČERVENY i sur., 2009.). Sekret mjehuričastih žlijezdi čini gel frakciju ejakulata. Volumen sekreta mjehuričastih žlijezdi je najveći u sezoni parenja (CHENIER, 2009.).

### Bulbouretralna žlijezda (*glandula bulbourethralis*)

Bulbouretralne žlijezde su parne žlijezde koje se kod pastuha nalaze dorzalno na zdjeličnom dijelu uretre, oko 8 cm kaudalno od prostate, veličine oraha te pokrivene parnim mišićima *m. bulbocavernosus* (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.; CHENIER, 2009.). Sekret bulbouretralnih žlijezdi čini većinu preejakulatorne tekućine čija je zadaća očistiti uretru prije same ejakulacije (CHENIER, 2009.).

### Žlijezde ampule sjemenovoda (*glandulae ampullae*)

Ampule sjemenovoda su zadebljali distalni dijelovi odvodnih kanala. Na njihovom distalnom kraju nastavljaju se kroz zid uretre te se otvaraju u *colliculus seminalis* (LITTLE i HOLYOAK, 1992.). Neki autori smatraju da *ampullae* nisu akcesorne spolne žlijezde, već

samo služe za skladištenje sperme, za razliku od ostalih koji ih smatraju žlijezdama zbog mnogih razgranatih tubularnih žlijezda u njihovom zidu (CHENIER, 2009.).

#### MUŠKI KOPULACIJSKI ORGAN (*penis*)

Penis pastuha sastoji se od tri dijela, korijena penisa (*radix penis*), tijela penisa (*corpus penis*) i glavića (*glans penis*) te je mišićnokavernoznog tipa (CHENIER, 2009.). Penis je sastavljen od tri stupa erektilnog tkiva: parnih *corpora cavernosa penis* i neparnog *corpus spongiosum penis*. Stupovi erektilnog tkiva su samostalni na korijenu, ali se u ostalim dijelovima penisa spajaju (ČERVENY i sur., 2009.). Korijen penisa započinje na sjednom luku (*arcus ischiadicus*) u obliku dva dorzalna stupa erektilnog tkiva, odnosno kraka penisa (*crura penis*) koji se sastoje od šupljikavog tkiva okruženog vezivnim tkivom (*tunica albuginea corporum cavernosum*). Parna šupljikava tijela (*corpora cavernosa penis*) međusobno se približavaju i nastavljaju u tijelo penisa (*corpus penis*) koje predstavlja glavninu organa (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.; ČERVENY i sur., 2009.; CHENIER, 2009.). Spužvasto tijelo (*corpus spongiosum penis*) nastaje na zdjeličnom izlazu, nadovezuje se na proširenje koje oblikuje lukovicu penisa (*bulbus penis*) koja okružuje penisni dio mokraćnice. Nastavlja se distalno na vrh penisa te tvori *corpus spongiosum glandis*, odnosno glavić penisa (*glans penis*) (ČERVENY i sur., 2009.; CHENIER, 2009.). *Corpus spongiosum glandis* je zaslužan za specifičan izgled vrha penisa pastuha gljivastog oblika. Završni dio mokraćnice (*processus urethrae*) je vidljiv u centru glavića oko kojeg se nalazi središnje udubljenje (*fossa glandis*) u kojoj se nakuplja smegma, što može dovesti do neugodnosti prilikom mokrenja i ejakulacije (ČERVENY i sur., 2009.; CHENIER, 2009.).

Mišići penisa su:

- *m. ischiocavernosus* – parni, snažni mišić koji okružuje krakove penisa do njihovog spajanja u korijen penisa
- *m. bulbospongiosus* – proteže se cijelom dužinom penisa te je nastavak poprečnoprugastog *m. urethralis*. On pomaže glatkim ritmičnim kontrakcijama penisnom dijelu uretre tijekom izlučivanja sekreta (mokraće i ejakulata)
- *m. retractor penis* – parni mišić koji se proteže cijelom dužinom penisa. Pomaže pri povratku penisa u prepucij posljedično detumescenciji (LITTLE i HOLYOAK, 1992.; ČERVENY i sur., 2009.; CHENIER, 2009.).

## PUZDRA (*preputium*)

Puzdra je dvostruka invaginacija kože koja nalikuje koži skrotuma jer je u pravilu bezdlačna i dobro opskrbljena lojnim i znojnim žlijezdama. Njena primarna uloga je zaštita neerektalnog penisa (ČERVENY i sur., 2009.; CHENIER, 2009.). Sastoji se od vanjskog sloja (*lamina externa*) i unutarnjeg sloja (*lamina interna*) koji prelaze jedan u drugi na otvoru puzdre (*ostium preputiale*). Puzdra pastuha se razlikuje po tome što ima dodatni nabor (*plica preputialis*) i prsten (*anulus preputialis*) koji dopuštaju znatno produživanje penisa za vrijeme erekcije (ČERVENY i sur., 2009.).

## VASKULARIZACIJA I INERVACIJA MOKRAĆNICE I PENISA

*A. pudenda interna* opskrbljuje mokraćnicu, dodatne spolne žlijezde i penis. Njena grana *a. prostatica* opskrbljuje spolne organe koji se nalaze u zdjeličnoj šupljini. *A. pudenda interna* se također dijeli u *a. bulbi penis* koja opskrbljuje *corpus spongiosum* penisa, u *a. profunda penis* za opskrbu *corpora cavernosa penis* i *a. dorsalis penis* koja opskrbljuje *glans penis*. *A. pudenda externa* opskrbljuje prepucij. *N. pudendus* inervira penis (ČERVENY i sur., 2009.).

## 2.2. NEUROHORMONALNA REGULACIJA RASPLOĐIVANJA PASTUHA

Endokrinologija reprodukcije proučava endokrine žlijezde odnosno djelovanje njihovih hormona uključenih u reprodukciju životinja. Hormoni su kemijski spojevi koji se sintetiziraju i izlučuju iz endokrinih žlijezdi u malim količinama izravno u krvotok i dalje transportiraju u ciljni organ gdje reguliraju specifične biokemijske procese (RUPIC, 2015.). U reprodukciji pastuha najvažniju ulogu imaju hipotalamus, hipofiza i testisi. Spermatogeneza ovisi o funkciji osi hipotalamus-hipofiza-testis, koja uključuje sekreciju hormona hipofize u perifernu cirkulaciju koji dalje imaju utjecaj na hormone testisa (ROSER, 2009.). Glavni hormoni uključeni u reprodukciju pastuha su gonadotropin oslobađajući hormon (GnRH) kojeg proizvodi hipotalamus, luteinizirajući hormon (LH) i folikulostimulirajući hormon (FSH) koje luči prednji režanj hipofize, androgeni koje luče Leydigove stanice testisa te estrogeni i inhibin koje luče Sertolijeve stanice testisa (HOLDCRAFT i BRAUN, 2004.).

## INTERREGULACIJA EPIFIZA – HIPOTALAMUS - HIPOFIZA

Normalna funkcija testisa ovisi o funkcionalnoj epifizi i osi hipotalamus -hipofiza - testis (ROSER, 2008.). Epifiza ili pinealna žlijezda je neparni duguljasti organ, smješten u epitalamusu (KÖNIG i LIEBICH, 2009.). Iz aminokiseline triptofan sintetizira hormon melatonin koji se luči kao odgovor na vizualne svjetlosne podražaje koji se prenose živčanim putem s retine do epifize (SJAASTAD i sur., 2017.). Ima gonadotropne učinke koji su važni za sezonsku aktivnost spolnog ciklusa te regulira proizvodnju i sekreciju GnRH (KÖNIG i LIEBICH, 2009.; ROSER, 2009.). U konja, u kojeg melatonin ima antigonadotropni učinak, stvaranje melatonina koče svjetlosne stimulacije te on svoj maksimalni reproduktivni kapacitet postiže u razdobljima dugih dana (SHARP i CLEAVER, 1993.; KÖNIG i LIEBICH, 2009.; SJAASTAD i sur., 2017.). Povećanjem svjetlosnog perioda izlučivanje melatonina se smanjuje, a otpuštanje GnRH, LH i FSH se povećava kao i aktivnost testisa (ROSER, 2009.). Sa smanjenjem svjetlosti, epifiza proizvodi više melatonina koji inhibira oslobađanje GnRH što rezultira smanjenjem gonadotropina, steroida i aktivnosti testisa (SHARP i CLEAVER, 1993.). Za razliku od većine kobilica, pastusi zadržavaju sposobnost parenja i izvan rasplodne sezone, no tada njihov ejakulat sadrži manji broj spermija (ROSER, 2009.).

Hormonska regulacija aktivnosti gonada prati osovino hipotalamus-prednji režanj hipofize-testis. Hipofiza je neparni organ smješten u udubljenju kosti baze lubanje, odmah ispod hipotalamusa. S hipotalamusom je povezana hipofiznim drškom u kojem se nalaze živčana vlakna i krvne žile. Hipotalamus služi kao spona između živčanog i endokrinog sustava. Peptidni hormon hipotalamusa, hormon koji oslobađa gonadotropine (GnRH), prenosi se do prednjeg režnja hipofize pulzatorno portalnim sustavom te regulira sekreciju dvaju gonadotropnih hormona, FSH i LH iz prednjeg režnja hipofize. FSH i LH potiču aktivnost gonada (SJAASTAD i sur., 2017.). FSH je nužan za gametogenezu te se veže na Sertolijeve stanice radi oslobađanja estrogena, inhibina, aktivina, androgen vežućeg proteina (ABP), transferina, inzulinu sličnog čimbenika rasta-1 (IGF-1) i drugih čimbenika potrebnih za spermatogenezu (AMANN, 1993.; SJAASTAD i sur., 2017.). LH potiče proizvodnju i oslobađanje testosterona i estrogena iz Leydigovih stanica (EISENHAUER i ROSER, 1995.). Proteini testisa i steroidni hormoni vraćaju se u hipotalamus i hipofizu putem periferne cirkulacije te reguliraju izlučivanje GnRH, LH i FSH (ROSER, 2009.). Testosteron ima učinak negativne povratne sprege, uglavnom na hipotalamus, ali i na prednji režanj hipofize. Inhibin negativnom povratnom spregom djeluje na oslobađanje FSH iz prednjeg režnja hipofize (SJAASTAD i sur., 2017.).

Testosteron potiče razvoj i funkciju akcesornih spolnih žlijezda, rast tijela i razvoj sekundarnih spolnih obilježja. Nužan je za održavanje normalnog spolnog nagona, proizvodnju spermija, održavanje muškog provodnog sustava, erekciju penisa i ejakulaciju. O djelovanju testosterona izravno ovise i muški spolni refleksi (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.).

U pastuha kao i u ostalih vrsta čini se da su sezonske promjene u oslobađanju GnRH/LH djelomično regulirane opioidima (GERLACH i AURICH, 2000.). Opioidi se luče iz mozga, odlaze u hipotalamus i uzrokuju smanjeno otpuštanje GnRH tijekom zimskih mjeseci (GERLACH i AURICH, 2000.).

Proces spermatogeneze, steroidogeneze i testikularne funkcije je reguliran interakcijom endokrinih, parakrinih i autokrinih čimbenika (HOLDCRAFT i BRAUN, 2004.). Glavna endokrina kontrola je GnRH koji signalizira hipofizi da proizvodi LH i FSH (WEINBAUER i NIESCHLAG, 1993.). Osim endokrine kontrole na djelovanje LH i FSH, na funkciju testisa i proizvodnju sperme utječu lokalni steroidi, proteini i peptidi koje nazivamo parakrino-autokrinim čimbenicima koji koordiniraju različite funkcije stanica testisa i/ili reguliraju aktivnost gonadotropnih hormona ovisno o uvjetima i potrebama (ROSER, 2009.). Parakrini čimbenici su oni koje stanica izlučuje u izvanstaničnu tekućinu, a djeluju na druge vrste okolnih ciljnih stanica dok autokrini čimbenici izlučeni u izvanstaničnu tekućinu vezanjem za receptore na staničnoj površini djeluju na istu stanicu koja ih je proizvela (GUYTON i HALL, 2012.).

Inzulinu sličan čimbenik rasta 1 (IGF-1) je jednolančani polipeptid (ROSER, 2009.). Kod pastuha je nađen u tkivu testisa i sjemenoj tekućini (HESS i ROSER, 2001.), a smatra se da ima ulogu u spermatogenezi (COLON i sur., 2007.). IGF-1 potiče proliferaciju Sertolijevih stanica u razdoblju prije puberteta, ima mitogeni učinak na nezrele Leydigove stanice i potiče proizvodnju testosterona (COLON i sur., 2007.).

Transferin je protein koji veže željezo i isporučuje ga kao nutritivnu komponentu zametnim stanicama. Sertolijeve stanice sintetiziraju transferin i kada se veže za željezo izlučuje se u adluminalni prostor te je tada dostupan receptorima na spermatocitima. Istraživanja ukazuju da koncentracija transferina u sjemenoj tekućini može biti pokazatelj stanja Sertolijevih stanica i spermatogenog potencijala. U pastuha maksimalna proizvodnja javlja se u doba puberteta (ROSER, 2009.).

Sertolijeve stanice proizvode estrogen s najvećim lučenjem tijekom puberteta. Leydigove stanice proizvode većinu estrogena u odraslog pastuha. Testosteron proizvode Leydigove stanice tijekom razvoja i u odrasloj dobi (ROSER, 2007.). U pastuha se receptori



za estrogen nalaze na Leydigovim, Sertolijevim i zametnim stanicama (BILINSKA i sur., 2006.). Receptori za androgene se nalaze na Leydigovim, Sertolijevim i peritubularnim stanicama. Estrogeni i androgeni važni su u ranom razvoju testisa i spermatogenezi, reguliraju funkciju Sertolijevih stanica, Leydigovih stanica, peritubularnih mioidnih stanica i zametnih stanica vezanjem za njihove receptore i izazivanjem staničnog odgovora (HOLDCRAFT i BRAUN, 2004.; BILINSKA i sur., 2006.; ROSER, 2007.). Androgeni su ključni u razvoju muških spolnih organa i spermatogenezi. Estrogen je važan u regulaciji funkcije testisa (ROSER, 2007.). Estrogen i testosteron također reguliraju oslobađanje LH putem povratne sprege (ROSER, 2009.). Estrogen se sintetizira iz androgenih hormona pomoću enzima aromataze. Intratestikularna koncentracija estradiola i konjugiranog estrogena povećava se sa sazrijevanjem testisa. Nema razlike u intratestikularnoj koncentraciji estradiola, konjugiranog estrogena i testosterona u plodnih, neplodnih pastuha i pastuha smanjene plodnosti, dok je koncentracija estrogena u plazmi znatno manja kod neplodnih pastuha. Koristeći tehniku stanične kulture testisa pastuha, istraživanje je pokazalo da LH stimulira Leydigove stanice na proizvodnju testosteron i estrogena, a FSH utječe na proizvodnju estrogena iz Sertolijevih stanica (ROSER, 2009.).

Inhibin i aktivin su glikoproteini koji se primarno proizvode u Sertolijevim stanicama, podjedinice možemo naći i u Leydigovim i u zametnim stanicama ovisno o stadiju razvoja testisa. Oba proteina imaju endokrinu, parakrinu i autokrinu funkciju. Inhibin i aktivin izlučeni u perifernu cirkulaciju reguliraju izlučivanje FSH iz hipofize (ROSER, 2009.). Inhibin inhibira proizvodnju i sekreciju FSH, dok aktivin uzrokuje porast FSH (ROSER, 2008.). Dokazano je da inhibin i aktivin, kao parakrini faktori, imaju utjecaj na steroidogenezu i spermatogenezu (ROSER, 2009.). Autokrina uloga aktivina je stimulacija proizvodnje folistatina i inhibina u Sertolijevim stanicama (DE KRESTER, 2004.). U pastuha, inhibin je dokazan u tkivu testisa, njegove podjedinice se nalaze podjednako i u Sertolijevim i Leydigovim stanicama. Intratestikularna koncentracija inhibina niža je u ždrebadi mlađe od godinu dana u usporedbi s pastusima u pubertetu i odraslim pastusima te je obično niža u pastuha smanjene plodnosti i značajno niža u neplodnih pastuha. Intratestikularna koncentracija inhibina je dobar pokazatelj smanjene plodnosti te se može mjeriti biopsijom testisa bez trajnog oštećenja tkiva (ROSER, 2008.).

Inzulinu sličan peptid 3 (INSL3), prije poznat kao čimbenik sličan inzulinu, je hormon koji proizvode isključivo Leydigove stanice te predstavlja odličan marker pomoću kojega možemo odrediti funkciju i status Leydigovih stanica (IVELL i sur., 2005.).

### 2.3. EJAKULAT

Ejakulat je tekućina koja se izlučuje od spolne zrelosti ejakulacijom. Nastaje pražnjenjem sadržaja testisa i sekreta akcesornih spolnih žlijezdi. Sastoji se od tekućeg dijela odnosno sjemene plazme i korpuskularnih elemenata (spermija i epitelnih stanica) (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.).

#### SJEMENA PLAZMA

Sjemena plazma je mješavina sekreta proizvedenog u testisima, epididimisima i akcesornim spolnim žlijezdama te predstavlja najveći dio ejakulata (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.; KARESKOSKI i KATILA, 2008.). Uključena je u mnoštvo funkcija spermija i događaja koji prethode oplodnji, aktivira spermu, hrani je, štiti itd. (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.; KARESKOSKI i KATILA, 2008.).

#### SPERMIJI

Spermiji nastaju u testisima iz matičnih stanica, koje se nakon što mužjak uđe u pubertet kontinuirano dijele, a taj se proces naziva spermatogeneza (SJAASTAD i sur., 2017.).

#### SPERMATOGENEZA

U savijenim sjemenim kanalićima prisutne su dvije vrste stanica: spolne prastanice, koje se razvijaju u zrele muške gamete i Sertolijeve stanice, koje opskrbljuju spolne prastanice hranjivim tvarima i reguliraju njihovo sazrijevanje (SJAASTAD i sur., 2017.). Spolne prastanice prolaze niz mitotskih dioba i tako nastaju matične stanice koje s mezodermalnim stanicama tvore sjemene tračke u osnovi testisa. U sjemenim tračcima miruju do početka spolne zrelosti, kada se aktiviraju i kreće spermatogeneza (McGEADY i sur., 2013.).

Spermatogeneza je proces stvaranja i sazrijevanja spermija. To je kontinuirani, ciklički proces koji počinje dijeljenjem spermatogonija, završava formiranjem spermija, a sve je popraćeno promjenama u citoplazmi i staničnoj jezgri. Zbiva se u savijenim sjemenim kanalićima testisa (KOZARIĆ, 1998.). Proces spermatogeneze odvija se u tri faze: (1) spermatocitogeneza – mitotička dioba spermatogonija, (2) mejoza i (3) spermioogeneza – dozrijevanje i diferencijacija spermatida (MEYERS, 2009.). Proces spermatogeneze u pastuha približno traje 58 dana, od čega spermatocitogeneza traje 19,4 dana, mejoza 19,4 dana i spermioogeneza 18,6 dana (AMANN i GRAHAM, 1993.). Do puberteta se u testisima nalaze nediferencirane matične stanice, spermatogonije (SJAASTAD i sur., 2017.). Spermatogonije su diploidne stanice koje sadrže dva seta kromosoma, jedan set od majke, drugi od oca

(SJAASTAD i sur.,2017.). Kromosomi dvaju setova raspoređeni su u parove gdje svaki par sadrži kromosom iz svakoga seta te je njihov broj obilježen sa  $n$  (SJAASTAD i sur.,2017.). Broj kromosoma u diploidnoj stanici je  $2n$ . Do puberteta se spermatogonije dijele mitozom, u pubertetu započinje proces spermatogeneze te spermatogonije tada prolaze seriju staničnih dioba, koje na kraju završavaju mejozom radi koje se broj kromosoma u svakoj gameti smanjuje na haploidan ( $n$ ) (SJAASTAD i sur., 2017.). U procesu spermatocitogeneze spermatogonije tipa  $A_1$  dijele se mitotički kako bi proizvele stanice kćeri čiji je cilj završetak spermatogeneze i spermatogonije tipa  $A_0$  koje ostaju uz bazalnu membranu sjemenih kanalića u svrhu očuvanja matičnih stanica radi trajnog odvijanja spermatogeneze tijekom života (MEYERS, 2009.; McGEADY i sur., 2013.; SJAASTAD i sur., 2017.). Spermatogonije tipa  $A_1$  mitotički se dijele u pravilnim intervalima u podtipove: spermatogonije tipa  $A_{1-4}$ , intermediarne spermatogonije i spermatogonije tipa B (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.; MEYERS, 2009.). Daljnjim dijeljenjem spermatogonija tipa B nastaju primarne spermatocite. Od primarnih (diploidnih) spermatocita prvom mejotskom diobom nastaju sekundarne (haploidne) spermatocite (KOZARIĆ, 1998.; McGEADY i sur., 2013.). Iz sekundarnih spermatocita drugom mejotskom diobom razvijaju se haploidne spermatide (McGEADY i sur., 2013.). Svaka generacija spermatogonija i spermatocita je međusobno povezana intracitoplazmatskim mostovima te prolaze sinkronizirano kroz stanične diobe i diferencijacije (MEYERS, 2009.). Središnji (adluminalni) odjeljak savijenih sjemenih kanalića gdje se nalaze spolne prastanice u kasnijim stadijima razvoja od manje diferenciranih spolnih prastanica u bazalnom odjeljku odvojen je čvrstim spojevima između Sertolijevih stanica koji čine krvno-testisnu barijeru koja sprečava prolaz mnogih tvari iz krvnih žila smještenih izvan kanalića u centralni odjeljak. Barijera štiti spermije od štetnih tvari i sprečava izloženost spermija imunološkom sustavu. Ako se ona naruši, imunološki sustav može tretirati spermije kao antigene (SJAASTAD i sur., 2017.).

Proces pri kojem se spermatide razvijaju u zreli spermij naziva se spermiogeneza (McGEADY i sur., 2013.). Tijekom spermiogeneze dolazi do niza promjena. Okrugla jezgra se kondenzira i smanjuje te poprima oblik kruške (LIN i TROYER, 2014.). Zrnca koja nastaju u Golgijevu kompleksu udružuju se i tvore akrosomski mjehurić, koji kada prekrije prednju stranu kondenzirane jezgre, naziva se akrosom (McGEADY i sur., 2013.). Akrosom je funkcionalno sličan lizosomima i sadrži lizosomalne enzime koji razgrađuju vanjsku membranu jajne stanice (LIN i TROYER, 2014.). Centrioli tvore aksijalne filamente od kojih će se razviti rep spermija te dolazi do redukcije citoplazme (McGEADY i sur., 2013.). Pri

završetku spermiogeneze nezreli spermiji istiskuju se u lumen sjemenih kanalića, što se naziva spermijacija. Spermiji u sjemenim kanalićima su nepokretni i pasivno ih prenosi tubularna tekućina do *rete testis*. Iz *rete testis* spermiji putuju kroz *ductuli efferentes* do epididimisa pomoću trepetljika epitelnih stanica i kontrakcija glatkih mišića stijenke kanalića (McGEADY i sur., 2013.). Spermiji sazrijevaju tijekom prolaska kroz epididimis te prolaze kroz brojne morfološke i fiziološke promjene: promjena u kromatinu jezgre, izmjene u građi stanične membrane, gubitak protoplazmatske kapice i postizanje sposobnosti samostalnog pokretanja (MEYERS, 2009.; McGEADY i sur., 2013.). Zreli spermiji prije ejakulacije pohranjuju se u repu epididimisa (McGEADY i sur., 2013.).

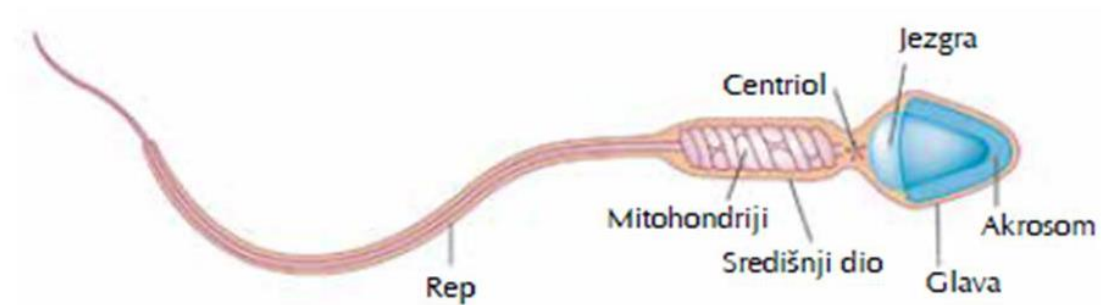
## GRAĐA SPERMIJA

Spermij je zrela muška spolna stanica koja se sastoji od glave, vrata i repa. Rep spermija možemo podijeliti u srednji, glavni i završni dio (BRITO, 2007.). Cijeli spermij je obavijen staničnom membranom koja je fosfolipidni dvosloj koji uključuje kolesterol, ugljikohidrate i proteine (MEYERS, 2009.). Formira se u epididimisu tijekom zrenja spermija. Ovojnica ih čini plodnim, nositelj je električnog naboja spermija i ima zaštitnu ulogu (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.). Dio stanične membrane koja prekriva glavu spermija dijeli se na akrosomsku i postakrosomalnu regiju. Značajka stanične membrane spermija je i ta što se dio membrane koji obavija glavu spermija razlikuje u sadržaju lipida i proteina od dijela koji obavija rep. Osim toga ta dva dijela razlikuju se i u električnom naboju, negativni naboj spermija je veći u području repa spermija (MEYERS, 2009.).

Glava spermija u pastuha je u obliku vesla, duljine oko 6-7  $\mu\text{m}$  (MEYERS, 2009.). Na njoj razlikujemo jezgru i citoplazmu (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.). Jezgra (*nucleus*) se sastoji od kromatina s DNK, koji je gusto zbijen i povezan s glavnim jezgrenim proteinima poznatim kao protamini (MEYERS, 2009.). Prednji dio spermija pokriva opna koja je formirana iz Golgijevog aparata, a naziva se akrosom (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.). Nalazi se između stanične membrane u prednjem dijelu glave spermija i jezgrine ovojnice te ima svoje vlastite membrane: unutarnju akrosomalnu membranu koja graniči s jezgrinom membranom i vanjsku akrosomalnu membranu koja je prekrivena staničnom membranom te se s njom stapa tijekom akrosomske reakcije. Sastoji se od proteinskog matriksa i sadrži brojne hidrolitičke i glikolitičke enzime koji su važni za proces oplodnje (MEYERS, 2009.). Tijekom sazrijevanja, spermiji smanjuju količinu citoplazme na minimum (SJAASTAD i sur., 2017.).

Vrat spermija spaja glavu i rep spermija. *Capitulum* tvori kranijalnu granicu repa spermija na mjestu gdje nalazimo implantacijska udubina. Ona je u pastuha često decentrirana što rezultira abaksijalnim pričvršćivanjem repa spermija. To je kod pastuha česta pojava i ne smatramo je patologijom (MEYERS, 2009.). U području vrata spermija se nalazi centriol koji je sastavljen od 9 segmenata (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.).

Rep spermija se sastoji od središnjeg dijela koji čine mikrotubuli (dva centralna i devet parnih na periferiji) nazvani aksonema, tanke stanične membrane koja obavlja središnji dio te nakupine mitohondrija oko aksoneme u proksimalnom tj. srednjem dijelu repa spermija (RUPIC, 2015.). Mitohondriji proizvode i stvaraju energiju koju koristi aksonema kako bi omogućila spermiju flagelarno kretanje (MEYERS, 2009.).



Slika 3. Shematski prikaz spermija (SJAASTAD i sur., 2017.).

## KAPACITACIJA I AKROSOMSKA REAKCIJA

Kako bi spermiji nakon ejakulacije postali sposobni za oplodnju moraju proći proces kapacitacije i akrosomske reakcije. Prije ulaska u jajnu stanicu spermij mora proći između stanica *corone radiatae*, prodrijeti kroz *zonu pellucidu* i vezati se sa staničnom membranom jajne stanice (McGEADY i sur., 2013.).

Kapacitacija je slijed biokemijskih promjena koje vode do destabilizacije membrane spermija, što im omogućuje da postanu sposobni za oplodnju. Tijekom kapacitacije dolazi do hiperaktivne pokretljivosti spermija što omogućava spermijima da penetriraju kroz *coronam radiatam* te se dolazi do pripreme spermija za akrosomsku reakciju (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.).

Akrosomska reakcija predstavlja strukturalnu i biokemijsku promjenu na spermijima. Dolaskom do *zone pellucidae* spermij se veže s vrsno-specifičnom glikoproteinskom molekulom

ZP3. Nakon vezanja spermija za *zonu pellucidu* dolazi do stapanja membrane spermija s vanjskom akrosomskom membranom, što dovodi do otpuštanja enzima hijaluronidaze i akrozina. Nakon toga se stanična membrana spermija spoji s akrosomskom membranom i uspostavlja se cjelovitost stanične membrane spermija. Oslobođanje enzima i pokretljivost spermija olakšavaju njihovo prodiranje kroz *zonu pellucidu*. Ulaskom u previtelini prostor spermij se veže za membranu jajne stanice (McGEADY i sur., 2013.).

## 2.4. POLUČIVANJE EJAKULATA

Za polučivanje ejakulata moramo umjetno osigurati uvjete koji i prirodno dovode do ejakulacije. Postupak dobivanja ejakulata mora zadovoljiti sljedeće kriterije: mora se polučiti cjelokupni ejakulat, ejakulat ne smije biti onečišćen, postupak ne smije oštetiti spermije, polučivanje mora biti neškodljivo po pastuha i spermatogenezu (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.). Prostor u kojem uzimamo ejakulat treba biti prostran, čist, bez prašine i prljavštine te pod ne smije biti sklizak. Ne bi smjelo biti buke, ljudi ili ostalih životinja koje bi mogle ometati postupak. Trebaju biti poduzete sve mjere sigurnosti kako ne bi došlo do ozljede životinja ili osoblja (HURTGEN, 2009.). Osoblje treba imati svu odgovarajuću opremu na sebi kao što je zaštitna kaciga te zaštitne cipele s metalnom kapicom. Svo osoblje treba proći obuku i znati pravilno polučiti ejakulat te pravilno postupati s pastuhom i polučenim ejakulatom. Sva oprema koja se koristi mora biti čista, dezinficirana i bez vidljivih oštećenja.

### METODE POLUČIVANJA EJAKULATA U PASTUHA

#### UPORABA KONDOMA

Ovu metodu najčešće upotrebljavamo ako je pastuh naučen na prirodni pripust. U ovom postupku potrebna nam je kobilica u estrusu. Sjeme prikupljeno uporabom kondoma često zna biti kontaminirano bakterijama i staničnim debrisom, a postoji i rizik od kontaminacije penisa pastuha prilikom ulaska u vaginu kobile (HURTGEN, 2009.).

#### FARMAKOLOŠKI INDUCIRANA EJAKULACIJA

Za farmakološki induciranu ejakulaciju prema objavljenim publikacijama možemo koristiti ksilazin, imipramin, ksilazin i imipramin te prostaglandin. Ksilazin je agonist  $\alpha$ -adrenoreceptora koristi se kao sedativ i analgetik (MATIČIĆ i VNUK, 2010.). Njega primjenjujemo u dozi od 0,7 mg/kg intravenski (KHANAM i sur., 2021.). Imipramin je triciklički antidepresiv koji se koristi za liječenje simptoma depresije, najčešće se koristi u

obliku soli kao imipramin hidroklorid. Kako bi izazvali ejakulaciju u pastuha može se davati dva puta dnevno u dozi od 100-600 mg peroralno ili intravenski u dozi od 50-1000 mg (KHANAM i sur., 2021.). Može se koristiti i kombinacija imipramina i ksilazina tako da imipramin hidroklorid apliciramo intravenski u dozi od 2 mg/kg te nakon 10 minuta apliciramo ksilazin intravenski u dozi od 0,3 mg/kg ili kombinacija peroralne primjene imipramina u dozi od 0,8-2,5 mg/kg te 1-3 sata nakon intravenski aplicirati ksilazin u dozi od 0,3 mg/kg. Opisana je i peroralna primjena imipramina u dozi od 3 mg/kg i 2 sata nakon intravenska aplikacija ksilazina u dozi od 0,7 mg/kg (KHANAM i sur., 2021.). Iako je imipramin najčešće korišteni triciklički antidepressiv za farmakološki induciranu ejakulaciju kod pastuha, zabilježeno je da klomipramin u kombiniranoj primjeni s ksilazinom također može izazvati ejakulaciju. Klomipramin se aplicira intravenski u dozi od 2,2 mg/kg te 55 minuta nakon slijedi aplikacija ksilazina intravenski u dozi od 0,5 mg/kg (KHANAM i sur., 2021.). Koristi se i prostaglandin F<sub>2α</sub> (PGF<sub>2α</sub>), stimulator glatkih mišića, aplicira se intramuskularno u dozi od 0,01-0,15 mg/kg. PGF<sub>2α</sub> ne koristi se često radi nuspojava poput grčeva u trbuhu, znojenja i curenja mokraće (KHANAM i sur., 2021.). Primjenjivati možemo i dinoprost te kloprostenol. Dinoprost (*dinoprost trometamin*) sadrži prirodni PGF<sub>2α</sub> dok je kloprostenol je sintetski analog PGF<sub>2α</sub> (MOREIRA i HAMMON, 2012.)

Ejakulat polučan ovom metodom malog je volumena i vrlo visoke koncentracije, a koristi se kod postupka umjetnog osjemenjivanja ohlađenim sjemenom te za krioprezervaciju. Mana ove metode je što ne možemo predvidjeti kada će točno doći do ejakulacije. Do ejakulacije može doći za vrijeme ili nakon sedacije ili sna (HURTGEN, 2009.).

## UMJETNA VAGINA

Kod pastuha ejakulat najčešće uzimamo pomoću umjetne vagine. Umjetna vagina sastoji se od vanjske tvrde (*vanjska vagina*) i unutarnje mekane cijevi (*unutarnja vagina*) između kojih je međuprostor koji ispunjavamo toplom vodom koji nam omogućuje postizanje željene temperature i tlaka. Prvu trećinu umjetne vagine trebamo premazati steriliziranim lubrikantom (tekući parafin, vazelin). Na umjetnu vaginu pričvršćujemo spermohvatač (HURTGEN, 2009.). Tipovi vagina razlikuju se po duljini, promjeru, lakoći punjenja međuprostora vodom, načinu rukovanja te težini. Najčešće korišteni tipovi umjetnih vagina su Missouri, Colorado, Hanover, Nishikawa, HarVet i Poljski model. Missouri model sastoji se od dva gumena djela koja tvore međuprostor, od kojih je jedan pričvršćen za spermohvatač te kožne presvlake s drškom. Kao spermohvatač koristi se plastična vrećica ili bočica. Colorado

model je duži, većeg promjera te teži. Sastoji se od vanjskog plastičnog djela te dva gumena sloja koji formiraju međuprostor. Ovaj model dulje zadržava željenu temperaturu unutar umjetne vagine, no zbog težine i veličine teži je za rukovanje. Nedostatak ovog modela je i što do ejakulacije dolazi u središnjem dijelu te je moguće oštećenje spermija radi temperaturnog šoka. Hanover je model koji se obično koristi u Europi. Kraći je i manjeg promjera u odnosu na Colorado model. Sastoji se od vanjskog tvrdog gumenog djela i unutarnje gumene navlake. Nishikawa (japanski) model je lagan te jednostavan za rukovanje. Sastoji se od vanjskog aluminijskog djela i navlake od lateksa. HarVet model lagan je i slične veličine kao Nishikawa model samo s plastičnim vanjskim djelom. Za ovaj model koriste se jednokratne navlake koje tvore "spermohvatač" na svome distalnom kraju. Poljski model ili umjetna vagina otvorenog tipa drugačija je od dosad navedenih modela. Korištenjem ovog modela proces ejakulacije je vidljiv te nam može pomoći u dijagnozi hematospermije, urospermije i sl. Kod ovog modela umjetne vagine smanjena je mogućnost temperaturnog šoka jer pastuh ejakulira izravno u ljevak za koji je pričvršćen spermohvatač. Za većinu modela umjetnih vagina dostupne su i jednokratne, sterilne plastične presvlake. Njih koristimo kako bi smanjili rizik od izlaganja ejakulata ostacima kemijskih tvari koje koristimo za čišćenje umjetne vagine te nam omogućuje korištenje iste umjetne vagine za više pastuha te smanjuje mogućnost bakterijske kontaminacije. Odmah nakon korištenja umjetnu vaginu moramo očistiti. Umjetnu vaginu treba isprati većom količinom tople vode, ukloniti smegmu i prljavštinu. Ako nismo koristili jednokratnu presvlaku, gumene dijelove trebamo uroniti u 70%-tni alkohol najmanje sat vremena, isprati vrućom vodom te osušiti. Sapune i dezinficijense ne bi trebali koristiti na gumenim dijelovima kako bi izbjegli nakupljanje rezidua. Neuspjesi prikupljanja ejakulata često su povezani s nepravilnim položajem umjetne vagine, padom temperature ispod kritične točke za pastuha, ako je fantom prenizak te ako je tlak u umjetnoj vagini previsok (HURTGEN, 2009.).



Slika 2. Umjetna vagina, model Hanover (HURTGEN, 2009.).



## MANUALNA FIKSACIJA PENISA

Ova metoda polučivanja ejakulata nije proširena i prihvaćena u praksi jer zahtjeva tehničku obuku i spretnost osobe koja prikuplja ejakulat i mnogi pastusi ne uspijevaju ejakulirati ako nisu dobro istrenirani za ovu metodu. Prednosti su da za polučivanje ejakulata nije potrebna specijalizirana oprema te nije potrebno puno osoblja.

Pastusi stoje na tlu ili je prisutan fantom, a kobilu u estrusu obično se nalazi u blizini. Penis pastuha se opere toplom vodom te se ponekad postavlja topli ručnik na bazu penisa kao dodatna stimulacija. Kada se postigne erekcija, preko penisa se postavlja plastična vrećica. Jedna ruka operatera hvata i stimulira glans penisa, dok se druga ruka koristi za stimulaciju baze penisa i uretre (HURTGEN, 2009.).

## STIMULACIJA PASTUHA

Pastuha prije dobivanja ejakulata trebamo stimulirati na skok, što najbolje možemo postići kobilom u estrusu, no ako nam nije dostupna najčešće koristimo fantom. Fantomi su surugati ženki koji stimuliraju pastuha na skok. Za pojedine pastuhe je potrebno da uz fantom bude prisutna i kobilu u estrusu (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.; HURTGEN, 2009.).

Odabir prikladne kobile često ovisi o iskustvu i uzgojnim navikama pastuha, te treba biti odgovarajuće veličine. Za neiskusne pastuhe najčešće biramo discipliniranu i kooperativnu kobilu koja će dozvoliti i skok sa strane. Ako se pastuh glasno glasa izabrat ćemo kobilu koja nije plašljiva, a kobile koje se koriste trebaju tolerirati i određenu količinu grickanja od strane pastuha (HURTGEN, 2009.).

Ako se u postupku polučivanja ejakulata koristi kobilu, prije samo postupka kobilu treba pregledati te pripremiti. Radi se klinički pregled, pregled vanjskih i unutarnjih spolnih organa, rektalna pretraga, ultrazvuk te bris klitorisa. Prije samog postupka rep kobile trebamo omotati čistom bandažom kako bi održali perinealno područje čistim, izbjegli kontaminaciju i spriječili zaplitanje penisa u rep kobile. Može se omotati u cijelosti tako da presavijemo rep ili se može zamotati tako da se bandaža proteže ispod ventralne komisure stidnice. Perinealnu regiju moramo oprati kako bi prevenirali kontaminaciju penisa pastuha. (CRABTREE, 2010b., DASCANIO, 2014.). Kobili na stražnja kopita stavljamo kožne ili filcane papuče kako bi ublažili udarac ako do njega dođe. Na vrat kobile postavljamo kožnu zaštitu kako bi spriječili ozljede radi pastuhova grickanja (DASCANIO, 2014.). Kobilu se treba nalaziti iza zaštitne ograde. Svo osoblje bi se trebalo nalaziti s iste strane. Osoblje također treba biti pravilno opremljeno. Svi moraju imati zaštitnu kacigu, zaštitni prsluk te čizme sa zaštitnom kapicom.



Slika 4. Prikaz fantoma i stojnice za kobilu (IZVOR:

<http://www.redheartappaloosas.co.uk/artificial-insemination-semen-collection-redheart-appaloosa-stud/> ).

#### POSTUPAK UZIMANJA EJAKULATA

Za učinkovito polučivanje ejakulata potrebna je dobra priprema kako bi se osiguralo pravilno rukovanje ejakulatom nakon polučivanja. Oprema koja se koristi prilikom rukovanja s ejakulatom treba biti čista te na temperaturi od 35-37 °C. Priprema se umjetna vagina te puni toplom vodom temperature od 48-52 °C. Ako u postupku polučivanju ejakulata sudjeluje i kobila u estrusu, nju također moramo pravilno pripremiti. Kobilin rep omotamo te operemo perinealno područje kako bi spriječili kontaminaciju penisa pastuha tijekom skoka. Nakon što pastuh postigne punu erekciju penis se čisti toplom vodom. Umjetnu vaginu prilagođavamo potrebama pastuha, podešavamo pritisak, prilagođavamo temperaturu na 45-48 °C te unutrašnjost premazujemo steriliziranim lubrikantom. Osoba koja vodi pastuha mora cijelo vrijeme u vidnom polju imati sve ostale osobe koje sudjeluju u procesu polučivanja kako bi mogla pravovremeno reagirati. Svi uključeni bi trebali biti s iste, toj osobi suprotne strane. Nakon skoka penis pastuha se usmjerava u umjetnu vaginu. Umjetna vagina treba biti položena paralelno s trbušnom stijenkom pastuha. Neposredno prije ejakulacije mogu se osjetiti jake pulzacije uretre. Nakon što ejakulacija započne umjetnu vaginu treba nagnuti prema dolje kako bi omogućili brzo prikupljanje ejakulata u spermohvatač te izbjegli temperaturni šok. Prikupljanje ejakulata pomoću fantoma provodi se na isti način kao što je prethodno opisano. Čim smo prikupili ejakulat odnosimo ga u laboratoriji na pregled i ocjenjivanje. Za učinkovito prikupljanje visokokvalitetnog sjemena bitan je odabir odgovarajuće kobile u estrusu ili

fantoma te odabir umjetne vagine i postizanje odgovarajućeg pritiska i temperature. Sigurnost životinja i osoblja također je od velike važnosti (HURTGEN, 2009.).

## **2.5. OCJENA EJAKULATA I SPERMIJA**

Pastuh ejakulira frakcionirano i u mlazovima. Neki koriste prva 2-3 mlaza sjemena, a neki i srednju frakciju (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.).

Ejakulat ocjenjujemo kako bi utvrdili plodnost ili neplodnost pastuha te odredili svojstva dobivenog ejakulata (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.; RUPIC, 2015.). Sjeme bi trebali ocijeniti svaki put nakon polučivanja te prije slanja, kod procjene vrijednosti pastuha, prije početka sezone parenja i barem jednom tijekom sezone parenja, kod uključivanja pastuha u rasplod, ako uočimo probleme s plodnošću, niski postotak gravidnosti ili ako nije onakav kakvog smo očekivali, kako bi procijenili sposobnost sjemena da podnese hlađenje i smrzavanje. Kako bi dobili što bolji uvid u kvalitetu sjemena pastuha preporučuje se napraviti što je više pretraga moguće jer ako napravimo samo jednu, nećemo dobiti objektivan rezultat (ESTRADA i SAMPER, 2007.). Razlikujemo sanitarnu, makroskopsku i mikroskopsku ocjenu.

### **SANITARNA OCJENA EJAKULATA**

Za umjetno osjemenjivanje mogu se upotrijebiti samo potpuno zdravi i normalno razvijeni pastusi. Radi toga trebamo obaviti i kompletan klinički pregled pastuha i posebnu pozornost obratiti na pretrage vezane uz spolne zaraze. Ako pastuh ima upalna žarišta unutarnjih spolnih organa otkrivamo ih androloškom pretragom. U ejakulatu oboljelog pastuha možemo naići na žuti gnoj na dnu spermohvatača. Ako nalazimo bjelančevinaste pahuljice možemo posumnjati na vezikulitis, naglo ugibanje spermija nakon polučivanja ejakulata upozorava na mogućnost da sekreti akcesornih spolnih žlijezdi sadrže upalne produkte, na epididimitis sumnjamo ako imamo veliki broj nezrelih spermija, ako je pH viši od 7.5 uz normalan broj spermija sumnjamo na upalno žarište u spolnim organima pastuha. Ejakulat ne upotrebljavamo ni u slučajevima kad u njemu naiđemo na primjese mokraće, krvi ili bilo kakva druga onečišćenja. U sumnjivim slučajevima radimo bakteriološku i mikološku pretragu. Ako ejakulat ne odgovara u sanitarnom pogledu ne smije se upotrijebiti (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.; RUPIC, 2015.).

## MAKROSKOPSKA OCJENA EJAKULATA

Makroskopskom ocjenom ejakulata ocjenjujemo volumen, boju, konzistenciju i miris (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.). Makroskopski izgled ejakulata ovisi o gustoći koja je određena koncentracijom spermija, sastavom sjemene plazme te fiziološkim (epitelne stanice) i patološkim (krv, urin) primjesama. Volumen ejakulata ovisi o pasmini, dobi, načinu držanja, okolišnim čimbenicima, metodi i učestalosti polučivanja te o dobu godine. Veća je količina ejakulata u sezoni parenja. Nakon polučivanja ejakulat moramo filtrirati ako to nismo napravili tijekom polučivanja. Volumen ejakulata bi trebao predstavljati frakciju bogatu spermijima koja kod pastuha iznosi oko 30-100 ml, ako u obzir uzmemo i gel frakciju ejakulata tada volumen iznosi oko 60 – 120 ml. Volumen mjerimo u prethodno zagrijanoj sterilnoj menzuri. Ispravno mjerenje volumena ejakulata u kombinaciji s koncentracijom spermija u ejakulatu je preduvjet za izračunavanje ukupnog broja spermija u ejakulatu. Ukupan broj spermija u ejakulatu predstavlja umnožak volumena ejakulata i koncentracije spermija izražene u mL te je najvažnija mjera za određivanje broja doza za umjetno osjemenivanje. Osnovna boja ejakulata pastuha je sivobijela. Ako primijetimo roza ili crvenu diskoloraciju sumnjamo na hematospermiju, smeđa diskoloracija nas upućuje kontaminaciju i prljavštinu, dok nas žuta upućuje na urospermiju i takav ejakulat odbacujemo. Konzistenciju ejakulata ocjenjujemo približno, ona varira ovisno o broju spermija. U pastuha je fiziološka kremasta, mliječna konzistencija. Ako je konzistencija rjeđa, skoro vodena ili vodena sumnjamo na oligospermiju ili azospermiju. Ocjenjujemo i miris koji je kod pastuha najčešće neutralan, ako primijetimo miris urina, fekalija, miris truleži ili bilo kakav drugi neugodan miris ejakulat odbacujemo (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.; ESTRADA i SAMPER, 2007.; SIEME, 2009.).

Nakon makroskopske ocjene mjerimo i pH ejakulata koji kod pastuha fiziološki iznosi 7,2 – 7,5 (CRABTREE, 2010.b).

## MIKROSKOPSKA OCJENA

Mikroskopski ocjenjujemo pokretljivost spermija, koncentraciju spermija u ejakulatu, morfologiju spermija, integritet stanične membrane spermija i status akrosome spermija.

### Pokretljivost

Pokretljivost ili aktivnost spermija je važan funkcionalni parametar kojeg je lako ocijeniti. Cilj ocjene pokretljivosti spermija je odrediti postotak pokretljivosti i udio spermija koji se progresivno kreću. Kod svježeg sjemena pokretljivost moramo odrediti odmah po

polučivanju kako ne bi došlo do aglutinacije spermija. Ako je sjeme gusto, nećemo moći precizno ocijeniti pokretljivost pa takvo sjeme prije ocjenjivanja moramo razrijediti (ESTRADA i SAMPER, 2007.; SIEME, 2009.; CRABTREE, 2010.b). Za ocjenu pokretljivosti nam je potreban fazno kontrastni mikroskop sa zagrijanim postoljem. Ako ne ocjenjujemo ejakulat odmah nakon polučivanja, moramo ga zagrijati jer su metabolizam i pokretljivost spermija pri manjim temperaturama smanjeni. Za ocjenu pokretljivosti, na zagrijanu predmetnicu (35-40 °C) stavljamo oko 5 $\mu$ l sjemena i pokrijemo zagrijanim pokrovnim stakalcem. Pokretljivost ocjenjujemo pod povećanjem 100-200 x (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.; ESTRADA i SAMPER, 2007.). Kada se spermiji kreću pravocrtno naprijed to nazivamo progresivnim gibanjem, kada se vrte u krug takvo gibanje nazivamo manježno ili kružno, gibanje kada im je rep prebačen preko vrata pa se kreću u smjeru suprotnom od glave nazivamo retrogradnim. Stupanj progresivnog gibanja prema američkom istraživaču Zavosu može se procjenjivati na skali od 0 do 4. Stupanj 0 – nema gibanja, stupanj 1 – oscilirajuće pokretanje na mjestu (treperenje), stupanj 2 – sporo gibanje s neodređenim smjerom, stupanj 3 – sporo progresivno gibanje, stupanj 4 – brzo progresivno gibanje (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.). Pokretljivost se izražava kao postotak progresivno pokretljivih spermija. Sjeme plodnog pastuha bi trebalo imati  $\geq 60\%$  progresivnih spermija. Abaksijalno pričvršćivanje repa spermija je fiziološka pojava u pastuha te radi toga imamo određenu količinu spermija koji se gibaju kružno (SIEME, 2009.).

Klasična mikroskopska ocjena pokretljivosti ima nedostatak što može varirati među ocjenjivačima, stoga je potrebno ocjenjivati sjeme što objektivnijim metodama i specijaliziranim priborom ili uređajima koji omogućuju računalno pomognutu analizu spermija (*Computer-assisted sperm analyser*, CASA). CASA omogućuje objektivno određivanje raznih parametara pokretljivosti, koncentracije sjemena, morfologije i vitalnosti, a najnoviji modeli imaju opciju za određivanje morfometrije glave spermija (SIEME, 2009.).

#### Koncentracija spermija u ejakulatu

Koncentracija ili gustoća spermija predstavlja broj spermija u jedinici volumena. Dobivena vrijednost označava broj spermija u mm<sup>3</sup> ili u mL (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006., SIEME, 2009.). Broj spermija koje proizvede pastuh ovisi o veličini testisa. Jedan gram parenhima testisa tijekom sezone parenja proizvede oko 19 milijuna spermija dnevno, dok van sezone parenja 15 milijuna spermija. Količina proizvedenih spermija povećava se s godinama, pa obično stariji pastusi proizvedu veći broj spermija nego mladi pastusi (ESTRADA i

SAMPER, 2007.). Koncentraciju spermija možemo mjeriti koristeći komorice za brojanje stanica (hemocitometre) i mikroskop ili spektrofotometar gdje se procjena temelji na gustoći uzorka (SIEME, 2009.). Komorica po Thomi izgleda poput predmetnice s uzdignućem na sredini i dva postrana žlijeba u koje odlazi višak razrijeđene sperme. Komorica se sastoji od 16 velikih kvadrata poredanih u 4 reda, svaki od njih je podijeljen još na 16 manjih. Spermiji se broje u sveukupno 5 kvadrata, 4 velika kvadrata dijagonalno odozgo prema dolje i u jednom koji se nalazi suprotno desnom ili lijevom uglu. Prije brojanja spermu moramo razrijediti i imobilizirati. Broje se spermiji kojima se glave drže desnog i gornjeg ili lijevog i donjeg ruba mrežice te sve spermije kojima su glave u velikom kvadratu, kao i same glave bez repova (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.). Osim Thomine, koristi se i Neubauerova komorica gdje se spermiji broje u 10 kvadrata u dva polja. Ova metoda se smatra najpreciznijom te se smatra zlatnim standardom, a njena mana je što je za njeno izvođenje moramo utrošiti dosta vremena (SIEME, 2009.).

Spektrofotometar radi na principu propuštanja snopa svjetlosti kroz uzorak te mjeri količinu svjetlosti koja se propušta kroz uzorak pomoću foto cijevi, a rezultat vidimo na mjeraču. Svjetlost koja se propušta kroz uzorak u obrnutoj je korelaciji s koncentracijom spermija u uzorku (ESTRADA i SAMPER, 2009.).

U centrima za umjetno osjemenjivanje za određivanje koncentracije spermija najčešće se upotrebljavaju fotometri ili uređaji za određivanje broja stanica. Negativna strana ove metode je nemogućnost diferencijacije između spermija i ostalih stanica u uzorku (SIEME, 2009.). U laboratorijskoj praksi, za određivanje koncentracije, koristi se i računalno potpomognuta analiza spermija.

#### Morfološka ocjena spermija

Morfološka ocjena spermija nam je bitna jer pomoću nje možemo odrediti uzgojnu vrijednost pastuha. Ako je povećan broj teratoloških oblika spermija u pastuhovu sjemenu njegova plodnost je smanjena. Pojedine morfološke karakteristike nam mogu ukazivati na neke bolesti poput degeneracije testisa, orhitisa, epididimitisa itd. (ESTRADA i SAMPER, 2007.). Morfologija spermija ocjenjuje se procjenom obojenih razmaza pod x100 imerzijskim povećanjem svjetlosnog mikroskopa. Metoda bojenja koja se najčešće koristi je eozin nigrozin jer je učinkovita, jednostavna i spermiji se lako vizualiziraju. Ova se metoda koristi i za određivanje postotka živih i mrtvih spermija što nam omogućuje istovremenu procjenu integriteta stanične membrane i morfologije (SIEME, 2009.) Razlikujemo primarne patološke

oblike koji su posljedica poremećaja u spermatogenezi, sekundarne do kojih dolazi za vrijeme prolaska spermija kroz epididimis te tercijarne do kojih dolazi tijekom i nakon ejakulacije, najčešće jatrogeno radi neispravnog postupanja s ejakulatom (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.; SIEME, 2009). Abnormalnosti spermija dijelimo i prema mjestu nastanka. Dijelimo ih na abnormalnosti glave (premala, prevelika, kruškasta, uska, deformirana, abnormalnosti akrosome), vrata (prelomljen, nema glave, zakrčljali spermij), spojnog dijela (tanak, kratak, debeo, spiralno zavijen, deformiran, prelomljen, presavijen) i repa (prebačen u petlju, zavrnuti, smotan oko glave, rudimentiran). U ejakulatu nalazimo i teratomne oblike spermija: višestruke glave i repove, samo repove i razne razvojne stadije spermatogeneze. Za ocjenjivanje možemo koristiti i računalno potpomognutu analizu spermija. Dopušteni postotak patoloških oblika spermija u pastuha je 25% (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.). Maksimalne dopuštene vrijednosti za različite kategorije iznose: <30% abnormalnosti glave spermija, <25% proksimalnih citoplazmatskih kapljica, <10% nezrelih zametnih stanica te >30% morfološki normalnih spermija. Društvo za teriogenologiju preporučuje za rasplod koristiti pastuhe čiji postotak uspješne oplodnje iznosi 75% ili više od 40 kobila kod prirodnog pripusta ili 120 i više kobila umjetno osjemenjeno. Također navode da bi pastuh trebao proizvesti najmanje 1 milijardu morfološki normalnih, progresivno pokretljivih spermija u dva ejakulata prikupljena u razmaku od sat vremena (SIEME, 2009.).

#### Ocjena integriteta stanične membrane spermija

Posljednjih godina sve se više pažnje pridaje procjeni integriteta membrane spermija. Spermiji sazrijevaju u epididimisu gdje dobivaju lipoproteinsku membranu. Što je ona kvalitetnija, spermiji su vitalniji i sposobniji za oplodnju jajne stanice (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.; SIEME, 2009.). Test hipoosmotskog bubrenja ili HOS test (*Hypoosmotic swelling test*) je jedna od metoda kojom možemo ocijeniti integritet stanične membrane. U hipoosmotskoj otopini, tekućina se transportira u stanicu preko stanične membrane. Dok se pokušava postići osmotska ravnoteža između unutarstaničnog prostora spermija i okoline, funkcionalno netaknuta membrana nabubri uzrokujući savijanje repa. Pod mikroskopom, spermije s funkcionalnom membranom lako prepoznamo po uvijenim repovima, dok će spermiji s oštećenom membranom imati ravne repove (ESTRADA i SAMPER, 2009.). Za provođenje HOS testa, uzorak sperme (50 $\mu$ L) pomiješa se s 1 mL hipoosmotske otopine te se inkubira 60 minuta na 37 °C. Za ocjenu koristimo fazno-kontrastni mikroskop, brojimo najmanje 200 spermija te ih razvrstavamo u 5 skupina od slova A do E. Tip A predstavlja maksimalno bubrenje, tip B i C predstavljaju srednji stadij, tip D predstavlja

početni stadij bubrenja, a tip E neaktivne, nenabubrene spermije (neaktivna ili oštećena membrana) (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.). Za određivanje integriteta stanične membrane spermija koristi se i metoda supravitalnog bojenja po Bloom-u pomoću koje možemo odrediti postotak živih i mrtvih spermija. Koristi se 5%-tna otopina eozina i 10%-tna otopina nigrozina. Na predmetnicu dodajemo kap ejakulata, dvostruko veću kap eozina i od nje dvostruko veća kap nigrozina, štapićem promiješamo te napravimo razmaz (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.). Mrtvi spermiji koji imaju nefunkcionalnu membranu obojati će se crveno, dok će oni s funkcionalnom membranom ostati bijeli. Brojimo 200 spermija te izračunavamo postotak bijelih i crvenih odnosno postotak živih i mrtvih spermija, a rezultat izražavamo kao postotak živih spermija u ejakulatu. Spermije kojima je glava napola bijela, a napola crvene ubrajamo u mrtve. Koriste se još i fluorescentni testovi CFDA (*carboxyfluorescein diacetate*), Calcein AM (CAM) testovi i SYBR-14 fluorescentna boja u kombinaciji s propidij jodidom (SYBR-14/PI test) (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.).

#### Ocjena statusa akrosome spermija

Za oplodnju jajne stanice spermij mora posjedovati netaknutu akrosomu kada naiđe na oocitu. Ako se akrosoma izgubi zbog oštećenja membrane tijekom krioprezervacije ili tijekom prolaska kroz ženski reproduktivni trakt, spermij se ne može vezati za *zonu pellucidu* i prodrijeti u jajnu stanicu. Stoga je u vrijeme oplodnje neophodna netaknuta akrosoma. Za ocjenu statusa akrosome spermija koristimo sljedeće metode: Test dvostrukog bojanja – Tripansko modrilo – Giemsa, Fast Green FCF/Eozin B, Eosin B – Anilinsko modrilo i testove lektinskog bojanja (GRAHAM, 1996.; CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.).

Osim navedenih parametara procjenjujemo integritet DNK, mitohondrijski status, kapacitacijski status i radimo test vezivanja spermija na ZP.

#### Biokemijski markeri plodnosti

Biokemijski markeri mogu biti od pomoći u dijagnostici plodnosti.

Alkalna fosfataza (AP) predstavlja klasični biokemijski marker u sjemenoj plazmi pastuha. Detekcija visoke aktivnosti alkalne fosfataze ukazuje na normalan doprinos sekreta testisa i epididimisa u ejakulat. Mjerenje alkalne fosfataze se može koristiti kao marker za ejakulaciju u pastuha te nam pomaže u razlikovanju azospermije podrijetlom iz testisa od azospermije koja je posljedica neuspješne ejakulacije. Vrijednost alkalne fosfataze < 100 IU/L ukazuje da uzorak ne sadrži tekućinu iz testisa i epididimisa (SIEME, 2009.).



**Tablica 1.** Minimalni standardi koje treba zadovoljavati ejakulat pastuha kako bi se mogao koristiti za umjetno osjemenjivanje (SIEME, 2009.).

|  |
|--|
| <p><b>SVJEŽI EJAKULAT</b></p> <p>Minimalno 300 milijuna progresivno pokretljivih spermija</p>  |
| <p><b>OHLAĐENI EJAKULAT</b></p> <p><u>Razrijeđeni /svježi</u></p> <p>Doza za UO: minimalno 300 milijuna progresivno pokretljivih spermija<br/>Osjemenjivanje unutar 12 sati od polučivanja ejakulata<br/>U vrijeme osjemenjivanja mora biti najmanje 35% progresivno pokretljivih spermija</p> <p><u>Razrijeđeni / transportirani</u></p> <p>Doza za UO: minimalno 600 milijuna progresivno pokretljivih spermija<br/>Maksimalni volumen 40 ml (razrjeđenje 1:2)<br/>Osjemenjivanje 24-36 sati nakon polučivanja ejakulata<br/>U vrijeme osjemenjivanja mora biti najmanje 35% progresivno pokretljivih spermija<br/>S ejakulatom koji napušta centar za osjemenjivanje mora se postupati kao s razrijeđenim/transportiranim</p> |
| <p><b>DUBOKO SMRZNUTI EJAKULAT</b></p> <p>Volumen: ovisi o procesu smrzavanja<br/>Doza za UO: minimalno 35% progresivno pokretljivih spermija nakon odmrzavanja<br/>Minimalno 250 milijuna progresivno pokretljivih spermija po dozi nakon odmrzavanja<br/>Doza za osjemenjivanje kobile mora sadržavati minimalno 3 pajete</p>  |

## 2.6. SPOLNO PONAŠANJE PASTUHA

Pastusi ulaze u pubertet s 14 (10-24) mjeseci. Spolni nagon (libido) ovisan je o androgenim hormonima koji utječu na ponašanje mužjaka, parenje te funkciju muškog spolnog sustava (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.).

Parenje (koitus) i u muških i u ženskih životinja je refleksna pojava, a sastoji se od nekoliko spolnih refleksa. Spolni refleksi dolaze samo u spolno zrelih životinja pod utjecajem i regulacijom hormona (RUPIC, 2015.). Razlikujemo prirodene (bezuvtjetne) spolne reflekse i stečene (uvjetne) spolne reflekse. Prirodni spolni refleksi su: refleks približavanja, refleks erekcije, refleks opasivanja, refleks kopulacije i refleks ejakulacije (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.). Tijekom refleksa približavanja pojačava se pastuhov libido. Pastuh se dovodi u blizinu kobile u estrusu ili fantoma u više navrata, ali se ne dozvoljava skok. Povećava mu se volja za parenjem radi dodatne stimulacije osjetilima vida, njuha i sluha. Pastuh njuši perianalno područje kobile i karakteristični miris kobile u estrusu potiče tzv. flehmen reakciju. Pastuh karakteristično podižu glavu i gornju usnu (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.; RUPIC, 2015.). Drugi spolni refleks je erekcija. Dolazi do ukrućenosti penisa, nužne za ulazak penisa u rodnicu i polaganje sjemena u ženski spolni sustav (SJAASTAD i sur., 2017.). Vanjski podražaji se prenose do središnjeg živčanog sustava, a iz njega u centar za erekciju smještenog u lumbosakralnom dijelu kraljezničke moždine, iz njega se dalje prenose na spolne organe (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.). Simpatički živčani sustav uzrokuje vazodilataciju krvnih žila penisa, opuštanje muskulature i konstrikcije mišića na korijenu penisa. Radi dilatacije arteriola, krv navire u kapilare erektilnog tkiva, ono otiče i komprimira vene koje odvede krv iz penisa. Penis postaje duži i krući (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.; SJAASTAD i sur., 2017.). Pod utjecajem nekih nespecifičnih podražaja poput dolaska na mjesto pripusta ili nazočnost čovjeka koji ga uvijek vodi na pripust refleks erekcije može postati uvjetan. Refleks opasivanja očituje se približavanjem pastuha kobili, skokom na nju te približavanjem penisa njenim spolnim organima. Četvrti spolni refleks je kopulacija tijekom koje pastuh nizom pokreta uvodi penis u kopulatorne organe kobile (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.). Refleks ejakulacije predstavlja izlazak sjemena iz penisa. Da bi došlo do ejakulacije taktilna tjelešca na glaviću moraju biti podražena određenom temperaturom i pritiskom. Prijenos spermija do mokraćnice omogućava kontrakcija glatkih mišića epididimisa i sjemenovoda. U mokraćnici spermiji se miješaju sa sekretom akcesornih spolnih žlijezdi. Sjeme se iz mokraćnice potiskuje snažnim, učestalim i ritmičkim kontrakcijama okolne muskulature. Do ejakulacije pastuha dolazi u periodu od 20 do 60 sekundi. Tijekom ejakulacije u pastuha na ventralnoj strani penisa

moгу se palpirati peristaltički valovi mokraćnice, a pastuh pokazuje i karakterističnu mlitavost repa (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.; SJAASTAD i sur., 2017.). Pastuh ejakulira frakcionirano i u mlazovima. Ejakulacija traje oko 30 sekundi dok postupak polučivanja traje 2-5 minuta. Prva frakcija ejakulata sadrži najviše spermija, najčešće se koriste prva 2-3 mlaza sjemena, neki koriste i srednju frakciju ejakulata dok se treća frakcija ne koristi jer sadrži mnogo sluzi (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.; RUPIC, 2015.). Nakon završetka ejakulacije pastuh izvlači penis iz rodnice i ejakulacija prestaje (SJAASTAD i sur., 2017.).

## ČIMBENICI KOJI UTJEČU NA SPOLNO PONAŠANJE PASTUHA

### Sezonost

Rasplodni pastusi često tijekom jeseni i zime imaju smanjen spolni nagon u odnosu na proljeće i ljeto, odnosno za vrijeme sezone parenja (McDONNELL, 2009.).

### Kobila u estrusu

Većina pastuha reagira adekvatno na bilo koju kobilu u estrusu. Pojedini pastusi pokazuju zanimanje prema određenoj kobili ili tipu kobile. Klinička istraživanja ukazuju da karakteristike kobile poput boje, veličine, pasmine, dobi, statusa ciklusa mogu utjecati na interes i odgovor pastuha (McDONNELL, 2009.).

### Menadžment i postupanje s pastuhom

Pastusi se lako prilagode na različite načine menadžmenta i uzgojne prakse. Kao i za opće zdravstveno stanje pastuha pa tako i za proizvodnju sjemena veliku važnost ima fizička aktivnost, izloženost prirodnom svjetlu te dosljedno rukovanje. Na reproduktivnu sposobnost pastuha utječe i učestalost polučivanja ejakulata. Neki pastusi mogu održavati odgovarajući libido ako dolazi do polučivanja ejakulata 1 do 3 puta dnevno, 7 dana u tjednu, dok se kod nekih razvijaju problemi ako polučujemo ejakulat više od 3 do 5 puta tjedno (McDONNELL, 2009.).

## PROBLEMI U SPOLNOM PONAŠANJU PASTUHA

### Smanjen libido

Probleme s libidom najčešće uočavamo u mladim, neiskusnim pastuhima te kod pastuha sa specifičnim preferencama. Pastuh može imati određene preference prema lokaciji, kobili, osoblju ili metodi polučivanja ejakulata te ako se nešto od toga promjeni možemo uočiti smanjen libido. Ozljede ili bolnost prilikom parenja mogu smanjiti libido. Ponekad problem

nastaje od strane čovjeka. Pastusi koji su bivali kažnjeni radi iskazivanja seksualnog interesa ili s kojima se loše postupalo mogu imati probleme tijekom pripusta, odnosno uzimanja ejakulata. Kada ih se dovede blizu kobile u estrusu takvi pastusi najčešće mirno stoje, djeluju tjeskobno i zbunjeno, a ponekad mogu iskazivati i agresivno ponašanje prema kobili. Problemi s libidom mogu biti povezani s hormonima i mogu se poboljšati češćom izloženosti kobilama i smanjenoj izloženosti pastusima. Na taj način povećava se razina androgena, samopouzdanja i libida. Derivate benzodiazepina možemo koristiti u pastuha koji ne odgovara dobro na češću izloženost kobilama u estrusu ili koji iskazuje agresivno ponašanje spram kobilu. Najčešće se koristi diazepam u dozi od 0,05 mg/kg intravenski 5 do 7 minuta prije parenja (TIBARY, 2007.; McDONNELL, 2009.). Uporaba testosterona i ostalih androgena u cilju povećanja libida nije preporučena jer može doći do povećanja agresivnog ponašanja, dok povećanje libida može izostati. GnRH apliciran subkutano u dozi od 25 µg svaka 3 sata ili u dozi od 50 µg 2 sata i ponovno 1 sat prije parenja poboljšava libido, erekciju i ejakulaciju u nekih pastuha (TIBARY, 2007.).

#### Agresivno ponašanje

Agresivno ponašanje pastuha rezultirat će nesigurnim radnim okruženjem za kobilu, pastuha i osoblje. Ponašanje okarakterizirano kao agresivno ili neposlušno može uključivati jurnjavu na kobilu ili fantom, udaranje kobile ili vodiča, osoblja, udaranje nogama, nagla okretanja i pokreti, griženje tijekom pripreme za parenje ili samog parenja. U tim uvjetima potrebna je ponovna obuka pastuha i osobe koja upravlja pastuhom. Ponovni trening pastuha traje otprilike tjedan dana te nam je u cilju smanjiti ili ukloniti nepoželjno ponašanje pastuha. To se postiže radom koristeći negativna potkrepljenja ako pastuh iskazuje nepoželjno ponašanje i pozitivna potkrepljenja kada se pastuh ponaša prihvatljivo. Kako bi izbjegli bilo kakve ozljede osoblja ili kobile, moramo poduzeti odgovarajuće mjere opreza. Svaka osoba koja je uključena u postupak polučivanja mora imati zaštitnu kacigu, čizme sa zaštitnom kapičom, kobila mora biti odvojena pregradom te imati filcane papuče, kožnu zaštitu na vratu i zabandažiran rep (TIBARY, 2007.).

#### Nemogućnost skoka

Do nemogućnosti skoka najčešće dolazi radi neuroloških problema ili problema s lokomotornim sustavom (McDONNELL, 2009.). Pastuha moramo održavati u dobroj kondiciju kako bi izbjegli stanja ili primjenu terapije koja bi mogla imati negativan utjecaj na spermatogenezu i kvalitetu sjemena. Simptomi koji upućuju na muskuloskeletne ili neurološke

probleme su neritmični i neravnomjerni pokreti zdjelice, asimetričnost stražnjih udova, neuobičajeno držanje vrata, leđa i/ili repa, odsutnost tonusa analnog sfinktera, neuobičajen položaj uški, nestabilnost, pad tijekom skoka ili silaska, slabe i/ili nepravilne ejakulacijske pulsacije i hromost. Stanja koja mogu dovesti do nevoljkosti ili nemogućnosti skoka su bol u leđima, osteoartritis, frakture kopitne kosti, laminitis, rabdomioliza, ozljede uključujući laceracije, ubodne rane, frakture i sl. (MARTIN Jr. i McDONNELL, 2011.). Neurološke bolesti uključuju mijeloencefalitis, oštećenje leđne moždine, konjsku degenerativni mijeloencefalopatiju, neuroaksonalnu distrofiju, ozljede perifernih živaca, zarazu EHV-1, bolesti kralježnične moždine (BERNARD i BEECH, 2011.).

### Eretilna disfunkcija

Do erektilne disfunkcije najčešće dolazi sekundarno kao posljedica traumatskog oštećenja erektilnog tkiva ili dugotrajne parafimoze. Razlikujemo primarnu i sekundarnu erektilnu disfunkciju. Primarna erektilna disfunkcija je kada pastuh nikada nije mogao postići erekciju radi nasljednih poremećaja, teških organskih ili funkcionalnih poremećaja. Sekundarna erektilna disfunkcija je kada pastuh koji je imao uredne erekcije ih više ne može postići. Uzrok može biti loše postupanje s pastuhom, dovodenje pastuha u novu okolinu, nepravilno pripremljena umjetna vagina, nepravilno i grubo postupanje s pastuhom tijekom postupka polučivanja, loši uvjeti prehrane i držanja (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.; TIBARY, 2007.; McDONNELL, 2009.).

### Poremećaji ejakulacije

Ako postoji bilo kakav problem s libidom, erekcijom ili skokom to može rezultirati neuspješnom ejakulacijom, kod nekih pastuha problem može biti sam refleks ejakulacije. Uzrok može biti neurološki, bolnost prilikom ejakulacije te patologija genitalnog trakta (McDONNELL, 2009.). Uzrok može biti i nepravilno ophođenje prema pastuhu tijekom postupka polučivanja ejakulata. Poremećaji ejakulacije uključuju izostanak ejakulacije (aspermija ili anejakulacija), nepotpunu ejakulaciju (oligospermija), prijevremenu ejakulaciju, retrogradnu ejakulaciju i urospermiju. Prijevremena ejakulacija je opisana, ali je izrazito rijetka. Retrogradna ejakulacija je poremećaj do kojeg dolazi radi nepotpunog zatvaranja sfinktera mokraćnog mjehura za vrijeme ejakulacije zbog traume ili infekcije te posljedično tome ejakulat završava u mokraćnom mjehuru. Osjetimo snažne pulzacije uretre tokom polučivanja, ali ejakulat nije prisutan ili je malog volumena. Retrogradna ejakulacija može se potvrditi citološkom analizom urina prikupljenog kateterizacijom nakon parenja ili polučivanja

ejakulata. Primjena imipramina prije parenja ili polučivanja ejakulata može poboljšati zatvaranje sfinktera mokraćnog mjehura i smanjiti šanse za retrogradnu ejakulaciju. Točan uzrok urospermije nije u potpunosti poznat, pojedini slučajevi su povezani s nepotpunim zatvaranjem sfinktera mokraćnog mjehura posljedično neurološkim poremećajima, infekciji s konjskim herpes virusom tipa 1, intoksikacijom ili urolitijazom (TIBARY, 2007.).

## **KOMBINACIJA UZGOJA I SPORTSKE KARIJERE U PASTUHA**

Primjena pastuha u rasplodu uz istodobno korištenje u sportu je široko rasprostranjena pojava o čijoj se uspješnosti još uvijek raspravlja. Svakako je riječ o individualnim reakcijama svakog pastuha te je potrebno pronaći protokol koji će svakom pojedinom pastuhu omogućiti maksimalnu uspješnost i upotrebljivost i u rasplodu i u sportu (McDONNELL, 2009.).

## **2.7. UPRAVLJANJE RASPLODOM PASTUHA TOPLOKRVNIH PASMINA I UZGOJNIH TIPOVA**

Pastusi toplokrvnih pasmina osim u uzgoju, koriste se i u sportu. Vrhunac uzgojne sezone je većinom u isto vrijeme kada i vrhunac natjecateljske sezone te stoga menadžment moramo prilagoditi individualnim potrebama svakog pastuha (HURTGEN, 2009.).

### **HRANIDBA**

Toplokrvni pastuh bi trebao ostati u dobroj tjelesnoj kondiciji čak i kada ga prestanemo koristiti u sportu. Visokokvalitetno sijeno i ispaša u većini slučajeva zadovoljit će pastuhovu potrebu za energijom i proteinima. Dodatak zobi ili nekih drugih žitarica te vitamina i minerala ponekad će biti potreban kako bi uravnotežili prehranu. Prehranu treba prilagoditi svakom pastuhu individualno ovisno o njegovim potrebama i radu. Nedavna istraživanja ukazuju kako dodatak dokosaheksaenske kiseline (DHA) ima pozitivan učinak na kvalitetu sjemena (HURTGEN, 2009.).

### **TJELESNA AKTIVNOST**

Pastuhu bi svakodnevno trebala biti omogućena tjelesna aktivnost. Ako je pastuh završio svoju sportsku karijeru te više nema određen raspored treninga trebao bi svakodnevno ili što je više moguće biti pušten u ispust. Ako primijetimo da se ne kreće u ispustu, trebali bi mu omogućiti kretanje u šetalici ili ga lonžirati 3 ili više puta tjedno po 20-30 minuta kako bi ostao u dobroj tjelesnoj kondiciji (HURTGEN, 2009.).

## VETERINARSKA SKRB

Pastuha je potrebno redovito čistiti od parazita. Dehelmintizaciju bi trebali provoditi otprilike svakih 8 tjedana. Antihelmintici koji se najčešće koriste su ivermektin pirantel pamoate, fenbendazole, moksidektin. Povremeno bi bilo dobro napraviti i koprološku pretragu kako bi provjerili učinkovitost dehelmintizacije i zdravstveno stanje pastuha.

Stomatološki pregled bi trebali napraviti minimalno jednom godišnje, ako je potrebno i češće.

Svakih 6-8 tjedana pastuha bi trebao pregledati potkivač, a neki pastusi zahtijevaju i češću obradu kopita. Pastusi koji imaju odgovarajuću stelju obično zahtijevaju minimalnu obradu odnosno podrezivanje kopita. Neki pastusi trebaju potkove samo na prednjim nogama, neki samo na stražnjim nogama, neki na sve četiri noge, dok neki nemaju niti na jednoj. Iz sigurnosnih razloga na mnogim farmama je uobičajeno da su pastusi bez potkova na prednjim nogama tijekom sezone parenja, osim ako su im one potrebne iz zdravstvenih razloga (HURTGEN, 2009.).

Pastusi toplokrvnih pasmina svoju performace vrijednost dokazuju putem natjecanja u sklopu Međunarodne konjičke federacije (FEI, *Fédération Equestre Internationale*). Kako bi pristupio FEI natjecanju, pastuh mora obavezno biti cijepljen protiv influence. Iako nije obavezno, cijepljenje protiv tetanusa je preporučeno. Ovisno o epidemiološkoj situaciji, u pojedinim područjima mogu biti obavezna i druga cjepiva npr. protiv konjskog herpes virusa i virusa zapadnog Nila. Cijepljenja mora provoditi licencirani veterinar. Sva dana cjepiva moraju biti upisana u putovnicu konja, potpisana i ovjerena od strane veterinara. U Republici Hrvatskoj obavezno je i cijepljenje konja protiv bedrenice ako se nalaze u bedreničnim distriktima.

**Tablica 2.** Cijepljenje protiv influence (IZVOR: <https://inside.fei.org/fei/your-role/veterinarians/biosecurity-movements/vaccinations> ).

|                        |  |  |
|------------------------|--|--|
| PRIMARNO CIJEPLJENJE   | 1. doza: 0. dan  | Konj se ne smije natjecati   |
|                        | 2. doza: 21. – 92. dan nakon prve doze                                   | Konji se smiju natjecati kada je od cijepljenja prošlo 7 dana  |
| PRVO DOCJEPLJIVANJE    | Unutar 7 mjeseci od 2. doze primarnog cijepljenja                        | Konji se mogu natjecati do 6 mjeseci +21 dan nakon 2. doze primarnog cijepljenja, no ne mogu se natjecati ako od docjepljivanja nije prošlo 7 dana |
| DALJNJE DOCJEPLJIVANJE | MINIMALNO: unutar jedne godine od prethodnog docjepljivanja              |  |
|                        | NATJECATELJSKI KONJI: 6 mjeseci + 21 dan nakon prethodnog docjepljivanja | Konji se mogu natjecati ako je od docjepljivanja prošlo 7 dana   |

Svi kopitari moraju biti testirani na infektivnu anemiju kopitara (IAK) jednom godišnje (HURTGEN, 2009.).

#### PROCJENA RASPLODNE SPOSOBNOST PASTUHA

Procjena rasplodne sposobnosti treba biti provedena prije uvođenja pastuha u uzgoj i prije početka rasplodne sezone kako bi ustvrdili da li su potrebne neke promjene u menadžmentu rasploda u svrhu očuvanje maksimalne reproduktivne sposobnosti. Procjena rasplodne sposobnosti uključuje klinički pregled, pregled vanjskih spolnih organa, njihovu veličinu, konzistenciju i prisutnost bilo kakvih lezija koje mogu utjecati na kvalitetu sjemena i plodnost. Klinički pregled započinjemo uzimanjem anamnestičkih podataka. Također trebamo prikupiti podatke o trenutnoj upotrebi pastuha, temperamentu, tjelesnoj kondiciji, prijašnjim



bolestima, ozljedama, operacijama, cijeptom statusu i prijašnjem korištenju u rasplodu (učestalosti parenja i polučivanja ejakulata, uspješnosti oplodnje). Pažnju treba obratiti na zdravstveno stanje ekstremiteta, posebno zglobova, tetiva i kopita. Nakon općeg kliničkog pregleda prelazimo na andrološku pretragu, specijalni pregled spolnih organa, koji se sastoji od inspekcije, palpacije, rektalne pretrage i UZV-a (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.; CRABTREE, 2012.a). Procjenjujemo veličinu penisa u erekciji. Kožu penisa i prepucija pažljivo pregledavamo na lezije i ožiljke. Moramo pregledati i *fossu glandis* na prisutnost smegme. Pregled skrotuma i testisa najbolje je napraviti nakon polučivanja ejakulata. Koža skrotuma bi trebala biti tanka i elastična. Oba testisa bi se trebala nalaziti u skrotumu te pregledavamo veličinu, orijentaciju i konzistenciju oba testisa. Normalno su postavljeni vodoravno unutar skrotuma s repom epididimisa orijentiranim kaudalno. Duljinu, širinu i visinu testisa treba izmjeriti. Testisi bi trebali biti otprilike simetrični, trebali bi biti slobodni unutar skrotuma, ne bi trebali biti temperirani niti bolni. Prilikom palpacije epididimisa moguće je palpirati glavu i rep, trebali bi biti simetrični, jednake konzistencije, bez čvorastih promjena i ne bi trebali biti povećani. Pregledavamo i *funiculus spermaticus*, koji su u starijih pastuha tvrđi i većeg volumena nego u mlađih (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.; BALL, 2014.) Pomoću ukupne širine skrotuma možemo procijeniti masu testisa u pastuha. Masa testisa je povezana s brojem dnevno proizvedenih spermija. Ukupnu širinu mjerimo tako da jednom rukom postavimo testise jedan do drugog te ih mjerimo u njihovom najširem dijelu. Točnije mjerenje se provodi pomoću pomičnog mjerila, te s tri uzastopna mjerenja i uzimanjem srednje vrijednosti. Još točniji volumen testisa može odrediti pomoću ultrazvuka određivanjem širine, visine i dužine testisa (BALL, 2014.).

$$\text{VOLUMEN} = 0,52 \times \text{visina testisa} \times \text{širina testisa} \times \text{dužina testisa}$$

$$\text{DNEVNA PROIZVODNJA SPERMIJA (u milijardama)} = (0,02 \times \text{volumen}) - 1,26$$

Usporedbom broja dnevno proizvedenih spermija na temelju volumena s izmjerenim brojem proizvedenih spermija na temelju polučivanja ejakulata možemo procijeniti učinkovitost spermatogeneze. Kada su velike razlike između procijenjenog broja dnevno proizvedenih spermija na temelju izmjerenog volumena testisa i stvarnog broja dnevno proizvedenih spermija na temelju prikupljenog ejakulata, to nam može ukazivati na smanjenu učinkovitost spermatogeneze (BALL, 2014.). Rektalnom pretragom pregledavamo korijen penisa i akcesorne spolne žlijezde (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.). Bulbouretralne žlijezde leže na korijenu penisa te ih ne možemo palpirati. Zdjelični dio uretre nam može

pomoći kao orijentacija prilikom pretrage unutarnjih spolnih organa pastuha, a palpiramo ju kao cilindričnu tvorbu promjera 3-4 cm. U kranijalnom dijelu zdjelične uretre možemo palpirati prostatu kao čvrstu žljezdastu strukturu 2x4 cm, s režnjevima koji se nalaze s obje strane uretre. Žlijezde ampule sjemenovoda se nalaze duž srednje linije kranijalnije od prostate, promjera 1-2 cm i 10-20 cm dužine. Mjehurićaste žlijezde su vrećaste strukture smještene bočno od žlijezdi ampule sjemenovoda te ih je često teško palpirati, osim ako su ispunjene posljedično spolnoj stimulaciji (BALL, 2014.). Ultrazvukom pregledavamo testise i akcesorne spolne žlijezde. Ultrazvuk testisa se može koristiti kako bi izmjerili duljinu, širinu i visinu testisa pomoću kojih možemo odrediti volumen testisa. Normalno bi skrotum trebao biti tanak, ravnomjerno ehogen sloj, a vrlo malo tekućine može biti vidljivo između kože i testisa. Parenhin testisa bi trebao biti homogene strukture i jednolično ehogen. Rep epididimisa vidimo kao izrazito heterogenu strukturu na kaudalnom polu testisa. Sjemenovod uže ima karakterističan heterogeni izgled radi brojnih krvnih žila *plexusa pampiniformisa* (CHENIER, 2007.). Žlijezde ampule sjemenovoda vidimo kao hipoehogeni središnji lumen koji je okružen ehogenim zidom i hiperehogenim vanjskim mišićnim slojem. Unutar zidova možemo vidjeti hipoehogena područja koja predstavljaju žljezdana područja. Mjehurićaste žlijezde u uzdužnom presjeku izgledaju kao spljoštene ovalne do trokutaste vrećice, ovisno o stupnju seksualne aktivnosti. Tanka, ehogena stijenka okružuje anehogeni lumen. U nekih pastuha unutar lumena vidimo i ehogene čestice radi gel frakcije ejakulata koja je u nekih pastuha vrlo viskozna. Prostatu lako prepoznajemo radi dva simetrična, homogena, ehogena režnjeva koji su jasno vidljivi. Vidljiva su i hipoehogena područja unutar parenhima svakog režnja, te i u isthmusu, samo su tamo manji. Veličina tih prostora varira ovisno o učestalosti ejakulacije i stupnju spolne stimulacije. Bulbouretralne žlijezde izgledaju kao ovalne strukture s više malih hipoehogenih prostora u parenhimu. Tanka hiperehogena linija koja predstavlja zid žlijezde okružena je hipoehogenim slojem koji predstavlja *m.bulbocavernosus* koji okružuje žlijezdu (CHENIER, 2009.). Procjena rasplodne sposobnosti uključuje i procjenu spolnog ponašanja, odnosno pokusni skok tijekom kojeg procjenjujemo spolne reflekse te procjenu ejakulata. Procjenjujemo koncentraciju spermija u ejakulatu, morfološke karakteristike te sposobnost progresivnog kretanja spermija. U ejakulatu se ne bi smjeli pronaći virusi ni bakterije. Također, ako se pastuha razmnožava prirodnim putem uzimamo i bris. Uzimamo bris uretre, fosse i divertikuluma uretre, sinusa uretre, površine penisa, nabora prepucija i preejakulatorne tekućine (HURTGEN, 2009.).

## OSPOSOBLJAVANJE PASTUHA ZA RASPLOD

Najsigurnija metoda rasploda toplokrvnih pastuha je polučivanje ejakulata pomoću umjetne vagine radi sigurnosti pastuha jer ih se većina koristi i u sportu i za rasplod.

Svaka obuka pastuha trebala bi trajati oko 15-30 minuta. Tijekom svake obuke bi se trebao poštivati klasični raspored radnji kao tijekom parenja, odnosno postupka polučivanja. Normalno spolno ponašanje pastuha se nikad ne bi trebao obeshrabrivati npr. glasno vokaliziranje i sl. Ponekad je potrebna dodatna obuka ako se promijeni okoliš ili bilo koja druga okolnost u postupku. Ako pastuha koristimo i u rasplodu i u sportu, polučivanje ejakulata bi se trebalo odvijati na mjestu te s osobama koje pastuh ne povezuje sa sportskim treninzima ili natjecanjima zato što pojedini pastusi potisnu svoje spolno ponašanje ako su u njihovu prisustvu (HURTGEN, 2009.).

### 2.8. NAJČEŠĆE BOLESTI SPOLNOG SUSTAVA PASTUHA

Kriptorhizam je stanje u kojem nije došlo do spuštanja jednog ili oba testisa u skrotum. Javlja se u 5-8% ždrebadi, a češće se javlja unilateralni kriptorhizam (ARIGHI, 2007.). Zaostali testis se nalazi ili u ingvinalnom kanalu ili u abdomenu. Ako su zaostali u abdomenu mogu se nalaziti bilo gdje kaudalno od bubrega prema ingvinalnom prstenu.. Kriptorhidni testisi su manji, mekši, teže između 25 – 131 g. U kriptorhidnom testisu ne dolazi do spermatogeneze, ali je proizvodnja i sekrecija hormona većinom nepromijenjena. Pastusi s unilateralnim kriptorhizmom su u većini slučajeva plodni za razliku od onih kod kojih se javlja bilateralni kriptorhizam, oni su sterilni ali i dalje ispoljavaju normalno spolno ponašanje (ARIGHI, 2007.; TURNER, 2007.). Aplikacija gonadotropnih hormona ili hCG-a kriptorhidnim pastusima prije ulaska u pubertet može prouzročiti spuštanje testisa. Kako bi uklonili nespuštene testise, pastuhe kastriramo (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.). Kriptorhidne pastuhe isključujemo iz rasploda.

Neoplazije testisa su rijetke u pastuha, nastaju iz zametnih ili negerminativnih stanica te su većinom benigne. Teratomi, seminomi, teratokarcinomi i embrionalni karcinomi su neoplazije germinativnih stanica opisane u konja. Negerminativne neoplazije nastaju iz stromalnih stanica te uključuju i neoplazme Sertolijevih i Leydigovih stanica (ARIGHI, 2007.).

Orhitis je upala testisa. Najčešće je posljedica traume, infekcije, parazitarne infekcije ili autoimune bolesti. Zahvaćeni testis je povećan, bolan i temperiran. Od preostalih kliničkih znakova možemo uočiti povišenu temperaturu, leukocitozu i hiperfibrinogenemiju. U

polučenom ejakulatu ćemo pronaći bijele krvne stanice te će ejakulat biti loše kvalitete. U slučaju bilateralnog orhitisa prognoza je nepovoljna radi upale te povišene lokalne temperature što može rezultirati fibrozom i degeneracijom parenhima testisa. Liječenje se sastoji od primjene antibiotika, protuupalnih lijekova te hladnih obloga (ARIGHI, 2007.).

Epididimitis je upala pasjemenika, pojavljuje se kao primarna upala, ali najčešće zajedno s orhitisom. Može biti akutnog i kroničnog tijeka. Simptomi su slični simptomima orhitisa. Patološke promjene na epididimisu uključuju promjene svojstava spermija koji najčešće nisu prikladni za daljnju uporabu. Jednostrani epididimitis uzrokuje smanjenu plodnost dok obostrani uzrokuje potpunu neplodnost pastuha. Liječenje je kao i kod orhitisa, rezultati liječenja su većinom loši te pastuha trebamo ukloniti iz uzgoja (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.).

Hematom testisa se najčešće javlja kao posljedica traume, mali hematomi se mogu pojaviti kao posljedica biopsije. Mogu se nalaziti u parenhimu ili na površini testisa. U akutnom stadiju testis je povećan, bolan i temperiran. U većini slučajeva dijagnozu možemo postaviti pomoću ultrazvuka. Daljnje korištenje pastuha u rasplodu ovisi o veličini hematoma te stupnju fibroze. Mali hematomi najčešće uzrokuju samo lokalne promjene u spermatogenezi, većina parenhima testisa ostaje funkcionalno nepromijenjena ili samo privremeno oštećena radi povećanja temperature testisa. Veći hematomi uzrokuju teže posljedice, a stupanj gubitka parenhima testisa ovisi o nekrozi i fibrozi (TURNER, 2007.).

Degeneracija testisa je čest uzrok stečene i često progresivne neplodnosti u pastuha. Do degeneracije testisa može doći idiopatski ili radi poznatog uzroka. Degeneraciju testisa može uzrokovati trauma, izloženosti testisa visokoj ili niskoj temperaturi, zračenju, određenim toksinima ili ishemiji, radi nedostatka određenih nutrijenata, primjene egzogenih androgena, infekcija, autoimunih bolesti te neoplazija. U tim slučajevima trajanje i težina uzročnog procesa određuju ozbiljnost degeneracije. Ako je testis blago zahvaćen, zahvaćena područja mogu se opraviti nakon uklanjanja uzroka. U slučaju da je testis jače zahvaćen degenerativnim procesom poznatog uzroka, isti je potrebno odmah ukloniti. Naime, iako je nemoguće očekivati regeneraciju testisa, barem će biti zaustavljeni daljnji degenerativni procesi. Idiopatska degeneracija testisa se najčešće javlja u starijih pastuha, najčešće je progresivna i rezultira smanjenom plodnošću ili sterilitetom. Degeneracija testisa može biti žarišna ili difuzna te može zahvatiti jedan ili oba testisa. Fokalna i/ili unilateralna degeneracija testisa najčešće je posljedica traume, dok idiopatska degeneracija zahvaća oba testisa kao i degeneracija testisa

kojoj je uzrok visoka ili niska temperatura, toksini ili nedostatak određenih nutrijenata. U slučajevima poznatog uzroka nagli pad broja spermija i kvalitete sjemena, a ponekad čak i azoospermija može se vidjeti unutar prva 2 tjedna nakon inzulta. Ako se ukloni uzrok degeneracije, kvaliteta sjemena trebala bi se postupno poboljšati tijekom naredna 2 mjeseca. U težim slučajevima oporavak može potrajati i do 5 mjeseci. Kako bolest napreduje, klinička slika se pogoršava te uključuje povećanje testisa, omekšanje parenhima testisa, smanjenje broja spermija u ejakulatu, povećanje broja nezrelih spermija te ukupni pad kvalitete ejakulata. Za sada još uvijek nema dokazano učinkovitog liječenja. Terapija je većinom potporna i simptomatska. Ako je uzrok bolesti poznat moramo ga ukloniti (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.; TURNER, 2007.).

Upala penisa naziva se faliitis (*phalitis*), glansa penisa balanitis, a prepucija *posthitis*. Balanopostitis je upala sluznice penisa i prepucija. Najčešći uzrok balanopostitisa je traumatska ozljeda nastala tijekom uzgoja udarcem ili nepravilnim rukovanjem i opremom (ARJUN i sur., 2018.). Drugi uzroci su neoplazije i strana tijela. Može nastati i kao posljedica spolnih zaraza ili primjene prejakih antiseptika prilikom ispiranja prepucija (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2012.; VNUK, 2012.). Blagi oblici bolesti mogu proći nezapaženo, teži oblici bolesti se očituju zažarenom sluznicom penisa i prepucija, gnojnim iscjetkom, bolnošću, malim vezikulama po tijelu penisa te smanjenim libidom (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2012.; ARJUN i sur., 2018.). Kao terapiju koristimo nesteroidne protuupalne lijekove, antibiotik kako bi spriječili sekundarnu bakterijsku infekciju te svakodnevno ispiranje prepucija antiseptičkom otopinom (razrijeđeni povidon-jodid ili klorheksidin) (ARJUN i sur., 2018.; VNUK, 2012.).

Fimoza je stanje kod kojeg dolazi do suženja prepucijskog otvora te je onemogućeno izlaženje penisa kroz otvor prepucija. Može biti nasljedna ili stečena. Mogući uzroci su trauma, edem, upala te neoplazije. Izostaje erekcija i dolazi do kočenja spolnih refleksa. Liječi se kirurškim zahvatom proširivanja otvora prepucija te se preporučuje kastracija (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2012.; VNUK, 2012.).

Parafimoza je nemogućnost povlačenja penisa u prepucij. Do nje najčešće dolazi nakon kopulacije, radi neoplazija, posljedično traumati, paralizi penisa ili ponekad balanopostitisa. Može nastati i kao nuspojava fenotijazinskih trankvilizanata poput acepromazina. Bilo što što uzrokuje ozljedu živaca koji su zaduženi za povlačenje penisa u prepucij može biti uzrok parafimoze. Treba se što prije pokušati rukom reponirati penis u prepucij, ako to ne možemo napraviti manualno potrebno je napraviti inciziju kako bi reponirali penis. Ako odmah ne

započnemo s liječenjem penis postaje edematozan, upaljen i otečen, te posljedično dolazi do pritiska na tkivo penisa, ishemije i nekroze. Živci penisa su osjetljivi i na manju ishemiju te često dolazi do gubitka refleksa ejakulacije. Ako bolest napreduje te dođe do pojave nekroze ili gangrene radi se amputacija penisa i prepucija s kastracijom (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2012.; VNUK, 2012.).

Neoplazije penisa i prepucija su česte u pastuha. Najčešća neoplazija je karcinom skvamoznih stanica, može doći do pojave sarkoida, melanoma, mastocitoma i hemangioma (GAUGHAN i VAN HARREVELD, 2007.).

## BAKTERIJSKE INFEKCIJE

Bakterije koje spadaju normalnu bakterijsku floru na vanjskim spolnim organima pastuha su  $\alpha$ -hemolitični streptokoki, *Lactobacillus* spp., *Micrococcus* spp., *Bacillus* spp., *Alcaligenes* spp., *Flavobacterium* spp., *Serratia* spp., *Staphylococcus lentiscus*, *Staphylococcus coptis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus xylous* i nehemolitični sojevi *Klebsiella* (CONBOY, 2007.). Promjene normalne bakterijske flore na vanjskim spolnim organima pastuha mogu uzrokovati rast oportunističkih bakterija poput *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Streptococcus equi subsp. zooepidemicus* koje mogu uzrokovati neplodnost kod pojedinih kobila. *S. equi subsp. zooepidemicus*, *E.coli*, *P. aeruginosa* i *K. pneumoniae* su najčešće izolirani patogeni u slučajevima endometritisa u kobila. Većina pastuha s poremećenom florom spolnih organa su asimptomatski nositelji infekcije. Prečesto pranje penisa sapunima ili nekim antisepticima može biti pogodni čimbenik za kolonizaciju bakterija (TIBARY i sur., 2009.).

*Klebsiella pneumoniae* je gram-negativna, štapićasta bakterija, uvjetno patogena. Možemo ju klasificirati po tipu kapsule. Opisano je 77 tipova kapsule, K1, K2 i K5 su najčešće povezani s pojavom metritisa u kobila. K7 i K5 su najčešći tipovi izolirani kod pastuha. Pretpostavlja se da je K7 tip dio uobičajene flore prepucija. K5 tip je izoliran iz sjemena pastuha te se stoga smatra kako se *K. pneumoniae* može prenijeti i pute umjetnog osjemenjivanja (CONBOY, 2007.; WOOD i sur., 2007.). *Pseudomonas aeruginosa* je gram-negativna štapićasta bakterija, možemo ju naći na koži i vanjskim spolnim organima pastuha i kobile. Klasificira se na temelju serotipa i sposobnosti hemolize. Sojevi koji sadrže hemolizin smatraju se patogenima. *P.aeruginosa* proizvodi štetne enzime, uključujući i hemolizin koji povećava sposobnost infekcije. Kobile koje imaju ozljede vanjskih spolnih organa radi ždrijebljenja ili parenja sklonije su infekciji od ostalih kobila. Inficirane kobile razvijaju endometritis s gnojnim

iscjetkom ili ponekad samo slabi metritis. Kobile mogu začeti, ali u većini slučajeva će doći do pobačaja radi placentitisa. Pastusi mogu zaraziti kobile, ali isto tako zaražene kobile mogu zaraziti pastuhe. Često pranje pastuhova penisa uništava normalnu bakterijsku floru i pogoduje kolonizaciji *Pseudomonasa* (CONBOY, 2007.). Kobile i pastusi trebaju biti pregledani prije svakog parenja i polučivanja ejakulata na prisutnost patogenih sojeva *K. pneumoniae* i *P. aerguinosa*. Infekciju *K. pneumoniae* liječimo antibioticima, a infekciju *P. aerguinosa* pranjem vanjskih spolnih organa s blagom otopinom dezinficijensa (WOOD i sur., 2007.).

*Streptococcus equi subsp. zooepidemicus* je gram-pozitivna, kuglasta ili ovalna bakterija. Obično se ne smatra primarnim patogenom u konja iako je povezan s endometritisom kod predisponiranih kobila i infekcijom vanjskih spolnih organa i sjemena pastuha (WOOD i sur., 2007.).

Bakterije koje se smatraju potencijalnim patogenima uključuju *Bordetella bronchiseptica*, *Citrobacter* spp., *Proteus morgani*, *Proteus mirabilis*, *Proteus rettgeri*, *Proteus vulgaris*, *Providencia* spp., *Pseudomonas* spp. (ali ne *P. aerguinosa*) i *Staphylococcus aureus* (CONBOY, 2007.).

Uzorke za izradu bakteriološke kulture uzimamo s penisa koji je u potpunoj erekciji, uzimamo preejakulatornu tekućinu te uzorak sjemena. Ako sjeme smrzavamo moramo uzeti uzorak razrijeđenog sjemena neposredno prije punjena pajeta. Uzorak svježeg ohlađenog sjemena trebamo uzimati pri svakoj pošiljci. Uzimamo bris *fossae glandis*, otvora uretre te s kože penisa i nabora prepucija. Radi se i bris uretre nakon ejakulacije (CONBOY, 2007.).

Kontagiozni metritis kobila je akutna, kontagiozna, spolna zarazna bolest koju uzrokuje bakterija *Taylorella equigenitalis*. Očituje se upalom proksimalnog i distalnog dijela reproduktivnog sustava u kobila te pobačajem. *T. equigenitalis* je gram-negativni mikroaerofilni kokobacil. Prenosi se veneralno, jatrogeno te je moguć vertikalni prijenos s kobile na ždrijebe. Izvor infekcije su asimptomatski kliconoše, odnosno inficirani pastusi i kronično inficirane kobile. CEM možemo dijagnosticirati klinički ako u kobile primijetimo simptome bolesti, mikrobiološki uzimanjem brisa te molekularno, lančanom reakcijom polimeraze (PCR). U kobila uzimamo bris klitoralne jame, 2 lateralna i medijanog klitoralnog sinusa te bris vrata maternice ili endometrija ovisno o fazi ciklusa. U pastuha uzimamo bris distalne uretre, fossae i divertikuluma uretre, sinusa uretre, površine penisa i nabora prepucija. Uzimamo i uzorak preejakulatorne tekućine i sjemena ako nam je dostupno. Briseve transportiramo u amijevu transportnom mediju s ugljenom, a ako je uzorak za PCR test, uzorak

ne stavljamo u transportni medij. Iako umjetno osjemenjivanje smanjuje mogućnost prijenosa, bolest se može i tako prenijeti. Neki antibiotici koji se koriste u razrjeđivačima za sjeme, osobito gentamicin, mogu značajno smanjiti broj *T.equigenitalis* u kontaminiranom sjemenu, ali ih ne uklanjaju u potpunosti. Nema objavljenih podataka da cetifour koji se često koristi može eliminirati infekciju. Stoga koji god antibiotik koristimo tijekom razrjeđivanja sjemena, jedina sigurna metoda u sprječavanju širenja infekcije je pregled pastuha prije polučivanja ejakulata (CONBOY, 2007.; WOOD i sur., 2007.). Pastuhe liječimo pranjem penisa i prepucija s 4% otopinom klorheksidina, te nakon što osušimo penis i prepucij premazujemo antimikrobnom mašću poput nitrofurazona. Postupak primjenjujemo 5-7 dana, te u tom periodu pastuha isključujemo iz rasploda. Terapirane pastuhe moramo testirati nekoliko puta unutar 6 tjedana prije nego ih vratimo u rasplod (CONBOY, 2007., TIBARY i sur., 2009.).

Prije početka rasplodne sezone preporučljivo je testirati pastuha na *T.equigenitalis*. Preporučuje se uzeti bris s površine penisa i prepucija, uretralnog sinusa, fosse glandis i distalne uretre. Svaki bris stavljamo zasebno u amijev transportni medij s ugljenom. Svaki uzorak moramo pravilno označiti, moramo navesti ime ili neku drugu identifikacijsku oznaku pastuha, mjesto uzorkovanja, vrijeme i datum uzimanja uzorka. Uzorci trebaju što prije biti otpremljeni u laboratorij. Trebali bi se pridržavati i ostalih mjera biosigurnosti kao što su testiranje kobilica, osoba koja prikuplja sjeme bi trebala nositi jednokratne rukavice, dobro očistiti perinealno područje kobile prije samog postupka te zabandažirati rep kobile, ako koristimo umjetnu vaginu, trebamo ju pravilno očistiti i dezinficirati prije ponovne upotrebe.

## PARAZITARNE BOLESTI

Durina je kontagiozna, kronična, spolno prenosiva parazitarne bolesti. Uzročnik je parazit *Trypanosoma equiperdum*. Klinička slika uključuje oticanje penisa i prepucija, povišenu temperaturu, letargiju, anoreksiju. Kožne lezije su prisutne na penisu, prepuciju, duž vrata i ramena. Lezije su erozivne, često dolazi i do depigmentacije zahvaćenog područja. Možemo uočiti mukopurulentni eksudat iz uretre i lezije po penisu (GAUGHAN i VAN HARREVELD, 2007.). *Trypanosomu equiperdum* možemo naći u sjemenu i u mukoznom eksudatu iz penisa te vaginalnoj sluzi. Infekcija se širi većinom koitusom, može se širiti umjetnim osjemenjivanjem i transfuzijom. Ako u životinje primijetimo znakove bolesti, infekciju potvrđujemo serološkim testiranjem. Većinom se koristi PCR ili ELISA test. Prije parenja ili polučivanja ejakulata obavezno moramo provesti testiranje (WOOD i sur., 2007.). Liječenje se ne provodi iz razloga što životinje mogu postati asimptomatski nositelji



(ŽIVIČNJAK, 2012.). Odgovarajući uzorci za dijagnostiku bolesti su puna krv, serum, sjemena tekućina, mukozni eksudat s organa pastuha i vaginalni sekret kobile (ANONIMUS, 2019.). Naredbom o mjerama zaštite zdravlja životinja od zaraznih i nametničkih bolesti i njihovom financiranju u 2022. godini (NN 145/2021) koju propisuje Ministarstvo poljoprivrede Republike Hrvatske, Člankom 22. propisana je obavezna žurna prijava veterinaru svih znakova bolesti kopitara koji mogu ukazivati na durinu koji uključuju opći infektivni sindrom, edeme po genitalijama i mliječnoj žlijezdi, slabost zglobova, jednostranu paralizu lica i usana, lezije po oku, anemiju, gubitak tjelesne težine u svrhu isključivanja bolesti laboratorijskim pretraživanjem. U svrhu održavanja statusa države slobodne od durine te održavanje kapaciteta laboratorija određuje se pretraživanje određenog broja uzoraka krvi podrijetlom od konja pristiglih i laboratorij u okviru Programa nadziranja, praćenja prevalencije i proširenosti infektivne anemije kopitara, virusnog arteritisa konja, leptospiroze i groznice zapadnog Nila u 2022. godini (klasa: 322-02/21-01/39) (ANONIMUS, 2021.).

## VIRUSNE BOLESTI

Virusni arteritis konja je virusna zarazna bolest konja, i drugih kopitara, uzrokovana RNK virusom iz porodice *Arteriviridae*, rod *Arterivirus*, klinički se očituje dišnim i reproduktivnim poremećajima. Glavni izvor infekcije su dugotrajno ili doživotno inficirani pastusi koji virus šire tijekom opasivanja, ali i na druge načine na životinje koje su u kontaktu s njima. Uzročnik se može prenijeti i korištenjem zajedničke opreme, boravkom u prostoru u kojem je boravila zaražena životinja čak i bez izravnog dodira s njom, jer izvor infekcije mogu biti kontaminirane površine i zrak. Virus se može prenijeti i tijekom umjetnog osjemenjivanja jer uzročnika može naći i u svježem, ohlađenom te smrznutom sjemenu. Nakon infekcije pastusi ostaju asimptomatski kliconoše (BARBIĆ i sur., 2019.). Period inkubacije je 3-14 dana. Najčešći klinički znakovi su povišena temperatura, depresija, letargija, anoreksija, konjunktivitis, rinitis, periorbitalni ili supraorbitalni edem, edem mliječne žlijezde, prepucija, ventralnog abdomena i/ili udova te urtikarije po koži. Ostali klinički znakovi su slabost, ataksija, dispneja i dijareja. Infekcija gravidnih kobila može rezultirati pobačajem. Do pobačaja dolazi 10-33 dana nakon infekcije. U kobila ne dolazi do posljedica koje ugrožavaju plodnost kao ni u perzistentno inficiranih pastuha, dok kod pastuha u akutnoj fazi bolesti dolazi do smanjenja kvalitete sjemena. U slučaju pobačaja virus možemo izolirati iz fetusa ili posteljice. Kobili nakon što je pobacila moramo izvaditi krv tri tjedna nakon pobačaja također u svrhu dijagnostike SN-testom. Dijagnosticiranje zaraze u perzistentno inficiranih pastuha moguće je SN-testom, PCR-om i staničnom kulturom. Od pastuha uzrokuje serum, ejakulat, ako je

možuće drugu frakciju ejakulata. Možemo uzorkovati i smrznuto sjeme, ali samo ako se u uzorku nalazi minimalno 2 milijarde spermija. U suprotnom uzorak ne možemo smatrati reprezentativnim (WOOD i sur., 2007., TIBARY, 2009.). U svrhu dijagnostike možemo uzorkovati i punu krv, nazalni i nazofaringealni bris ili ispirak izolacijom virusa u kulturi stanice ili RT-PCR-om. Provode se i parna serološka testiranja u razmaku od 2-4 tjedna, a pri tumačenju rezultata u obzir trebamo uzeti i cijepni status životinje (ANONIMUS, 2019.). Na tržištu postoje dvije vrste cjepiva: žive, atenuirane i mrtve, inaktivirane vakcine. U Republici Hrvatskoj nije registrirano niti jedno cjepivo te nema legalnog načina za njegovu primjenu (BARBIĆ i sur., 2019.). Prije sezone pripusta potrebno je serološki pretražiti pastuhe. Serološki pozitivnim pastusima pretražujemo najmanje dva uzorka ejakulata. Pozitivne pastuhe isključujemo iz rasploda. Preporučuje se i pretraživanje kobila prije pripusta, te ako je došlo do pobačaja. Ako uočimo kliničke znakove koji upućuju na virusni arteritis konja, životinju obavezno testiramo. Na području Republike Hrvatske se bolest se nadzire i suzbija od 2009. godine. U svrhu ranog otkrivanja te praćenja prevalencije bolesti kopitara određuje se provedba Programa nadziranja, praćenja prevalencije i proširenosti infektivne anemije kopitara, virusnog arteritisa konja, leptospiroze i groznice zapadnog Nila. Program se u 2021. godini sastojao od pasivnog i aktivnog nadziranja. Pasivno nadziranje uključivalo je isključivanje i prijavu sumnje na virusni arteritis konja na čitavom području Republike Hrvatske u svih konja, a aktivno nadziranje uzorkovanje nasumično odabranih konja starijih od 12 mjeseci na području Republike Hrvatske. Službeni laboratorij za pretragu na virusni arteritis konja je ARTERIlab, Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zavod za mikrobiologiju i zarazne bolesti s klinikom, Heinzelova 55, Zagreb. Uzorci se pretražuju VN-testom. U slučaju potvrde ili sumnje na bolesti provodi se Pravilnik o mjerama kontrole arteritisa konja (NN 62/2009). Ako dođe do pobačaja moramo obavezno isključiti virusni arteritis konja, ali i druge zarazne bolesti poput rinopneumonitisa konja i leptospiroze koji su najučestaliji uzročnici pobačaja u RH (BARBIĆ i sur., 2019.).

Koitalni egzantem je akutna, virusna, kontagiozna spolno prenosiva bolest koja se očituje promjenama na vanjskim spolnim organima. Uzrokuje ju virus iz porodice *Herpesviridae*, konjski herpes virus 3. Bolest se najčešće prenosi koitusom, ali može se prenijeti i opremom za umjetno osjemenjivanje ili drugom kontaminiranom ginekološkom opremom. Inkubacija je 2-10 dana. Prvi simptom koji možemo primijetiti na oboljeloj životinji je pojava nodularnih lezija (0,5-1,5 cm) na penisu i prepuciju pastuha ili u perinealnoj regiji u kobile koje s vremenom prelaze u erozije. Obično prolaze unutar 2-4 tjedna, na mjestima na

kojima su se nalazile dolazi do depigmentacije. Dijagnozu možemo postaviti klinički ako uočimo tipične lezije, VN-testom ili PCR-om, uzorak uzimamo s ruba promjena. Utjecaj ove bolesti na plodnost je minimalan, no ipak oboljele životinje moramo udaljiti iz uzgoja kako bi spriječili daljnje širenje bolesti. Nije još potvrđenom može li se bolest prenijeti putem sjemena, no preporučuje se polučivati ejakulat od oboljelog pastuha. Penis pastuha tretiramo s 2% otopinom klorheksidina 3 uzastopna dana kako bi spriječili sekundarnu bakterijsku kontaminaciju. Neki pastusi mogu ostati asimptomatski nositelji duže vrijeme (TIBARY i sur., 2009.). Oboljelu životinju ne bi trebali koristiti u rasplodu sve dok se lezije ne povuku u potpunosti.

## **2.9. BIOSIGURNOST U UPRAVLJANJU RASPLODIVANJEM PASTUHA TOPLOKRVNIH PASMINA**

Cilj mjera biosigurnosti je smanjiti rizik od unosa i širenja zaraznih bolesti u uzgojnim objektima, štalama i svim drugi mjestima gdje pastusi borave. Pri određivanju koje će se mjere biosigurnosti primjenjivati u obzir moramo uzeti potencijalne rizike, geografsku lokaciju, gustoću populacije te metode uzgoja koje koristimo. Mjera se mora pridržavati svo osoblje te bilo koji posjetitelj koji dođe u objekt. Ako dođe do pojave zarazne bolesti moramo obavijestiti ovlaštenu veterinarsku organizaciju.

Prije svake sezone parenja pastuh obavezno mora biti testiran na spolno prenosive bolesti poput virusnog arteritisa konja, EHV-3, bakteriju *Taylorella equigenitalis*. Za prikupljanje sjemena može se upotrijebiti pastuh koji je negativan na IAK, a testiran je Coggins testom ili ELISA testom; ako je negativan na virusni arteritis konja, testiran testom izolacije virusa, PCR-om ili SN-testom; negativan na uzročnika kontagioznog metritisa kobilica (*Taylorella equigenitalis*), a bris je uzet s prepucija, uretre i fossae glandis te podvrgnut barem jednom od sljedećih testova: kulturi u mikroaerofilnim uvjetima, PCR-om ili RT PCR-om. Testiranje moramo provesti minimalno jednom godišnje, prije početka sezone parenja ili prije prvog prikupljanja sjemena. Uzorak za test za IAK moraju biti uzeti najviše 90 dana prije datuma prikupljanja sjemena. Uzorak za test za virusni arteritis konja trebamo uzeti najviše 30 dana prije datuma prikupljanja sjemena, osim ako je pomoću PCR-a ili RT PCR-a na uzorcima sjemena uzetim najviše 6 mjeseci prije datuma prikupljanja sjemena potvrđeno da pastuh donor nije prenositelj i ako je podvrgnut SN-testu pozitivnim rezultatom na razrijeđenje seruma 1:4. Uzorci za dokaz uzročnika kontagioznog metritisa kobilica trebaju biti uzeti najviše 60 dana prije prikupljanja sjemena. U slučaju pozitivnog rezultata pastuh se izolira, a sjeme prikupljeno

od datuma kad je prikupljen zadnji uzorak koji je dao negativan rezultat ne smije se premještati. Sjeme prikupljeno od svih drugih pastuha u centru za prikupljanje sjemena od datuma kad je prikupljen zadnji uzorak koji je dao negativan rezultat na jedan od testova pohranjuje se odvojeno i ne smije se koristiti dok se zdravstveni status centra ne obnovi i dok se pohranjeno sjeme službeno ne pregleda kako bi se isključila prisutnost patogena (DELEGIRANA UREDBA KOMISIJE (EU) 2020/686). Naredbom o mjerama zaštite zdravlja životinja od zaraznih i nametničkih bolesti i njihovom financiranju u 2022. godini određena je provedba Programa nadziranja, iskorjenjivanja ili kontrole, odnosno mjere otkrivanja, nadziranja, sprečavanja pojave i širenja, kontrole, suzbijanja i iskorjenjivanja bolesti u 2022. godini za sljedeće bolesti kod kopitara: groznica zapadnog Nila, infektivna anemija kopitara (IAK), leptospiroza, rinopneumonitis konja, virusni arteritis konja, konjska kuga, infekcija bakterijom *Burkholderia mallei* (maleus) i durina.

Ako koristimo umjetnu vaginu njeno pravilno rukovanje, čišćenje i skladištenje pomoći će u kontroli horizontalnog prijenosa spolno prenosivih bolesti. Fantomi također imaju visok potencijal za horizontalni prijenos spolnih zaraza. Preporučljivo je pokriti stražnji dio fantoma (dio koji dolazi u kontakt s genitalnim organima pastuha) jednokratnom plastičnom folijom. Fantom možemo oprati sapunom i vodom, ako su prisutni vidljivi ostaci dezinficirati 70 %-tnim alkoholom. Za razliku od nekih dezinficijensa alkohol kada se osuši ne ostavlja tragove te kako bi se izbjeglo oštećenje sjemena dezinficijensi se smiju koristiti za čišćenje fantoma samo ako bilo koji ostatak neće kontaminirati ejakulat tijekom polučivanja ili narušiti kvalitetu ejakulata. Procjena sjemena prije osjemenjivanja može otkriti znakove prisutnosti infektivnog agensa. Ako se smatra potrebnim, provode se daljnja dijagnostička ispitivanja. Preporučuje se da se ejakulat razrijedi u razrjeđivaču koji sadrži i odgovarajuće antimikrobne lijekove koji mogu ograničiti rast bakterija i prijenos potencijalno patogenih bakterija. Većina komercijalnih razrjeđivača sadrži antimikrobni lijek ili se on može dodati. Također mogu se dodati ako nisu prisutni u poželjnim koncentracijama. Treba svakako imati na umu da bakterijski ili gljivični patogeni mogu preživjeti u razrijeđenom sjemenu čak i ako sadrži antimikrobni lijek te još uvijek može doći do infekcije kobile. Za oplodnju bi bilo najbolje koristiti sterilnu jednokratnu opremu. Nakon postupka oplodnje sve bi trebalo očistiti i dezinficirati, uključujući svu opremu te prostor (ANONIMUS, 2019.).

### 3. RASPRAVA

Pastusi su visokovrijedne životinje te imaju ključnu ulogu u rasplodivanju jer se koriste na velikom broju kobila i imaju značajan utjecaj na iduću generaciju. Često se simultano koriste u sportu i rasplodu. Stoga veliku pažnju trebamo posvetiti pravilnom menadžmentu te zdravstvenoj skrbi pastuha.

Prije svega, kako bi bili uspješni u upravljanju rasplodivanjem, važno je dobro poznavati anatomiju spolnih organa pastuha i neurohormonalnu regulaciju. Pastusi spolnu zrelost dosežu u dobi od 12-18 mjeseci, a pripusnu zrelost s 3-4 godine. Važno je znati da je pastuhov libido na vrhuncu u sezoni spolne aktivnosti kobila tijekom travnja, svibnja i lipnja, dok je tijekom jesenskih i zimskih mjeseci prisutan pad libida i smanjen seksualni nagon. Proces spermatogeneze je dugotrajan i osjetljiv, traje oko 60 dana te se svako odstupanje od homeostaze može odraziti na kvalitetu sjemena i do 2 mjeseca kasnije. Prije uvođenja pastuha u rasplod bilo bi poželjno napraviti kompletan spermogram. Pastuha je također potrebno naučiti na postupak polučivanja ejakulata te svo osoblje koje sudjeluje u brizi o pastuhu i u postupku polučivanja ejakulata mora biti pravilno educirano. Što je pastuh mlađi to ga je lakše naučiti. Pastusi se razlikuju po jačini spolnih refleksa i libidu pa neki pozitivno reagiraju i bez poteškoća ejakuliraju i pogodniji su za rasplod dok drugi oklijevaju te im je teže polučiti ejakulat (PRVANOVIĆ BABIĆ i sur., 2019.). Svakom pastuhu individualno prilagođavamo i učestalost polučivanja ejakulata. Neki pastusi mogu održavati odgovarajući libido ako se ejakulat uzima 1 do 3 puta dnevno, 7 dana u tjednu dok se kod nekih razvijaju problemi ako polučujemo više od 3 do 5 puta tjedno (McDONNELL, 2009.). Za postupak polučivanja ejakulata najčešće koristimo umjetnu vaginu, no ejakulat možemo polučiti i drugim metodama poput uporabe kondoma, manualne fiksacije penisa te ejakulaciju možemo inducirati farmakološkim pripravcima. Pastuha prije polučivanja ejakulata treba stimulirati na skok. To najbolje postizemo kobilom u estrusu ili uporabom fantoma. Nakon postupka polučivanja ejakulata potrebno je ocijeniti ejakulat i kvalitetu spermija. Ejakulat se može koristiti kao svjež, rashlađen ili duboko smrznut. Svjež ejakulat moramo iskoristiti u svega nekoliko sati nakon polučivanja, rashlađen ejakulat može se upotrijebiti u roku od 48 h od polučivanja. Duboko smrznuta sperma u promet se stavlja u kontejnerima s tekućim dušikom. Uz pošiljke rashlađenog ili duboko smrznutog ejakulata mora se obavezno nalaziti popratna dokumentacija s podacima o zdravstvenom statusu pastuha od kojeg je polučen ejakulat, detaljan spermogram i podatci o veterinaru koji je uputio spermu. Pošiljku duboko smrznutog ejakulata

osim navedene dokumentacije treba pratiti i uputa za odmrzavanje i pripreme ejakulata za osjemenjivanje (PRVANOVIĆ BABIĆ i sur., 2019.).

Pažnju moramo posvetiti svim segmentima menadžmenta te svakom pastuhu pristupiti individualno jer se pastusi toplokrvnih pasmina osim u uzgoju, često koriste i u sportu te se vrhunac uzgojne sezone većinom preklapa s vrhuncem natjecateljske sezone. Kako za opće zdravstveno stanje tako i za dobre rezultate, pažnju treba posvetiti hranidbi te tjelesnoj kondiciji primjenom BCS (Body condition score) ili određivanjem tjelesne mase pastuha. Pastuha treba redovito klinički pregledati te mu pružiti dobru veterinarsku skrb koja uključuje redovitu dehelmintizaciju, stomatološki pregled, pregled potkivača te obradu kopita, redovito cijepljenje i testiranje na zarazne bolesti. Posebnu pažnju trebamo obratiti na zaraze koje se mogu prenijeti sjemenom. Trebamo poštivati sve zakonske odredbe koje su trenutno važeće te sve preporučene biosigurnosne mjere kako bi smanjili rizik širenja i unosa bolesti. Prije uvođenja pastuha u uzgoj i prije svake rasplodne sezone moramo napraviti procjenu rasplodne sposobnosti pastuha kako bi mogli napraviti plan pomoću kojeg bi očuvali njegovu maksimalnu reproduktivnu sposobnost.

#### **4. ZAKLJUČAK**

Pastusi imaju veliki značaj u rasplodu odnosno prijenosu kvalitetnog genetskog materijala. Istovremena primjena u rasplodu i sportu je moguća te je olakšana primjenom raznih tehnika asistiranе reprodukcije. Svaki rasplodni pastuh zahtjeva individualni pristup i strogi zdravstveni nadzor kako bi mogao dati svoj maksimum u rasplodu, a i u sportu ako se koristi, jer svaka bolest, stres, napor ili odstupanje od homeostaze može imati negativan utjecaj na spermatogenezu i plodnost.

## 5. LITERATURA

1. AMANN, R. P. (1993): Physiology and endocrinology. U: Equine reproduction. (A. O. McKinnon, J. L. Eds.). Philadelphia: Lea & Febiger, 658-685.
2. AMANN, R. P., J. K. GRAHAM (1993): Spermatozoal function. U: Equine Reproduction (A. O. McKinnon, J. L. Voss, Eds.). Lea & Febiger. Philadelphia, 715-745.
3. ANONIMUS (2019): AMERICAN ASSOCIATION OF EQUINE PRACTITIONERS (AAEP): Biosecurity guidelines for control of venereally transmitted diseases, 1-24.
4. ANONIMUS (2021a): Nacionalni program poticanja provedbe uzgojnih programa za toplokrvne pasmine konja u Republici Hrvatskoj 2021.-2025, Ministarstvo poljoprivrede.
5. ANONIMUS (2021b): Program nadziranja, praćenja prevalencije i proširenosti infektivne anemije kopitara, virusnog arteritisa konja, leptospiroze i groznice zapadnog Nila U 2021. GODINI, Ministarstvo poljoprivrede, Uprava za veterinarstvo i sigurnost hrane. KLASA: 322-02/20-01/55. UR. BROJ: 525-10/1315-21-1.
6. ARIGHI, M. (2007): Testicular descent and cryptorchidism. U: Current therapy in equine reproduction. (J. C. Samper, J. F. Pycoc, A. O. McKinnon Ur.). Saunders Elsevier. St. Louis, 187-190.
7. ARJUN, K., M. S. SANGITA, G. THANKESAWAR, R. INDRAPAL (2018): Balanoposthitis in equine and its clinical management. World journal of pharmaceutical research. Volume 7. Issue 3, 699-701. doi:10.20959/wjpr20183-10828.
8. BALL, B. A. (2014): Applied andrology in Horses. U: Animal andrology theories and applications. (P. J. Chenoweth, S. P. Lorton, Eds.). CABI. 255-257.
9. BARBIĆ, LJ., V. STEVANOVIĆ, L. RADMANIĆ, J. MADIĆ (2019.): Virusni arteritis konja – nadzor i suzbijanje na području RH 2009.-2019. Zbornik predavanja 6. savjetovanje uzgajivača konja u Republici Hrvatskoj. Ministarstvo poljoprivrede. Zagreb. 9-15.
10. BERNARD, W. V., J. BEECH (2011): Neurological examination and neurological conditions causing gait deficits. U: Diagnosis and management of lameness in the horse. 2nd. Ed. (M. W. Ross, S. J. Dyson, Ur.). Saunders Elsevier. St. Louis, 141-145.



11. BILINSKA, B., B. WISZNIEWSKA, K. KOSINIAK-KAMYSZ, M. KOTULA-BALAK, M. GANCARCZYK, A. HEJMEJ, J. SADOWSKA, M. MARCHLEWICZ, A. KOLASA, L. WENDA-ROZEWICKA (2006): Hormonal status of male reproductive system: androgens and estrogens in the testis and epididymis. In vivo and in vitro approaches. *Reprod. Biol.* 1, 43-58. PMID: 16967089.
12. BRITO, L. F. C. (2007): Evaluation of stallion sperm morphology. *Clin Tech Equine Pract* 6, 249-263. doi:10.1053/j.ctep.2007.09.004.
13. CERGOLJ, M., M. SAMARDŽIJA (2006): Veterinarska andrologija. (M. Samardžija, Ur.). Veterinarski fakultet. Zagreb, 15-101, 128-130, 164-210.
14. CERGOLJ, M., M. SAMARDŽIJA (2012): Rasplod mužjaka. . U: Veterinarski priručnik. (V. Herak-Perković, Ž. Grabarević, J. Kos Ur.). Medicinska naklada. Zagreb, 1934-1935
15. CHENIER, S. T. (2007): Anatomy and examination of the normal testicle. U: Current therapy in equine reproduction. (J. C. Samper, J. F. Pycoc, A. O. McKinnon Ur.). Saunders Elsevier. St. Louis, 169.
16. CHENIER, S. T. (2009): Anatomy and physical examination of the stallion. U: Equine breeding management and artificial insemination 2nd. Ed. ( J. C. Samper, Ur.). Saunders Elsevier. St. Louis, 1-15.
17. COLON, E., F. ZAMAN, M. AXELSON, O. LARSSON, C. CARLSSON-SKWIRUT, K. V. SVECHNIKOV, O. SÖDER (2007): Insulin-like growth factor-I is an important antiapoptotic factor for rat Leydig cells during postnatal development. *Endocrinology* 148, 128-139. doi:10.1210/en.2006-0835.
18. CONBOY, H. S. (2007): Significance of bacteria affecting the stallion's reproductive system. U: Current therapy in equine reproduction. (J. C. Samper, J. F. Pycoc, A. O. McKinnon Ur.). Saunders Elsevier. St. Louis, 231-235.
19. CRABTREE, J. (2010): Prebreeding examination of the stallion: 1. Physical examination. *In practice*, 32 (2), 22-28. doi:10.1136/inp.b5503.
20. CRABTREE, J. (2010): Prebreeding examination of the stallion: 2. Semen collection and evaluation. *In Practice*, 32 (2), 58-63. doi: 10.1136/inp.b5661.
21. ČERVENY, C., H. E. KÖNIG, H-G. LIEBICH (2009): Muški spolni organi. U: Anatomija domaćih sisavaca. (H.E. König, H-G. Liebich, Ur.). Naklada slap. Zagreb, 417-433.

22. DASCANIO, J. J. (2014): Preparation of a jump mare or a mare for natural cover. U: Equine reproductive procedures. ( J. J. Dascanio, P. McCue, Ur.). Wiley Blackwell. 349-350.
23. DE KRESTER, D., J. J. BUZZARD, Y. OKUMA, A. E. O'CONNOR, T. HAYASHI, SHYR-YEU LIN, J. R. MORRISOM, K. L. LOVELAND, M. P. HEDGER (2004): The role of activin, follistatin and inhibin in testicular physiology. *Mol. Cell Endoc.* 225, 57–64. doi: 10.1016/j.mce.2004.07.008.
24. DELEGIRANA UREDBA KOMISIJE (EU) 2020/686 od 17. prosinca 2019. o dopuni Uredbe (EU) 2016/429 Europskog parlamenta i Vijeća u pogledu odobravanja objekta za zametne proizvode i zahtjeva u pogledu sljedivosti i zdravlja životinja za premještanje zametnih proizvoda određenih držanih kopnenih životinja u Uniji, SL L 174, 3.6.2020., 50-52.
25. EISENHAUER, K. M., J. F. ROSER (1995): Effects of lipoprotein, equine luteinizing hormone, equine follicle-stimulating hormone, and equine prolactin on equine testicular steroidogenesis in vitro. *J. Androl.* 16, 18-27. doi: 10.1002/j.1939-4640.1995.tb01725.x.
26. ESTRADA, J. A., J. C. SAMPER (2007): Evaluation of raw semen. U: Current therapy in equine reproduction. (J. C. Samper, J. F. Pycock, A. O. McKinnon Ur.). Saunders Elsevier. St. Louis, 253-256.
27. GAUGHAN, E. M., P. D. van HARREVELD (2007): Penile infections, U: Current therapy in equine reproduction. (J. C. Samper, J. F. Pycock, A. O. McKinnon Ur.). Saunders Elsevier. St. Louis, 223
28. GERLACH, T., J. E. AURICH (2000): Regulation of seasonal reproductive activity in the stallion, ram and hamster. *Anim. Reprod. Sci.* 58, 197-213. doi: 10.1016/s0378-4320(99)00093-7.
29. GRAHAM, J. K. (1996): Analysis of stallion semen and its relation to fertility. *Veterinary Clinics of North America: Equine practice* 12(1), 119-130. doi: 10.1016/s0749-0739(17)30299-7.
30. GUYTON, C. A., J. E. HALL (2012): Medicinska fiziologija. (S. Kukolja Raradi i I. Andreis, Ur.). Medicinska naklada. Zagreb, 881.
31. HESS, M. E., J. F. ROSER (2001): The effects of age, season and fertility status on plasma and intratesticular insulin-like growth factor I concentration in stallions. *Theriogenology* 56, 723-733. doi: 10.1016/s0093-691x(01)00602-1.

32. HOLDCRAFT, R. W., R. E. BRAUN (2004): Hormonal regulation of spermatogenesis. *Int. J. Androl.* 27, 335-342. doi: 10.1111/j.1365-2605.2004.00502.x.
33. HURTGEN, J. P. (2009): Breeding management of the warmblood stallion. U: *Equine breeding management and artificial insemination* 2nd. Ed. (J. C. Samper, Ur.). Saunders Elsevier. St. Louis, 83-87.
34. HURTGEN, J. P. (2009): Semen collection in stallions. U: *Equine breeding management and artificial insemination* 2nd. Ed. (J. C. Samper, Ur.). Saunders Elsevier. St. Louis, 33-39.
35. INSIDE FEI. URL: <https://inside.fei.org/fei/your-role/veterinarians/biosecurity-movements/vaccinations/> (Pristupljeno 2022-01-12)
36. IVELL, R., S. HARTUNG, R. ANAND-IVELL (2005): Insulin-like factor 3: Where are we now? *Ann. NY Acad. Sci.* 1041, 486-496. doi: 10.1196/annals.1282.073.
37. KARESKOSKI, M., T. KATILA (2008): Components of stallion seminal plasma and effects of seminal plasma on sperm longevity. *Animal Reproduction Science* 107. 249-256. doi: 10.1016/j.anireprosci.2008.04.013.
38. KHANAM, A., A. A. SWELUM, F. A. KHAN (2021): Pharmacologically induced copula ejaculation in horses and donkeys. *Front. Vet. Sci.* 8:669423. doi:10.3389/fvets.2021.669423.
39. KÖNIG, H. E., H.-G.LIEBICH (2009): Endokrine žlijezde (Glandulae Endocrinae). U: *Anatomija domaćih sisavaca.* (H.E. König, H-G. Liebich, Ur.). Naklada slap. Zagreb, 581-591.
40. KOZARIĆ, Z. (1998): *Veterinarska histologija.* Naklada Karolina. Zagreb. 196-200.
41. LIN, B. J., D. TROYER (2014): Testicular anatomy and physiology. U: *Pathobiology of human disease.* (L. M. McManus, R. N. Mitchell, Ur.). Elsevier, 2464-2475.
42. LITTLE, T. V., G. R. HOLYOAK (1992): *Reproductive anatomy and physiology of the*
43. MARTIN Jr., B. B., S. M. McDONNELL (2011): Lameness in breeding stallions and broodmares. U: *Diagnosis and management of lameness in the horse.* 2nd. Ed. (M. W. Ross, S. J. Dyson, Ur.). Saunders Elsevier. St. Louis, 1235-1237.
44. MATIČIĆ, D., D. VNUK (2010): *Veterinarska kirurgija i anesteziologija.* Medicinska naklada. Zagreb, 248.
45. McDONNELL, M. S. (2009): Stallion sexual behavior. U: *Equine breeding management and artificial insemination* 2nd. Ed. (J. C. Samper, Ur.). Saunders Elsevier. St. Louis, 41-46.

46. McGEADY, T. A., P. J. QUINN, E. S. FITZPATRICK, M. T. RYAN (2013): Veterinarska embriologija. (M. Zobundžija, K. Babić, V. Gjurčević Kantura, Z. Kozarić, Ur.) Naklada Slap. Zagreb. 10.
47. MEYERS, A. S. (2009): Sperm Physiology. U: Equine breeding management and artificial insemination 2nd. Ed. ( J. C. Samper, Ur.). Saunders Elsevier. St. Louis, 47-53.
48. MOREIRA, F., D. HAMMON (2012): LUTALYSE and cloprostenol: Clearing up misconceptions. Pfizer animal health technical bulletin.
49. PRVANOVIĆ BABIĆ, N., M. LOJKIĆ, T. KARADJOLE, N. MAĆEŠIĆ, G. BAČIĆ, I. GETZ, A. KOSTELIĆ (2019): Reproaktivno zdravlje rasplodnih pastuha. Zbornik predavanja 6. savjetovanje uzgajivača konja u Republici Hrvatskoj. Ministarstvo poljoprivrede. Zagreb. 22-26.
50. ROSER, J. F. (2007): Endocrine diagnostics and therapeutics for the stallion with declining fertility. U: Current therapy in equine reproduction. (J. C. Samper, J. F. Pycock, A. O. McKinnon Ur.). Saunders Elsevier. St. Louis, 244-249.
51. ROSER, J. F. (2008): Regulation of testicular function in the stallion: An intricate network of endocrine, paracrine and autocrine system. Anim. Reprod. Sci. 107, 179-196. doi: 10.1016/j.anireprosci.2008.05.004.
52. ROSER, J. F. (2009): Reproductive endocrinology of the stallion. U: Equine breeding management and artificial insemination 2nd. Ed. ( J. C. Samper, Ur.). Saunders Elsevier. St. Louis, 17-24.
53. RUPIĆ, V. (2015): Reprodukcijska domaćih životinja. (V. Rupić, Ur.) Zrinski d.d. Čakovec, 55, 66-75, 146.
54. SHARP, D. C., B. D. CLEAVER (1993): Melatonin. U: Equine Reproduction. (A. O. McKinnon, J. L. Voss., Ur.). Philadelphia: Lea & Febiger, 100-108.
55. SIEME, H. (2009): Semen evaluation. U: Equine breeding management and artificial insemination 2nd. Ed. ( J. C. Samper, Ur.). Saunders Elsevier. St. Louis, 60-73.
56. SJAASTAD, Ø. V., O. SAND, K. HOVE (2017.): Fiziologija domaćih životinja. (S. Milinković Tur i M. Šimpraga, Ur.). Naklada Slap. Zagreb, 220-257, 684-722.
57. Stallion. Vet. Clin. North Am. Equine Pract. 1, 1-29. doi: 10.1016/s0749-0739(17)30464-9.
58. TIBARY, A. (2007): Stallion reproductive behavior. U: Current therapy in equine reproduction. (J. C. Samper, J. F. Pycock, A. O. McKinnon Ur.). Saunders Elsevier. St. Louis, 174-184.

59. TIBARY, A., J. RODRIGUEZ, J. C. SAMPER (2009): Microbiology and diseases of semen. U: Equine breeding management and artificial insemination 2nd. Ed. ( J. C. Samper, Ur.). Saunders Elsevier. St. Louis, 99-109.
60. TURNER, R. M. O. (2007): Testicular abnormalities, U: Current therapy in equine reproduction. (J. C. Samper, J. F. Pycock, A. O. McKinnon Ur.). Saunders Elsevier. St. Louis, 195-203.
61. VNUK, D. (2012): Balanopostitis. U: Veterinarski priručnik. (V. Herak-Perković, Ž. Grabarević, J. Kos Ur.). Medicinska naklada. Zagreb, 1016-1017.
62. WEINBAUER, G. F., E. NIESCHLAG (1993): Hormonal control of spermatogenesis. U: Molecular Biology of Male Reproductive System. (D. de Kretser, Ur.). New York: Academic Press, 99-142.
63. WOOD, J. L. N., J. M. CARDWELL, J. CASTILLO-OLIVARES, V. IRWIN (2007): Transmission of diseases through semen. U: Current therapy in equine reproduction. (J. C. Samper, J. F. Pycock, A. O. McKinnon Ur.). Saunders Elsevier. St. Louis, 266-271.
64. ŽIVIČNJAK, T. (2012): Durina. U: Veterinarski priručnik. (V. Herak-Perković, Ž. Grabarević, J. Kos Ur.). Medicinska naklada. Zagreb, 1573-1575.

## 6. SAŽETAK

Margareta Jaguš

### UPRAVLJANJE RASPLOĐIVANJEM I KONTROLA RASPLODNE SPOSOBNOSTI PASTUHA TOPLOKRVNIH PASMINA

Pastusi kao glavni prijenosnici kvalitetnog genetskog materijala imaju ključnu ulogu u rasplodivanju, jer se koriste na velikom broju kobila i time imaju značajan utjecaj na iduće generacije. Rasplodni pastusi se odabiru na temelju podrijetla, eksterijera i sportskih rezultata. Svaki pastuh prije ulaska u rasplod i prije svake rasplodne sezone mora proći procjenu rasplodne sposobnosti te biti redovito testiran na zarazne bolesti. Procjena rasplodne sposobnosti uključuje klinički pregled, pregled vanjskih spolnih organa, procjenu libida, ponašanja tijekom parenja odnosno polučivanja ejakulata te ocjenu ejakulata i spermija. Plan mora biti prilagođen svakom pastuhu individualno s obzirom na to da se toplokrvni pastusi osim u rasplodu koriste i u sportu, a vrhunac sportske sezone se poklapa sa sezonom parenja. Toplokrvni pastusi se u rasplodu, a i u sportu obično koriste od svoje 3. godine, a njihova karijera najčešće traje 15 ili više godina. Istovremenu primjenu pastuha u rasplodu i sportu nam olakšavaju razne tehnike asistirane reprodukcije poput umjetnog osjemenjivanja svježim, ohlađenim ili smrznutim sjemenom. Svako polučivanje ejakulata te rukovanje s ejakulatom mora biti u skladu s mjerama biosigurnosti kako bi spriječili kontaminaciju ejakulata i prijenos zaraznih bolesti. Kako bi odredili prikladan uzgojni plan za pastuha određujemo njegovu sposobnost proizvodnje odgovarajućeg broja morfološki normalnih i vitalnih spermija koji imaju sposobnost progresivne pokretljivosti 24-72 sata nakon razrjeđenja u odgovarajućim ekstenderima. Ejakulat mora biti slobodan od virusnog arteritisa konja, bakterije *Taylorella equigenitalis* i ostalih patogenih bakterija poput *Pseudomonas*, *Klebsiella* i *Streptococcus zooepidemicus*. Pastuh mora biti pod strogim zdravstvenim nadzorom jer svaki odmak od homeostaze može ugroziti plodnost. Isto tako, svi postupci vezani uz korištenje pastuha u rasplodu moraju biti u skladu s važećim zakonskim regulativama.

**Ključne riječi:** pastuh toplokrvne pasmine, ejakulat, rasplodivanje, biosigurnost

## 7. SUMMARY

Margareta Jaguš

### BREEDING MANAGEMENT AND BREEDING SOUNDNESS EXAMINATION OF WARMBLOOD STALLIONS

As the main carriers of quality genetic material, stallions are the focal point of equine breeding program, because they are used on a large number of mares and thus have a significant impact on future generations. Breeding stallions are selected based on their pedigree, performance, and conformation. Before entering the breeding program and before each breeding season, each stallion must undergo a breeding soundness examination and be regularly tested for infectious diseases. Breeding soundness examination includes clinical examination, examination of the external genitalia, libido, sexual behavior, and semen evaluation. The plan must be adapted to each stallion individually, since most warmblood stallions are not used solely in breeding but also in sports, and the peak of the sports season coincides with the mating season. Warmblood stallions are often used in breeding and as well in sports usually from the age of three, and their career mostly lasts 15 or more years. Simultaneous use of stallions in breeding and sports is facilitated by various assisted reproduction techniques such as artificial insemination with fresh, cooled, or frozen semen. Each semen collection and handling of semen must be in accordance with biosecurity measures to prevent semen contamination and transmission of infectious diseases. In order to determine a suitable breeding plan for stallion, we should check stallion's ability to produce adequate numbers of morphologically normal sperm that have the ability to remain progressively motile for 24-72 hours when diluted in an acceptable semen extender. Semen should be free of equine arteritis virus, bacteria *Taylorella equigenitalis*, and other pathogenic bacteria such as *Pseudomonas*, *Klebsiella*, and *Streptococcus zooepidemicus*. The stallion must be constantly under strict health supervision because any deviations from homeostasis can endanger fertility. Also, everything must be in accordance with applicable legislation.

**Key words:** warmblood stallion, semen, breeding, biosecurity

## 8. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 06.05.1996. u Zagrebu gdje sam pohađala Osnovnu školu Bartola Kašića, nakon koje sam upisala XVIII. Gimnaziju u Zagrebu, hrvatsko-francuski dvojezični program. Srednju školu završila sam 2014. te iste godine upisujem studij veterinarske medicine na Veterinarskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Na petoj godini studija odabrala sam smjer Veterinarsko javno zdravstvo. Tijekom studiranja prisustvovala sam kongresima: 7<sup>th</sup> International Congress “Veterinary Science and Profession“ i 9<sup>th</sup> International Congress “Veterinary Science and Profession“, te sam povremeno volontirala u veterinarskoj ambulanti Vet-Svijet. Stručnu praksu odradila sam u sklopu “Erasmus + stručne prakse“ u klinici za male životinje AniCura Kleintierzentrum Heilbronn, Njemačka. Tijekom osnovne i srednje škole i prvih godina fakulteta bavila sam se jahanjem.