Duboko smrzavanje sperme pastuha

Vrhovec, Fani

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:178:318339

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-20**

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Veterinary Medicine - Repository of PHD, master's thesis

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
VETERINARSKI FAKULTET

Fani Vrhovec

Duboko smrzavanje sperme pastuha

Diplomski rad

Zagreb, 2022.

Diplomski rad je izrađen u Klinici za porodništvo i reprodukciju Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Predstojnik Klinike za porodništvo i reprodukciju: prof. dr. sc. Marko Samardžija.

Mentorice : izv. prof. dr. sc. Iva Getz
prof. dr. sc. Martina Lojkić

Članovi povjerenstva za obranu diplomskog rada:

1. dr. sc. Ivan Butković dr. med. vet.
2. prof. dr. sc. Martina Lojkić
3. izv. prof. dr. sc. Iva Getz
4. prof. dr. sc. Nikica Prvanović Babić (zamjena)

ZAHVALE

Zahvaljujem svojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Ivi Getz na usmjeravanju i velikoj pomoći pri izradi ovog diplomskog rada, također i mentorici prof. dr. sc. prof. Martini Lojkić na svim savjetima pri pisanju diplomskog rada.

Zahvaljujem mojoj mami na neupitnoj podršci kroz sve godine studija i brizi koju je posvetila mojoj djeci tijekom mojeg izbivanja na fakultetu.

Zahvaljujem svojoj obitelji i prijateljima što su me podupirali i bili uz mene do kraja studija.

Najveće hvala mojoj Elizabeti i mojoj Pavli koje su mi bile glavni poticaj za završetak studija.

POPIS KRATICA:

ABP - androgen vezajući hormon
ALH - amplituda lateralnog otklona glave spermija u odnosu na prosječnu putanju
BCS - Body Condition Score
CASA - engl. *Classical microscopic assessment*
CFCD - karboksi fluorescein diacetat
cm - centimetar
DNK - deoksiribonukleinska kiselina
DS - duboko smrznuto
EthD-1 - etidij homodimerni test
FSH - folikulostimulirajući hormon
GnRH - gonadotropin oslobađajući hormon
HOST - hipoosmotski test bubrenja stanice
IGF-1 - inzulinu sličan čimbenik rasta 1
iLBP - unutarstanični protein koji veže lipide
INSL3 - inzulinu sličan peptid 3
LH - luteinizirajući hormon
LIN - indeks linearnosti spermija
LPO - lipidna peroksidacija
m. - *musculus*
mL - mililitar
mm - milimetar
MOT - ukupna pokretljivost spermija
PI - propidij jodid
PMOT - progresivna pokretljivost spermija
PUFA - polizasićene masne kiseline
ROS - slobodni radikali
STR - pravolinijski indeks spermija
UFT - (engl. *Unique freezing technique*)
UO - umjetno osjemenjivanje
VAP - prosječna brzina spermija
VCL - krivolinijska brzina spermija
VSL- pravolinijska brzina spermija

POPIS PRILOGA:

Slika 1. Spolni organi pastuha (IZVOR: https://www.rrnursingschool.biz/sertoli-cells/the-penis.html).

Slika 2. Dijelovi spolnog sustava pastuha kod erektilnog penisa (IZVOR: https://www.rrnursingschool.biz/sertoli-cells/the-penis.html).

Slika 3. Umjetna vagina tipa Missouri za uzimanje ejakulata kod pastuha (IZVOR: https://www.imv-technologies.com/product/mini-digitcool?from=252).

Slika 4. Spremnik za duboko smrzavanje sjemena (IZVOR: https://www.imv-technologies.com/product/mini-digitcool?from=252).

Slika 5. Unutrašnjost spremnika za duboko smrzavanje sjemena (IZVOR: https://www.imv-technologies.com/product/micro-digitcool?from=252).

Slika 6. Omjer postotka UO sa ohlađenim i DS sjemenom kod sportskih kobila u Europi u periodu između 2013. i 2017.godine (KOWALCZYK, 2019.).

Slika 7. Omjer postotka UO sa ohlađenim i DS sjemenom kod uzgojnih kobila u Europi u periodu između 2013. i 2017.godne (KOWALCZYK, 2019.).

Slika 8. Omjer postotka UO sa ohlađenim i DS sjemenom kod kobila bez određene kategorije u Europi u periodu između 2013. i 2017.godine (KOWALCZYK, 2019.).

SADRŽAJ

1. Uvod....1
2. Pregled rezultata dosadašnjih istraživanja....2
2.1. Muški spolni sustav kod konja....2
2.1.1. Spolni organi pastuha....2
2.1.2. Neurohormonalna regulacija spolnog sustava konja....8
2.2. Spolno ponašanje pastuha....10
2.3. Spermatogeneza....12
2.4. Ejakulat pastuha....13
2.4.1. Građa spermija konja....13
2.4.2. Sastav sjemene plazme konja....15
2.5. Polučivanje ejakulata kod pastuha....17
2.6. Ocjena rasplodne sposobnosti i kvalitete ejakulata pastuha....19
2.7. Umjetno osjemenjivanje kobila....24
2.8. Duboko smrzavanje/odmrzavanje sjemena pastuha....28
2.8.1. Postupak dubokog smrzavanja/odmrzavanja sjemena....29
2.8.2. Svojstva sjemena za krioprezervaciju....33
2.8.3. Tehnike UO kobila DS sjemenom pastuha....35
2.8.4. Čimbenici koji utječu na komercijalnu uporabu DS sjemena pastuha....37
3. Rasprava....42
4. Zaključak....45
5. LITERATURA....46
6. SAŽETAK....55
7. SUMMARY....56
8. ŽIVOTOPIS....57

1. UVOD

Konzerviranje genetskog materijala izuzetno je važan zadatak suvremene znanosti, a postupak je neophodno usavršavati i učiniti što jednostavnijim i pristupačnijim kako bi u budućnosti imali više mogućnosti zadržati što veću genetsku raznolikost biljnoga i životinjskoga svijeta. U ovom trenutku, kada pokušavamo predvidjeti kakve će posljedice u tom smislu imati utjecaj trenutnih i budućih geopolitičkih, klimatskih, demografskih promjena i brojnih drugih čimbenika, a uzimajući u obzir dosadašnji nedostatni i kompromitirani uspjeh ekoloških politika, budućnost je neizvjesna. Općenito, dobro upravljanje genetskim resursima biti će sve potrebnije i upravo je zato duboko smrzavanje sjemena muških životinja svih vrsta, kao oblik očuvanja gena veoma važno, te ga treba znanstveno razvijati.

Među domesticiranim životinjama konj ima posebno mjesto. Teško je pronaći životinjsku vrstu koja je kao konj *(Equus cabalus)* utjecala na razvoj ljudske civilizacije od trenutka svoje domestikacije koja se dogodila u još uvijek neutvrđenom vremenu neolotika. Iako je domesticiran poslije koze, ovce, svinje i goveda, konj je pogledu razvoja kulture u posebnom odnosu s čovjekom. Sve do početka 20. stoljeća, još točnije do kraja prvog svjetskog rata, konj je bio nezamjenjiv u mnogim radnim ulogama, a ne treba zaboraviti ni njegov poseban socijalno statusni položaj, a tada se njegova uloga ubrzano počinje gasiti. U sadašnjosti, konj je životinja koja nosi različite uloge koje ovise o podneblju, kulturi i svrsi.

U ovome radu posvetit ću se istraživanjima koja ispituju i proučavaju sve pozitivne aspekte najnovijeg načina očuvanja sperme, dubokog smrzavanja (DS), te također razmotriti i moguće negativne aspekte. U reprodukciji konja mjerilo je uspješnosti što veći broj gravidnih kobila nakon što je izvršen pripust ili umjetno osjemenjivanje (UO) sa što više živorođene ždrebadi. Sve do kraja prošlog stoljeća fokus istraživanja bio je koncentriran na konja kao cjelokupnu jedinku. Duboko smrzavanje sperme pastuha omogućava jednostavniju međunarodnu trgovinu kvalitetnim genetskim materijalom i učinkovitije progeno testiranje pastuha preko njegovog potomstva. Kako bi mogli doći do primjene svih dostignuća važno je postići skladnu interakciju između veterinara i uzgajivača u implementaciji novih otkrića (SQUIRES, 2009.). U radu će biti prikazani i analizirani literaturni podatci o postupcima DS sperme pastuha te osobitosti UO kobila sa DS/odmrznutom spermom pastuha. Primjenom UO s DS spermom želimo postići stupanj koncepcije kobila kao u prirodnom pripustu, no u istom trenutku isključiti sve rizike koji prirodni pripust nosi.

2. PREGLED REZULTATA DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA

2.1.Muški spolni sustav kod konja

Pravilan razvoj spolnih organa koji kasnije proizvode zdrave muške spolne stanice vrlo je važan pri izboru pojedinog pastuha u proizvodnji ejakulata. Ovim sustavom obuhvaćeni su organi u kojima se odvija razvoj, dozrijevanje, transport i pohrana muških spolnih stanica (ČERVENY i sur., 2009.). Muški spolni organi su testisi, mošnja, nuzjaja, sjemenovod, mokraćnica, akcesorne spolne žlijezde (prostata, mjehurićaste, bulbouretralne i žlijezde ampule sjemenovoda), penis i puzdra (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.).

2.1.1.Spolni organi pastuha

Mošnja *(scrotum)* je kožna vreća iz dva dijela koja sadrži jaja, nuzjaja i dijelom sjemenovode (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.). Postoje različiti slojevi skrotuma i oni odgovaraju određenim slojevima trbušne stijenke. To su vanjska koža, *tunica dartos* kao mišićno-elastično potkožje, dvoslojna *fascia spermatica externa* kao odvojak vanjske fascije trupa, *musculus cremaster* kao nastavak unutarnjeg kosog trbušnog mišića s fascijom i *fascia spermatica interna* te *lamina parietalis* kao nastavak potrbušnice (ČERVENY i sur., 2009.). Položaj mošnje u kojoj se nalaze testisi je visoko u ingvinalnoj regiji (CHENIER, 2009.) izvan trbušne i zdjelične šupljine kako sjemenici ne bi bili izloženi normalnoj tjelesnoj temperaturi pastuha koja iznosi 37,2 do 38,5°C. Da bi se u testisima normalno mogao odvijati proces spermatogeneze, temperatura unutar skrotalnih vreća treba iznositi 30,5 do 32,5ºC (CHENIER, 2009.). Čimbenici koji sudjeluju u termoregulaciji su koža mošnje koja je glatka, bez dlačnog pokrova, sa brojnim lojnim i znojnim žlijezdama u njoj (CHENIER, 2009.), mišićna komponenta ovojnice *tunica dartos* koja mijenja debljinu i površinu mošnje kontrakcijama regulirajući tako količinu kontakta između testisa i površine tijela (HAFEZ, 2000.a). Skrotalna fascija kao vezivno tkivo omogućava testisima i parijetalnoj *tunici vaginalis* da se relativno slobodno kreću unutar mošnje (CHENIER, 2009.). Između parijetalnog i visceralnog lista *tunice vaginalis* nalazi se šupljina *tunice vaginalis* s malo tekućine koja također omogućava slobodno kretanje testisa u skrotumu (CHENIER, 2009.).

Testisi ili sjemenici *(testes)* su parne muške spolne žlijezde u kojima se stvaraju spermiji i sintetiziraju muški spolni hormoni. U mošnji su smješteni vodoravno zajedno

s nuzjajima i jednim dijelom sjemenovoda. Oblik im je jajolik te su laterlano spljošteni (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.). Prosječna masa testisa kod zrelog pastuha je oko 300 grama, a njegove mjere su 10 cm u dužinu, 5 cm u dubinu i 4 cm u širinu. Sve navedene veličine podložne su individualnim varijacijama. Veličina samog testisa nije presudna za kvalitetu proizvedenog ejakulata, ali jest za njegovu kvantitetu. Kada govorimo o UO i pastusima od kojih se polučuje sperma pozornost se obraća na kvalitetu i količinu ejakulata koju proizvode. Prema nekim istraživanjima, mjerenjima je ustanovljeno da je lijevi testis često veći od desnog (ROSSDALE i BAILEY, 2002.). Ukoliko je veličina testisa pojedinog pastuha manja od prosječne, produkcija sperme će biti manja. To je važan čimbenik koji veterinar treba napomenuti vlasniku pogotovo ako je namijenio pastuha za uzgoj i proizvodnju ejakulata za UO (CHENIER, 2009.). Veličina testisa ovisit će i o godišnjem dobu odnosno periodu sezone, tako da će se povećanje dogoditi tijekom pune sezone. Uklanjanjem jednog sjemenika, preostali će se značajno povećati, čak do 80 % u masi (HAFEZ, 2000.a). Površina testisa prekrivena je vezivnotkivnom čahurom *(tunica albuginea)* građenom od kolagenih vlakana. Unutar nje nalaze se velike krvne žile *arteria* i *vena testicularis* čiji je tok vidljiv na površini testisa. Na *tunicu albugineu* naliježe visceralni list *processus vaginalis peritonei* kao serozna prevlaka koja mu daje gladak izgled. Osim *tunice albuginee* kao vezivnotkivne komponente postoje i vezivnotkivne pregrade *(septulae testis)* i vezivnotkivno tijelo *(mediastinum testis)*. Vezivnotkivne pregrade dijele testise u piramidno oblikovane režnjeve *(lobuli testis)* (ČERVENY i sur., 2009.). Parenhim testisa grade savijene sjemene cjevčice *(tubuli seminiferi contorti)*, ravne sjemene cjevčice (*tubuli seminiferi recti)*, kanalići koji u medijastinumu čine mrežu (*rete testis*) i odvodni kanalići (*ductuli efferentes testis*). U svakome režnjiću nalazi se 2 do 5 savijenih sjemenih cjevčica (*tubuli seminiferi contorti*) u kojima se odvija spermatogeneza i u čijem epitelu se nalaze potporne Sertolijeve stanice. Sertolijeve stanice stvaraju muške spolne hormone, opskrbljuju hranjivim tvarima spermatogene stanice tijekom razvitka, te otpuštaju spermatide u lumen cjevčica. U intersticiju između kanalića koji čine parenhim sjemenika nalaze se Leydigove intersticijske stanice koje su glavni tvorac muških steroidnih spolnih hormona, testosterona (ČERVENY i sur., 2009.). Spuštanje testisa je proces koji se odvija najčešće tijekom intrauterinog razvoja ždrebeta, točnije od devetog mjeseca graviditeta pa sve do nekoliko dana nakon poroda.

Prelaze put iz abdominalne šupljine, gdje su smješteni u okolini bubrega, kroz ingvinalni kanal sve do mošnje.

Nuzjaja ili pasjemenici *(epididymis)* su parni organi po dužini spojeni s testisima. Sastoje se od izvijuganih kanalića (*ductus epididymis)* čija je dužina 60 do 80 metara. Na njima razlikujemo glavu, tijelo i rep (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.). Glava epididimisa *(caput epididymidis)* čvrsto je spojena s čahurom sjemenika i prima odvodne kanaliće sjemenika *(ductuli efferentes testis)* kojih je u prosjeku između 13 i 20 (HAFEZ, 2000.a), te se oni sjedinjuju u izvodni kanal nuzsjemenika. U središnjoj regiji pojedinog odvodnog kanalića je ustanovljena sekretorna aktivnost (HAFEZ, 2000.a), no još uvijek sekretorna funkcija pojedinog dijela epididimisa je predmet istraživanja (CHENIER, 2009.). Transport sjemena u nuzjaju kreće od glave preko tijela do repa gdje se pretežito skladište zreli spermiji (CHENIER, 2009.), a trajanje transporta sjemena kroz nuzjaja je od 9 do 13 dana (HAFEZ, 2000.a). Izvodni kanal nuzsjemenika čini brojne zavoje i oblikuje tijelo nuzsjemenika *(corpus epididymidis)* koje u položaju drži dvostruki list seroze *(mesepididymis).* Izvodni kanal nuzsjemenika nadalje čini rep nuzsjemenika (*cauda epididymidis*) koji je pričvršćen na kaudalni okrajak sjemenika pomoću vlastitog ligamenta repa *(ligamentum caudae epididymidis). Ductus epididymidis* medijano na repu nastavlja se u sjemenovod *(ductus deferens)* (ČERVENY i sur., 2009.). Dok se spermiji nalaze u nuzjajima, gibaju se minimalno. Pri ejakulaciji oni se miješaju sa sjemenom plazmom i naglo se aktiviraju. Nuzjaja imaju višestruko djelovanje u spolnom sustavu, a to je transport spermija, koncentracija i zrenje spermija, skladištenje zrelih i za oplodnju sposobnih spermija te reguliranje izlučivanja ejakulata (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.).

Sjemenovodi *(ductus deferens)* su parni i tanki mišićni kanali koji se protežu od repa nuzjaja i pružaju se dorzalno zajedno s krvnim žilama, živcima i mišićima kroz sjemeno uže *(funiculus spermaticus)* i prolaze kroz ingvinalni kanal, te se u blizini vrata mokraćnog mjehura ulijevaju u mokraćnicu (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.). U sklopu sjemenog užeta na mjestu *anulus vaginalis* ulazi u trbušnu šupljinu i tamo oblikuje kranijalno konveksnu omču u naboru potrbušnice *(mesoductus deferens).* Kada prođe ventralno mokraćovod, u mokraćnicu se ulijeva u njenom početnom dijelu na *colliculus seminalis.* Završni dio sjemenovoda ampulasto je zadebljao *(ampulla ductus deferens)* zbog žlijezda *(glandula ampullae)* (ČERVENY i sur., 2009.). Promjer ampulastog proširenja nekoliko je puta širi (18 mm) od promjera sjemenovoda (4 do 5 mm). Do značajnog proširenja prvenstveno dolazi zbog zadebljanja zida odvodnog kanala zbog prisutnosti žlijezda, dok je proširenje lumena odvoda minimalno (AMANN, 1993.). Prije ušća u mokraćnicu sjemenovod je spojen s odvodnim kanalićem mjehurićastih žlijezda

(ductus excretorius) u zajednički *ductus ejaculatorius* (ČERVENY i sur., 2009.). Dužina sjemenovoda je 50 do 60 cm, a promjer je 5 mm (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.).

Mokraćnica *(urethra masculina)* je kod muških životinja dugačka mišićno-sluznička cijev koja se proteže od kaudalnog kraja vrata mokraćnog mjehura tj. od unutarnjeg otvora *(ostium urethrae internum)* do vanjskog otvora na slobodnom kraju penisa *(ostium urethrae externum)* (ČERVENY i sur., 2009.), te služi za odvod urina i spreme. Na mokraćnici razlikujemo tri dijela: zdjelični dio *(pars pelvina)*, *bulbus urethrae* i penisni dio *(pars externa)* (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.). Penisni dio možemo još podijeliti na kratki početni dio *pars preprostatica* koji vodi samo mokraću i *pars prostatica* koji je spojen s odvodnim kanalima spolnih žlijezda. Nakon izlaska iz zdjelične šupljine mokraćnica je obavijena erektilnim tkivom *(stratum spongiosum)* (ČERVENY i sur., 2009.).

Mjehurićaste žlijezde *(vesiculae seminales)* su parne, kompaktne, neravne žlijezde oblikom izduženog mjehura (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.). Naziv *vesiculae seminales* prihvaćen je zbog njhovog izgleda, odnosno jer su velike, šuplje žlijezde s debelom mišićnom stijenkom i glatkom površinom (ČERVENY i sur., 2009.). Položaj ovih žlijezda je iznad mokraćnog mjehura u *plici urogenitalis.* Ove žlijezde su tubuloalveolarnog tipa s izvodnim kanalima koji se ulijevaju u glavni izvodni kanal *(ductus excretorius)* iz kojeg se dalje sa sjemenovodom *(ductus deferens)* ulijevaju u uretru (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.). Kada se spoje odvodna cijev mjehurićaste žijezde i sjemenovod nastaje kratak zajednički odvod koji se opisuje kao *ductus ejaculatorius* (ČERVENY i sur., 2009.). Veličina ovih žlijezda je 15 do 20 cm u dužinu i 5 cm u širinu (AMANN, 1993.). Produkt ovih žlijezda je obilan sekret ljepljivo tekuće konzistencije koji sadrži limunsku kiselinu, fruktozu, sorbitol, proteine i flavin. Boja ovog sekreta je žuta. (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.). Sekret ovih žlijezda gotovo u potpunosti čini gel frakciju ejakulata pastuha (CHENIER, 2009.).

Prostata *(glandula prostatica)* je žlijezda tubuloalveolarnog tipa i izlučuje bistar, vodenastoserozni sekret koji sadrži proteine i limunsku kiselinu (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.). U nekih životinjskih vrsta prostata može biti u dva dijela (bik), no kod pastuha ona je jedinstvema i čini je samo *corpus prostatae* koji je smješten izvana na mokraćnici (ČERVENY i sur., 2009.). Tijelo prostate sastoji se od centralnog *isthmusa* i dva lateralna režnja koji se pružaju uz kaudolateralni rub svake mjehuričaste žlijezde. Svaki režanj dugačak je 5 do 9 cm, širok 2 do 6 cm i 1 do 2 cm debljine. Izvodni kanali prostate ulijevaju se u mokraćnicu na mjestu *colliculus seminalis*. Sekret prostate zbog

svoje lužnatosti pridonosi frakcijama sperme koje su bogate sjemenom jer djeluju pozitivno na metabolizam spermija, pogotovo na njihovu pokretljivost (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.; CHENIER, 2009.).

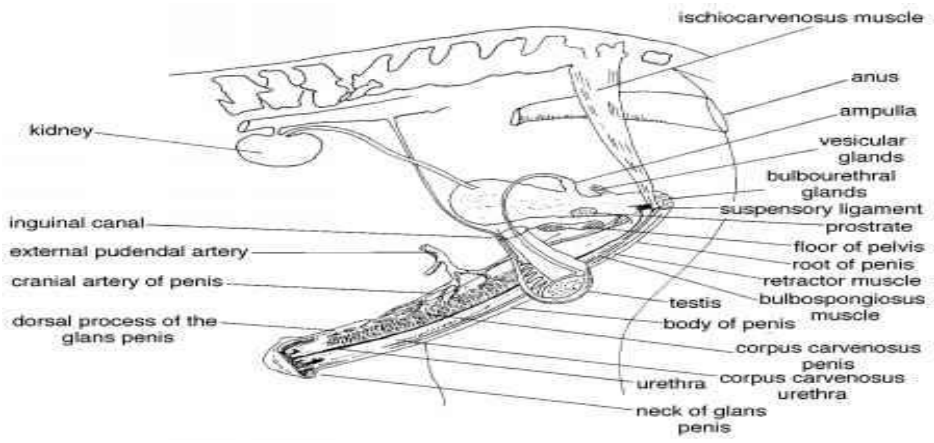
Bulbouretralne žlijezde *(glandule bulbourethrales)* parne su žlijezde i nalaze se kaudalno na uretri, na njenom izlasku iz zdjelične šupljine (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.). Veličine su oraha i nalaze se 8 cm kaudalno od prostate, te se rektalno ne mogu palpirati jer su prekrivene mišićjem (ČERVENY i sur., 2009.), (CHENIER, 2009.). Sekret koji izlučuju je bistar, vodenastoserozan iz erektilnog penisa, kao kap ili mlaz koji čisti mokraćnicu prije ejakulacije od ostatka urina (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.). Osim što čisti mokraćnicu od urina, sekret ove žlijezde prisutan je i u prvoj frakciji ejakulata s visokom koncentracjom aktivnosti lipaze koja nam ukazuje na pozitivno djelovanje ovog sekreta na pokretljivost spermija (CHENIER, 2009.).

Ampule sjemenovoda su zadebljani distalni listovi odvodnih kanala, te se kroz zid mokraćnice otvaraju u *colliculus seminalis*. U nekim izvorima navodi se da ampule sjemenovoda nisu akcesorne spolne žlijezde već isključivo služe za skladištenje sjemena (CHENIER, 2009.).

Penis je muški spolni kopulacijski organ koji se sastoji od korijena, trupa i glavića. Korijen penisa *(radix penis)* sastoji se od dva kraka *(crura penis)* koji se protežu od *arcusa ischiadicusa* do trupa penisa u kojem se i spajaju. Trup penisa *(corpus penis)* je glavnina organa. Glavić penisa *(glans penis*) je proširenі krajnji dio organa koji je dobro opskrbljen senzornim živcima (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.). Kad nije u erekciji penis pastuha je dugačak oko 50 cm, a u promjeru širok između 2,5 i 5 cm. U erekciji najčešće dolazi do povećanja od 50 % u dužinu i širinu, dok se glavić poveća između 300 % i 400 % u promjeru (AMANN, 1993.). Oblik mu je cilindričan. (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.). Penis pastuha spada u mišićnokavernozni tip penisa s velikim prostorima koji se u trenutku nadraženosti ispunjavaju krvlju, tako da je u odnosu na fibroelastični tip potrebna relativno veća količina krvi kako bi došlo do erekcije. Ta se promjena očituje povećanjem penisa u dužinu i debljinu. Penis je sastavljen od tri stupa erektilnog tkiva koje čine parni *corpora cavernosa penis* i neparni *corpus spongiosum penis* (ČERVENY i sur., 2009.) koji u potpunosti obuhvaćaju mokraćnicu pastuha, a vezivno tkivna ovojnica koja ih drži zajedno je *tunica albuginea* (HAFEZ, 2000.a). Specifičnost glavića penisa je njegovo široko kavernozno tijelo koje je u erekciji gljivastog oblika, te na sebi nosi vanjski otvor mokraćnice *(ostium urethrae externum).* Na donjem se dijelu glavića penisa nalazi *fossa glandis* u kojoj strši uretra. (CERGOLJ i

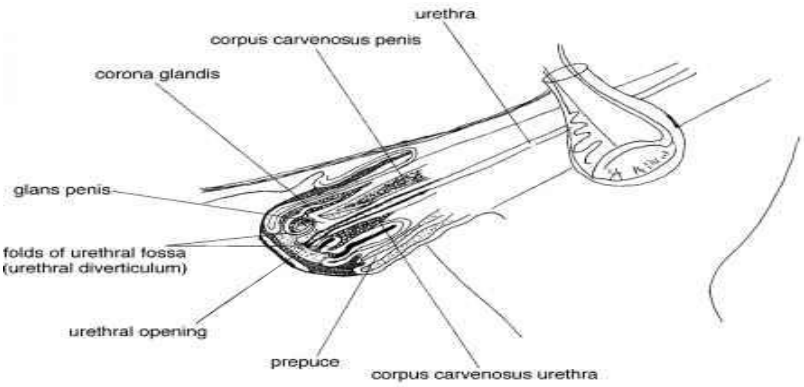
SAMARDŽIJA, 2006.). Mišiće penisa čine parni *m. ischiocavernosus* koji okružuje *crura penis* do njihovog spajanja u *radix penisu*, *m. bulbospongiosus* koji je izvanzdjelični nastavak poprečnoprugastog *m. urethralis*, a okružuje zdjelični dio mokraćnice te parni *musculus retractor penis* koji započinje na repnim kralješcima, postrance od anusa kroz perineum do penisa i zajedno sa *m. bulbospongiosus* proteže se do vrha penisa (ČERVENY i sur., 2009.).

Puzdra *(preputium)* je dvostruka invaginacija kože koja pokriva slobodni dio neerigiranog penisa (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.). Slojevi od kojih se sastoji prepucij pastuha su vanjski sloj *(lamina externa)* i unutranji sloj *(lamina interna)* koji prelaze jedan u drugi na otvoru prepucija *(ostium preputiale).* Puzdra pastuha specifična je zbog svojeg dodatnog nabora (plica preputialis) i prstena (anulus preputialis) koji omogućavaju znatno produžavanje penisa za vrijeme erekcije (ČERVENY i sur., 2009.). Površina kože na prepuciju je bez dlačnog pokrivača i unutar nje nalazimo veliki broj lojnih i znojnih žlijezda. Njena glavna uloga je zaštita penisa koji nije u erekciji (CHENIER, 2009.).



Slika 1: Spolni organi pastuha

(https://www.rrnursingschool.biz/sertoli-cells/the-penis.html)



Slika 2: Dijelovi spolnog sustava pastuha kod erektilnog penisa (https://www.rrnursingschool.biz/sertoli-cells/the-penis.html)

2.1.2.Neurohormonalna regulacija spolnog sustava konja

Kako bi se pastuh mogao razviti u spolno i reproduktivno zdravu jedinku mora se razviti njegov hormonski sustav čija glavna os je hipofiza, hipotalamus, testis. Princip po kojem djeluju hormoni ovih tkiva njihovo je lučenje iz adenohipofize u krv kako bi stimulirali lučenje hormona iz testisa i povratno opet utjecali na lučenje hormona iz hipotalamusa i hipofize (ROSER, 2009.). Hormoni u reprodukciji imaju ključnu ulogu za normalno odvijanje spermatogeneze, spolno sazrijevanje pastuha, te manifestaciju njegovih spolnih refleksa. Hormoni su fiziološke, organske i kemijske supstance sintetizirane i izlučene putem endokrinih žlijezda koje cirkulacijom dolaze do ciljnog organa ili tkiva gdje inhibiraju ili stimuliraju određenu aktivnost (HAFEZ i sur., 2000.b). Najvažniji hormoni uključeni u reprodukciju pastuha su gonadotropni oslobađajući hormon (GnRH) koji sintetizira i luči hipotalamus, luteinizirajući hormon (LH) ili hormon stimulacije intersticijalnog tkiva (*Intersticial Cell Stimulating Hormon*, ICSH) i folikulostimulirajući hormon (FSH) koje sintetizira i luči adenohipofiza, androgeni i estrogeni koje luče Leydigove stanice testisa, estrogeni i inhibin koje luče Sertolijeve stanice iz sjemenika (ROSER, 2009.). Uz dobro razvijenu os hipotalamus, hipofiza, testis važna je i funkcionalna epifiza tj. pinealna žlijezda koja je neparni duguljasti organ smješten u epitalamusu (KÖNIG i LIEBACH, 2009.). Melatonin je kod pastuha važan hormon koji se sintetizira iz aminokiseline triptofan, a luči se kao odgovor na vizualne podražaje koji se prenose živčanim putem od mrežnice oka do epifize (SJAASTAD i sur., 2017.). U konja on ima antigonadotropni učinak, te njegovo stvaranje koči prisutnost svjetlosne stimulacije. Na taj način izvan pune sezone, kada je manja količina svjetlosti, melatonin koči produkciju GnRH (CLEAVER i SHARP, 1993.). Uz melatonin kočenje

lučenja gonadotropnih homona potiču i opioidi tijekom zimskim mjeseci sezone (GERLACH i AURICH, 2000.). Produžavanjem dana i povećanjem količine dnevne svjetlosti smanjuje se lučenje melatonina, a otpuštanje GnRH, LH i FSH se povećava (ROSER, 2009.). Kobile su sezonski poliestrične životinje i ne mogu se razmnožavati izvan rasplodne sezone, no pastusi ne gube sposobnost parenja, te ejakulat mogu polučivati tijekom cijele godine, no sperma neće biti jednake kvalitete kao ona polučena u punoj sezoni. Hipotalamus je tkivo unutar mozga koje se nalazi u regiji trećeg moždanog ventriluka i zauzima jako mali prostor (HAFEZ i sur., 2000.b), te služi kao veza između endokrinog i živčanog tkiva. Luči GnRH koji dolazi do adenohipofize pulzatorno portalnim sustavom. GnRH će regulirati lučenje FSH i LH iz prednjeg režnja hipofize koji će dalje cirkulacijom poticati aktivnost muških spolnih žlijezda (SJAASTAD i sur., 2017.). Funkcija FSH u kontekstu muške životinje, odnosno pastuha, mehanizmom vezanja na Sertolijeve stanice otpušta različite komponente važne za spermatogenezu poput estrogena, inhibina, aktivina, androgen vezajućeg proteina (ABP), transferina i inzulinu sličnog čimbenika rasta 1 (IGF-1). Funkcije LH biti će sintetiziranje i otpuštanje testosterona i estrogena iz Leydigovih stanica (EINHAUSER i ROSER, 1995.). Testosteron spada u skupinu steroidnih hormona kojeg proizvode muške gonade i njegove glavne zadaće su razvoj i održavanje akcesornih spolnih žlijezda, stimulacija sekundarnih spolnih obilježja, poticanje spolnog ponašanja i spermatogeneza. Pastusi spadaju u jedinstvenu kategoriju životinja jer se testosteron proizvodi i u epididimisu. To znači da ukoliko pri kastraciji veterinar ostavi komad epididimisa uz sjemenovod konj će zadržati ponašanje pastuha zbog kontinuirane proizvodnje androgena u preostalom dijelu epididimisa (HAFEZ i sur., 2000.b). Osim već navedenih hormona na funkciju testisa i proizvodnju ejakulata djeluju parakrini i autokrini čimbenici koji upravljaju različitim funkcijama stanica testisa i/ili reguliraju aktivnost gonadotropnih hormona ovisno o uvjetima i potrebama (ROSER, 2009.). Za IGF-1 se pretpostavlja da ima mitogeni učinak na nezrele Leydigove stanice i potiče sintezu testosterona (COLON i sur., 2007.). Transferin je protein koji veže željezo i transportira ga kao hranjivu komponentu zametnim stanicama. Luče ga Sertolijeve stanice, tako da koncentracija transferina u sjemenoj plazmi može ukazati na stanje Sertolijevih stanica i spermatogeni potencijal (ROSER, 2009.). Inhibin i aktivin su glikoproteini koje u najvećoj mjeri proizvode Sertolijeve stanice. Ispušteni u perifernu cirkulaciju oni reguliraju lučenje FSH iz adenohipofize. Oba proteina imaju svoju endokrinu, parakrinu i autokrinu funkciju. Koncentracija inhibina niža je kod ždrebadi mlađe od godinu dana u odnosu na zrele

pastuhe. Iz toga zaključujemo da ukoliko imamo smanjenu koncentraciju inhibina kod odraslog pastuha, radi se o životinji s potencijalno smanjenom plodnošću (ROSER, 2008.). Inzulinu sličan peptid 3 (INSL3) hormon je kojeg isključivo proizvode Leydigove stanice, te predstavlja odličan marker za određivanje funkcije i statusa Leydigovih stanica (IVELL i sur., 2005.).

2.2.Spolno ponašanje pastuha

Spolno ponašanje pastuha započinje njihovim ulaskom u pubertet između 12 i 24 mjeseca života ovisno o pasmini i tipu, te sazrijevaju do potpune maturacije sa 5 do 6 godina starosti (STEINER i UMPHENOUR, 2009.). Period idealan za uvođenje u rasplod za UO je pubertet kako bi životinje što bolje i lakše prihvatile i naučile postupak. Korištenje ejkulata za UO započeti ćemo kada pastuh navrši između 2 i 3 godine života. U proljeće se događa sinkronizacija reproduktivnih nagona kobile i pastuha, čim kobila izađe iz zimskog perioda anestrusa. Pastusi nikad ne ulaze u fazu potpunog mirovanja spolnih nagona kao što je to slučaj kod kobila. Kada pastuh uđe u sezonu parenja u testisima se stvara veća količina testosterona, a time i bolja kvaliteta sjemena. Kako se dani produljuju možemo uočiti veću prevalenciju spontanih erekcija. Sezonu parenja produljujemo uvođenjem umjetnog izvora svjetlosti u uzgoje. Takvu praksu najčešće susrećemo u uzgojima engleskog punokrvnjaka (*Thoroughbred*), američkog kasača (*Standardbred*), američkog quarter konja (*Quarter horse*) i arapskog punokrvnjaka. Kod pastuha, stavljanjem pod umjetno osvjetljenje očekivat ćemo povećanje veličine testisa i količinu stvorene sperme. Uobičajena praksa u uzgoju konja je odvojeno držanje pastuha. Ukoliko ih je u rasplodu više, drže se u zasebnoj štali koju nazivamo pastuharna. Razlog je tomu prevencija ozljeda samog pastuha kao i ostalih konja koje bi mogle nastati zbog njegovog dinamičnog ponašanja. Moramo istaknuti da haremski držani pastusi imaju potpuno drugačije razvijeno ponašanje od onih koji se drže odvojeno i jedini kontakt s kobilom ostvaruju tijekom kratkog perioda parenja. Sa starenjem pastuha kvaliteta ejakulata opada, no ne i libido. Tako će pastuh u dobi od 20 godina imati slabiju kvalitetu ejakulata, ali će imati prisutan normalan libido. Kada uspoređujemo pastuhe koje držimo slobodno haremski s pastusima koje pripuštamo iz ruke ili koristimo za prikupljanje sjemena, ovi potonji pokazuju smanjenu seksualnu snagu i plodnost i višu stopu disfunkcije seksualnog ponašanja. Kao primjer možemo navesti da haremski držani pastusi tijekom jednoga dana mogu realizirati devet skokova na kobile s održivom

plodnošću (skok svaka 2,5 sata), dok pastuh koji je pripuštan iz ruke nakon dva skoka u danu ne može održati zadovoljavajuću plodnost (McGREEVY, 2004.). U brojnim istraživanjima na slobodno držanim konjima uočeno je da pastusi s kobilom koja je u estrusu kopuliraju više puta dnevno. Kada su uspoređeni rezultati u slobodno haremski držanih konja do začeća je došlo u 75 do 85 %, dok je kod konja koji su pripuštani iz ruke začeća bilo 55 do 60 %. Najbolji rezultati sa postignutom 100 % gravidnošću kobila u slobodno držanih životinja zabilježeni su kod islandskih ponija gdje je na jednog pastuha išlo 15 fertilnih ponica (McGREEVY, 2004.).

Vanjski podražaji prenose se putem odgovarajućih živaca do središnjeg živčanog sustava, a od njega se reakcije organizma prenose do pojedinih organa. Na taj način organizam pokazuje reakciju na vanjske podražaje. Ukoliko se radi o podražajima spolnih organa takve refleksne pojave nazivamo spolnim refleksima. Kako bi došlo do spolnog akta neophodno je da rasplodnjak ima urođene spolne reflekse, a oni su redom refleks približavanja, refleks erekcije, refleks opasivanja, refleks kopulacije i refleks ejakulacije (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.).

Postoje različiti faktori koji će utjecati na spolne reflekse, a to će prije svega biti prijašnja iskustva i osjetilni stimulansi. Postoje istraživanja u kojima je prihvaćena mogućnost individualnih želja pojedinih pastuha. Tako je kod nekih pastuha uočena sklonost odabiru manjih kobila, te je u tom slučaju isključena mogućnost lokomotornih poremećaja. Drugi je primjer pastuha koji je uvijek odabirao kobilu specifične boje koja podsjeća na jelensku kožu *"buckskin mare"*. Vizualni je faktor jako važan kod postizanja spolnih refleksa u pastuha. Čim je kobila u estrusu vidljiva pastuhu, a još više ako podiže rep i miče ga u stranu, bliska stidnim usnama, on joj prilazi. Njeno pasivno ponašanje zadnji je pokazatelj koji mu daje znak da je spremna za parenje. Olfaktorni stimulansi, posebno miris genitalne regije i urovaginalnih sekreta i ekskreta potiču seksualne nagone pastuha (McGREEVY, 2004.). U fazi estrusa kobile luče feromone koji kod pastuha izazivaju specifičnu reakciju koju nazivamo flehmen reakcija. Očituje se karakterističnim podizanjem stražnjeg dijela glave i podizanjem gornje usne (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.). Pastusi kroz naučene radnje te uporabom istih predmeta u procesu pripuštanja mogu naučiti i prepoznati odlazak na pripust. To znači da se određeni spolni refleksi poput erekcije mogu pojaviti i prije bilo kakvih vizualnih ili mirisnih stimulacija. Prema zaključcima znanstvenika Frasera Darlinga velika je prednost ukoliko se mlade ždrijepce predodređene za uzgoj izloži gledanju samog akta parenja kako bi isto što bolje prihvatili u budućnosti. Danas rezultate takvog načina učenja nazivamo Fraser Darling učinci

(MURPHY i ARKINS, 2007.).

Pastuhe koje se koristi u proizvodnji sjemena za UO od početka se uči da skaču na fantome. Neki od njih to će prihvatiti bez potrebe za dodatnim stimulansima. Oni koji će zahtijevati dodatnu stimulaciju, najbolje će reagirati na uvođenje kobile u estrusu u njihovu neposrednu blizinu (McGREEVY, 2004.). U normalna spolna ponašanja trebamo uvrstiti i masturbaciju pastuha koja se tradicionalno među uzgajivačima smatrala abnormalnom pojavom. To je međutim uobičajena i normalna pojava, te se javlja kod muških jedinki bez obzira na starost, socijalnu okolinu u kojoj se nalaze ili status u krdu. Događa se spontana erekcija, no najčešće ne dolazi do ejakulacije. Nije dokazano da je spontana erekcija i masturbacija povezana sa smanjenom plodnošću parnjaka (McGREEVY, 2004.).

Klasifikacija poremećaja spolnog ponašanja u grubo je podijeljena u tri kategorije. To su poremećaji smanjenog libida, erektilni poremećaji i poremećaji koordinacije. Pastusi toplokrvnih pasmina u vrijeme rasplodne sezone često sudjeluju i u sportsim natjecanjima te je veoma važno uskladiti njihovo korištenje u sportu i u rasplodu, uz odgovarajuću hranidbu, veterinarsku skrb i upravljanje prilagođeno individualnim potrebama pastuha, da bi se očuvala njihova plodnost tijekom sezone (PRVANOVIĆ BABIĆ i sur., 2019.).

2.3.Spermatogeneza

Spermatogeneza predstavlja sazrijevanje spermatogonija u zrele spermije. Započinje ulaskom životinje u pubertet, kod pastuha u prosječnoj dobi od 14 mjeseci, što može varirati obzirom na tip i pasminu konja. Spermatogeneza kod konja traje 57 dana i odvija se u više faza, a događa se u sjemenim kanalićima testisa. Jednom kada spermatogeneza započne, odvija se tijekom cijelog života pastuha.

Muška spolna prastanica tijekom embrionalnog razvoja prodre u embrionalnu osnovu testisa i na taj način postaje spermatogonija. Kada u pubertetu nastupi spolna zrelost, spermatogonije se kreću dalje razvijati. Tri su tipa spermatogonija: spermatogonije A, spermatogonije I i spermatogonije B. Spermatogonije A predstavljaju pričuvu spermatogonija koje osiguravaju da se one i dalje mitozama dijele te da se spermatogeneza neprekidno odvija. Spermatogonije B diferenciraju se u primarne spermatocite. U njima dolazi do replikacije DNK molekule i započinje prva mejotička dioba. Završetkom prve mejotičke diobe nastaju dvije sekundarne spermatocite s

haploidnim brojem kromosoma. Svaka životinjska vrsta ima drugačiji broj diploidnih kromosoma u stanici, a kod konja ih je 46. Svaki sekundarni spermatocit prolazi kroz drugu mejotičku diobu kojom nastaju po dvije spermatide. Proces kojim se spermatida morfološki diferencira i pretvara u funkcionalne spermije, naziva se spermiogeneza. Tijekom spermiogeneze događa se modifikacija organela i oblika stanice karakterističnog za somatsku stanicu u oblik koji je stvoren za oplodnju jajne stanice. Po završetku spermiogeneze spermiji se izbaciju u lumen sjemenih kanalića te se, zajedno s testikularnom tekućinom transportiraju u nuzjaja, gdje dodatno sazrijevaju i pohranjuju se do ejakulacije (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.).

2.4.Ejakulat pastuha

Sperma, odnosno ejakulat je tekućina koju smatramo jednom od najkompleksnijih bioloških materijala koja se sastoji od spremija, sekreta epididimisa i sekreta akcesornih spolnih žlijezda. Glavna funkcionalna jedinica ejakulata je muška spolna stanica, spermij. Uz spermije ejakulat čini još i sjemena plazma.

Da bi spermij mogao oploditi jajnu stanicu mora razviti i tijekom života zadržati pet osnovnih funkcija. To su: potpuno i pravilno razvijen metabolizam kako bi osigurao dovoljno energije, progresivna pokretljivost, prisutnost enzima u akrosomu koji su neophodni za penetraciju u jajnu stanicu, pravilna distribucija lipida u membrani akrosoma koja osigurava stabilnost stanične membrane, prisutnost bjelančevina u lipoproteinskoj membrani koja je esencijalna za preživljavanje spermija unutar ženskog reproduktivnog sustava, odnosno za interkaciju s epitelnim stanicama ženskih spolnih organa i prihvaćanje na membranu oocite u trenutku oplodnje (AMANN i GRAHAM, 1993.).

2.4.1.Građa spermija konja

Spermij konja građen je od glave, vrata i repa koji se može podijeliti na srednji, glavni i završni dio. Posebnu pozornost obratit ćemo na funkcije određenih građevnih dijelova spermija, te kako se one mijenjaju i ponašaju u procesima hlađenja do 5°C i dubokog smrzavanja do -196°C. Mikrotubularne i fibrozne strukture spermija izuzetno su važne za progresivnu pokretljivost spremija, dok je membrana spremija važna kod izloženosti spermija niskim temperaturama tijekom krioprezervacije (AMANN i

GRAHAM, 1993.).

Stanična membrana spermija je organel koji u potpunosti obavija spermij. U staničnoj membrani su najzastupljeniji lipidi i proteini koji čine tri glavna sloja, lipidni dvosloj, fosfolipide i glikokaliks, a njihov pravilni raspored je važan kako ne bi došlo do oštećenja i dezintegracije samog spermija. Važna je i fluidnost membrane koja može biti ugrožena većom količinom kolesterola unutar nje, čime se gubi njena fleksibilnost. Nestabilnost membrane može uzrokovati pretvaranje lipida iz tekućeg stanja u kristalne nizove i posljedičnu agregaciju proteina. Na ovakav način dolazi do ireverzibilnog oštećenja membrane, a tomu je najćešći uzrok hlađenje sjemena (AMANN i GRAHAM, 1993.). Značajka stanične membrane spermija je njezin različiti sastav u području glave od područja repa spermija. Osim toga, ta se dva dijela razlikuju i u električnom naboju. Negativni naboj spermija veći je u području repa (MEYERS, 2009.).

Glava spremija sadrži jezgru s pripadajućom ovojnicom, akrosom, postakrosomalnu laminu i staničnu membranu (AMANN i GRAHAM, 1993.). Stanična se membrana dijeli na akrosomalni i postakrosomalni dio (MEYERS, 2009.). Oblik glave spermija u najvećoj je mjeri određen oblikom jezgre koja se u njoj nalazi. Kod pastuha je glava spermija oblika vesla, široka i ravna. Od kaudalnog ruba gdje je nešto šira, glava se rostralno postepeno zašiljuje. Unutar same jezgre nalazi se stisnut kromatin u kojem nalazimo DNK molekule u kombinaciji s protaminom. Jezgra je ovijena dvostrukom ovojnicom koja sadrži pore. Rostralni dio jezgre prekriven je akrosomom, specijaliziranom vezikulom koja sadrži enzime hijaluronidazu, proakrozin/akrozin i lipazu. Nakon spajanja spermija na *zonu pellucidu*, vanjska akrosomalna membrana spaja se sa staničnom membranom spermija, a enzimi se izbacuju kako bi pomogli razgradnju *zonae pellucidae* i prodiranje spermija u jajnu stanicu. Kaudalni dio akrosoma ne sadrži enzime te ne sudjeluje u akrosomskoj reakciji. Na kaudalnom završetku glave spermija sjedinjuju se stanična membrana i jezgrina ovojnica. Na bazi glave nalazi se implantacijska udubina u kojoj se vrat i ostatak spermija vežu na glavu spermija. Pozicija same implantacijske udubine kod pastuha često je pozicionirana decentrirano kada je uspoređujemo s pozicijom u ostalih sisavaca. Posljedica takvog pozicioniranja je abaksijalni položaj repa u 50 % spermija. To je kod pastuha česta pojava i ne smatramo je patologijom (MEYERS, 2009.). Ukoliko nalazimo spermije s dva repa, to znači da postoje i dvije implatancijske udubine (AMANN i GRAHAM, 1993.).

Vrat spermija mjesto je spajanja glave i ostatka tijela spermija, te je veoma krhke i složene građe. Ukoliko tijekom spermatogeneze dolazi do višestrukih nepravilnosti u

području vrata koje rezultiraju oslabljenim spojem ili povezanošću između glave i vrata, velika je vjerojatnost da se radi o nasljednoj abnormalnosti u samom procesu spermatogeneze. Nasljedni poremećaj koji utječe na ovu abnormalnost spermija može se odvijati i u narušenoj fukciji epididimisa. Vrrat spermija je građem od fibroznih proteina i spleta gustih vlakana (AMANN i GRAHAM, 1993.).

Srednji dio repa karakterističan je po pristunosti veće količine mitohondrija koji su raspoređeni po njegovom rubnom dijelu. Tipičan spermatozoid u pastuha sadrži približno 50 vijugi mitohondrija koji sadrže enzime potrebne za sintezu adenozin trifosfata (ATP). Stvorena energija se koristi za pokretljivost spermija. Annulus je mjesto spajanja srednjeg i glavnog dijela repa (AMANN i GRAHAM, 1993.).

Prelaskom repa iz srednjeg u glavni dio, njegova se građa mijenja. Gustoća vlakana postepeno se smanjuje. U ovome dijelu postoji poseban strukturni oblik koji nazivamo fibrozni omotač koji omogućuje snažnu strukturnu podršku i fleksibilnost pomoću koje se ostvaruje pokretljivost spremija (AMANN i GRAHAM, 1993.).

Završnim dijelom spermija još uvijek se proteže intaktna aksonema, koja se pri kraju počne sužavati, a na kraju i nestane (AMANN i GRAHAM, 1993.).

2.4.2.Sastav sjemene plazme konja

Sjemena plazma predstavlja tekući dio ejakulata, a luče ju nuzjaja i akcesorne spolne žlijezde prije i tijekom ejakulacije. Funkcije sjemene plazme su višestruke. Ona djeluje kao tranzitno sredstvo za spermije u trenutku ejakulacije kroz uretru i ženski spolni sustav, te kao zaštita i izvor hranjivih tvari za spermije (KARESKOSKI, 2011.). Sastav sjemene plazme je šarolik; sadrži enzime, prostaglandine, kloride, bikarbonate, fosfate, sulfate, limunsku kiselinu, alanin, glicin, tirozin, natrij, kalij, magnezij, cink, bakar i vitamine A, B, C, D, E kompleksa. Sjemena plazma predstavlja do 98 % ejakulata, što ovisi o pasmini i individulanim predispozicijama pastuha. Radi se o izotoničnoj neutralnoj tekućini s mnogobrojnim organskim elementima. Kalij i magnezij od posebnog su značaja za pokretljivost spermija (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.). Svaka akcesorna spolna žijezda luči neki sebi svojstven sekret koji je po svome sastavu drugačiji od ostalih. Sekret bulbouretralnih žlijezdi je lužnat i prvenstveno služi za čišćenje urogenitalnih putova kojima prolazi ejakulat. Njegova prisutnost u ejakulatu smanjuje kvalitetu, te se zato pri polučivanju i uzimanju ejakulata od pastuha ona odbacuje. Sadržaj prostate također je lužnatog pH, a sadržaj sjemenih vrećica je kiselog

pH (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.).

U sjemenoj plazmi ustanovljena je prisutnost mnogih enzima koji su još uvelike predmet istraživanja kako bi se ustanovilo njihovo djelovanje na kvalitetu sjemena i plodnost pastuha. Vrijednost alkalne fosfataze (AP) u sjemenoj plazmi je visoka, te je njezino podrijetlo iz testisa i nuzjaja. Niska AP upućuje na azospermiju. Uz AP u sjemenoj plazmi nalazimo i kiselu fosfatazu koja najvećim dijelom dolazi iz prostate (KARESKOSKI, 2011.). Obje fosfomonoesteraze ostvaruju pozitivnu korelaciju s brojem spermija i negativnu korelaciju s volumenom ejakulata (PESCH i sur., 2006.).

Glukozidaze su još jedna skupina enzima koju nalazimo u sjemenoj plazmi. Njihova je funkcija pomaganje u hidrolizi složenih šećera tj. u razgradnji ugljikohidrata. α -1,4- glukozidaza je detektirana u epididimisu iz kojeg dolazi u sjemenu plazmu. Lipokalin prostaglandin D2 sintaza i angiotenzin 1 konvertirajući enzim dokazano su u pozitivnoj korelaciji s plodnošću pastuha, no ne i s ukupnom količinom proteina u sjemenoj plazmi. Lipaza je jedan od enzima čijom je prekomjernom aktivnošću dokazana smanjena pokretljivost spermija (KARESKOSKI, 2011.).

Od ostalih proteinskih komponenti u sjemenoj plazmi ustanovljena je prisutnost albumina, α-globulina, ß-globulina, γ -globulina, transferina i imunoglobulina (POLAKOSKI i KOPTA, 1982.). Funkcije koje obavljaju proteini sjemene plazme ključni su u koracima koji prethode samoj oplodnji. Proteini u sjemenoj plazmi razvrstani su u osam grupa koje su nazvane seminalni proteini konja numerirani od 1 do 8 "*Horse seminal protein 1-8*". Glavninu (70-80 %) od ukupne količine proteina čine "*Horse seminal protein 1 i 2*". Najistaknutiji protein te grupe je kratki fibronektin tipa 2 koji sudjeluje u procesu kapacitacije spermija (KARESKOSKI, 2011.). Kapacitacija spermija je slijed biokemijskih promjena koje vode do destabilizacije membrane spermija, što im omogućava da postanu sposobni za oplodnju (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.). U trenutku ejakulacije fibronektin tipa 2 protein veže se za fosfolipide na staničnoj membrani spermija uzrokujući strukturne promjene membrane. Zajednička je karakteristika tih proteina njihova sposobnost vezanja heparina. Količina proteina bit će najniža u onoj frakciji koja je i najsiromašnija sjemenom (3. frakcija), a najbogatija proteinima će biti ona koja je najbogatija sjemenom (1. frakcija) (KARESKOSKI, 2011.).

Prostaglandin u sjemenoj plazmi ima višestruko djelovanje. Jedno od djelovanja je na imunološki odgovor ženskog genitalnog sustava (KARESKOSKI, 2011.). PGE2 unutar sjemene plazme potiče otpuštanje proupalnih faktora, interleukina 8 (IL-8) i

protuuplanih citokina, interleukina 10 (IL-10). Na taj način sjemena plazma može imati upalnu i protuupalnu ulogu (DENISON i sur., 1999.).

Jedna od najistraživanijih komponenti sjemena je kalcij, zbog njegove fizioške uključenosti u proces oplodnje i funkcije spermija. Ekstracelularni kalcij (Ca^{2+}) važan je čimbenik u mehanizmu kapacitacije. Povećane količine ioniziranog kalcija dovode do prijevremene akrosomske egzocitoze, što dovodi do smanjenog postotka oplodnje. U frakcijama ejakulata koje su bogate spermijima prisutne su individualne razlike u količini kalcija, magnezija i bakra. Koncentracija spermija u ejakulatu je u negativnoj korelaciji s koncentracijom magnezija i kalcija u sjemenoj plazmi. Koncentracije ukupnog kalcija i ioniziranog kalcija u pozitivnoj su korelaciji s volumenom ejakulata iz čega zaključujemo da su akcesorne spolne žlijezde glavni izvor kalcija u sjemenoj plazmi. Kada je proučavan efekt kalija na pokretljivost spermija uočena je njihova povećana pokretljivost zbog njegovog dodavanja u razrjeđivače sjemena (KARESKOSKI, 2011.).

Organske komponente sjemene plazme su male molekularne mase porijeklom iz akcesornih spolnih žlijezda. Kada uspoređujemo količinu ugljikohidrata koja se nalazi u sjemenoj plazmi pastuha u odnosu na sjemene plazme ostalih vrsta kao npr. bikova, ona je neznatna. To se prvenstveno odnosi na fruktozu, galaktozu, glukozu i manozu (KARESKOSKI, 2011.).

Sjemena plazma sadrži i hormone, aminokiseline, ureu te lipide. Za zaštitu sjemena od oksidativnog stresa koji uzrokuju reaktivni kisikovi spojevi, posebno vodikov peroksid, zaduženi su enzimi katalaza, glutation peroksidaza i superoksid dismutaza. Značajan izvor reaktivnih kisikovih spojeva su spermiji oštećeni zbog temperaturnog šoka i morfološki promijenjeni spermiji. Glavni izvor katalaze u reproduktivnome sustavu je prostata (KARESKOKI, 2011.). Kisikovi reaktivni spojevi negativno utječu na progresivnu pokretljivost spermija, oštećuju njegovu staničnu membranu te fragmentiraju njegovu DNK. Sva ova oštećenja posljedica su lipidne peroksidacije. Istraživanja su pokazala da je mala količina reaktivnih kisikovih spojeva nužna za odvijanje određenih procesa kao što je kapacitacija, no prevelika je količina vrlo toksična za sjeme (KARESKOSKI, 2011.).

2.5.Polučivanje ejakulata kod pastuha

Vođenje postupka polučivanja ejakulata važno je pravilno izvoditi u svakom segmentu. Pastuh ejakulira u mlazovima i frakcionirano. Uglavnom se uzimaju prva 2 do

3 mlaza sjemena iz prve frakcije jer sadrže najviše spermija. Neki uzimaju i drugu frakciju dok se treća frakcija siromašna spermijima ne uzima. (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.).

Osnovno je ljude koji obavljaju zahvat pravilno educirati i zaštititi od mogućih ozljeda. U postupku se većinom koristi umjetna vagina i fantom uz prisutnost kobile u estrusu. Pokušaji dobijanja ejakulata primjenom elektroejakulacije nisu dali očekivane rezultate (PICKETT, 1993.a). Tijekom godina razvijeno je više različitih modela umjetnih vagina, a neki od njih su "Missouri", "Colorado", "Inra model", "Roanoke" i "Brasilian".

Slika 3: Umjetna vagina tipa Missouri za uzimanje ejakulata kod pastuha (https://www.imv-technologies.com/product/mini-digitcool?from=252)

Prve umjetne vagine razvijene su između 1930. i 1940. godine i od tada se usavršavaju i poboljšavaju (FOOTE, 2002.). Svaka umjetna vagina mora posjedovati određene odlike. Treba biti napravljena od materijala koji nisu grubi i ne mogu ozljediti pastuha, te mora osigurati maksimalno preživljavanje sjemena nakon ejakulacije. Prije postupka uzimanja ejakulata pastuh se mora pripremiti. Penis i područje oko njega mora se oprati i isprati toplom vodom zagrijanom na 42°C, a ispiranje je važno ponoviti i nakon polučivanja ejakulata. Zahvat može započeti tek nakon što se kod pastuha postigne erekcija koja će se najčešće izazvati izvođenjem kobile u estrusu u njegovu blizinu. Kako bi se ejakulacija odvijala na zadovoljavajući način potrebno je pripremiti umjetnu vaginu tako da je u njezinoj unutarašnjosti temperatura od približno 42°C, odgovarajući pritisak od 40 do 60 mmHg, i mora biti obložena lubrikantom (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.). Prihvatljiva temperatura unutar umjetne vagine postiže se ulijevanjem tople vode u njene pripadajuće spremnike koje pri korištenju nikako ne smijemo zatvoriti kako bi pastuh mogao bez zapreke realizirati sve spolne reflekse izbacujući suvišnu vodu iz spremnika pri ejakulaciji. Kako bi sjeme bilo u što većoj mjeri zaštićeno od vanjskih

utjecaja poput temperaturnog šoka i svjetlosti, spermohvatač mora biti adekvatno pripremljen. To podrazumijeva njegovo zagrijavanje i stavljanje u košuljicu koja će spriječiti dopiranje svjetosti do sjemena. Da bi sjeme dalje mogli koristiti u postupcima konzerviranja obavezno je ejakulat filtrirati. To je moguće napraviti već u spermohvatačU no može se obaviti neposredno nakon ejakulacije. U istraživanju iz 2013. godine komparirana su dva načina odstranjivanja sjemene plazme iz ejakulata. Metoda primjene posebnog filtera kojeg čini sintetička hidrofilna membrana pokazala se učinkovitijom od primjene uobičajenog centrifugiranja jer je veći postotak spermatozoida preživio i oporavio se od procesa uklanjanja sjemene plazme. Uspješnost uklanjanja količine sjemene plazme bila je jednaka u obje metode (RAMIRES i sur., 2013.).

2.6.Ocjena rasplodne sposobnosti i kvalitete ejakulata pastuha

Procesi umjetnog osjemenjivanja i čuvanja sjemena zahtijevaju detaljan pregled pastuha i njegovog ejakulata prije korištenja. Pastuh čiji se genetski materijal želi upotrijebiti za rasplođivanje treba biti podvrgnut veterinarskom pregledu i laboratorijskim pretragama kojima će se utvrditi njegovo zdravstveno stanje. Važno je ustanoviti da nije prenositelj određenih zaraznih bolesti. To se posebno odnosi na virusni arteritis konja za čije širenje su najodgovorniji pastusi kliconoše. Upravo zato pastusi koji sudjeluju u rasplodu trebali bi biti cijepljeni jednom godišnje protiv ove zarazne bolesti. Od ostalih poremećaja posebno bitno je utvrditi postoje li određeni neurološki ili mišćnokoštani deficiti. Iz toga slijedi da pastuh mora bez poteškoća ostvariti sve spolne reflekse. Pregled vanjskih spolnih organa izvodi se putem inspekcije i palpacije. Oba testisa moraju biti kompletno spuštena u mošnji te u njoj moraju biti slobodni. Penis i prepucij najjednostavnije i najsigurnije je pregledavati tijekom erekcije, a moraju biti normalnog oblika, veličine i bez prisutnosti lezija. Sjemeno uže trebamo moći palpirati kranijalno dorzalno od svakog testisa. Na ovaj način možemo isključiti iz uzgoja nasljedni poremećaj kriptorhizma. Testiranja na genetske bolesti pojedinih pasmina također su neizostavna u procjeni rasplodne sposobnosti pastuha. Tu možemo navesti testiranje arapskih punokrvnjaka na *"Severe combined immunodeficiency"* (SCID) i toplokrvnjaka na *"Warmblood fragile foal syndrome"* (WFFS) (PRVANOVIĆ BABIĆ i sur., 2019.). Mikrobiološki obrisci spadaju također u rutinske pretrage pastuha. Obriske treba uzeti prije ispiranja i pranja genitalija pastuha. Predilekcijska mjesta s kojih ćemo uzeti obriske su vanjska površina penisa, uretralna udubina, te mokraćnica prije i nakon

ejakulacije. Dodatno se može uzeti obrisak prepucija i samo sjeme. Bakterije koje najčešće nalazimo u obriscima i koje predstavljaju najveću opasnost za kobile prilikom UO ili prirodnog pripusta su *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* i *Tayorella equigenitalis* koja je uzročnik zaraznog metritisa kobila. Reproduktivno zdravlje pastuha u rasplodu treba shvatiti kao brigu o zdravstvenom stanju i dobrobiti konja u cjelini. To se poglavito odnosi na zdravlje lokomotornog sustava i očuvanje plodnosti u smislu preventivnih biosigurnosnih mjera i kontrola (PRVANOVIĆ BABIĆ i sur., 2019.). Da bi plodnost pastuha bila zadovoljavajuća, treba voditi računa o tjelesnoj masi životinje. Ukoliko je pastuh pretio ili je previše izgubio na masi plodnost će biti narušena. To konkretno znači da u vrhuncu rasplodne sezone pastuh dnevno mora pojesti 2 do 3 % svoje tjelesne mase, a od toga 50 % sirove tvari kako navodi SAMPER (2009.).

Elemeti ocjene svježe sperme podijeljeni su na kvantitativne i kvalitativne čimbenike. Kvantitativni čine volumen sjemene plazme, ukupni volumen sjemena, volmen sjemena bez sjemene plazme, koncentraciju spermija po mL i ukupni broj spermija u ejakulatu, dok kvalitativni čine udio pokretljivih spermija i njihovu morfologiju, dugovječnost spermija te pokretljivost nakon postupka hlađenja (SIEME, 2009.).

Prije ocjene važno je pravilno rukovati s polučenim ejakulatom. Sjeme pastuha može biti vrlo osjetljivo, pa je presudna nježna manipulacija i izbjegavanje temperaturnog šoka (PICKETT, 1993.b). Makroskopskoj ocjeni prethodi sanitarni pregled ejakulata, koji podrazumijeva već ranije opisani pregled zdravstvenog stanja pastuha i procjenu ispravnosti ejakulata. Sam uzorak može biti sanitarno ispravan ili neispravan. Ukoliko je neispravan njegova uporaba u svrhu rasplođivanja nije dopuštena. Razlozi neispravnosti prvenstveno su povezani s rasplodnjakom koji je zbog određenog poremećaja ili bolesti proizveo neodgovarajući ejakulat, no također mogu biti posljedica neodgovarajućeg postupka uzimanja ejakulata i njegove naknadne kontaminacije.

Prosječan volumen ejakulata pastuha je između 60 i 120 mL, a volumen bez sjemene plazme 30 do 100 mL, sivo bijele je boje, konzistencije mlijeka (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006; SIEME, 2009.). i neodređenog mirisa. Ukoliko u ejakulatu utvrdimo pojavu ružičaste ili crvene boje radi se o pojavi krvi u ejakulatu *(hemospermia)*. Pojava smeđe boje u spermi može značiti pojavu stare krvi ili kontaminacije kao i pojava žute boje *(urospermia),* te takav uzorak mora biti odbačen (SIEME, 2009.). Miris ejakulata koji će podsjećati na urin, fekalije ili trulež također bez iznimke treba biti odbačen (SIEME, 2009.). Volumen ejakulata ovisi o pasmini, dobi, načinu držanja,

okolišnim čimbenicima, metodi i učestalosti polučivanja te periodu sezone (JANETT i sur.; 2003.; SIEME i sur.; 2004.). Ukoliko je ejakulat uziman pomoću umjetne vagine, miris gume će biti intenzivan. Normalan pH sperme iznosi 7,2 do 7,7 (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.).

Mikroskopska pretraga sjemena obuhvaća procjenu koncentracije, pokretljivosti i morfologije spermija.

Koncentracija spermija govori nam koliki je broj spermija po mm^3. Normalna količina kreće se između 100 i $350x10^6$/mL ovisno o dijelu pripusne sezone i učestalosti uzimanja ejakulata. Ukoliko uzimamo ejakulat svaki dan gustoća sperme pada na 50 do $150x10^6$/mL (HERNANDEZ-AVILES i sur., 2019.). Postoje različite metode i sustavi pomoću kojih utvrđujemo ovaj parametar, a neki od njih su hemocitometar, fotometri i elektronski sustav CASA (enlg. *Computer Assisted Sperm Analyzers*) koji služi i za procjenu gibljivosti spermija.

Pokretljivost spermija glavni je elemet mikroskopske ocjene svakog uzorka sperme i relativno se lako procjenjuje. Dvije su najvažnije komponente pokretljivosti koje treba ustanoviti, a to su ukupna pokretljivost (MOT) gdje procjenjujemo bilo koji oblik pokretljivosti i progresivna pokretljivost (PMOT) gdje ocjenjujemo ravno kretanje prema naprijed (SIEME, 2009.). Postotak progresivne pokretljivosti za svježe sjeme je 60 % i 30 % za ohlađeno i DS/odmrznuto sjeme (HERNANDEZ-AVILES u sur., 2019.). Da bi određeni spermij proglasili progresivno pokretljivim mora se preko vidnog polja mikroskopa kretati relativno brzo pomoću kretnji repa koje idu naprijed, a glava spermija mora se rotirati 360° čitavo vrijeme dok se spermij kreće. Približno 50 % spermija konja ima abaksijalan položaj repa, tako da je njihovo kretanje kružno ukoliko se ne rotiraju (PICKETT, 1993.b). Pri procjeni progresivne pokretljivosti nekih pastuha, zbog visokog postotka abaksijalno položenog repa spermija, može doći do krive procjene plodnosti (SIEME, 2009.). Kako bi sjeme mogli pregledati sa što većom objektivnošću uzorak moramo razrijediti sa ekstenderom. Ukoliko pregledavamo sjeme bez ekstendera, ono će lakše aglutinirati (PICKETT, 1993.b), a ako u uzorku dođe do aglutinacije ona se mora zabilježiti kao slaba, umjerena ili visoka. Pregled uzorka sjemena svjetlosnim mikroskopom je jednostavna i dostupna metoda, no kako se radi o subjektivnoj metodi, potrebno je standardizirati postupak kako bi dobili objektivne i ujednačenije rezultate. Postupak obuhvaća inkubaciju uzorka na 37°C kroz 2 minute u vodenoj kupelji, razrjeđenje uzorka na koncentraciju od 25 do $50x10^6$/mL spermija i 10 do 20 µL uzorka po predmetnici. Tako pripremljen uzorak stavljamo na zagrijanu predmetnicu (35 - 40ºC)

i pokrijemo zagrijanim pokrovnim stakalcem. Pokretljivost ocjenjujemo pod povećanjem 100-200 x. Pokretljivost spremija treba se pregledavati u sredini pokrovnog stakalca jer na njegovim krajevima dolazi do smanjene pokretljivosti zbog bržeg isušivanja uzorka (SIEME, 2009.).

S ciljem što veće objektivizacije ocjene pokretljivosti uvedena je računalna analiza spermija (engl. *Computer-assisted sperm analyser*, CASA). Ovakvi uređaji utvrđuju različite parametre u kretanju spermija, a to su: MOT, PMOT, pravolinijska brzina (engl. VSL - *straight-line velocity*) ili prosječna brzina spermija na pravolinijskoj putanji (putanja koja spaja prvu i posljednju slikanu poziciju spermija); izražena u µm/s, krivolinijska brzina (engl. VCL - *curvilinear velocity*) ili prosječna brzina spermija na njegovoj pravolinijskoj putanji; izražena u µm/s, prosječna brzina (engl. VAP – *average path velocity*) ili prosječna brzina spermija na njegovoj prosječnoj putanji (putanja se izračunava preko algoritma CASA uređaja kojom se ispravlja krivolinijsko gibanje spermija); izražena u µm/s, pravolinijski indeks (engl. STR – *straightness*) ili linearnost na prosječnoj putanji, a izračunava se međusobnim odnosom pravolinijske i prosječne brzine (VSL/VAP), *linearity* (LN = VSL/VCL), amplituda lateralnog otklona glave u odnosu na prosječnu putanju (engl. ALH – *amplitude of lateral head displacement*); izražena u µm/s (BUTKOVIĆ, 2021.). Zbog skupoće ovakve opreme, ona je ograničena na centre za UO i istraživačke centre. Na ishod ove pretrage mogu značajno utjecati ekstenderi posebno oni na bazi žumanjka koji uzrokuju aglutinaciju u uzorku sperme. Upravo iz tog razloga preporučeno je korištenje pročišćene suspenzije na bazi žumanjka koja se dobije centrifugiranjem uzorka i dodavanjem deterdženta (Equex STM). Za razrjeđenje DS/odmrznutog ejakulata pri računalnoj analizi spermija preporuča se korištenje ekstendera na bazi nemasnog mlijeka u prahu u kombinaciji s glukozom. Cilj ovakve pretrage omogućuje nam bolji uvid u plodnost pastuha (SIEME, 2009.).

Činjenica je da nakon postupka DS/odmrzavanja imamo smanjenu pokretljivost spermija. Ako je pokretljivost u svježem uzorku 50 do 60 %, minimalna očekivana pokretljivost nakon DS i odmrzavanja je 25 %, a može iznositi i do 40 %. Neki oblici CASA-e omogućavaju morfološku analizu spermija, pogotovo njegove glave čija je veličina u pojedinim izvješćima bila povezana sa plodnošću pastuha (SIEME, 2009.).

Zabilježena treba biti i prisutnost stranih čestica poput epitelnih stanica iz mokraćnice, penisa ili prepucija koje ćemo prepoznati zbog njihove veličine koja je do 10x veća od glave spermija. Njihova prisutnost ne predstavlja smanjenje kvalitete uzorka. Osim toga, u ejakulatu se mogu naći eritrociti i leukociti, koji ejakulat čine

neprihvatljivim za korištenje te on mora biti podvrgnut daljnjem ispitivanju kako bi se utvrdio razlog njihove prisutnosti. Nalazimo i stanice u različitim fazama spermatogeneze koje su okrugle, veće od glave spermija i bez razvijenog repa karakterističnog za spermije. Veliki broj ovakvih nezrelih stanica pojavljuje se kod pastuha s degenerativnim promjenama testisa (SIEME, 2009.).

Morfologija spermija ocjenjuje se procjenom obojenih razmaza. 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. Spermiji čija membrana je izgubila integritet su mrtvi te će u procesu bojanja poprimiti ružičastu boju. (SIEME, 2009.) Morfološke abnormalnosti možemo kategorizirati s obzirom na anatomsko podrijetlo abnormalnosti (abnormalnosti glave, vrata ili repa spermija) ili pak mjesto nastanka. Primarni patološki oblici su posljedica poremećene spermatogeneze, sekundarni nastaju tijekom prolaska kroz pasjemenike, a tercijarni patološki oblici nastaju tijekom ili poslije ejakulacije. Maksimalne vrijednosti za pojedine abnormalnosti iznose 30 % za abnormalnosti glave, 25 % za proksimalne citoplazmatske kapljice, 10 % nezrelih zametnih stanica te minimalno 30 % morfološki normalnih spermija. Primjena fluoroscentnih bojanja i fluorofora omogućuje pregled sjemena pomoću fluorescentne mikroskopije i protočne citometrije. Na ovaj način može se ustanoviti odnos živih i mrtvih spermija, funkcija mitohondrija, integritet akrosoma, sposobnost kapacitacije, unutarstanična koncentracija kalcija, stabilnost kromatina i DNK molekule. Protočna citometrija postala je metoda izbora pri analizi staničnih populacija zbog svoje brzine i sposobnosti procjene i obrade populacije stanica koje se izdvajaju od normalne (SIEME, 2009.).

Kako je već navedeno integritet stanične membrane može se procijeniti tijekom pretage pokretljivosti spermija, primjenom različitih tipova bojanja (eosin-nigrosin, eosin-anilin ili fluorofori) i protočnom citometrijom. Jednostavna metoda za utvrđivanje funkcionalnog integriteta stanične membrane je hiposmotski test bubrenja stanice (HOST). Ukoliko se radi o spermiju čija membrana je cjelovita i neoštećena, tijekom ovog testa rep će se u različitom intezitetu saviti. HOST proveden na svježem sjemenu nam daje dobar uvid u prikladnost sjemena za smrzavanje (SIEME, 2009.).

Kako bi odredili sposobnost kapacitacije moramo znati da je ona uvjetovana točno određenim biokemijskim procesima na razini spermija koji utječu na uklanjanje bjelančevina sjemene plazme i preslagivanje fosfolipida unutar membrane. Kod

DS/odmrznutog sjemena dolazi do prerane kapacitacije spermija, što smanjuje njegovu sposobnost oplodnje i životni vijek. Kapacitaciju možemo dokazati primjenom fluorescentnog antibiotskog pripravka klortetraciklina (CTC) koji se unutarstanično veže na slobodan kalcij (SIEME, 2009.).

Integritet akrosoma je također važan parametar koji ocjenjujemo. Ako se akrosom ošteti tijekom krioprezervacije, spermij se ne može vezati za *zonu pellucidu* i prodrijeti u jajnu stanicu. Integritet akrosoma najčešće određujemo pomoću posebnih boja i fluorescentnih markera, a najčešća metoda je primjena konjugiranog lektina s fluorescein izotiocianatom (FITC) (HERNANDEZ-AVILES i sur., 2019.).

Normalna funkcija mitohondrija ima znatnu povezanost sa pokretljivošću spermija. Flurofori se koriste za provjeru mitohondrijske funkcije u spermijima putem označavanja negativnog potencijala duž unutarnje mitohondrijske membrane. Samo aktivni mitohondriji obojit će se fluorescentno zeleno (SIEME, 2009.).

Integritet DNK molekula i kromatina važan je za oplodnju i pravilan razvoj zametka. Spermiji s narušenim integritetom kromatina mogu oploditi jajnu stanicu, no rana embrionalna smrtnost je kod takvih zametaka visoka (SIEME, 2009.). Testovi kojima se ispituje DNK integritet i fragmentacija su analiza strukture kromatina spermija (SCSA) (engl. *sperm chromatin structure assay*), analiza fragmentacije DNK spermija (SDFA) *(*engl. *Sperm DNA Fragmentation Assay)*, TUNEL test (engl. *terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick-end labeling*) ispitivanje elektroforezom pojedinačnih stanica (COMET test) i test disperzije kromatina sjemena (engl. *sperm chromatin dispersion)* (SCD) (SANTI i sur., 2018.).

Kada obuhvatimo testove koji se provode različitim fluoroscentim tehnikama to su procjena integriteta stanične membrane spermija, procjena integriteta membrane akrosoma, mitohondrijska funkcija, integritet DNK molekule i stupanj oksidativnog stresa u spermiju. Ovakvi testovi sve se češće provode i nailaze na sve bolju prihvaćenost zbog dobrih rezultata koji se njima dobivaju (HERNANDEZ-AVILES i sur., 2019.).

2.7.Umjetno osjemenjivanje kobila

U dugoj povijesti uzgoja životnja koja traje već tisućama godina, čovjek je uzgoj usavršavao s ciljem dobivanja što boljih jedinki sa što boljim značajkama koje odgovaraju određenim uzgojnim ciljevima. Ova definicija primjenjiva je i na uzgoj konja koji teži postizanju što boljih rezultata odnosno dobivanju jedinki koje u najvećoj

mogućoj mjeri odgovaraju svrsi korištenja. U posljednjih sto godina uloga i svrha držanja konja značajno je promijenjena. Iz konteksta zapadnog kulturnog kruga konji se u današnje vrijeme ne uzgajaju sa ciljem dobivanja njihovih proizvoda kao što je slučaj kod uzgoja farmskih životnja, već se pretežito uzgajaju kao životnje za sport i rekreaciju. Upravo radi takvog načina uzgoja za reprodukciju se biraju samo najuspješnije jedinke, no to nam ne garantira jednaku uspješnost u kontekstu rasploda. Metodama asistirane reprodukcije morat ćemo intervenirati kod takvih kobila i pastuha (PRVANOVIĆ BABIĆ, 2014.).

Veliku prekretnicu u uzgoju domaćih životinja predstavlja uvođenje UO. U uzgoju konja UO je široko prihvaćena metoda biotehnologije rasplođivanja, a tijekom vremena ljudi su prepoznali i prihvatili mnoge prednosti umjetnog osjemenjivanja nad prirodnim pripustom. Primjeri tih prednosti su sljedeći: 1. Dobiveni ejakulat može se podijeliti u puno više doza za osjemenjivanje i na taj način ćemo efikasnije iskoristiti dobivenu spermu 2. U razrjeđivače za svježu, ohlađenu i DS spermu možemo dodati antibiotike koji će smanjiti incidenciju prijenosa bakterijskih spolno prenosivih bolesti na kobile od strane potencijalno zaraženog pastuha 3. Sami ekstenderi sadrže komponente koje će pozitivno djelovati na spermatozoide poboljšavajući njihovu stopu preživljavanja u ženskom spolnom traktu 4. Umjetno osjemenjivanje omogućava rasplod pastusima koji zbog određenih trauma ili ozljeda nisu u stanju izvršiti normalan koitus sa kobilom 5. Znatno se smanjuje količina ozljeda koje mogu nastati tijekom prirodnog pripusta 6. Prikupljanje ejakulata pomoću umjetne vagine omogućava stručnjacima da pregledom u kratkom vremenskom roku procijene njegovu kvalitetu 7. Ovakvim načinom rasplođivanja, dostupnost genetskog materijala rasplodnjaka iz udaljenijih područja dostupnija je i prihvatljivija za uzgoj vlasnicima kobila (BRINSKO i VARNER, 1993.) 8. Primjena UO kobila ubrzati će postupak oplemenjivanja pasmina i uzgojnih tipova, te će ubrzati selekcijski učinak, jer najkvalitetniji pastusi ostavljaju znatniji uzgojni trag (PRVANOVIĆ BABIĆ, 2014.). Uz sve ove prednosti moramo naglasiti da postoje neke odrednice koje možemo okarakterizirati kao otežavajuće u postupku UO kobila. Da bi uopće pristupili ovom obliku asistirane reprodukcije moramo imati osposobljene veterinare, veterinarske tehničare i ostalo osoblje potrebno pri ovakvim zahvatima. Znanje i vještine koje moraju posjedovati puno su zahtjevnije od onih za prirodan pripust. Zahtijeva se i puno dodatne opreme, laboratorij s educiranim stručnjacima što će predstavljati značajno veće financijsko opterećenje (BRINSKO i VARNER, 1993.). Također ne treba zanemariti rizik pri uzimanju ejakulata, jer su konji

kod pokazivanja spolnih refleksa izuzetno nemirni. U svijetu postoje pojedine organizacije za uzgoj konja koje zabranjuju uporabu UO kobila kao oblik razmnožavanja. Prvenstveno se radi o zabrani takvog načina uzgoja kod engleskih punokrvnjaka. Krovne uzgojne udruge za ovu pasminu konja smatraju da je genetski bazen ove pasmine smanjen i da bi korištenjem ove metode razmnožavanja došlo do preobilnog križanja u srodstvu.

Kada govorimo o povijesti umjetnog osjemenjivanja kod konja, vjeruje se da je prva kobila podvrgnuta tom procesu 1322. godine u jednom arapskom plemenu. Kroz stoljeća priča o tome događaju je romansirana i kaže da je vuneni smotuljak bio smješten u vaginu kobile i tamo ostavljen preko noći. Nakon što je izvađen iz vagine stavljen je pastuhu pod nos, kako bi pastuh potom na njega ejakulirao. Takav materijal je bio ponovno postavljen u vaginu kobile koja je prema priči oždrebila živo ždrijebe (BOARD, 1972.). Za rješavanje problema jalovosti kobila veterinari i znanstvenici su već krajem 19. st. uvelike provodili eksperimentalna umjetna osjemenjivanja nakon kojih su kobile uspješno koncipirale. Zapisi o prvim umjetno osjemenjenim kobilama sa uspješnim rezultatom dolaze sa Sveučilišta američke savezne države Pennsylvanie i iz Francuske od strane veterinara imenom Repiquet. Na prijelazu 19. u 20. stoljeće uzgajivači su uvelike razmišljali kako što efikasnije iskoristiti genetski materijal vrijednih pastuha. Istraživači Sand i Stribold iz Danske u svojim su istraživanjima isticali da sjeme vrijednih pastuha ima izrazitu ekonomsku vrijednost. U svojim ispitivanjima umjetno su osjemenili osam kobila od kojih je četiri koncipiralo (BRINSKO i VARNER, 1993.). Ozbiljnija uporaba ovog načina razmnožavanja događa se krajem 19. stoljeća. U to vrijeme najveće proučavanje UO kobila pokreće rusko sovjetski biolog Ilija Ivanovič Ivanov na Petrogradskom sveučilištu. Godine 1899. on piše svoje kapitalno dijelo "*Iskusstvennoe oplodotvorenie mlekopitajuških primenenie ego v skotovodstve i včasnosti v konevodstve*" u prijevodu "Umjetno oplođivanje sisavaca i njena primjena u uzgoju stoke posebno konja", na temelju čega dobiva zahtjev da 1901. godine osnuje prvi centar za umjetno osjemenjivanje konja u svijetu (https://www.encyclopedia.com/science/dictionaries-thesauruses-pictures-and-press-releases/ivanov-ilya-ivanovich). Centar se nalazio u mjestu Dolgoe u Orelskoj oblasti. Interes tada carske Rusije za financiranje ovakvog pionirskog projekta bio je potaknut velikom potrebom za ratnim konjima (FOOTE, 2002.). Istraživanja je Ivanov provodio na različitim ergelama, te su rezultati konstantno varirali. Osim interesa za umjetno osjemenjivanje domaćih životinja Ivanov je razvijao i međuvrsne hibride. Na taj način proizveo je hibrida između zebre (*Equus Hippotigris*) i jedinog pravog divljeg konja Przewalski (*Equus ferus przewalskii*)

(https://www.encyclopedia.com/science/dictionaries-thesauruses-pictures-and-press-releases/ivanov-ilya-ivanovich).

Drugo najveće središte pročavanja i istraživanja umjetnog osjemenjivanja bilo je u Japanu gdje ga profesor Ishikawa pokreće 1912. godine (FOOTE, 2002.). Proces razvoja umjetnog osjemenjivanja konja razvijao se dugi niz godina, te je u jednom trenutku sredinom 20. stoljeća počela njegova komercijalna primjena. U Jugoslaviji je to bilo 1948. godine (BOWEN, 1969.). Već do 1938. godine u Rusiji je UO bilo podvrgnuto 120.000 kobila. U Kini je 1959. godine UO podvrgnuto 600.000 kobila koje su koncipirale u 61 % slučajeva. U Sjedinjenim Američkim Državama glavna organizacija za uzgoj američkog kasača prihvatila je principe ovakvog oblika asistirane reprodukcije, te od 1950. godine dozvolila da se godišnje umjetno osjemeni 25.000 kobila (BRINSKO i VARNER, 1993.). Značajno dostignuće u polju UO kobila dogodilo se 27. srpnja 2013. godine kada je oždrijebljeno prvo ždrijebe divljeg konja (Equus Przewalski) koje je koncipirano nakon UO zahvaljujući radu reproduktivnog fiziologa Budhana Pukazhenthija i njegovog tima sa Auburn Sveučilišta u Alabami, koji su također razvili uspješan protokol za duboko smrzavanje sperme ove visoko ugrožene pasmine (PUKAZHENTHI i sur., 2014.).

Kako sam već u prijašnjim poglavljima pojasnila na koji ćemo način dobiti ejakulat za UO, sad ćemo pojasniti način na koji se on polaže u kobilu. Veterinarski nazdor je prijeko potreban nad kobilom kako bi sjeme u nju bilo uneseno u što optimalnijem trenutku za koncepciju. Nakon što ponašanjem kobila počne pokazivati da je ušla u estrus koji prosječno traje šest dana, moramo je temeljito ginekološki pregledati, uključujući vaginalnu pretragu, rektalnu palpaciju unutranjih spolnih organa, i ultrazvučni pregled maternice i jajnika. Ultrazvučnim pregledom jajnika tražimo folikul koji će ovulirati te mjerimo njegov promjer. Idealan promjer folikula bit će u fazama F3 i F4 (3,5 do 6 cm). Kombinacijom rektalne i ultrazvučne pretrage palpira se tonus maternice i folikula koji omekša neposredno pred ovulaciju, dok se ultrazvučnom pretragom precizno može izmjeriti promjer folikula i vidjeti ehostruktura maternice. Karakteristična ehotekstura maternice u estrusu podjeća na presjek naranče što je posljedica estrogenizacije tijekom estrusa te je najbolje izražena 1 do 4 dana prije ovulacije i tada progresivno slabi da bi nestala 2 do 6 dana nakon ovulacije (MAKEK i sur., 2009.).

Postoje određeni protokoli po kojima se provodi umjetno osjemenjivanje ovisno o tipu čuvanja sjemena. Kada kobile osjemenjujemo sa svježim i ohlađenim sjemenom

na 4°C proces ćemo započeti nakon ulaska kobile u estrus i utvrđivanja preovulatornog folikula od minimalno 35 mm u promjeru. To ćemo činiti svaka dva dana do trenutka kada nastupi ovulacija. Optimalan broj spermija u pojedinoj inseminaciji za svježe i ohlađeno sjeme je 200 x 10^6, a za smrznuto sjeme je 400 x 10^6. Kako navode BRINSKO i VARNER (1993.) kada se kobile osjemenjuju 24 sata prije ovulacije svježim ili ohlađenim ejakulatom, rezultati koncepcije na kraju sezone su čak i do 88 %. SIEME i sur. (2004.) iznose da se polaganjem sjemena u tijelo maternice postiže koncepcija od 58,8 % po ciklusu.

Pri osjemenjivanju kobila DS sjemenom potrebno je učestalo pratiti folikularni razvoj. Najbolja koncepcija nakon umjetnog osjemenjivanja s DS sjemenom pastuha postiže se ako se kobilu osjemeni 6 sati prije ovulacije, no tolerira se i unutar 6 sati nakon ovulacije (METCALF, 2007.). Dokazano je da je koncepcija kobila prilikom UO s DS sjemenom niža i iznosi u prosjeku 35 do 45 %. CROWE i sur. (2008.) postigli su koncepciju od 82,0 % nakon dvokratnog osjemenjivanja kobila DS sjemenom pastuha, uz indukciju ovulacije pomoću potkožnog umetka 2,2 mg deslorelin acetata (Ovuplant®). Stoga je kod UO kobila s DS sjemenom preporučljivo hormonalno inducirati ovulaciju te osjemenjivati svaka 24 sata od indukcije do ovulacije s obzirom na skupoću i ograničeni broj doza koje bivaju isporučene u jednoj pošiljci (GRIZELJ i sur., 2008.).

Osim što se UO kobila koristi kao metoda asistirane reprodukcije kojom ćemo olakšati i poboljšati uzgoj konja za sportske aktivnosti i time unaprijediti razinu kvalitete natjecanja u preponskom, dresurnom i daljinskom jahanju te zaprežnom sportu kao najistaknutijim disciplinama, također ćemo je koristiti kao osnovu za stvaranje banke sjemena. Takva strategija biti će izuzetno važna u održanju hrvatskih autohtonih pasmina konja kao što su hrvatski posavac, hrvatski hladnokrvnjak, lipicaner i međimurski konj (PRVANOVIĆ BABIĆ, 2014.). Postupak UO sa svježim, ohlađenim i DS sjemenom provodi se već dulji niz godina na Klinici za reprodukciju Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i u određenim veterinarskim stanicama (PRVANOVIĆ BABIĆ, 2014.).

2.8. Duboko smrzavanje/odmrzavanje sjemena pastuha

Otkrićem mnogih prednosti koje donosi tehnika DS sjemena, istraživanja su se usmjerila na pronalazak što efikasnijih protokola koji bi omogućili dostupnost ove tehnologije uzgajivačima diljem svijeta. Jedna od glavnih prednosti osjemenjivanja s DS

sjemenom je mogućnost naručivanja sjemena unaprijed i njegovog skladištenja, što omogućuje da se kobila osjemeni u najpovoljnijem trenutku (SQUIRES, 2009.). Glavne prepreke u značajnijoj komercijalnoj uporabi DS/odmrznutog sjemena su: 1. Veći veterinarski troškovi pripreme kobile za osjemenjivanje smrznutim sjemenom u odnosu na ohlađeno sjeme 2. Nužnost transporta pastuha u specijalizirane i ovlaštene centre koji trebaju procijeniti kvalitetu sjemena i sjeme uskladištiti 3. Smanjena plodnost smrznutog sjemena u odnosu na ohlađeno 4. Izuzetak sustava selekcije za kvalitetu DS sjemena 5. Mogućnost distribucije sjemena vrlo loše kvalitete koja će se pokazati tek nakon odmrzavanja (LOOMIS i GRAHAM, 2008.).

Prva zabilježena gravidnost kobile osjemenjene DS sjemenom ostvarena je 1957. godine, a proveli su je Barker i Gandiera. Znanstvenici su sjeme izdvojili iz repa epididimisa, dodali punomasno mlijeko sa 10 % glicerolom kao razrjeđivačem, duboko smrznuli i odmrznuli te njime osjemenili sedam kobila. Od sedam osjemenjivanja, jedno je rezultiralo ždrijebljenjem (PICKETT i AMANN, 1993.).

2.8.1.Postupak dubokog smrzavanja/odmrzavanja sjemena

Kako bi dobili sjeme zadovoljavajuće kvalitete nakon smrzavanja, ono mora na što pogodniji način proći postupak DS. Glavni problem u postupku DS je voda i njeno prelaženje iz različitih agregatnih stanja u samim spermijima. Odgovarajućim postupcima moramo prevenirati stvaranje kristala unutar spermija i uništavanje njihove stanične membrane. Točnije, treba izbjeći nastanak hladnog šoka u stanici i njegove posljedice. Hladni šok donosi niz potencijalno ireverzibilnih promjena koje se najčešće događaju u procesu brzog hlađenja sa 20°C na 1°C (PICKETT i AMANN, 1993.).

Postupak DS spermija uzrokovat će oštećenja i promjena u staničnoj membrani spermija koje se mogu poistovjetiti sa promjenama koje se događaju tijekom kapacitacije, zbog štetnih učinaka nastalih oksidativnim stresom, osmotskim poremećajima i temperaturnim promjenama. Zbog ovih promjena uspješnost UO sa DS spermom ima slabije rezultate, no taj se nedostatak može se djelomično nadomjestiti s većim brojem živih spermija u dozi za UO (SOUSA, 2014.).

Duboko smrzavanje sjemena pastuha uključuje razrjeđenje sjemena u dva koraka, gdje se u prvom koraku dodaje primarni razrjeđivač na bazi obranog mlijeka ili kazeina, a nakon centrifugiranja slijedi drugi korak dodavanjem razrjeđivača s krioprotektorom. Razrjeđivači su otopine koje sadržavaju puferske, hranjive i zaštitne sastojke za sjeme

(CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.). Nakon što je ejakulat polučen, filtracijom se uklanja gel frakcija. Potom se ejakulat miješa s primarnim razrjeđivačem u omjeru 1:1 ili do koncentracije 50 x 10^6/mL i centrifugira kako bi se uklonila sjemena plazma (SIEME i sur., 2011.). Centrifugiranje može oštetiti spermije, a uspjeh centrifugiranja ovisi o sili/brzini (350-700 x g) i vremenu (10-12 min) vrtnje. Velika centrifugalna sila uzrokuje snažnu adheziju taloga, što je štetno za spermije. Prema BLISS i sur. (2012.) najmanje oštećenje spermija nastaje tijekom centrifugiranja kroz 20 minuta na 1000 g, koristeći gradijent gustoće (*cushion fluid*). Pet do 20 % sjemene plazme u uzorcima sjemena djeluje pozitivno tijekom krioprezervacije (SOUSA, 2014.). Sekundarni ekstenderi sadrže krioprotektor. Kod pastuha je utvrđen je individualni afinitet i tolerancija za pojedine razrjeđivače, a isto tako postoje i individualane varijacije u preživljavanju spermija nakon DS. Razrjeđivač omogućuje dobivanje većeg broja doza za UO, štiti spermije od potencijalnih oštećenja koji mogu dovesti do smanjenja plodnosti, osigurava energiju potrebnu za normalan metabolizam spermija i može utjecati na brzinu hlađenja prije zamrzavanja. Razrjeđivači sadrže šećere, elektrolite, pufere, žumanjak, mlijeko i mliječne proizvode (MARTIN i sur., 1979; LOOMIS i sur., 1984; HEITLAND i sur., 1996; ECOT i sur., 2000; ALLEN, 2005.). Kazeinske micele i laktoza iz mlijeka ponašaju se kao zaštitne komponente poput proteina koji vežu lipide (iLBP) (BERGERON i MANJUNATH, 2006.). Proteini imaju funkciju sprječavanja destabilizacije stanične membrane spermija štiteći njezin fosfolipidni dvosloj. Najprihvaćeniji izvor proteina u postupku DS sjemena su kokošji i pačji žumanjci u koncentraciji od 10 do 20 %. Krioprotektori, koje dodajemo u sekundarni ekstender, spriječavaju oštećenje spermija tijekom procesa smrzavanja i odmrzavanja. Krioprotektori će djelovati na formiranje kristala leda, smanjenje izloženosti oksidativnome stresu i na očuvanje strukture stanice (SOUSA, 2014.). Podjela krioprotektora je na permeabilne, male molekulske mase, koji prolaze staničnu membranu (dimetilsulfoksid, glicerol, etilen glikol, metanol, etanol i drugi alkoholi), te na nepermeabilne koji ne prolaze staničnu membranu i mogu biti male ili velike molekulske mase (fruktoza, saharoza, galaktoza, polivinil alkohol, goveđi serumski albumin) (CERGOLJ i SAMRDŽIJA, 2006.). Djelotvornost pojedinog kriprotektora ovisit će o propusnosti stanične membrane na primjenjenu otopinu, te njegovoj toksičnosti. Glicerol je najčešće korišten krioprotektor koji se koisti u DS sjemena u koncentraciji od 2,5 do 5 % (SQUIRES i sur., 2004.). Prisutnost glicerola zaustavlja stvaranje kristala leda, odnosno povećava udio nesmrznute frakcije i smanjuje skupljanje

stanica (MAZUR i RIGOPOULOS, 1983.). Prema SQUIRES (2004.) krioprotektori dimetil sulfoksid, etilen glikol, metil formamid i dimetil formamid postigli su još bolje rezultate od glicerola. Kombinacija šećera fruktoze i glukoze često se dodaje u sekundarni ekstender kao nepermeabilan krioprotektor. Slijedi pakiranje sjemena. Danas je najprihvaćenija metoda smrzavanje sjemena u pajetama zbog jednostavnosti primjene i vrlo dobrih rezultata u brzini DS uzoraka koja je ujedno i ključni čimbenik procesa. Postoje tri veličine pajeta zapremnine 0.25 mL, 0,5 mL i 1 mL (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.). Najčešće su u uporabi pajete od 0,5 ml koje mogu sadržavati između 50 i 800 x 10^6 spermija ovisno o laboratoriju koji ih priprema. Doza koja se najčešće primjenjuje je 250 x 10^6 spermija za jednu kobilu po ciklusu, koja se polaže u tijelo maternice (AURICH i sur., 2020.). Pajete se stavljaju na posebne stalke, hlade na 4° C, nakon čega se izlažu parama tekućeg dušika postavljanjem stalka nekoliko cm iznad razine tekućeg dušika. Također, postoji i automatizirani sustav koji obavlja čitav proces DS putem kontrole računala (ALLEN, 2005.). Što se tiče brzine smrzavanja pajeta, različiti autori navode različite brzine, od 20° do 100° C po minuti (DEVIREDDY i sur., 2002.a; 2002.b). Optimalna stopa DS/odmrzavnja značajno će ovisiti o vrsti krioprotektora i vrsti otopine u kojoj se nalazi sperma (LEIBO, 2006.). Postoje i alternativni načini DS sperme za koje se pretpostavlja da bi mogle zamijeniti dosadašnju tradicionalnu metodu DS u tekućem dušiku na -196°C. Te metode su UFT (engl. *Unique freezing technique*) i MTG (engl. *Multi Thermal* Gradient) (SOUSA, 2014.). Dva najčešća protokola korištena pri odmrzavanju sjemena su pri 37°C na 30 sekundi i pri 75°C na 7 sekundi s dodatnim kratkotrajnim uranjanjem pajete u vodenu kupelj na 37°C (BRADFORD i BUHR, 2002.).

Kako bi postupak DS/odmrzavanja protekao što uspješnije moraju biti zadovoljeni određeni uvjeti. Spermiji moraju biti zamrznuti na način da unutar stanice ostane minimalna količina vode ili da je ona u potpunosti uklonjena kako se ne bi zamrznula unutar stanice, dok u procesu odmrzavanja voda koja je ostala odmrznuta unutar stanice treba ostati odmrznuta do kraja procesa. To se postiže upotrebom krioprotektora, koji ne smiju biti prisutni u toksičnim koncentracijama (CHAVEIRO, 2005.).

Spermiji su tijekom smrzavanja izloženi ekstremnim varijacijama temperature i osmolarnosti. Najopasniji period za spermije tijekom DS je od točke smrzavanja do -60° C, koji će morati proći dva puta, tijekom DS i odmrzavanja (MAZUR, 1963.).

Sjeme se može pohraniti na -196°C kroz duže vremensko razdoblje, iako maksimalno

vrijeme pohrane bez narušavanja kvalitete sjemena nije ustanovljeno. Brzina hlađenja znatno utječe na preživljavanje spermija tijekom DS (MAZUR i sur., 1972.). Ukoliko je stopa hlađenja prespora, nastupa dehidracija stanice koja će se manifestirati skupljanjem stanice i njenom potpunom dezintegracijom, a također može doći do oštećenja zbog prezasićenosti izvanstanične tekućine. Stopa hlađenja ne smije biti ni prebrza kako bi se omogućio pravovremen izlazak vode iz stanice i spriječilo njeno unutarstanično zamrzavanje (SOUSA, 2014.) i osmotski šok (MORRIS i sur., 2007.). Za razliku od hlađenja koje mora biti postepeno, odmrzavanja treba biti brzo kako bi se izbjegla oštećenja spermija od izvanstaničnih kristala leda (MAZUR, 1984.).

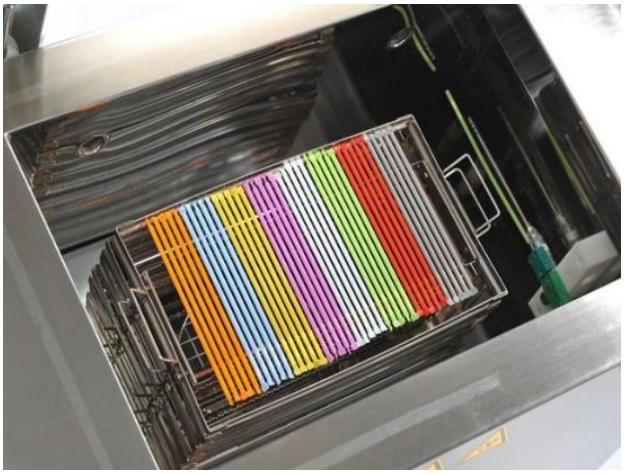
Određene tvari unutar stanične membrane spermija pastuha određivati će njegovu sposobnost za DS. Tu prvenstveno mislimo na lipide tj. razmještaj polinezasićenih masnih kiselina (PUFA) unutar stanične membrane. Bikova sprema puno bolje podnosi DS jer u staničnoj stijeci sadržava visoku razinu dokosaheksaenoične kiseline, a pastuh i nerast čija sprema slabo podnosi proces DS sadži visoku razinu Dokozapentaenoinska kiselina kiseline (PARKS i LYNCH, 1992.; MACIAS i sur., 2011.). Fluidnost membrane zbog različite količine kolesterola varira među pastusima i smatra se jednim od uzroka izrazite individaulane razlike među ejakulatima pastuha u preživljavanju DS/odmrzavanja spermija (SOUSA, 2014.).

Spermiji su izuzetno osjetljivi na oksidativni stres zbog nedostatka citoplazmatskih enzima za obnovu od oštećenja. Visok sadržaj PUFA u staničnoj membrani uzrok je što su spermiji pastuha izuzteno podložni oštećenjima uzrokovanim slobodnim kisikovim spojevima, što na kraju završava lipidnom peroksidacijom (LPO).

Prisutnost i stvaranje slobodnih kisikovih radikala (ROS) povećano je ukoliko imamo veću količinu oštećenih i nefunkcionalnih spermija u ejakulatu, a krajnji rezultat će biti mitohondrijska oštećenja i smanjena pokretljivost spermija. Populacija spermija koja će biti okidač za stvaranje ROS-a su morfološki abnormalni spermiji, spermiji oštećeni krioprezervacijom i spremiji s proksimalnim citoplazmatskim kapljicama (BALL i sur., 2001.). Spermiji pastuha u najvećem obimu stvaraju anion superoksid ($O2^-$) koji se ubrzo raspada i tvori vodikov peroksid (H_2O_2) koji pokazuje najveći citoksični učinak na spermije (BALL i sur., 2001.). Kako bi spriječili nastanak oksidativnog stresa razrjeđivačima se dodaju antioksidansi. To su vitamin E odnosno α-tokoferol i vitamin C odnosno askorbinska kiselina. Prema AÜGERO i sur. (1995.) dodatak vitamina E u sjeme prije hlađenja na 5ºC očuvalo je cjelovitost stanične membrane i progresivnu

pokretljivost spermija. BAUMER i sur. (2005.) dokazali su da dodatak vitamina E i vitamina C u razrjeđivač za DS nije poboljšao kvalitetu sjemena nakon odmrzavanja. Ipak, smatra se da su vitamini E i C primarna komponenta antioksidativnog sustava spermija i da sudjeluju u osnovnoj zaštiti stanične membrane protiv ROS-a i LPO-e (AURICH i sur., 1997.; CONTRI i sur., 2011.). Na slikama 4 i 5 prikazan je spremnik za DS sjemena.

Slika 4: Spremnik za dukoko smrzavanje sjemena
(https://www.imv-technologies.com/product/mini-digitcool?from=252)



Slika 5: Unutrašnjost spremnika za duboko smrzavanje sjemena
(https://www.imv-technologies.com/product/micro-digitcool?from=252)

2.8.2. Svojstva sjemena za krioprezervaciju

Postoje velike individualne varijacije među pastusima u preživljavanju spermija nakon DS. Procjenjuje se da sjeme 20 – 30 % pastuha ne podnosi proces DS (TISCHER, 1979.; AMAN i PICKETT, 1987.; AURICH i sur., 2020.). Zato je nužno, prije nego se odlučimo za pojedinog pastuha, prilagođavati protokole DS sjemena i provjeravati njihov

uspjeh nakon svake faze u postupku. Time ćemo procijeniti je li pastuh prikladan za postupak DS sjemena ili će se koristiti samo u prirodnom pripustu.

Prije nego što uopće pristupimo manipulaciji s ejakulatom i postupcima kojima ga pripremamo za željene postupke u asistiranoj reprodukciji, moramo znati da postoje velike varijacije u osobitostima i kvaliteti sjemena među pasminama i tipovima konja. Kao primjer možemo istaknuti šetlandske ponije koji u ejakulatu imaju manji broj spermija u odnosu na druge pasmine, te tegleće konje koji imaju manju količinu sjemene plazme u odnosu na toplokrvnjake (GREISER i sur., 2020.). Način na koji će sjeme podnijeti DS/odmrzavanje nasljedna je karakteristika koja može biti određena pasminski ili individualno (DARIN-BENNET i WHITE, 1977.; LOOMIS i GRAHAM, 2008.). Prema istraživanju AMAN i PICKETT (1987.), 38 % pastuha imalo je pokretljivost sjemena nakon DS/odmrzavanja 80-100 % inicijalne pokretljivosti, dok je ostatak pastuha imao pokretljivost < 65 % inicijalnih vrijednosti. Još davne 1979. godine TISCHER je podijelio pastuhe u one koji izvrsno podnose DS, s progresivnom pokretljivošću nakon DS > 40 %, one koji dobro podnose DS s pokretljivošću 20-40 % i one koje ne podnose DS s progresivnom pokretljivošću nakon postupka <20 %. AURICH i sur. (2020) proučavali su uspješnost krioprezervacije sjemena 134 pastuha 5 različitih pasmina. Utvrđeno je da sjeme arapskih pastuha najbolje podnosi proces DS/odmrzavanja, potom slijede toplokrvnjaci, američki quarter konji i lipicaneri, a najlošije su rezultate pokazali islandski konji. Prema istom istraživanju, dob pastuha predstavlja važan parametar pri izboru pastuha, gdje je utvrđeno da najviše ejakulata koji nisu prihvatljivi za uporabu proizvode pastusi stariji od 9 godina. Ejakulati pastuha čija se dob kretala između 2 i 9 godina pokazali su najbolje karakteristike poslije odmrzavanja, a to se prvenstveno odnosilo na PMOT i MOT spermija te očuvanost integriteta njihove stanične membrane. Najvažnija varijabla koja određuje prikladnost sjemena za DS je PMOT prije smrzavanja. Toplokrvni pastusi se smatraju prikladnim donorima ako njihovi ejakulati imaju minimalno 200 x 10^6/mL spermija sa 50 % PMOT i barem 70 % morfološki normalnih spermija (SIEME, 2009.).

Utjecaj sezone na kvalitetu sjemena je minimalan u usporedbi s individualnom dispozicijom pojedinog pastuha na DS njegovog sjemena. Prema istraživanju AURICH (2016.) najbolji period za DS sjemena je jesen tj, interval između rujna i studenog, umjesto dosadašnje prakse u kojoj su to bili kasna zima ili rano proljeće. Ustanovljeno je da sjeme DS u jesenskom razdoblju nakon odmrzavanja pokazuje najbolju PMOT. Za pasmine koje lošije podnose DS poput quater američkog konja ili islandskog konja,

najbolji rezultati postignuti su u ljeto (AURICH i sur., 2020.). Isti autori zaključuju da se sjeme većine pastuha može uspješno DS i izvan rasplodne sezone.

2.8.3.Tehnike UO kobila DS sjemenom pastuha

Kobilu ćemo za postupak osjemenjivanja DS sjemenom pripremiti na klasičan način kao za bilo koji drugi način UO. Najpoželjnije je kobilu smjestiti u stojnicu no, ako to nije moguće, treba je smjestiti u boks. Područje oko vulve i anusa mora biti temeljito očišćeno, a rep podignut i omotan. Prilikom uvođenja katetera u vaginu vrh treba zaštiti u zatvorenoj šaci, jer u tom je trenutku najveća mogućnost njegova onečišćenja (GRIZELJ i sur., 2008.). Sva oprema i zaštita koju ćemo upotrijebiti mora biti sterilna, posebice kateter koji ćemo uvesti duboko u ženski spolni sustav. Na ruke treba navući jednokratne rukavice i cijelo vrijeme paziti na kontaminaciju. Svakako na rukavicu kojom ćemo uvoditi kateter treba nanijeti lubrikant bez spermicidnog djelovanja.

Jedna od prihvaćenih metoda za UO s DS sjemenom pastuha je duboko intrauterino osjemenjivanje u ipsilateralni rog maternice (eng. *"deep intrauterine insemination")*. Na taj način polažemo sjeme duboko u rog maternice na onoj strani gdje je na jajniku ultrazvučnom pretragom ustanovljen preovulatorni folikul. Poželjno je kateter držati na toplome u inkubatoru kako bi u trenutku uporabe bio što prilagodljiviji pri prolasku kroz rodnicu, cerviks i maternicu (SCHMIDT, 2011.). Zagrijan kateter treba zavrnuti u krug kako bi pri ulasku u cerviks imao izraženu zakrivljenost od 45°. Jednom kad kateter usmjerimo i on uđe u cerviks, ruku vadimo iz rodnice, a možemo je postaviti u rektum i tako kontrolirati smjer kretanja katetera. Rukom koja je postavljena transrektalno ćemo voditi kateter kroz tijelo maternice i usmjeriti ga u odgovarajući rog (SCHMIDT, 2011.). Mogu se koristiti duži kateteri (75 cm) koji su pogodni za ohlađenu i DS spermu pastuha. U kombinaciji s metalnim mandrenom omogućuju osjemenjivanje kobila DS sjemenom pastuha pohranjenim u pajetama od 0,5 mL. Ukoliko se doza DS sjemena sastoji od više pajeta (najčešće 4 do 8), plastični kateter ostaje u maternici, a metalnim mandrenom se apliciraju dodatne pajete do iskorištenja pune doze DS/odmrznutog sjemena (SAMPER i PLOUGH, 2010.).

Cijena pojedinih doza visokovrijednih pastuha izrazito je visoka pa je u interesu postići gravidnost sa što manjom količinom sjemena iz financijskih razloga. Ako su pastusi u treningu i natjecateljskoj sezoni, ejakulat koji proizvode bit će siromašniji spermijima zbog stresa i napora koji prolaze (SCHMIDT, 2011.).

Prema AURICH i sur. (2020.) te prema Svjetskoj federaciji uzgajivača sportskih konja (ANONIMUS, 2020.), DS/odmrznuto sjeme je prikladno za osjemenjivanje kada je progresivna pokretljivost ≥35 %, odnosno jedna doza za UO sadrži minimalno 250 x 10^6 progresivno pokretljivih spermija nakon otapanja.

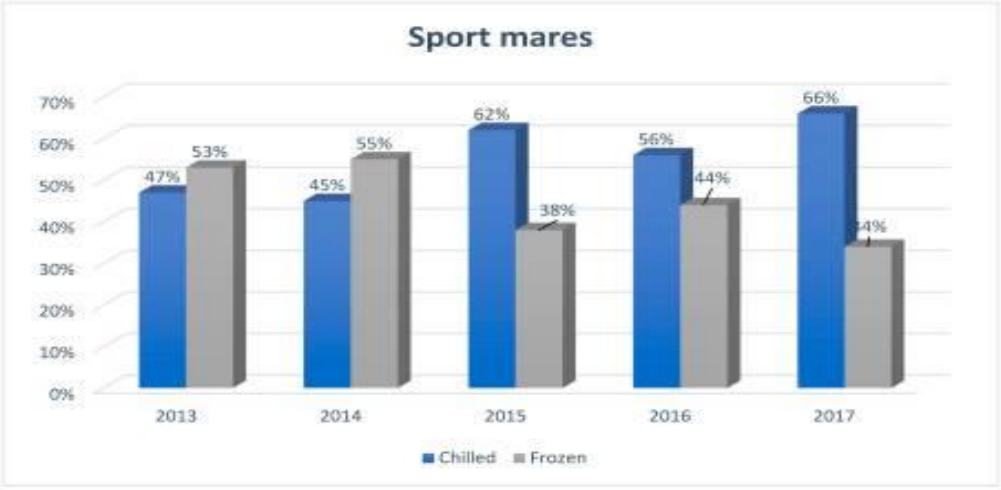
Među metodama odabira još je i endoskopsko osjemenjivanje za male doze DS sjemena pastuha (eng. *"low dose insemination")*. Da bi bolje vizualizirali gdje se nalazi kateter i anatomske strukture ženskog spolnog sustava u cerviks uvodimo endoskop zaštićen jednokratnom rukavicom koju izvlačimo u trenutku njegovog ulaska u cervikalni kanal. Endoskopom pronalazimo spoj maternično roga i jajovoda i tu ispuštamo sjeme. Ovakvom metodom postignuta je vrlo dobra koncepcija (50 %) kod kobila osjemenjenih vrlo niskom dozom od 5 x 10^6 DS/odmrznutog sjemena (LINDSEY i sur. 2002.). Zbog opreme koju zahtijeva, ova metoda nije prikladna za izvođenje u terenskim uvjetima.

U istraživanju iz 2004. godine uspoređena je uspješnost DS/odmrznutim sjemenom reproduktivno zdravih kobila u odnosu na kobile koje su imale reproduktivne probleme i anamnestički slabije rezultate koncenpcije. Rezultati su pokazali da sama tehnika osjemenjivanja, količina spermija u dozi ili njihov volumen nema utjecaja na ishod procesa. U ovome slučaju najvažnija varijabla bilo je reproduktivno zdravlje koje je utjecalo na plodnost kobile (SIEME i sur., 2004.). U drugome istraživanju koje je proveo Kazim Güvenc 2004. godine navodi se da nije utvrđena razlika u koncepciji između kobila sa određenim patologijama na maternici i zdravih kobila koje nakon UO s DS/odmrznutim sjemenom pastuha (GÜVENC i sur., 2004.).

Duboko smrznuto sjeme može se također koristiti za oplodnju *in vitro* jajnih stanica kobila, točnije za intracitoplazmatsku injekciju spermija, koja je relativno nova metoda nastala 1990. godine (PALMER i sur, 1991.). Koristi se u slučaju kad je značajno smanjena plodnost pastuha, tj, kada imamo ograničen broj zdravih i morfološki ispravnih spermija. Takve situacije imamo i kod pastuha koji su uginuli ili su kastrirani, a želimo iskoristiti njihov rasplodni materijal. Pojedinu zamrznutu pajetu možemo podijeliti na više dijelova i koristiti ih u više navrata (GONZALEZ-CASTRO i sur., 2019.). Za proces intracitoplazmatske injekcije spermija potrebno je ekstrahirati jajne stanice iz kobile. Možemo ih dobiti transvaginalnom ultrazvučnom aspiracijom (engl. *Tranvaginal Ultrasound Guided Aspiration*, TUGA) jajnih stanica ili iz klaoničkog materijala. Spermij se mikromanipulatorom ubrizgava izravno u citoplazmu jajne stanice zbog njene debele *zone pellucide* (ALLEN, 2005.).

2.8.4. Čimbenici koji utječu na komercijalnu uporabu DS sjemena pastuha

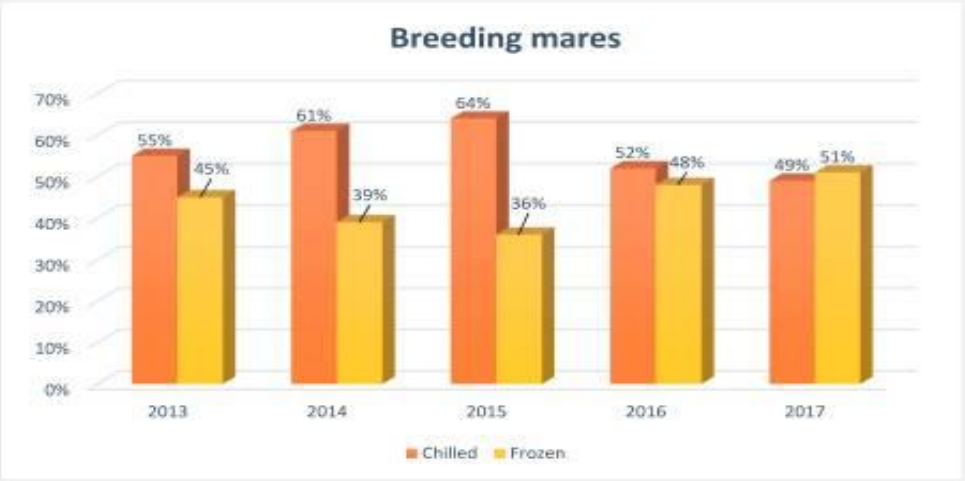
Istraživanjem provedenim u pastuharnama u Francuskoj, Njemačkoj i Poljskoj u razdoblju od 2013. do 2017. ustanovljeno je da se ohlađeno sjeme više koristi za UO kobila koje su u sportu, dok je kod kobila koje se koriste isključivo u uzgoju zastupljenija uporaba DS sjemena. Ako govorimo o kobilama koje nisu strogo kategorizirane u svojoj uporabi, također prevladava UO ohlađenim sjemenom (KOWALCZYK i sur., 2019.). Na slici 6 prikazan je omjer postotaka UO sportskih kobila ohlađenim i DS sjemenom pastuha tijekom istraživanog razdoblja.



Slika 6: Omjer postotka UO sa ohlađenim i DS sjemenom kod sportskih kobila u Europi u periodu između 2013. i 2017.godine (KOWALCZYK i sur., 2019.)

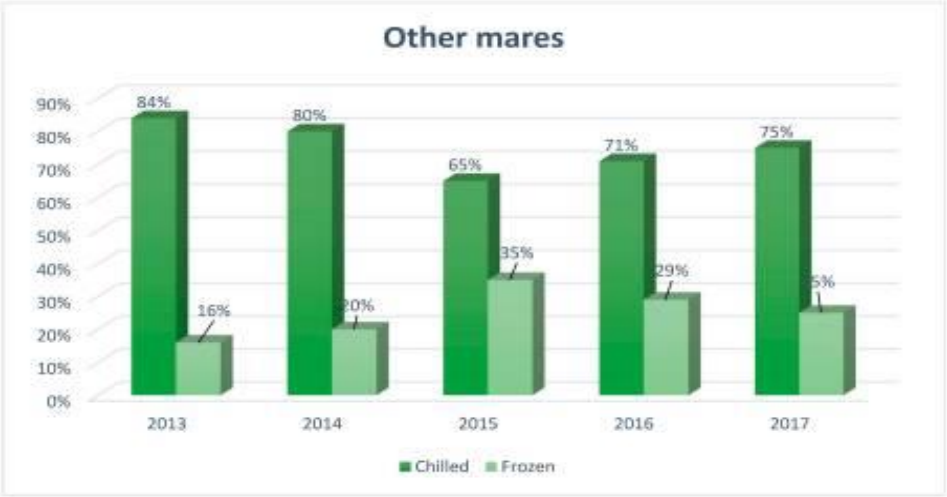
Na slici 6 razvidno je da je većina sportskih kobila tijekom 2013. i 2014. godine osjemenjena DS sjemenom, a 2015. je popularnost korištenja ohlađenog sjemena kod sportskih kobila počela dinamično rasti (za oko 15 % u usporedbi s prethodnim godinama) te je 2017. godine čak 66 % sportskih kobila osjemenjeno ohlađenim, a 44 % DS sjemenom pastuha.

Na slici 7 prikazana je učestalost korištenja ohlađenog i DS sjemena pastuha za UO rasplodnih kobila, tijekom istraživanog razdoblja međutim, od 2016. godine bilježi se značajan porast učestalosti korištenja DS sperme, koja je dosegla sličnu razinu kao i uporaba ohlađene sperme.



Slika 8: Omjer postotka UO sa ohlađenim i DS sjemenom kod rasplodnih kobila u Europi u periodu između 2013. i 2017.godne (KOWALCZYK i sur., 2019.)

Za razliku od sportskih kobila, kod rasplodnih je kobila u razdoblju od 2013. do 2015. korištenje ohlađenog sjemena u umjetnom osjemenjivanju značajno prevladavalo nad smrznutim, sa 55 % (2013.), 61 % (2014.) i 64 % (2015.). Međutim, od 2016. godine bilježi se značajan porast učestalosti korištenja DS sperme, koja je dosegla sličnu razinu kao i uporaba ohlađene sperme (KOWALCZYK i sur., 2019.). U grupi kobila koje nisu kategorizirane niti kao sportske, niti isključivo rasplodne, korištenje DS sjemena čini mali postotak, što je u prosjeku oko 25 % od svih kobila u ovoj skupini, kao što je prikazano na slici 8.



Slika 8: Omjer postotka UO sa ohlađenim i DS sjemenom kod kobila bez određene kategorije u Europi u period između 2013. i 2017.godine (KOWALCZYK i sur., 2019.)

Autori su zaključili da na popularnost vrste sjemena koje se koristi za UO kobila (ohlađeno ili DS sjeme pastuha) utječe prvenstveno učinkovitost postupka

osjemenjivanja, odnosno koncepcija kobila. KOWALCZYK i sur. (2019.) ukazali su na činjenicu da nedovoljna kvaliteta sperme, bilo da je ohlađena ili smrznuta, izravno utječe na popularnost njegove upotrebe, budući da smanjuje profit uzgajivača (ne samo za vlasnike kobila, već i za vlasnike pastuha i proizvođače sjemena).

Prema VIDAMENT i sur. (1997.) veći broj doza sjemena koje su dostupne za pojedinu kobilu u ciklusu može znatno utjecati na njenu koncepciju. Naglašava da će gravidnost biti ostvarena prije, ukoliko je UO izvršeno dvokratno umjesto jednokratno. Istraživanje provedeno 1999. i 2000. godine uspoređuje rezultate osjemenjivanja ohlađenim i DS/odmrznutim sjemenom i pokazuje značajno povećanje interesa za UO DS/odmrznutim sjemenom među uzgajivačima američkog quarter konja i *American Paint Horse*. Provedena je usporedba uspješnosti koncepcije u odnosu na osjemenjivanje ohlađenim i DS/odmrznutim sjemenom. Ohlađenim sjemenom od 16 pastuha osjemenjeno je 850 kobila diljem Sjeverne Amerike. U prvom ciklusu sezone, gravidnost je potvrđena kod 59,4 % i 74,7 % kobila. U istome razdoblju osjemenjeno je 876 kobila DS/odmrznutim sjemenom od 106 različitih pastuha, a graviditet je potvrđen kod 51,3 % i 75,6 % kobila. Duboko smrznuto sjeme kao dio istraživanja distribuirano je i izvan Sjeverne Amerike, gdje je postignuta viša stopa gravidnosti. To je opravdano moguće boljim menadžmentom reprodukcije kobila, ali i činjenicom da su neke kobile nakon neuspjelog UO sa DS/odmrznutim sjemenom osjemenjene ohlađenim sjemenom, što je u konačnici rezultiralo većim brojem gravidnih kobila (LOOMIS, 2001.).

VIDAMENT (2005.) je analizirao 20-godišnje rezultate koncepcije kobila osjemenjenih DS sjemenom u Francuskoj te izvijestio o značajnom povećanju pokretljivosti nakon odmrzavanja, učinkovitosti zamrzavanja i koncepcije nakon modifikacije standardnog protokola DS i strategija UO. U starom protokolu DS sjeme se nakon polučivanja razrjeđivalo na temperaturi od 37°C razrjeđivačem koji sadrži žumanjak te se zatim postupno hladilo na 4°C tijekom 4 sata. Centrifugiranje, dodavanje razrjeđivača, koji sadrži glicerol i pakiranje u pajete također su provedeni na 4°C prije brzog smrzavanja na -140°C i skladištenja u tekućem dušiku. U novom protokolu, sjeme se razrjeđuje u razrjeđivaču na bazi mlijeka bez žumanjka na 37°C te zatim hladi na sobnoj temperaturi (22°C) tijekom 10 minuta. Centrifugiranje i dodavanje razrjeđivača s glicerolom se također provodi na sobnoj temperaturi, prije hlađenja na 4°C tijekom 75 minuta. Sjeme se pakira na 4°C, a zatim brzo samrzava na -140°C prije skladištenja. Koristeći ovaj novi protokol, VIDAMENT (2005.) je izvijestio da je 90 % DS ejakulata proizvedenih od 344 pastuha tijekom 2003.-2005. bilo prihvatljivo za komercijalnu

primjenu, s progresivnom pokretljivošću >40 % nakon odmrzavanja te je koncepcija kobila nakon osjemenjivanja iznosila 46 % do 48 % po ciklusu, s tim da su osjemenjivanje s dozom od 400 x 10^6 spermija (8 pajeta u dozi) svakih 24 sati do ovulacije.

U 2006. godini Crowe započinje istraživanje s postavljenom hipotezom kako je uspješnost UO veća pri uporabi ohlađenog sjemena u odnosu na duboko smrznuto. Takvo je mišljenje općenito prevladavalo pa je istraživanje zamišljeno kako bi se potvrdilo ili opovrgnulo. Obuhvaćena je 251 kobila iz sjeverne hemisfere u dvije uzgojne sezone. Umjetno osjemenjivanje ohlađenim sjemenom učinjeno je na 112 kobila, a DS sjemenom na 139 kobila. Sve su kobile podvrgnute indukciji ovulacije aplikacijom deslorelin acetata. Ohlađeno sjeme položeno je u jednoj dozi u tijelo maternice prije ovulacije, a DS u dvije doze, prva prije i druga poslije ovulacije, duboko u rog maternice gdje se nalazi ovulirajući folikul. UZV kontrola koncepcije učinjena je 15 dana nakon osjemenjivanja kobila. Neposredni rezultati pokazali su višu stopu uspješnog UO s DS sjemenom (82 %) u odnosu UO ohlađenim sjemenom (69,6 %). U iznesenom zaključku ustanovljeno je kako se osjemenjivanje DS/odmrznutim sjemenom pokazalo značajno uspješnijim od očekivanog, odnosno učinkovito je kao i ono provedeno ohlađenim sjemenom, a istovremeno pruža značajno veće mogućnosti izbora pastuha čije će sjeme biti uporabljeno (CROWE i sur., 2008.).

U Hrvatskoj su za sada istraživanja takve vrste vrlo rijetka. Kao primjer navodimo vrijedna saznanja objavljena u izvornom znanstvenom radu "Učinkovitost umjetnog osjemenjivanja kobila svježim, ohlađenim i DS sjemenom pastuha" (NERVO i sur., 2013.). Istraživanje kroz tri pripusne sezone uspoređuje umjetno osjemenjivanje izvođeno na sva tri načina, svježim, ohlađenim i DS/odmrznutim sjemenom, a provedeno je u Centru za reprodukciju u stočarstvu Hrvatske d.o.o. u sklopu kojega se nalazila stanica za umjetno osjemnjivanje kobila. Obuhvaćene su sezone od 2009. do 2011. godine. Po potrebi za indukciju estrusa korišten je prostaglandin F2α (Estrumate®, Schering-Plough Ltd.) u funkciji skraćivanja lutealne faze ciklusa i hCG-a (Chorulon®, Intervet-International B.V.) za indukciju ovulacije. Postignuti rezultati pokazali su ostvarenu koncepciju za svježe sjeme (80 %), ohlađeno sjeme (90,9 %) i DS/odmrznuto sjeme (45,5 %). Kad smo prvom ciklusu pridodali drugi, dobili smo ukupnu koncepciju od 90% za svježe sjeme i 100 %-tnu koncepciju za ohlađeno i DS/odmrznuto sjeme. Za provjeru ostvarene koncepcije provodila se obavezna ultrazvučna pretraga na gravidnost 13 do 16 dana poslije UO.

Ukoliko planiramo kobilu osjemeniti DS sjemenom pastuha preporučeno ju je

naručiti prije rasplodne sezone. Duboko smrznuto sjeme biti će upućeno u transport u jednokratnim ili višekratnim kontejnerima. Uobičajena je praksa slanje tri doze koje će biti iskorištene u tri ciklusa osjemenjivanja. Dokumentacija koja prati pošiljku sperme potvrda je o podrijetlu i zdravstvenom statusu pastuha, detaljan spermiogram, te uputa za odmrzavanje i pripremu sperme za osjemenjivanje (PRVANOVIĆ BABIĆ i sur., 2019.). Trgovina sjemenom pastuha unutar Europske unije nije više ograničena na centre za UO, već sjeme mogu slobodno naručiti i koristiti svi veterinari, sve dok je ono prikupljeno u centru koje je odobrila Europska unija. Kada je moguća odgovarajuća logistika i transport unutar 24 sata, prednost za UO ima rashlađeno transportirano sjeme pastuha. Međutim, tamo gdje nije moguće organizirati adekvatan transport ohlađenog sjemena, u većem se obimu koristi se DS sjeme pastuha (AURICH i AURICH, 2006.).

3. RASPRAVA

Temelj za dobivanje sanitarno ispravnog, makroskopski i mikroskopski dobro ocjenjenog ejakulata na prvome je mjestu dobra briga i držanje pastuha. Važno je sjetiti se da svaka životinja ima pravo na svojih pet temeljnih sloboda, a to su sloboda od gladi i žeđi, sloboda od neprikladnog smještaja, sloboda od boli, sloboda izražavanja ponašanja svojstvenog svojoj vrsti i pasmini i sloboda od straha i stresa (PAVIČIĆ i OSTOVIĆ, 2013.). Ovo se napominje zbog vrlo česte neadekvatne manipulacije pastusima koja ne samo da izravno ugrožava njihovu dobrobit, nego posljedično može kompromitirati kvalitetu sjemena. Nadalje, važna je kvalitetna hranidba u svojoj količini i sastavu, da bi pastuh održavao zadovoljavajuću tjelesnu kondiciju (BCS<) između 4 i 6 na ljestvici od 1 do 9 (PRVANOVIĆ BABIĆ i sur., 2019.). Dobro zdravstveno stanje pastuha značajno je kako bi proizveo sjeme koje može oploditi jajnu stanicu kobile, no također zbog prijenosa zaraznih bolesti koje se primarno šire spolnim putem. Stoga su kontrola i nadzor nad prometom sjemena pastuha prijeko potrebni i u sprječavanju širenja spolno prenosivih bolesti, kao što su virusni arteritis konja i kontagiozni metritis kobila (Contagious equine metritis, CEM).

Ministarstvo poljoprivrede 2009. godine donosi "Pravilnik o mjerama kontrole arteritisa konja", a iste se godine "Naredbom o mjerama zaštite životinja od zaraznih i nametničkih bolesti i njihovom financiranju" po prvi puta propisuje kontrola svih pastuha koji se koriste za rasplod kao i svih kobila u slučaju pobačaja (BARBIĆ i sur., 2019.).

Kontagiozni metritis konja spolno je prenosiva zarazna bolest uzrokovana bakterijom Taylorella equigenitalis. Bolest je prvi puta opisana 1977. godine u Velikoj Britaniji i Irskoj, a od tada je dokazana u većini europskih zemalja i u mnogim zemljama drugih kontinenata. Bolest je izrazito kontagiozna, a najčešći izvor infekcije su subklinički inficirane životinje. Prenosi se prvenstveno izravnim spolnim kontaktom, zatim posredno preko kontaminirane sperme i predmeta, no moguć je i prijenos kohabitacijom. Klinički se bolest u kobila očituje akutnim metritisom i posljedičnim preganjanjem nakon pripusta te ranijim ulaskom u estrus. U pastuha su infekcije uvijek subkliničke zbog čega su oni najvažniji prijenosnici bolesti. Iako UO smanjuje mogućnost prijenosa, bolest se može i tako prenijeti. Zbog toga, Ministarstvo poljoprivrede 2016. godine donosi "Program utvrđivanja proširenosti kontagioznog metritisa konja u Republici Hrvatskoj". Kod pastuha se na početku rasplodne sezone preporuča uzeti bris distalne uretre, fossae i divertikuluma uretre, sinusa uretre, površine

penisa i nabora prepucija. Uzima se također i uzorak preejakulatorne tekućine i sjemena (ŠTRITOF i sur., 2017.). Primjenjivanjem preventivnih metoda najbolje ćemo kontrolirati pojedine bolesti. Vakcinacijama za virusne bolesti i mikrobiološkim obriscima za provjeru na bakterijske bolesti značajno ćemo smanjiti mogućnost nastanka infekcija i širenja patogena. Genetske bolesti najčešće su karakteristične za pojedini tip ili pasminu, te ćemo njihovo izvođenje prilagoditi toj varijabli.

Umjetno osjemenjivanje kobila može se učiniti s tri oblika pripremljenog sjemena, a to su svježe, ohlađeno i DS sjeme. Svježe i ohlađeno sjeme ima svoj točan vremenski rok trajanja. Za svježi ejakulat to je tek nekoliko sati po njegovom polučivanju, dok će ohlađeno sjeme biti upotrebljivo maksimalno 48 sati nakon njegovog polučivanja. Razvoj tehnologije koja je omogućila da genetski materijal zamrznemo i stavimo u kategoriju produženog vremenskog razdoblja čuvanja revolucionarni je trenutak iz kojeg će prozaći potpuno nove mogućnosti za uzgoj svih kategorija konja, kako onih za vrhunski sport, tako i onih pasmina koje su ugrožene, te svih ostalih kategorija u kojima koristimo konje i njihove proizvode.

Postupak DS/odmrzavanja sjemena konstantno je podložan promjenama i predmet je istraživanja koja donose nove spoznaje o dinamici hlađenja sjemena, izbjegavanju hladnog šoka na spermije koji vode dezintegraciji njihove membrane, sastavu razrjeđivača i krioprotektora, načinima odvajanja sjemene plazme, pakiranju i skladištenju sjemena. Duboko smrznuto/odmrznuto sjeme, iako omogućuje značajno produženo preživljavanje i pohranu, nije se populariziralo u tolikoj mjeri kao i ostali tipovi osjemenjivanja. SQUIRES (2009.) navodi da je u Sjedinjenim Američkim Državama svježim sjemenom osjemenjeno 50 do 60 % kobila, ohlađenim 30 do 45 %, a DS/odmrznutim sjemenom tek 5 do 10 % kobila. U istome radu autor je prikazao omjere uspješnosti pojedinog tipa osjemenjivanja. Svježe sjeme imalo je 65 do 70 % uspješnosti, ohlađeno sjeme 50 do 60 % , a DS/odmrznuto sjeme najnižu stopu uspješnosti od 40 do 50 %. Tri godine prije objavljivanja ovoga rada CROWE i sur. (2006.) opovrgavaju prijašnja istraživanja koja su UO sa DS sjemenom stavljali uvijek na začelje uspješnosti koncepcije kobila. Dokazana je koncepcija od 82 % u korist DS/odmrznutog sjemena u odnosu na ohlađeno sjeme (69,6 %). Koji je uzrok velike varijabilnosti u koncepciji nakon UO sa DS/odmrznutim sjemenom koje variraju od 40 do 80 %? Odgovor je u individualnoj dispoziciji pastuha na krioprezervaciju njegovog sjemena. Radi se o nasljednoj karakteristici koja je u većini slučajeva individualna, a u manjem obimu i pasminska (LOOMIS i GRAHAM, 2008.). Ostali čimbenici koji će određivati uspješnost

krioprezervacije su dob pastuha s najpoželjnijim razdobljem između 2 i 9 godina starosti (AURICH i sur., 2020.), godišnje doba i pasmina. Jesen se pokazala kao najuspješniji dio sezone za polučivanje i konzerviranje sjemena (AURICH, 2016.). Što se tiče pasminske predispozicije, AURICH i sur. (2020.) su pokazali da arapski punokrvnjak najbolje reagira na postupak DS sjemena. Navedeni čimbenici ocjenjivani su pomoću procjene PMOT spermija kao najvažnijeg parametra u svim istraživanjima. U svijetu se još nije razvio sustav koji će analizirati i selektirati sjeme pastuha s obzirom na sposobnost DS/odmrzavanja, kao što je to praksa u uzgoju goveda (LOOMIS i GRAHAM, 2008.). Prema dosadašnjim istraživanjima samo 20 do 38 % sjemena koje se koristilo u postupku DS /odmrzavanja, dobro je podnijelo postupak (LOOMIS i GRAHAM, 2008.).

Tehnike osjemenjivanja također mogu utjecati na učinkovitost osjemenjivanja DS/odmrznutim sjemenom. Posebno se ističu metode kojima se koristimo ako imamo ograničeni broj spermija kao u slučaju uginuća ili kastracije. Te metode su duboko intrauterino umjetno osjemenjivanje u ipsilateralni rog maternice i intracitoplazmatska injekcija spermija kao oblik oplodnje *in vitro*.

Ono što je najnepopularniji aspekt ove metode UO je njegova cijena koja je uvjetovana osjetljivim postupkom polučivanja i zamrzavanja sperme pastuha u specijaliziranim laboratorijima koji zahtjevaju skupu opremu za ocjenu i obradu ejakulata te viši trošak osjemenjivanja kobila, kao što je to slučaj kod histeroskopskog osjemenjivanja u uterotubalni spoj (LINDSEY i sur., 2002.) i veći angažman visokospecijaliziranih veterinara koji pregledavaju i osjemenjuju kobile DS sjemenom pastuha. Upravo zato potrebno je doći do ustaljene visoke koncepcije pri izvođenju ove metode, kako visoka cijena zahvata ne bi bila uzaludna.

.

4. ZAKLJUČAK

Primjena duboko smrznute/odmrznute sperme pastuha posjeduje brojne prednosti nad ostalim tehnikama umjetnog osjemenjivanja kobila. Te prednosti najbolje se očituju pri transportu i pohrani jer ne postoji geografska i vremenska ograničenost kao s ohlađenim i svježim sjemenom. Nedostatak ove tehnologije je cijena postupka i velike individualne varijacije između pastuha u prikladnosti njihova sjemena za DS. Nužno je oformiti sustav selekcije i registar pastuha u kojem će biti sadržani podaci o sjemenu i njegovim kvalitetama. Na temelju tih podataka odabir tehnike osjemenjivanja DS sjemenom pastuha trebao bi omogućiti zadovoljavajuću stopu koncepcije kobila.

5. LITERATURA

1. ALLEN, W. R. (2005.): The Development and Application of the Modern Reproductive Technologies to Horse Breeding. Reprod. Dom. Anim. 40, 310-329.

2. AMANN, R. P. (1993.): Functional anatomy of the adult male. U: Equine Reproduction. (A.O. McKinnon, J.L. Voss Ur.). Lea & Febiger, Philadelphia, London. 645-658.

3. AMANN, R. P., J. K. GRAHAM (1993.): Spermatozoal function. U: Equine Reproduction. (A.O. McKinnon, J.L. Voss Ur.). Lea & Febiger, Philadelphia, London. 715-740.

4. AMANN, R. P., B. W. PICKETT (1987.): Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. Journal of Equine Veterinary Science. 7(3), 145-173. doi: 10.1016/S0737-0806(87)80025-4.

5. ANONIMUS (2020.) : WBFSH, World Breeding Federation for Sport Horses: Semen Standards. Available online: http://www.wbfsh.org/files/Semen%20standards.pdf (preuzimanje 19. 8. 2022.).

6. AÜGERO, A., M. H. MIRAGAYA, N. G. MORA, M. G. CHAVES, D. M. NEILD, M. T. BECONI (1995.): Effect of vitamin E addition on equine sperm preservation. Comunicaciones Biologicas.13, 343–356.

7. AURICH, C. (2016.): Seasonal Influences on Cooled-Shipped and Frozen-Thawed Stallion Semen. Journal of Equine Veterinary Science. 43, 1-5. doi: 10.1016/j.jevs.2016.04.089

8. AURICH, J., C. AURICH (2006.): Developments in European Horse Breeding and Consequences for Veterinarians in Equine Reproduction. Reprod. Dom. Anim. 41, 275-279. doi: 10.1111/j.1439-0531.2006.00719.x

9. AURICH, J. E., U. SCHÖNHERR, H. HOPPE, C. AURICH (1997.): Effects of antioxidants on motility and membrane integrity of chilled-stored stallion semen. Theriogenology. 48(2), 185–192. doi: 10.1016/s0093-691x(97)84066-6.

10. AURICH, J., J. KUHL, A. TICHY, C. AURICH (2020.): Efficiency of Semen Cryopreservation in Stallions. Animals. 10(6). doi: 10.3390/ani10061033.

11. BALL, B. A., A. T. VO, J. BAUMER (2001.): Generation of reactive oxygen species by equine spermatozoa. Am J Vet Res. 62(4), 508–515. doi: 10.2460/ajvr.2001.62.508.

12. BARBIĆ, LJ., V. STEVANOVIĆ, L. RADMANIĆ, J. MADIĆ (2019.):

Virusni arteritis konja – nadzor i suzbijanje na području RH 2009. - 2019. Zbornik predavanja 6. Savjetovanja uzgajivača konja u Republici Hrvatskoj. 15. ožujak 2019., Kutina; str., 9-15.

13. BAUMER, J., B. A. BALL, J. J. LINFOR (2005.): Assessment of the cryopreservation of equine spermatozoa in the presence of enzyme scavengers and antioxidants. Am J Vet Res. 66(5), 772–779. doi: 10.2460/ajvr.2005.66.772.

14. BERGERON, A., P. MANJUNATH (2006.): New insights towards understanding the mechanisms of sperm protection by egg yolk and milk. Mol Reprod Dev. 73(10), 1338–1344. doi: 10.1002/mrd.20565.

15. BLISS S. B., J. L. VOGE, S. S. HAYDEN, S.R. TEAGUES, S. P. BRINSKO, C. C. LOVE, T. L. BLANCHARD, D. D. VARNER. (2012.): The impact of cushioned centrifugation protocols on semen quality of stallions. Theriogenology 77 (6),1232–9.

16. BOARD, J. A., (1972.): Artificial Insemination in the Human. Mcv Quarterly. 8(1), 13-18.

17. BOWEN, J. M., (1969.): Artificial Insemination in the Horse. Equine veterinary journal. 1(3), 98-110. doi: 10.1111/j.2042-3306.1969.tb03355.x.

18. BRADFORD, L. L., M. M. BUHR (2002.): Function of cryopreserved horse semen is improved by optimized thawing rates. J Equine Vet Sci. 22(12), 546–550. doi: 10.1016/S0737-0806(02)70196-2.

19. BRINSKO, S. P., D. D. VARNER (1993.): Artificial insemination. U: Equine Reproduction. (A.O. McKinnon, J.L. Voss Ur.). Lea & Febiger, Philadelphia, London. 790-797.

20. BUTKOVIĆ, I. (2021.): Učinak radiofrekvencijskog elektromagnetskog zračenja na pokazatelje kakvoće, antioksidacijski status i oštećenje DNK-a in vitro ozračenog sjemena rasplodnih nerasta. Doktorska disertacija. Veterinarski fakultet, Zagreb

21. CERGOLJ, M., M. SAMARDŽIJA (2006.): Veterinarska andrologija. (M. Samardžija Ur.). Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. 15-33, 80-86, 101-111, 129-130.

22. CHAVEIRO, A. (2005.): Bull sperm cryopreservation: fundamental and applied aspects. PhD thesis. Utrecht University.

23. 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.

24. CLEAVER B.D., D.C. SHARP (1993): Treatment with melatonin alters plasma levels of estradiol, progesterone, but not LH during the estrous cycle of pony mares. Biol Reprod, 48 (Suppl 1), 88.

25. COLON, E., F. ZAMAN, M. AXELSON, O. LARSSON, C. CARLSSON-SKWIRUT, K. V. SVECHNIKOV, O. SÖDER (2007.): Insulin-like growth factor-1 is an importnant antiapoptotic factor for rat Leydig cells during postnatal development. Endocrinology 148, 128-139. doi: 10.1210/en.2006-0835.

26. CONTRI, A., I. D. AMICIS, A. MOLINARI, M. FAUSTINI, A. GRAMENZI, D. ROBBE, A. CARLUCCIO (2011.): Effect of dietary antioxidant supplementation on fresh semen quality in stallion. Theriogenology. 75(7), 1319–1326. doi: 10.1016/j.theriogenology.2010.12.003.

27. CROWE, C. A. M., P. J. RAVENHILL, R. J. HEPBURN, C. H. SHEPHERD (2008.): A retrospective study of artificial insemination of 251 mares using chilled and fixed time frozen-thawed semen. Equine Veterinary Journal. 40(6), 572-576. doi: 10.2746/042516408X281199.

28. ČERVENY, C., H. E. KÖNIG, H. -G. LIEBICH (2009.): Muški spolni organi. U: Anatomija domaćih sisavaca. (H.E. Konig, H.-G. Liebich, Ur.). Naklada slap. 417-433.

29. DARIN-BENNETT, A., I. G. WHITE (1977.): Influence of the Cholesterol Content of Mammalian Spermatozoa on Susceptibility to Cold-Shock. Cryobiology. 14(4), 466-470. doi: 10.1016/0011-2240(77)90008-6.

30. DENISON, F. C., A. A. CALDER, R. W. KELLY (1999.): The action of prostaglandin E2 on the human cervix: Stimulation of interleukin 8 and inhibition of secretory leukocyte protease nhibitor. Am. J. Obstet. Gynecol. 180(3), 614-620. doi: 10.1016/s0002-9378(99)70263-2.

31. DEVIREDDY R.V., D.J. SWANDLUND, T. OLIN, W. VINCENTE, M.H.T. TROEDSSON, J.C. BISCHOF, K.P. ROBERTS (2002.a): Cryopreservation of equine sperm: optimal cooling rates in the presence and absence of cryoprotective agents determined using differential scanning calorimetry. Biol. Reprod. 66, 222–31.

32. DEVIREDDY R.V., D.J. SWANLUND, A.S. ALGHAMDI, L.A. DUOOS, M.H.T. TROEDSSON, J.C. BISCHOF, K.P. ROBERTS (2002.b): Measured effect of collection and cooling conditions on the motility and the water transport parameters at subzero temperatures of equine spermatozoa. Reproduction 124, 643–8.

33. ECOT, P., M. VIDAMENT, A. de MORNAC, K. PERIGAULT, F. CLEMENT, E. PALMER (2000.): Freezing of stallion semen: interactions among cooling treatments,

semen extenders and stallions. J Reprod Fertil Suppl 2000. 56, 141–50.

34. 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.19394640.1995.tb01725.x.

35. FOOTE, R. H. (2002.): The history of artificial insemination: Selected notes and notables. Journal of Animal Science. 80(E-suppl_2), 1-10.

36. GARNER, D. L., L. A. JOHNSON (1995.): Viability Assessment of Mammalian Sperm Using SYBR-14 and Propidium Iodide. Biology of Reproduction. 53(2), 276-284.

37. 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/s03784320(99)00093-7.

38. GONZALEZ-CASTRO, R. A., J. M. TRENTIN, E. M. CARNEVALE, J. K. GRAHAM (2019.): Effects of extender, cryoprotectants and thawing protocol on motility of frozen-thawed stallion sperm that were refrozen for intracytoplasmic sperm injection doses. Theriogenology 136, 36-42. doi: 10.1016/j.theriogenology.2019.06.030.

39. GREISER, T., H. SIEME, G. MARTINSSON, O. DISTL (2020.): Breed and stallion effects on frozen-thawed semen in warmblood, light and quarter horses. Theriogenology. 142, 8-14. doi: 10.1016/j.theriogenology.2019.09.033.

40. GRIZELJ, J., A. GRIZELJ, I. GETZ, N. PRVANOVIĆ, S. VINCE, L. TURMALAJ, P. GJINO, M. SAMARDŽIJA, M. BELIĆ, M. LIPAR, T. DOBRANIĆ (2008.): Umjetno osjemenjivanje kobila-ogledan primjer suradnje veterinara i uzgajivača. U: Zbornik radova 2. Hrvatskog simpozija o lipicanskoj pasmini s međunarodnim sudjelovanjm. (M. Čačić, Ur.). Neron d.o.o. Bjelovar. 147-155.

41. GÜVENC, K., T. REILAS, T. KATILA (2004.): Effect of frozen semen on the uterus of mares with pathological uterine changes. Reprod. Nutr. Dev. 44(3), 243-250. doi: 10.1051/rnd:2004028.

42. HAFEZ, E. S. E., (2000.a): Anatomy of male reproduction U: Reproduction in farm animals 7th edition. (B. Hafez, E.S.E. Hafez, Ur.). Lippincott Williams & Wilkins, 3-13.

43. HAFEZ, E. S. E., M. R. JAINUDEEN, Y. ROSNINA (2000.b): Hormones, Growth Factors, and Reproduction U: Reproduction in farm animals 7th edition. (B. Hafez, E.S.E. Hafez, Ur.). Lippincott Williams & Wilkins, 33-55.

44. HEITLAND, A. V., D. J. JASKO, E. L. SQUIRES, J. K. GRAHAM, B. W. PICKETT, C. HAMILTON (1996.): Factors affecting motion characteristics of frozen-thawed stallion spermatozoa. Equine Vet J. 28(1), 47–53. doi: 10.1111/j.2042-3306.1996.tb01589.x

45. HERNANDEZ-AVILES, C., J. ZAMBRANO-VARON, C. JIMENEZ-ESCOBAR (2019.): Current Trends on Stallion Semen Evaluation: What Other Methods can be used to Improve our Capacity for Semen Quality Assessment? Journal of Veterinary Andrology. 4(1), 1-19

46. „IVANOV, ILIYA IVANOVICH." Complete Dictionary of Scientific Biography. Encyclopedia.com. 25 Aug. 2022 <https://www.encyclopedia.com>.

47. 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.

48. JANETT, F., R THUN, K NIEDERER, D BURGER, M HÄSSIG (2003.): Seasonal changes in semen quality and freezability in the Warmblood stallion. Theriogenology 60 (3), 453-461.

49. KARESKOSKI, M. (2011.): Components of fractionated stallion seminal plasma and the effects of seminal plasma on sperm longevity. Academic dissertation. Department of Production Animal Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, University of Helsinki, Finland.

50. KÖNIG, H. E., H. -G. LIEBICH (2009.): Endokrine žlijezde (Glandulae Endocrinae). U: Anatomija domaćih sisavaca. (H.E. Konig, H.-G. Liebich, Ur.). Naklada Slap. 581-591.

51. KOWALCZYK, A., E. CZERNIAWSKA-PIATKOWSKA, M. KUCZAJ (2019.): Factors influencing the Popularity fo Artificial Insemination of Mares in Europe. Animals. 9(7), 460. doi: 10.3390/ani9070460.

52. LINDSEY A. C., L. H. A. MORRIS, W. R. ALLEN, J. L. SCHENK, E. L. SQUIRES, J. E. BRUEMMER (2002.): Hysteroscopic insemination of mares with low numbers of nonsorted or flow sorted spermatozoa. Equine Vet J. 34(2), 128–32.

53. LEIBO, S. P., (2006.): Cryobiology of spermatozoa: principles, species differences and individual variations. 10th International Symposium on Spermatology, Madrid. 48, 17-22.

54. LOOMIS, P. R. (2001.): The equine frozen semen industry. Animal Reproduction Science. 68 (3-4), 191-200. doi: 10.1016/S0378-4320(01)00156-7.

55. LOOMIS, P. R., R. P. AMANN, E. L. SQUIRES, B. W. PICKETT (1984.):

Fertility of unfrozen and frozen stallion spermatozoa extended in EDTA-lactose-egg yolk and packaged in straws. J Anim Sci. 56(3), 687–93. doi: 10.2527/jas1983.563687x.

56. LOOMIS, P. R., J.K. GRAHAM (2008.): Commercial semen freezing: Individual male variation in cryosurvival and the response of stallion sperm to customized freezing protocols. Animal reproduction Science 105, 119-128. doi: 10.1016/j.anireprosci.2007.11.010.

57. MACIAS GARCIA, B. M., L. G. FERNÁNDEZ, C. O. FERRUSOLA, C. SALAZAR-SANDOVAL, A. M. RODRIGUEZ, H. R. MARTINEZ, J.A. TAPIA, D. MORCUENDE, F. J. PEÑA (2011.): Membrane lipids of the stallion spermatozoon in relation to sperm quality and susceptibility to lipid peroxidation. Reprod Domest Anim. 46(1), 141–148. doi: 10.1111/j.1439-0531.2010.01609.x.

58. MAKEK, Z., I. GETZ, N. PRVANOVIĆ, A. TOMAŠKOVIĆ, J. GRIZELJ (2009.): Umjetno osjemenjivanje. U: Rasplođivanje konja. (S. Vince, M. Samardžija, Ur.). Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. 67-72.

59. MARTIN, J. C., E. KLUG, A. R. GUNZEL (1979.): Centrifugation of stallion semen and its storage in large volume straws. J Reprod Fertil. 27(Suppl), 47–51.

60. MAZUR, P., S. P. LEIBO, E. H. CHU (1972.): A two-factor hypothesis of freezing injury Evidence from Chinese hamster tissue-culture cells. Exp Cell Res. 71(2), 345–355. doi: 10.1016/0014-4827(72)90303-5.

61. MAZUR, P., N. RIGOPOULOS (1983.): Contributions of unfrozen fraction and of salt concentration to the survival of slowly frozen human erythrocytes: influence of warming rate. Cryobiology. 20(3), 274–289. 10.1016/0011-2240(83)90016-0.

62. MAZUR, P. (1963.): Kinetics of water loss from cells at subzero temperatures and the likelihood of intracellular freezing. J Gen Physiol. 47(2), 347–369. doi: 10.1085/jgp.47.2.347.

63. MAZUR, P., (1984.): Freezing of living cells: mechanisms and implications. Am J Physiol. 247(3 Pt 1), 124–142. doi: 10.1152/ajpcell.1984.247.3.C125.

64. McGREEVY, P. (2004.): Behaviour of the stallion. U: Equine Behaviour: A Guide for veterinarians and Equine Scientists. (P. Mcgreevy, Ur.). Saunders Elsevier. 245-265.

65. METCALF, E. S. (2007.): The efficient use of equine cryopreserved semen. Theriogenology 68 (3), 423-428.

66. MEYERS, A. S. (2009): Sperm Physiology. U: Equine breeding management and artificial insemination 2nd. Ed. (J. C. Samper, Ur.). Saunders Elsevier. St. Louis,

4753.

67. MORRIS, G. J., K. FASZER, J. E. GREEN, D. DRAPER, B. W. GROUT, F. FONESCA (2007.): Rapidly cooled horse spermatozoa: loss of viability is due to osmotic imbalance during thawing, not intracellular ice formation. Theriogenology. 68(5), 804–812. doi: 10.1016/j.theriogenology.2007.06.009.

68. MURPHY, J., S. ARKINS (2007.): Equine learning behaviour. Behavioural Processes. 76(1), 1–13. doi: 10.1016/j.beproc.2006.06.009.

69. NERVO, V., A. ORAK, M. KAJGANIĆ, N. PRVANOVIĆ BABIĆ, J. GRIZELJ, I. GETZ (2013.): Učinkovitost umjetnog osjemenjivanja kobila svježim, ohlađenim i duboko smrznutim sjemenom pastuha. Veterinarska stanica. 44 (5), 351-358.

70. PALMER E., J. BEZARD, M. MAGISTRINI, G. DUCHAMP (1991.): In *vitro* fertilisation in the horse: A retrospective study. J. Reprod. Fertil. 44 (Suppl.), 375–384

71. PARKS, J.E., D. V. LYNCH (1992.): Lipid composition and thermotropic phase behavior of boar, bull, stallion and rooster sperm membranes. Cryobiology. 29(2), 255–66. doi: 10.1016/0011-2240(92)90024-v.

72. PAVIČIĆ, Ž., M. OSTOVIĆ (2013.): Dobrobit farmskih životnja. Hrvatski veterinarski vjesnik. 21(7-8), 55-59.

73. PESCH, S., M. BERGMANN, H. BOSTEDT (2006.): Determination of some enzymes and macro- and microelements in stallion seminal plasma and their correlations to semen quality. Theriogenology 66, 307–313.

74. PICKETT, B. W. (1993.a): Collection and evaluation of stallion semen for artificial insemination. U: Equine Reproduction. (A.O. McKinnon, J.L. Voss Ur.). Lea & Febiger, Philadelphia, London. 705-714.

75. PICKETT, B. W. (1993.b): Seminal extenders and cooled semen. U: Equine Reproduction. (A.O. McKinnon, J.L. Voss Ur.). Lea & Febiger, Philadelphia, London. 746-754.

76. PICKETT, B. W., R. P. AMANN (1993.): Cryopreservation of semen. U: Equine Reproduction. (A.O. McKinnon, J.L. Voss Ur.). Lea & Febiger, Philadelphia, London. 769-789.

77. POLAKOSKI, K. L., M. KOPTA (1982.): Seminal plasma.In: L. J. D. Zaneveld and R. T. Chatterton (Eds.).Biochemistry of Mammalian Reproduction.New York: J. Wiley, pp. 89-117.

78. PRVANOVIĆ BABIĆ, N. (2014.): Primjena umjetnog osjemenjivanja u

konjogojstvu. U: 1. Savjetovanje uzgajivača konja u Republici Hrvatskoj. (F. Poljak Ur.). Hrvatska poljoprivredna agencija, Križevci. Ured u Zagrebu.

79. PRVANOVIĆ BABIĆ, N., M. LOJKIĆ, T. KARADJOLE, N. MAĆEŠIĆ, G. BAČIĆ, I. GETZ, A. KOSTELIĆ (2019.): Reproduktivno zdravlje rasplodnih pastuha. U: 6. savjetovanje uzgajivača konja u Republici Hrvatskoj. (K. Dugalić, M. Čačić, N. Korabi, I. Rukavina, D. Pašalić, D. Tadić, D. Solić, M. Šklempe, J. Čičak Ur.). Ministarstvo poljoprivrede RH. 22-26.

80. PUKAZHENTHI, B. S., A. JOHNSON, H. D. GUTHRIE, N. SONGSASEN, L. R. PADILLA, B. A. WOLFE, D. E. WILDT (2014). Improved sperm cryosurvival in diluents containing amides versus glycerol in the Przewalski's horse (Equus ferus przewalskii). Cryobiology, 68(2), 205–214.

81. RAMIRES NETO, C., G. A. MONTEIRO, R. F. SOARES, C. PEDRAZZI, J. A. DELL'AQUA JR, F. O. PAPA, M. M. CASTRO-CHAVES, M. A. ALVARENGA (2013.): New seminal plasma removal method for freezing stallion semen. Theriogenology 79, 1120-1123. doi: 10.1016/j.theriogenology.2013.01.014

82. ROSER, J. F. (2008.): Regulation of testicular function in the stallion: An intricate network of endocrine, paracrine and autocrine systems. Animal Reproduction Science. 107, 179-196. doi: 10.1016/j.anireprosci.2008.05.004.

83. 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, 17-31.

84. ROSSDALE, P. D., M. BAILEY (2002): The stallion. U: The horse from Conception to Maturity. (P. Rossdale, M. Bailey, Ur.). J.A. Allen London. 51-80.

85. SAMPER J.S. (2009): Equine Breeding, Management and Artificial insemination, second edi ti on, Saunders Elsevier, 1- 47.

86. SAMPER, J.C., T. PLOUGH (2010.): Techniques for the insemination of low doses of stallion sperm. Reprod. Dom. Anim. 45 (2), 35-39.

87. SANTI, D., G. SPAGGIARI, M. SIMONI (2018.): Sperm DNA fragmentation index as a promising predictive tool for male infertility diagnosis and treatment management - meta-analyses. Reprod Biomed Online.37(3), 315-26.

88. SCHMIDT, A. R. (2011.): How to Breed Mares with Frozen Semen by Deep Horn Insemination. AAEP Proceedings. 57, 48-51.

89. SIEME, H., A. BONK, H. HAMANN, E. KLUG, T. KATILA (2004.): Effects of different artificial insemination techniques and sperm doses on fertility of normal

mares and mares with abnormal reproductive history. Theriogenology. 62(5), 915-928. doi: 10.1016/j.theriogenology.2003.12.011.

90. SIEME, H. (2009.): Semen evaluation. U: Equine Breeding Management and artificial Isemination, Second Edition. (J.C. Samper, Ur.). Saunders Elsevier Inc. 57-74.

91. SIEME, H. (2011.): Freezing semen. U: In Equine Reproduction, 2nd ed. (A.O. McKinnon, E.L. Squires, W.E Vaala, D.D Varner, Ur.). Wiley-Blackwell: Chichester, UK. Vol. 2, 2972–2982.

92. 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.

93. SOUSA, J. (2014.): Studies on Equine Sperm Cryopreservation Fundamental and applied Aspects. Thesis. Universidade Dos Açores, Departamento de Ciências Agrárias.

94. SQUIRES, E.L. (2009.): Changes in Equine Reproduction: Have They Been Good or Bad for the Horse Industry?. Journal of Equine Veterinary Science. 29(5), 268-273. doi: 10.1016/j.jevs.2009.04.184.

95. SQUIRES, E. L., S. L. KEITH, J. K. GRAHAM (2004.): Evaluation of alternative cryoprotectants for preserving stallion spermatozoa. Theriogenology. 62(6), 1056–1065. doi: 10.1016/j.theriogenology.2003.12.024.

96. STEINER, J. V., N. W. UMPHENOUR (2009.): Breeding Management of the Thoroughbred Stallion. U: Equine Breeding Management and artificial Isemination, Second Edition. (J.C. Samper, Ur.). Saunders Elsevier Inc. 75-81.

97. ŠTRITOF, Z.; J. HABUŠ; V. MOJČEC PERKO, M. MAJHUT, N. BRKLJAČA BOTTEGARO, M. PERHARIĆ, S. HAĐINA, Z. MILAS, N. TURK (2017.): Detection of Taylorella equigenitalis and Taylorella asinigenitalis in horses in Croatia as a result of small scale survey. Vet. arhiv, 87 (5), 535-541.

98. TISCHER M. (1979.): Evaluation of deep-frozen semen in stallions. J. Reprod. Fert. Suppl. 27, 53-59.

99. VIDAMENT, M., A. M. DUPERQ, P. JULIENNE, A. EVAIN, P. NOUE, E. PALMER (1997.): Equine Frozen Semen, Freezability and Fertility Field Results. Theriogenology. 48(6), 907-917. doi: 10.1016/S0093-691X(97)00319-1.

100. VIDAMENT, M. (2005.): French field results (1985–2005) on factors affecting fertility of frozen stallion semen. Anim. Reprod. Sci. 89, 115–136.

6. SAŽETAK

Fani Vrhovec

DUBOKO SMRZAVANJE SPERME PASTUHA

Duboko smrzavanje (DS) sperme omogućuje korištenje vrhunskih rasplodnih pastuha na većem broju kobila, kontrolira prenošenje spolno prenosivih bolesti, omogućuje dobivanje potomstva od jedinki koje žive u različitim krajevima svijeta te omogućuje pohranu genetskog materijala kroz duži vremenski period. Kvalitetan ejakulat dobiva se od zdravog pastuha normalno razvijenih spolnih organa i s dobro izraženim spolnim refleksima. Kontrola reproduktivnog zdravlja rasplodnih pastuha temelji se na procjeni općeg zdravstvenog stanja životinje, a usredotočena je na spolni sustav, lokomotorni sustav, preventivne biosigurnosne mjere, otkrivanje spolno prenosivih zaraznih bolesti i potencijalno nasljednih genetskih poremećaja. Svaki ejakulat pastuha podvrgava se sanitarnoj, makroskopskoj i mikroskopskoj ocjeni kako bi ustanovili njegovu kakvoću i prikladnost za DS. Sperma potencijalnog pastuha donora mora proći probni test DS i odmrzavanja kako bi utvrdili stopu preživljavanja spermija s obzirom na velike varijacije u kriotoleranciji spermija između pastuha. Smrzavanje sjemena obuhvaća uklanjanje sjemene plazme, razrjeđivanje spermija razrjeđivačem, punjenje u pajete, smrzavanje i pohranu u tekućem dušiku. Razrjeđivači osiguravaju spermijima hranjive tvari, stabilan pH te štite od temperaturnog i osmotskog šoka. Najčešće korišteni krioprotektor u razrjeđivačima je glicerol koji sprječava stvaranje ledenih kristala unutar spermija. Spermiji pastuha osobito su osjetljivi na temperaturni šok, te postoje velike varijacije između pojedinih pastuha. Stoga se konstantno istražuju novi protokoli i razrjeđivači koji će omogućiti optimalno preživljavanje spermija nakon DS i zadovoljavajuće stope koncepcije. UO s DS sjemenom posebice je zastupljeno kod sportskih konja čiji se natjecateljski kalendar često preklapa s uzgojnom sezonom. Upravo zbog mogućnosti pohrane DS sjemena, omogućeno je polučivanje ejakulata od rasplodnjaka i UO kobila u najpovoljnijem trenutku u odnosu na sezonu natjecanja i početak rasplodne sezone kobila.

Ključne riječi: pastuh, ejakulat, razrjeđivač, krioprezervacija, umjetno osjemenjivanje.

7. SUMMARY

Fani Vrhovec

SEMEN CRYOPRESERVATION IN STALLIONS

Cryopreservation of equine semen provides the use of superior breeding stallions on larger population of mares, controls transfer of sexually transmitted diseases, enables offspring from horses that live in different parts of the world and storage of genetic material for a long period of time. Good quality ejaculate is provided only from healthy stallion with normally developed genitalia and sexual behavior. Breeding soundness examination of donor stallions consists of general physical examination with the focus on the reproductive organs, locomotor system, preventive biosecurity measures, and testing for contagious venereal diseases and potentially hereditary genetic disorders. Each ejaculate undergoes sanitary, macroscopic and microscopic evaluation, with the aim to enhance fertility of frozen semen. Potential semen donor must undergo a freezing / thawing quality test to determine post-thaw sperm survival rates, due to the large variations in sperm cryotolerance between stallions. Semen freezing includes seminal plasma removal, dilution with extenders, straw-filling, freezing and storage in liquid nitrogen. Extenders provide sperm with nutrients, buffer and protect spermatozoa against cold and osmotic shock. The most commonly used cryoprotectant is glycerol, which prevents the ice formation inside spermatozoa. Stallion spermatozoa are particularly sensitive to cold shock, and there are large variations between individual stallions. Scientific research is constantly performed to improve protocols and extenders for cryopreservation of equine semen with aim to improve post-thaw sperm survival with acceptable pregnancy rate. Artificial insemination with frozen semen is especially represented in sport horses because of the constant overlap of the competition calendar and breeding season. Semen cryopreservation give us possibility to collect and freeze the stallion semen and inseminate the mares in most favorable timing, regardless to the breeding season and competition calendar.

Key words: stallion, semen, extender, cryopreservation, artificial insemination.

8. ŽIVOTOPIS

Rođena sam u Zagrebu, 27. svibnja 1989. godine, gdje sam završila osnovnu i srednju školu. Maturirala sam 2007. godine u općoj Gimnaziji Tituša Brezovačkog. Nakon završetka gimnazije upisala sam Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Tijekom pohađanja gimnazije i prvih godina fakulteta bavila sam se konjičkim sportom na zagrebačkom Hipodromu. Uz jahanje imala sam i belgijskog ovčara tipa malinois s kojim sam trenirala i natjecala se u športskoj radnoj kinologiji. Bila sam aktivan član IVSA-e (International veterinary student assosiation) i sudjelovala u organizaciji razmjene studenata. Prilikom trajanja pete godine studija sudjelovala sam u programu istraživanja pojave zaraznih bolesti na galebovima koji obitavaju na zagrebačkom odlagalištu otpada „ Jakuševec “ u sklopu projekta Centra za peradarstvo pri Hrvatskom veterinarskom institutu, u vodstvu dr. sc. Luke Jurinovića dipl. ing. biol. Tijekom posljednje dvije godine studiranja volontiram u veterinarskoj ambulanti “Bela” u Zagrebu.