

# PRIMJENA OHLAĐENE SPERME U UMJETNOM OSJEMENJIVANJU KUJA

---

**Horvatić, Petra**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2016**

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:178:662087>

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

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



*Repository / Repozitorij:*

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



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
VETERINARSKI FAKULTET**

**PETRA HORVATIĆ**

**PRIMJENA OHLAĐENE SPERME U  
UMJETNOM OSJEMENJIVANJU KUJA**

**DIPLOMSKI RAD**

**ZAGREB. 2016.**

**Klinika za porodništvo i reprodukciju Veterinarskog fakulteta  
Sveučilišta u Zagrebu**

Predstojnik Klinike za porodništvo i reprodukciju:

Prof. dr. sc. Marko Samardžija

Mentori:

Doc. dr. sc. Martina Lojkić

Prof. dr. sc. Goran Bačić

Članovi povjerenstva za obranu diplomskog rada:

Doc. dr. sc. Nino Maćešić

Prof. dr. sc. Goran Bačić

Doc. dr. sc. Martina Lojkić

Prof. dr. sc. Tugomir Karadjole (zamjena)

# SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
2. EJAKULAT.....	2
2.1.Morfološke karakteristike ejakulata pasa .....	2
2.1.1. Ejakulacija pasa.....	2
2.2.Spermiji.....	3
2.2.1. Građa spermija.....	3
3. POLUČIVANJE EJAKULATA.....	5
3.1.Polučivanje ejakulata pasa.....	5
4. METODE OCJENJIVANJA EJAKULATA.....	7
4.1.Makroskopska ocjena ejakulata.....	7
4.2.Mikroskopska ocjena ejakulata.....	8
4.3.Napredna ocjena ejakulata.....	10
5. RAZRJEĐIVANJE EJAKULATA.....	11
5.1.Sintetički razrjeđivači.....	12
5.2.Prirodni razrjeđivači.....	13
6. HLAĐENJE, POHRANA I TRANSPORT SJEMENA PASA.....	14
7. SPOLNI CIKLUS KUJA.....	17
7.1.Faze spolnog ciklusa.....	18
7.1.1. Proestrus.....	18
7.1.2. Estrus.....	18
7.1.3. Metestrus.....	19
7.1.4. Anestrus.....	19
7.2.Hormonske promjene tijekom ciklusa.....	19
8. UMJETNO OSJEMENJIVANJE KUJA.....	21
8.1.Određivanje optimalnog vremena za osjemenjivanje kuja.....	22
8.1.1. Ginekološki pregled.....	22
8.1.2. Vaginalna endoskopija.....	23
8.1.3. Ultrazvučni pregled jajnika.....	23
8.1.4. Vaginalno citološki bris.....	23
8.1.5. Laboratorijske metode.....	24

8.2. Metode umjetnog osjemenjivanja kuja.....	25
8.3. Umjetno osjemenjivanje ohlađenom spermom.....	26
8.3.1. Postupak intravaginalnog osjemenjivanja.....	26
9. ZAKLJUČAK.....	28
10. SAŽETAK.....	29
11. SUMMARY.....	30
12. LITERATURA.....	31
13. ŽIVOTOPIS.....	34

## 1. UVOD

Umjetno osjemenjivanje kuja je zahvat kojim se muške spolne stanice, spermiji, polažu u rodnicu ili maternicu ženke, kako bi došlo do oplodnje.

Prvo opisano umjetno osjemenjivanje izveo je talijanski znanstvenik Lazzaro Spallazani 1780. g., pri čemu je u spolni sustav kuje zagrijanom iglom ubacio netom dobiveni ejakulat mužjaka. Kuja je oštenila tri živa šteneta.

U današnje vrijeme interes uzgajivača za umjetnim osjemenjivanjem u cijelom svijetu brzo raste. Tome doprinose činjenice da umjetno osjemenjivanje omogućuje korištenje vrhunskih rasplodnih pasa na većem broju kuja, ali i svijest o sprječavanju prenošenja spolnih bolesti. Umjetno osjemenjivanje najčešće se primjenjuje kada kuja ne prihvaća mužjaka, ako je mužjak neiskusni ili nezainteresiran te kada su partneri međusobno udaljeni.

Za umjetno osjemenjivanje možemo koristiti svježe, ohlađeno ili smrznuto sjeme.

Korištenje ohlađenog sjemena ima velike prednosti zbog jednostavnosti prikupljanja uzorka, pohrane i transporta. Važnu ulogu u popularizaciji korištenja ohlađenog sjemena ima i zadovoljavajući postotak koncepcije intravaginalnim osjemenjivanjem. Upravo zato, umjetno osjemenjivanje ohlađenim sjemenom pasa postaje sve češći način osjemenjivanja kuja.

## **2. EJAKULAT**

Sperma (lat. semen) je složena tekućina koja se pod određenim uvjetima na mahove izbacuje kroz vanjski otvor uretre. Njezini sastojci potječu iz različitih organa muškog genitalnog sustava. Ejakulat se stvara i izlučuje od spolne zrelosti do starosti ejakulacijom ili polucijom (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.).

Ejakulat nastaje pražnjenjem sadržaja testisa, sekreta epididimisa te sekreta prostate. Ejakulat se sastoji od spermija i epitelnih stanica te tekućeg dijela odnosno sjemene plazme.

Sjemena se plazma sastoji od sekreta prostate, epididimisa, sjemenovoda i uretre. Njezina uloga je hranjenje i zaštita sperme te aktivacija i sudjelovanje u transportu spermija (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.). Ejakulacijom se izbacuje sjeme iz penisa u erekciji kao posljedica kontrakcije epididimisa, sjemenovoda, prostate i uretre.

### **2.1. Morfološke karakteristike ejakulata pasa**

Ejakulat psa je vodenastobijele boje, konzistencije mlijeka.

Ejakulat pasa sadrži 96% vode i 4% spermija. Prosječnog je volumena 1-50 ml. U 1 ml ejakulata nalazi se 4 do 400 milijuna spermija. pH ejakulata je 6,0 – 7,0 (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.).

#### **2.1.1. Ejakulacija pasa**

Ejakulacija pasa, kao i nerasta, pastuha i kunića odvija se frakciono s diskontinuitetom različitog trajanja između pojedinih frakcija. To nam omogućuje da prilikom uzimanja ejakulata hvatamo poželjne frakcije.

Psi ejakuliraju tri međusobno odvojene frakcije.

Lučenje prve frakcije započinje vrlo brzo nakon vidnijeg bubrenja *glansa* penisa i traje 30-ak sekundi. Sadrži ustajali urin zaostao u uretri i male količine sjemene tekućine. Volumena je 0,2 do 2 ml i gotovo da ne sadrži spermije. Bezbojna je. Ima ulogu očistiti i dezinficirati urogenitalne putove. Luči se u prvoj fazi erekcije, dok traju kopulatorni pokreti mužjaka.

Druga frakcija izlučuje se nakon kraćeg prekida i traje 60-ak sekundi, ovisno o količini ejakulata. Ova frakcija je vrlo koncentrirana i bogata spermijima i bjelkaste je boje. Volumena je 0,5 do 3,5 ml, ovisno o veličini psa. Događa se nakon prestanka kopulatornih pokreta mužjaka kod potpune erekcije.

Treća frakcija sastoji se od prozirne tekućine podrijetlom iz prostate. Može doseći volumen do 40 ml. Njezino izlučivanje traje od 5 do 30 minuta. Služi za potiskivanje druge, spermom bogate frakcije u ženskom genitalnom traktu i za povećanje ukupnog volumena ejakulata (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.; GÜNZEL-APEL, 1994.; JOHNSTON, 2001.).

## **2.2. Spermiji**

Spermiji su specifične zgusnute stanice koje nemaju mogućnost rasta niti dijeljenja. Specifičnog su oblika. Karakterizira ih mogućnost samostalnog kretanja te sposobnost življenja (i oplodnje) izvan organizma u aerobnim i anaerobnim uvjetima.

Otkriću spermija pogodovalo je otkriće optičkog mikroskopa. Prvi ih je vidio Van Leeuwenhoek 1677. godine. Nakon toga, izučavani su preko 300 godina, a posljednje spoznaje otkrivene su elektronskim mikroskopom (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.).

### **2.2.1. Građa spermija**

Spermiji se sastoje od tri dijela: glave, srednjeg dijela kojeg čine vrat i tijelo te repa.

Glava spermija je asimetrična, ovalna i dorzoventralno spljoštena, što spermiju omogućuje pravocrtno rotirajuće gibanje. U glavi razlikujemo jezgru i citoplazmu. Jezgra (nukleus) ima tanak sloj protoplazme i sadrži kompletan genetski materijal. Sastoji se od kromatina, DNK, RNK, bjelančevina i alkalne fosfataze. Jezgra sadrži haploidan broj kromosoma.

Prednji dio glave pokriva opna koja se naziva akrosoma (nalik je kapi), na kojoj razlikujemo prednji apikalni i stražnji dio. Akrosoma sadrži enzime koji omogućuju razgradnju zone pellucide jajne stanice da bi došlo do oplodnje.



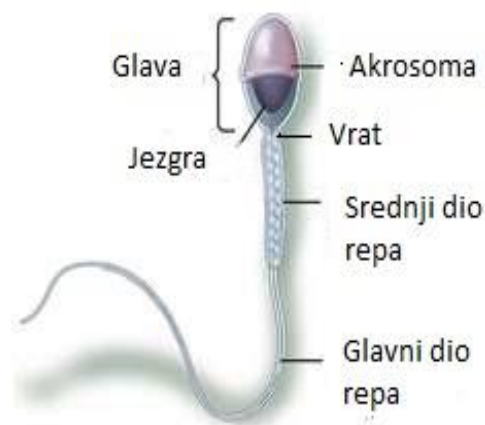
Vrat spermija je kratak, dugačak svega 1  $\mu\text{m}$ . On omogućuje pokretljivost glave spermija. U njemu se nalazi bazalno tjelešće od kojeg prolaze dvije aksoneme, centralna i spiralna koje se pružaju kroz tijelo i rep spermija.

Tijelo spaja glavu s repom, dužine 10-12  $\mu\text{m}$  te sadrži centralnu i spiralnu aksonemu. Tijelo sadrži mitohondrije koji su raspoređeni oko centralne aksoneme, a važni su za proizvodnju energije potrebne za gibanje spermija.

Rep je najduži dio spermija, dužine oko 50  $\mu\text{m}$ , debljine 0,6  $\mu\text{m}$ . Struktura je poput biča, a pokreće spermij brzinom od 4 mm u sekundi. Sadrži centralnu aksonemu koja je u području srednjeg dijela omotana spiralnom mitohondrijskom ovojnicom. Aksonema završava na kraju repa kao kist s 9 do 12 dlačica (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.).

Spermiji su izvana prekriveni i zaštićeni lipoproteinskom ovojnicom koja se sastoji od lipida, bjelančevina i fosfolipida. Dobivaju je prilikom zrenja u epididimisu. Ovojnica spermija ima zaštitnu ulogu, čini ih plodnima i nositeljica je negativnog električnog naboja, pa se spermiji međusobno odbijaju i ne lijepe unatoč velikoj koncentraciji.

Nezreli spermiji imaju protoplazmatsku kapljicu koja se spušta od glave prema repu, a zrenjem se gubi (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.).



Slika 1. Građa spermija (<http://medical-dictionary.thefreedictionary.com/spermatozoa> )

### **3. POLUČIVANJE EJAKULATA**

Glavni cilj polučivanja ejakulata je prikupiti dovoljnu količinu sjemena za osjemenjivanje (AROKIA ROBERT i sur., 2016.).

Uzimanje ejakulata relativno je jednostavan postupak, iako zahtjeva nešto vježbe za savladavanje tehnike. Ejakulat treba uzimati prije kliničkog pregleda ili bilo kojeg stresnog postupka (FRESHMAN, 2002.; JOHNSTON, i sur. 2001.).

Najčešća metoda uzimanja ejakulata u pasa je manualna fiksacija penisa. Sjeme može biti prikupljeno i iz epididimisa neposredno nakon kastracije, postmortalno ili ispiranjem vagine nakon prirodnog parenja (AXNER i LINDE FORSBERG, 2002.).

Polučivanjem ejakulata potrebno je dobiti cjelokupnu količinu ejakulata koji ne smije sadržavati onečišćenja. Postupak ne smije dovesti do oštećenja spermija i mora biti neškodljiv za rasplodnjaka i proces spermatogeneze (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.).

#### **3.1. Polučivanje ejakulata pasa**

Kao stimulaciju prilikom uzimanja najčešće se koristi kuja, po mogućnosti u proestrusu ili estrusu. Preporučljivo je da je kuja iste težine kao i mužjak (SEAGER, 1986.). Ejakulat se može uzeti i bez prisustva kuje u tihom izoliranoj sobi, iako će se uz njezino prisustvo vjerojatno dobiti ejakulat s višom koncentracijom spermija (BLENDIGER, 2007.). Ako mužjak nije voljan dati ejakulat (izostanak erekcije, agresivno ili plaho ponašanje, izostanak ejakulacije, kratka erekcija i slično) stimulacija se može izazvati mirisom ženke u estrusu ili brisovima vaginalnog sekreta uzetih kujama u estrusu (FRESHMAN, 2002.; KUTZLER, 2005.; OLSEN i HULSTED, 1986.). Idealan razmak između uzimanja uzoraka je 4-5 dana, dok bi razmak veći od 10 dana mogao rezultirati povećanjem broja morfoloških abnormalnosti i smanjenjem pokretljivosti spermija (PURSWELL i sur., 1992.; JOHNSTON i sur., 2001.).

Poželjno je da su kuja i mužjak na povodcu. Mužjaku se mora omogućiti pristup stražnjem dijelu tijela kuje. Osoba koja uzima ejakulat, ako je dešnjak, treba prići mužjaku s lijeve strane. Dok pas njuši i liže perinealnu regiju kuje, osoba koja uzima ejakulat nježno masira penis preko prepucija. Kako seksualno uzbuđenje raste, dolazi do erekcije penisa i bulbus glandisa. Tada se prepucij mora povući kaudalno preko bulbusa, prije nego se on poveća. Ukoliko se to ne učini, nabrekli *bulbus glandis* ostaje zaglavljen u prepuciju što je za psa jako bolno. To može prouzročiti kočenje spolnih refleksa i privremenu ili trajnu impotenciju. Čvrstim pritiskom iza bulbusa glandisa osigurava se nastavak erekcije. Ako se koristi umjetna vagina, ona se navuče preko bulbusa glandisa. Prva frakcija izlazi odmah pri rapidnim pokretima zdjelice, a odmah slijedi druga, spermom bogata frakcija. Pri prestanku pokreta zdjelice mužjak podiže stražnju nogu, a penis se rotira za 180 stupnjeva unatrag i usmjerava prema ljevkastom otvoru spermohvatača (FARSTAD, 2010.; LINDE FORSBERG, 2005.). Tada nastupa izlučivanje treće frakcije, sekreta prostate, koja traje nekoliko minuta. Ukoliko se sjeme skuplja za osjemenjivanje, tada se preporuča hvatanje treće frakcije radi volumena koji je neophodan za oplodnju (FELDMAN i NELSON, 1996.). U slučaju osjemenjivanja ohlađenim sjemenom, hvata se samo druga, spermom bogata frakcija (LOJKIĆ i sur., 2012.)

Ne preporuča se korištenje lubrikanta tijekom skupljanja ejakulata jer na taj način može doći do zagađenja ejakulata (ENGLAND i ALLEN, 1991.; FRESHMAN, 2002.).

Treba napomenuti da pas ejakulira gustu frakciju bogatu spermijima nekoliko puta u kraćim ili dužim razmacima te ne smijemo prerano prestati sa stiskom i uzimanjem ejakulata. Kada nakon zadnje ejakulacije prođe više od 2 do 3 minute možemo olabaviti stisak i odmaknuti spermohvatač od glansa penisa. Kuju koja je služila za podražaj mužjaku možemo izvesti iz prostorije. Vlasnika treba zamoliti da lagano šee mužjaka kako ne bi legao i ozlijedio penis i da mu erekcija prestane što prije. Ako erekcija ne prestaje nakon minutu dvije, možemo staviti ruke pod hladnu vodu i par puta uhvatiti psa za penis s hladnim rukama što u pravilu dovodi do brzog prestanka erekcije i povlačenja u prepucij. Nakon toga potrebno je pregledati prepucij da nema zaostalih dlaka u prepuciju i da je penis u pravilnom položaju (BLENDIGER, 2007.; AROKIA ROBERT i sur., 2016.).

## 4. METODE OCJENJIVANJA EJAKULATA

Ocjena ejakulata ima važnu ulogu u ocjenjivanju plodnosti mušjaka i trebala bi se obaviti rutinski prije uzgojnog ispitivanja. Ejakulat se ocjenjuje prije samog postupka umjetnog osjemenjivanja ili pohrane spermija, a treba biti pregledan odmah nakon uzimanja uzorka jer kašnjenje u ocjeni može smanjiti postotak pokretljivih spermija i povećati postotak mrtvih spermija. S uzorkom treba pažljivo rukovati tijekom svih postupaka. Poželjno je opremu i uzorak čuvati na 37°C jer nagla promjena temperature može uzrokovati promjene u motilitetu i strukturi spermija (CHRISTIANSEN, 1984.; FELDMAN i NELSON, 1996.; LINDE-FORSBERG, 1991.).

Ocjenom ejakulata određujemo izgled, volumen, koncentraciju, pokretljivost i postotak morfološki normalnih spermija (BLENDIGER, 2007.). Jednom napravljena ocjena ejakulata nije trajno pouzdana zato što:

- česta parenja ili uzimanje ejakulata mogu dovesti do smanjene kvalitete sjemena;
- prolongiranjem seksualnog odmora psi mogu ejakulirati mnogo mrtvih i nepokretnih spermija abnormalne morfologije;
- uzorak mladih neiskusnih mušjaka može sadržavati samo dio frakcije bogate spermijima (PAYAN-CARREIRA i sur., 2011.).

Različite tehnike za ocjenu kvalitete sjemena podijeljene su u konvencionalne i napredne. Konvencionalne tehnike su makroskopska (volumen i boja) i mikroskopska ocjena sjemena (koncentracija i broj živih stanica u ejakulatu) (PAYAN-CARREIRA i sur., 2011.).

### 4.1. Makroskopska ocjena ejakulata

**Volumen.** Volumen ejakulata može se procijeniti u kalibriranim spermohvatačima koji su korišteni prilikom sakupljanja sjemena. On najviše ovisi o veličini psa, o veličini prostate, učestalosti uzimanja sjemena, dobi životinje, libidu i volumenu treće frakcije (PAYAN-CARREIRA i sur., 2011.). Volumen psećeg ejakulata iznosi od 2,5 do 80 ml, a ovisi o volumenu treće frakcije koja čini oko 90% ukupnog volumena (LINDE-FORSBERG, 1991.; FARSTAD, 2010.).

**Boja.** Boja ejakulata ovisi o koncentraciji spermija po mililitru, volumenu treće frakcije i prisutnosti negerminativnih stanica u ejakulatu. Kod analize boje treba uzeti u obzir metodu uzimanja uzorka jer se boja mijenja s frakcijom koja se analizira. Analiza se može napraviti na ukupnom uzorku ili na svakoj pojedinačnoj frakciji. Fiziološka boja ukupnog ejakulata je sivkastobijela ((PAYAN-CARREIRA i sur., 2011.).

**pH ejakulata.** pH ejakulata određujemo neposredno odmah nakon makroskopske ocjene pomoću indikator papira ili pomoću tekućine univerzalnog indikatora. Fiziološka vrijednost je 6,5 do 7 (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.; OLSEN i HUSTED, 1986.).

#### **4.2. Mikroskopska ocjena ejakulata**

**Pokretljivost.** Jedan od važnijih koraka u ocjeni ejakulata je subjektivna ocjena pokretljivosti spermija pod fazno kontrastnim mikroskopom. Ocjenu pokretljivosti radimo odmah nakon uzimanja ejakulata. Optimalna temperatura za ocjenu pokretljivosti je 37 do 39°C. Na zagrijanu predmetnicu stavi se kap sjemena i prekrije pokrovnicom te pregleda pod mikroskopom. Ako je prikupljena spermom bogata frakcija visoko koncentrirana treba razrijediti sjeme do koncentracije koja omogućuje prikladan pregled spermija. Uzorci se mogu razrijediti sekretom prostate, fosfatnom puferskom soli ili 2,9% otopinom natrijeva citrata. Ejakulat zdravog psa sadrži najmanje 70% progresivno pokretljivih spermija (FELDMAN i NELSON, 1996.; GÜNZEL-APEL, 1994.).

**Koncentracija i ukupan broj spermija.** Koncentraciju spermija određujemo citometrijskom metodom u hemocitometrima (Thoma, Thoma-Neu, Bürker ili Neubauer komore) s razrijeđenim sjemenom u omjeru 1:200. Broj spermija određujemo tako da broj spermija u jednom ili četiri kvadrata (ovisno o komorici) množimo sa 500 000. Broj spermija  $\times 10^6$  izražava koncentracija spermija po mililitru. Ukupan broj spermija u ejakulatu izražava se kao umnožak volumena i koncentracije spermija po mililitru (PAYAN-CARREIRA i sur., 2011.). Koncentracija spermija u ukupnom ejakulatu zdravog psa iznosi  $80 \times 10^6$  spermija po mililitru. Koncentracija spermija samo druge frakcije obično varira od 200 do  $600 \times 10^6$  spermija po mililitru.

Za uspješno osjemenjivanje broj pokretljivih spermija u dozi treba iznositi više od  $150 \times 10^6$  (LINDE-FORSBERG, 1991.).

Od sofisticiranije opreme može se koristiti spektrofotometar, protočni citometar ili analizator sperme pomoću računala (RIJSSELAERE i sur. 2005.).

**Morfologija spermija.** Postotak morfološki normalnih spermija u ejakulatu mora iznositi više od 70% (GÜNZEL-APEL, 1994.). Radi utvrđivanja strukturnih abnormalnosti spermija radi se mikroskopski pregled razmaza nerazrijeđenog ejakulata koristeći fazno kontrastni mikroskop. Morfologija se najčešće ocjenjuje bojanjem spermija bojenjem po Giemsa-Wrightu, eozin-nigrozin i Spermac®.

Bojenje po Giemsa-Wrightu je brza i djelotvorna metoda koja ne boji akrosomalno područje spermija. Eozin-nigrozin je pozadinsko bojilo koje više ocrta sama spermija nego što ga boji. Mrtve spermije oboji ružičasto dok živi ostaju bezbojni, a pozadina se oboji ljubičasto. Spermac® bojilo je diferencijalno bojenje kod kojeg se jezgra oboji crveno, a akrosoma, srednji dio i rep oboje zeleno.

Za određivanje morfologije pod mikroskopom koristi se imerzijsko ulje i objektiv s povećanjem od x100 i x125. Treba pregledati minimalno 200 spermija nakon čega se izračuna postotak normalnih stanica i onih s morfološkim defektom (PAYAN-CARREIRA i sur., 2011.).

**Abnormalnosti spermija** se dijele po mjestu nastanka, pa razlikujemo abnormalnosti:

- glave (premala, prevelika, kruškasta, uska, deformirana),
- implantacije repa (ekscentrična, paraksijalna, retroaksijalna),
- vrata (prelomljen, nema glave, zakržljali spermiji),
- spojnog dijela (tanak, debeo, kratak, spiralno zavijen, deformiran, prelomljen) i
- repa (prebačen u petlju, zavrnuti oko glave, rudimentaran).

Možemo naći i teratomne oblike spermija: višestruke glave, same repove, višestruke repove poput meduze te razvojne stadije spermija (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.).

**“Živi-mrtvi” spermiji:** određivanje njihovog postotka temeljeno je na teoriji da mrtvi spermiji imaju raspadnutu staničnu membranu koja bojena eozin-nigrozin bojom propušta eozin. Postotak eozin pozitivnih stanica predstavlja postotak mrtvih stanica. Normalno sjeme psa smije sadržavati najviše 30% mrtvih stanica (PAYAN-CARREIRA i sur., 2011.).

### **4.3. Napredna ocjena ejakulata**

Unazad nekoliko godina uvedene su nove tehnike za ocjenu psećeg ejakulata, koje omogućuju detaljniju procjenu više karakteristika spermija. Za ocjenu sjemena sve se više koriste tehnike fluorescentnog bojenja spermija, kompjutorska analiza (Computer Assisted Sperm Analysis, CASA) i protočna citometrija. Brojnim tehnikama fluorescentnog bojenja ocjenjuju se karakteristike i funkcije spermija uključujući integritet membrane, kapacitacijski status i akrosomsku reakciju (RIJSSELAERE i sur., 2005.).

## 5. RAZRJEĐIVANJE EJAKULATA

Razrjeđivači su vodene otopine ili emulzije elektrolita, neelektrolita i ostalih aditiva koji poboljšavaju biološke karakteristike spermija (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.). Njihova glavna uloga je povećanje volumena ejakulata i dobivanje što većeg broja doza kojima se može osjemeniti što više kuja. Oni štite membranu spermija od temperaturnog šoka i mehaničkih trauma tijekom transporta, a osiguravaju stabilan pH, izvor energije i inhibiraju rast bakterija. To postižemo dodavanjem pufera, šećera, proteina, antibiotika i krioprotektora (LOJKIĆ i sur., 2012.).

**Puferi.** Puferi se dodaju zbog kontrole pH i/ili osiguravanja osmotskog tlaka i puferskog kapaciteta. Većina današnjih razrjeđivača za hlađenje i smrzavanje sjemena pasa sadrži pufer Tris-hidroksimetil-aminometan (Tris). Testiranjem kod hlađenja i smrzavanja psećeg sjemena dobrim su se pokazali i proteini mlijeka (ROTA, 2001.).

**Šećeri.** Šećeri se u razrjeđivače dodaju zbog izvora energije i pridonose održavanju osmotskog tlaka. Od šećera se najčešće koriste monosaharidi (glukoza i fruktoza) i disaharidi (laktoza). Nedavna istraživanja pokazala su da je dodavanje fruktoze rezultiralo boljim motilitetom kod postupka hlađenja psećeg sjemena (ROTA, 2001.).

**Proteini.** Za sprečavanje temperaturnog šoka dodaje se žumanjak jaja. Aktivni sastojci žumanjka su fosfolipidi i lipoproteini niske gustoće. Većina razrjeđivača sjemena psa sadrži 10-20 % žumanjka. Kao drugi izvor proteina ponekada se koristi obrano mlijeko ili vrhnje (ROTA, 2001.). Nedostatak žumanjka je nemogućnost sterilizacije, pa su razrjeđivači s žumanjkom pogodan medij za rast i razmnožavanje mikroorganizama. Nedispergirane kapljice žumanjka mogu prouzročiti masovnu aglutinaciju spermija i otežati vidljivost kod mikroskopiranja i ocjene kvalitete razrijeđene sperme (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.).

**Antibiotici.** Razrjeđivači moraju sadržavati antibiotike, najčešće penicilin i streptomycin ili sulfonamide da bi spriječili razmnožavanje i kasnije štetno djelovanje mikroorganizama te njihovih toksina na spermije (ROTA, 2001.; CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.).

**Krioprotektori.** Krioprotektori su otopine koje se dodaju sjemenu, a uloga im je zaštita spermija od dehidracije i zaštita staničnih proteina od termalne destrukcije pri zamrzavanju.



Dodatna uloga im je održavanje stabilnog pH. Njihova uloga je ključna kod smrzavanja spermija, dok kod hlađenja ih nije nužno dodati.

Krioprotektore dijelimo na intracelularne (glicerol i DMSO) i na ekstracelularne (šećeri i laktoza) (ROTA, 2001.). Glicerol je najčešće korišten krioprotektor kod smrzavanja sjemena psa, a koristi se u koncentraciji od 2 do 8% (LOJKIĆ i sur., 2012.).

Razrjeđivače dijelimo na sintetičke i prirodne.

### **5.1. Sintetički razrjeđivači**

Sintetički razrjeđivači su oni koje sastavljamo od elektrolita, neelektrolita, antibiotika i žumanjka.

Dijelimo ih na:

1. obične razrjeđivače ili distendere
2. zaštitne razrjeđivače ili protektore
3. implementore ili bioaktivne razrjeđivače i
4. tzv. specijalne razrjeđivače.

Obični razrjeđivači ili distenderi sadrže samo izotoničnu otopinu elektrolita koja osigurava izotoniju i određeni pH. Može im biti dodan i šećer (heksoza). Služe za povećanje volumena ejakulata i povećanje boja doza. Spermiji preživljavaju nekoliko sati, najviše 6-8 sati.

Zaštitni razrjeđivači uz sve spomenute sastojke sadrže i žumanjak. Štite spermije od temperaturnog šoka. Pri temperaturi hladnjaka (4°C), ovisno o vrsti životinje, spermiji u njima mogu živjeti više dana. Moraju sadržavati antibiotike.

Implementore ili bioaktivne razrjeđivače čine protektor i biološki aktivna tvar (hormon, enzim). U spolnim organima ženke poboljšavaju postotak oplodnje jajne stanice.

Tzv. specijalni razrjeđivači se koriste kod specijalnih metoda konzerviranja sperme (duboko smrzavanje, kiselinska i kemijska inaktivacija) (CERGOLJ I SAMARDŽIJA; 2006.).

## **5.2. Prirodni razrjeđivači**

Prirodni razrjeđivači imaju sva svojstva sintetičkih. Takav je razrjeđivač obrano kravlje mlijeko. Ima jednaku depresiju ledišta kao i sperma domaćih životinja, a sadrži i mliječni šećer i niz drugih bioloških tvari koje koriste spermijima u metabolizmu. Mlijeko svojim koloidima štiti lipoproteinsku ovojnicu spermija, povećava sposobnost oplodnje i preživljavanje spermija. Mlijeko sadrži i laktozu koju spermiji koriste kao izvor energije (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.).

Razrjeđivače mogu proizvesti sami veterinari u svojim ambulancama ili ih nabaviti od veterinarskih fakulteta, veterinarskih klinika ili nekoliko komercijalnih proizvođača (RIJSSELAERE i sur., 2011.).

Najčešće korišteni i opisani razrjeđivač je na bazi Tris-fruktoze-citrata (LOJKIĆ i sur., 2012.).

## 6. HLAĐENJE, POHRANA I TRANSPORT SJEMENA PASA

Polučeni ejakulat, odnosno spermiji hlade se na 4-5°C. Njihova oplodna sposobnost zbog usporenog metabolizma ostaje očuvana kroz duži vremenski period. Zbog toga se sjeme čuva na temperaturi 4-5°C (LOJKIĆ i sur., 2012 ).

Za pohranu ohlađenog sjemena uzima se druga, spermom bogata frakcija ejakulata. U slučaju kontaminacije trećom frakcijom ili kod premale koncentracije spermija, preporuča se centrifugiranje uzorka na 720 G kroz 5 minuta (LOJKIĆ i sur., 2012.). Centrifugiranje se preporučuje i kod pronalaska krvi u ejakulatu. Međutim, moguće je pronaći krvne stanice i nakon centrifugiranja zajedno sa sjemenom u sedimentu. Do 10% krvnih stanica nije štetno za pohranu i hlađenje spermija (ROTA, 2001.).

Nakon procjene boje, volumena, koncentracije i pokretljivosti, uzorak se razrjeđuje 1:3 do 1:5, ovisno o koncentraciji i priprema se za hlađenje. Najčešće korišteni razrjeđivač je Tris-fruktoza-citratni uz dodatak žumanjka (LOJKIĆ i sur., 2012.).

Prema brojnim istraživanjima sperma pohranjena na 4°C može preživjeti i do 20 dana, a kuje uspješno koncipirati 7-11 dana nakon polučivanja ejakulata (VERSTEGEN i sur., 2001.). Spermiji zadržavaju optimalnu plodnost 48-96 sati nakon polučivanja ejakulata (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.), pa je tako i plodnost bolja ako se kuja osjemeni unutar 48 sati od uzimanja ejakulata (TSUTSUI i sur., 2003.).

Prilikom hlađenja moramo obratiti pozornost na samu krivulju hlađenja zbog mogućnosti nastajanja temperaturnog šoka. Temperaturnim šokom nazivamo oštećenja spermija koja se događaju kada ih hladimo na temperaturu od 4°C. On se očituje smanjenom pokretljivošću spermija, smanjenom proizvodnjom energije, promjenama na staničnoj membrani spermija i smrću stanice (LOJKIĆ i sur, 2012.).

Postupak hlađenja sperme izvodimo tako da uzorak razrijeđene sperme uronimo u posudu s vodom temperature 37°C i sve zajedno stavimo u hladnjak gdje će se uzorak postepeno hladiti. Za postizanje optimalnih rezultata preporuča se postepeno hlađenje uzorka od 0,2-1°C/min do temperature 4-5°C (RIJSSELAERE i sur., 2011.; CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.)



Slika 2. Uzorak razrijeđene sperme uronjen u posudu s vodom na temperaturu od 37°C (RIJSSELAERE i sur., 2011. )

Nekoliko istraživanja pokazalo je da je moguće uspješno duboko smrznuti ohlađenu spermu nakon 2 do 3 dana pohrane. To omogućuje prikupljanje, hlađenje i transport sjemena psa do najbližeg reproduktivnog centra gdje će biti smrznuto i pohranjeno na -196°C za kasniju upotrebu (RIJSSELAERE i sur., 2011.).

Način transporta ohlađenog ili smrznutog sjemena ovisi o zakonima države u koje se sjeme transportira. Uzorci moraju biti popraćeni uvoznom dozvolom, zdravstvenim certifikatom i, za neke države uvoznice, nalazom nekoliko seroloških testova (npr. *Brucella Canis* i *Leptospira spp.*). Pravila uvoza ohlađenog sjemena mogu se razlikovati od pravila za uvoz smrznutog sjemena. Transport ohlađenog sjemena puno je jeftini i jednostavniji od transporta smrznutog sjemena.

Ohlađeno sjeme možemo transportirati u termos boci, stiropornoj kutiji i u kutiji od neopora. U kutije uz uzorke stavljamo ohlađene ledene uloške (RIJSSELAERE i sur., 2011.). Danas se najčešće koristi kutija od neopora (Minitube™) gdje se u postranične odjeljke stavljaju ohlađeni ulošci, a u središnji dio razrijeđeno sjeme u epruveti. Koristeći ovu kutiju, razrijeđeno sjeme se može izravno sa sobne temperature staviti u kutiju, gdje se zatim sjeme

postepeno hladi tijekom transporta. Temperatura 4-5°C ostaje tijekom 48 sati, unutar kojih sjeme mora doći na željenu destinaciju (LINDE FORSBERG, 2010.).



Slika 3. Transport ohlađenog sjemena u kutiji od neopora (RIJSSELAERE i sur., 2011.)

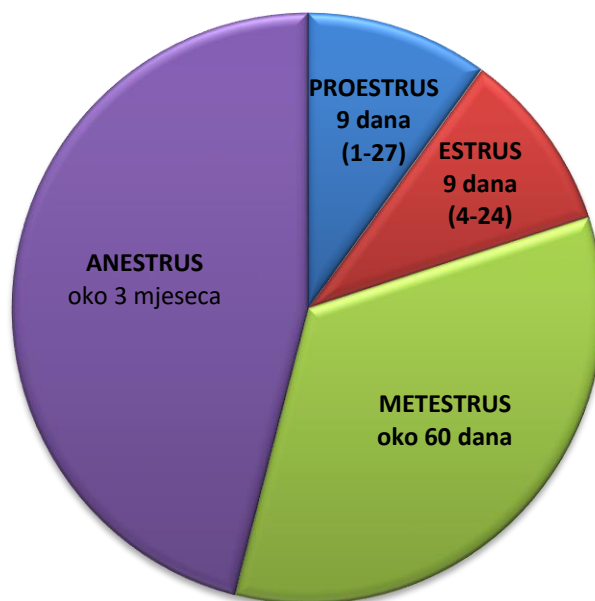
Nakon transporta, sjeme se mora odmah izvaditi iz kutije i uzorak sjemena pregledati kako bi isključili eventualna oštećenja spermija tijekom transporta. Ostatak doze pohranjuje se na 4°C do upotrebe.

## 7. SPOLNI CIKLUS KUJA

Spolna zrelost, odnosno pubertet nastupa ovisno o pasmini u dobi između 6. i 24. mjeseca starosti. Kuje malih pasmina pasa ranije dostižu spolnu zrelost te kod njih prvo tjeranje nastupa već sa 6 do 10 mjeseci starosti. Kuje velikih pasmina spolno sazrijevaju nešto kasnije pa će se kod njih prvo tjeranje javiti tek sa 18 do 20 mjeseci starosti (<http://veterinaronline.blogspot.hr/2011/12/reprodukcija-psi-spolni-ciklus-kuje.html>).

Kuje su monoestrične životinje, što znači da imaju jedan estrus tijekom jedne sezone parenja koji se javlja u bilo koje doba godine.

Faze spolnog ciklusa kuja su: proestrus, estrus, metestrus (disestrus) i anestrus.



Slika 4. Spolni ciklus kuja

## **7.1. Faze spolnog ciklusa**

### **7.1.1. Proestrus**

Proestrus je faza spolnog ciklusa kada postaju vidljivi vanjski znakovi tjeranja kuje. Do toga dolazi zbog povećanja koncentracije estrogena. Prvi znak je otečenje (edem) stidnice, često popraćen sa serosangvinoznim iscjetkom. Proestrus prosječno traje 9 dana. Karakterizira ga proliferacija vaginalnih epitelnih stanica te njihova kornifikacija, tj. orožnjavanje i edem. U ranom proestrusu kada je koncentracija estrogena niska u vaginalnom brisu najviše ima parabazalnih i intermedijalnih stanica. Kako koncentracija estrogena raste prevladavaju kornificirane stanice koje na kraju mogu činiti i do 98% svih stanica epitela. U proestrusu dolazi do sekrecije feromona koji privlače mužjake. Vaginoskopskom pretragom vidljiva je edematozna sluznica koja progresivno prelazi iz ružičaste boje u bijelu i serosangvinozni iscjedak. Pri kraju proestrusa smanjuje se agresivnost kuje prema mužjaku (CONCANNON, 2011.).

### **7.1.2. Estrus**

Estrus je faza spolnog ciklusa kada kuja prihvaća mužjaka i spremna je za koitus. Traje 5-10 (9) dana. Stidnica je edematozna, mekane konzistencije, a vaginalni iscjedak je smanjen. U endokrinološkom smislu estrus obično počinje u vrijeme LH vala, koji traje 24-48 sati. Istovremeno dolazi do smanjivanja koncentracije estrogena i rasta koncentracije progesterona. Vaginalni bris sadrži više od 90% kornificiranih epitelnih stanica, mali broj eritrocita, a neutrofili nisu prisutni. Koncentracija kreće se od 5 do 8 ng/ml, a za vrijeme ovulacije i od 4 do 20 ng/ml u fertilnom periodu (CONCANNON i sur. 1979., EDENS i HEATH, 2003.).

### **7.1.3. Metestrus**

Metestrus je post-estrusno razdoblje lutealne faze, počinje kad estrusno ponašanje prestaje. Traje 56-58 dana od ovulacije. U ovom periodu kuja više ne dozvoljava parenje. Vaginalni obrisak sadrži oko 60% intermedijalnih stanica. Prisutan je veliki broj neutrofila. Metestrus traje dok znakovi lutealne faze ne postanu minimalni. Kraj metestrusa i početak anestrusa različito su definirani. To podrazumijeva obnovu endometrija maternice, smanjenje mliječnih žlijezdi i pad progesterona u serumu na razinu ispod 1 ili 2 ng/ml. Progesteron u serumu raste do 15-80 ng/ml 20 do 35 dana ciklusa. Nakon toga polako pada i dostiže 1 ng/ml 55-90 (70) dana (CONCANNON i sur., 1979.; EDENS i HEATH, 2003.).

#### **7.1.4. Anestrus**

Anestrus uključuje odsutnost očiten dokaza aktivnosti jajnika. Smatra se da mora trajati najmanje 7 tjedana nakon pada razine progesterona ispod 1-2 ng/ml, a prosječno traje 18 do 20 tjedana. Važan je za normalan oporavak endometrija koji završava 120 do 130 dana. Indeks apoptoze i postotak degeneriranih epitelnih stanica u endometriju su visoki tijekom srednje lutealne faze, niski u ranom anestrusu, a odsutni 120 dana. Vaginalna citologija pokazuje mali broj parabazalnih stanica i promjenjiv ali umjeren broj neutrofila. Vaginalna sluznica je tanka, crvena s vidljivim kapilarama. Površina je lagano oštećena zbog čega nije moguće napraviti citološki bris bez lažnih eritrocita u nalazu (OKKENS i KOOISTRA, 2006.; PO-YIN i sur., 2006.).

#### **7.2. Hormonske promjene tijekom ciklusa**

Razmnožavanje je pod kontrolom regulacijskih mehanizama koji postoje između središnjeg živčanog sustava, hipotalamusa, hipofize i reproduktivnih organa. Prijenos informacije između ovih sustava vrše različiti hormoni.

Osjetilni podražaji iz okoliša interpretirani od strane mozga prenose se putem živaca do hipotalamusa. Hipotalamus nadzire niz životnih funkcija kao što su tjelesna temperatura, rad srca, krvni tlak, hranjenje i pijenje te aktivnosti autonomnog živčanog sustava, a preko hipofize upravlja i endokrinim hormonalnim sustavom. Nakon stimulacije luči specifične neurohormone GnRH (gonadotropni otpuštajući hormoni) koji portalnim krvotokom stižu u hipofizu te stimuliraju adenohipofizu na lučenje gonadotropnih hormona.

Hipofiza je endokrina žlijezda koja regulira rad svih ostalih endokrinih žlijezda. Tijekom proestrusa hipotalamus posredstvom GnRH djeluje na prednji režanj hipofize koja luči gonadotropne hormone FSH (folikulostimulirajući hormon) i LH (luteinizirajući hormon).

Ovi hormoni na jajnicima potiču rast i razvoj Graafovih folikula koji luče estrogene. Pod djelovanjem estrogena dolazi do pojave vanjskih znakova tjeranja. Niska razina estrogena potiče povratnom spregom dodatno lučenje FSH koji potiče rast folikula, a time i rast koncentracije estrogena što dovodi do smanjenog lučenja FSH i pokretanja pulzatornog vala LH hormona. Porast koncentracije LH hormona izaziva ovulaciju koja se javlja 1-2 dana



nakon LH vala. Unutar 24-48 sati većina sazrelih folikula puca i oslobađa jajne stanice koje ulaze u jajovod. Folikul koji je puknuo prilikom ovulacije formira žuto tijelo čiji je daljnji razvoj i održavanje pod utjecajem LH i prolaktina. Za razliku od ostalih životinja, kod kuja je određeni stupanj luteinizacije folikula prisutan i prije ovulacije. Žuto tijelo luči progesteron koji priprema i održava graviditet te odgađa pojavu estrusa te pogodovno djeluje na razvoj mliječne žlijezde odnosno na lučenje prolaktina.

(<http://veterinaronline.blogspot.hr/2011/12/reprodukcija-psi-spolni-ciklus-kod-kuje.html>).

Tablica 1. Koncentracija progesterona u serumu kuja

([www.starovef.unizg.hr/org/porodnistvo/studenti/materijali/spolni\\_ciklus\\_kuja\\_macka.pdf](http://www.starovef.unizg.hr/org/porodnistvo/studenti/materijali/spolni_ciklus_kuja_macka.pdf))

Koncentracija progesterona u serumu (ng/ml)	Očekivano vrijeme ovulacije	Najbolje vrijeme za parenje	Očekivano vrijeme Štenjenja
1.0-1.9	+2 dana	+4 (3-6) dana	+63 (62-64) dana
2.0-3.9	+1 dana	+3 (2-5) dana	+63 (62-64) dana
4.0-10.0	0 dana	+2 (1-4) dana	+63 (62-64) dana

## 8. UMJETNO OSJEMENJIVANJE KUJA

Umjetno osjemenjivanje je postupak kojim se manualno uzeta sperma mužjaka na umjetan način unosi u spolne organe kuje nakon čega dolazi do oplodnje bez prirodnog parenja (LOJKIĆ i sur., 2012.; PRVANOVIĆ BABIĆ i sur., 2016.).

Ono se može provoditi svježom, rashlađenom i duboko smrznutom spermom.

Uporabom ohlađenog ili duboko smrznutog sjemena omogućuje se korištenje vrhunskih rasplodnih pasa na većem broju kuja čime se potiče kvalitetna pasminska selekcija i sprečava širenje spolno prenosivih bolesti.

Glavna prednost ove tehnologije je dobivanje potomstva od jedinki koje žive na različitim krajevima svijeta bez troškova i stresa koje izaziva putovanje životinja (LOJKIĆ i sur., 2012.).

Umjetno osjemenjivanje kuja primjenjujemo i kada partner visokovrijednih kuja ne može obaviti koitus, kod mladih i neiskusnih partnera, kod stečenih malformacija na vagini te kada je mužjak agresivan prema kuji (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.; LOJKIĆ i sur., 2012.).

U današnje vrijeme sve češći način za rasplodivanje kuja je pomoću ohlađenog (4 °C) i duboko smrznutog (-196 °C) sjemena pasa.

Prednosti korištenja ohlađenog sjemena osim već navedenog su jednostavnost postupka, niski troškovi opreme i zadovoljavajući postotak koncepcije nakon umjetnog osjemenjivanja.

Za razliku od hlađenja, krioprezervacija sjemena je tehnički zahtjevniji i skuplji postupak s lošijim postotkom koncepcije. Velika prednost krioprezervacije je pohranjivanje sjemena na neodređeno vrijeme što omogućuje dobivanje potomstva i nakon uginuća rasplodnjaka.

Veliku ulogu na postotak koncepcije ima i određivanje optimalnog vremena za osjemenjivanje kuja (LOJKIĆ i sur., 2012.).

## **8.1. Određivanje optimalnog vremena za osjemenjivanja kuja**

Vrlo je važno ciljano i precizno odrediti plodne dane jer je estrus kuja dugotrajan, a period kada je kuja sposobna ostati gravidna kratak. Pošto su kuje multiparne životinje, vrijeme parenja izravno utječe na broj štenadi u leglu. To je od osobitog značaja kod visoko vrijednih pasmina pasa jer izravno utječe na ekonomsku isplativost uzgoja. Zbog svega navedenog, vlasnici kuja često se obraćaju veterinarima kako bi im stručna osoba utvrdila optimalno vrijeme za parenje, odnosno osjemenjivanje.

Danas u praksi koristimo dvije metode za određivanje plodnih dana: laboratorijsku metodu i kliničko praćenje. Pod laboratorijskim metodama podrazumijevamo određivanje razine LH i progesterona u serumu kuje. Kliničko praćenje se sastoji od vanjskog i vaginoskopskog pregleda te uzimanja brisa sluznice rodnice i izrade vaginalno citološkog brisa (PRVANOVIĆ BABIĆ i sur., 2016.). Ove metode trebaju se provoditi svaka 2-3 dana u većine kuja.

### **8.1.1. Ginekološki pregled**

Vanjski znakovi estrusa dobro su vidljivi i dugo traju. Pratimo promjene na spolnim organima i vladanje kuja. Provodimo inspekciju i palpaciju stidnice i perineuma. Za vrijeme proestrusa stidnica se povećava i otvrdne, a pojavljuje se krvavo-serozni iscjedak. Početkom estrusa stidnica postaje mekša, smanjuje se edem i prestaje iscjedak. Kada je kuja spremna za osjemenjivanje prisutni su i spolni refleksi, dizanje repa, širenje stražnjih nogu i podizanje stidnice. Prilikom skoka mužjaka kuja stoji mirno (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.).

### **8.1.2. Vaginalna endoskopija**

Vaginalnom endoskopijom moguće je odrediti plodni period, ali ne i točno vrijeme ovulacije. Ova metoda zahtjeva skupu opremu. Štoviše, ona može dati veliki doprinos u procjeni i otkrivanju anatomskih abnormalnosti vagine koje mogu utjecati na normalnu funkciju reproduktivnog sustava (PAYAN-CARREIRA i sur. 2011.).

Vaginalnom endoskopijom pregledava se površina sluznice rodnice, a postupak se temelji na promatranju nabora, kontura, boje, promjena koje nastaju tijekom prijelaza proestrusa u estrus i prisustvo iscjetka (ENGLAND i CONCANNON, 2002.). Za pregled se koristi rigidni endoskop sa optičkim vlaknima promjera 3 do 4 mm, dužine 30 do 33 cm ili duži. Zahvat se izvodi u stojećem položaju najčešće bez upotrebe sedativa.

Vrh endoskopa na početku uvodimo kranijalno i dorzalno pod kutom od 45 do 60°. Kada se vrhom endoskopa dosegne vagina, uvodi se horizontalno (PAYAN-CARREIRA, 2011.).

U proestrusu vidljivi su vaginalni nabori, a sluznica je otečena, ružičasta i glatka. U vagini je normalno vidljiv i krvavi iscjedak. Lumen vagine je uzak što je vidljivo kada je endoskop položen kranijalno. Krajem proestrusa i početkom estrusa dolazi do pada koncentracije estrogena i povećanja koncentracije progesterona što rezultira kolapsom vaginalnih nabora. Dolazi do dehidracije sluznice, gubitka edema i sluznica poprima naborani izgled. To je najbolje vidljivo između 3 – 7 dana estrusa, kada su nabori potpuno stisnuti, angularnog oblika s oštrim rubovima. Rezultat toga je širi lumen vagine. Za vrijeme diestrusa vaginalni nabori postaju ravni i zaobljeni, a boja sluznice je crvena s mogućim petehijalnim krvarenjima kao posljedicom endoskopije. To potkrepljuje činjenicu da je epitel vagine za vrijeme diestrusa i anestrusa tanak i građen od 2 do 3 sloja stanica. Na površini ponekad je vidljiva neprozirna gusta sluz (PAYAN-CARREIRA, 2011.). Tijekom anestrusa sluznica je relativno ravna, suha i ružičaste boje, veoma tanka, krhka i jako osjetljiva na traumu (LINDSAY i CONCANNON, 1986.).

### **8.1.3. Ultrazvučni pregled jajnika**

Iako je ovo vrlo pouzdana i točna metoda za određivanje ovulacije kod većine domaćih životinja, kod kuja je njena pouzdanost smanjena zbog nakupljanja masnoće u burzi jajnika koja ga obavlja. Nekoliko istraživanja pokazalo je da je teško analizirati slike ultrazvuka u vrijeme ovulacije zbog činjenice da se folikuli jajnika teško razlikuju prije i poslije ovulacijskog razdoblja (ENGLAND i CONCANNON, 2002.).

### **8.1.4. Vaginalno citološki bris**

Jedan od najsigurnijih pokazatelja optimalnog vremena za osjemenjivanje kuja je vaginalno citološki bris (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.). Za vrijeme estrusa vaginalne epitelne stanice pojačano se dijele i mijenjaju svoj oblik od malih okruglih stanica s jasno vidljivom citoplazmom i velikom jezgrom, u velike keratinizirane stanice s malom piknotičnom ili nevidljivom jezgrom. Idealno vrijeme za umjetno osjemenjivanje kuje je kada broj keratiniziranih poligonalnih stanica bez jezgre dosegne 80%. Kako bi metoda bila što pouzdanija, uzimanje brisa i mikroskopski pregled potrebno je ponoviti nekoliko puta u par dana (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.; PAYAN-CARREIRA, 2011.).

### 8.1.5. Laboratorijske metode

Određivanje razine progesterona temelji se na predovulatornoj luteinizaciji folikula, što je popraćeno naglim porastom progesterona u krvi. On je dokaz da je kuja spremna za osjemenjivanje. Periodično uzorkovanje krvi u razmacima od 2-3 dana otkrit će porast progesterona na početnih 2-3 ng/ml, što odgovara oslobođenom LH valu koji će uzrokovati ovulaciju 2 dana kasnije. Na dan ovulacije koncentracija progesterona iznosi 4-10 ng/ml. Mjerenje razine progesterona u krvi ponavlja se svakih 48 sati, počevši od prijelaza kuje iz proestrusa u estrus, što možemo utvrditi vaginalno-citološkim brisom. Određivanje LH u krvi još je pouzdaniji dokaz ovulacije, ali je ova metoda skuplja i kompliciranija u izvedbi.

Laboratorijske metode za određivanje progesterona svode se na brze gotove testove koji se mogu uz minimalnu opremu napraviti u svakoj veterinarskoj ambulanti. Prednost „kućnih“ testova, odnosno ambulantnih semikvantitativnih testova sastoji se u tome što su osobi koja prati kuju dostupni 24 sata dnevno. Njihovi nedostaci su skupoća i nedovoljna preciznost.

Što se tiče klasičnih laboratorijskih testova koje nude različiti humani laboratoriji, oni imaju svoja ograničenja, dostupni su samo ujutro radnim danom i često postoje odstupanja mjernih instrumenata.

Određivanje razine LH u serumu kuja preporuča se samo kod problematičnih kuja. Proizvođači testa za određivanje razine LH u serumu preporučuju provoditi test svaka 24 sata i istodobno uz njega određivati razine progesterona u krvi. Zato se najčešće mjeri samo razina progesterona u krvi (PRVANOVIĆ BABIĆ i sur., 2016.).

Vremensko razdoblje u kojem je moguća oplodnja nazivamo plodni period kuje.

## **8.2. Metode umjetnog osjemenjivanja kuja**

Postoji više metoda umjetnog osjemenjivanja kuja:

1. Intravaginalno osjemenjivanje
2. Transcervikalno osjemenjivanje (TCI)
3. Intrauterino osjemenjivanje laparoskopom
4. Intrauterino osjemenjivanje laparotomijom (LINDE-FORSBERG, 2010.).

Intravaginalni postupak najčešće se primjenjuje kod korištenja svježeg ili ohlađenog sjemena. Izvodi se aplikacijom sjemena u rodnicu kuje uz pomoć katetera i brizgalice (PRVANOVIĆ BABIĆ i sur., 2016.).

Transcervikalno osjemenjivanje primjenjuje se kod korištenja duboko smrznute sperme, a preporuča se i kod slabije kakvoće ohlađenog ejakulata. Ova metoda se radi na dva načina: pomoću skandinavskog katetera ili endoskopski. Osjemenjivanje skandinavskim kateterom je nespretno i komplicirano, a kuju je često potrebno sedirati. Stalno je prisutan rizik od povrede pa čak i perforacije rodnice i maternice. Zato se najčešće bira metoda endoskopom kod kojeg se pod kontrolom kamere sperma unosi izravno u maternicu. Navedena metoda je pouzdana, sigurna i učinkovita, ali zahtjeva dobro uigran tim specijalista, popratni laboratorij i visoku razinu opremljenosti. Stoga se preporuča obavljati samo na specijaliziranim klinikama (PRVANOVIĆ BABIĆ i sur., 2016.).

Kirurška metoda umjetnog osjemenjivanja zahtjeva opću anesteziju koja nosi rizik koji je mnogim vlasnicima neprihvatljiv (PRVANOVIĆ BABIĆ i sur., 2016.). Na primjer, u Nizozemskoj, Norveškoj i Švedskoj primjena ovih metoda nije etički prihvatljiva i ilegalna je, dok se u Velikoj Britaniji primjenjuje ograničeno. Operativni zahvat nosi rizik od infekcija i broj zahvata umjetnog osjemenjivanja je ograničen, pa je laparoskopski zahvat prihvatljivija alternativa (LINDE-FORSBERG, 2010.).

## **8.3. Umjetno osjemenjivanje ohlađenom spermom**

Prilikom osjemenjivanja ohlađenom spermom bitna je dobra koordinacija između veterinara koji određuju optimalno vrijeme za osjemenjivanje i veterinara koji uzima, razrjeđuje i stavlja u promet ejakulat željenog psa. Isto tako, važno je osigurati transport sjemena koje će biti isporučeno na vrijeme (PRVANOVIĆ BABIĆ i sur., 2015.). Kada se

spermiji ohlade na 4-5 °C njihova oplodna sposobnost zbog usporenog metabolizma ostaje očuvana kroz duži vremenski period (LOJKIĆ i sur., 2012.). Ukoliko se sjeme isporuči unutar 24-48 sati od uzimanja, a u tom periodu je i optimalno vrijeme za osjemenjivanje kuje, postotak koncepcije će biti sličan kao kod osjemenjivanja svježim sjemenom (PRVANOVIĆ BABIĆ i sur., 2016.).

Najčešći postupak umjetnog osjemenjivanja ohlađenim sjemenom je intravaginalno osjemenjivanje pomoću katetera i brizgalice (PRVANOVIĆ BABIĆ i sur., 2016.).

### **8.3.1. Postupak intravaginalnog osjemenjivanja**

Prilikom uporabe ohlađenog sjemena rade se dvije inseminacije, prva na dan ovulacije, a druga 48h nakon prve (PAYAN-CARREIRA i sur., 2011.).

Pribor potreban za zahvat je plastična pipeta i plastična brizgalica. Preporuča se da spoj između njih nije čvrst već da se spoje pomoću kratke gumene cjevčice (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.). Prije samog početka potrebno je očistiti perinealno područje, a posebno područje oko stidnice.

Sjeme treba aplicirati 15 minuta nakon što se izvadi iz hladnjaka. Ohlađeno sjeme može se aplicirati na 4°C ili nakon zagrijavanja u kupelji na 37°C (RIJSSELAERE i sur., 2011.).

Prije same aplikacije treba ispitati jesu li spermiji zadržali oplodnu sposobnost prilikom transporta. U tu svrhu koristi se mala kapljica sjemena koja se stavlja na zagrijani stolić mikroskopa (PRVANOVIĆ BABIĆ i sur., 2016.).

Kuja treba biti u stojećem položaju, na stolu za pregled ili na podu, ovisno o veličini kuje.

Prije uvođenja sjemena u brizgalicu prvo se navuče 3 ml zraka koji služi za čišćenje pipete na kraju inseminacije. U ostatak brizgalice se navuče sjeme i onda se pričvrsti pipeta. Volumen ejakulata potreban za umjetnu oplodnju varira o veličini kuje, od 2 ml za patuljaste pasmine do 20 ml za gigantske pasmine. Koncentracija spermija po dozi iznosi 150-200 milijuna (LOJKIĆ i sur., 2015.).

Prilikom uvođenja pipete u rodnicu treba ju navlažiti ejakulatom ili razrjeđivačem. Ona se nježno uvodi u vaginu po dorzalnoj stjenci (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.).

Prilikom uvođenja pipete treba paziti na otvor uretre jer se on kod kuja nalazi na samom rubu zdjelice. Posebnu pažnju treba posvetiti da se nehotice pipeta ne uvede u mokraćni mjehur (FARSTAD, 2010.).

Pipetu lagano rotiramo lijevo desno. Smjer uvlačenja prvo je dorzokranijalan, a nakon prolaska ruba zdjelice usporedan sa kralježnicom (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.; FARSTAD, 2010.). Kada se prilikom uvlačenja pipete osjeti čvršći otpor, treba prestati sa guranjem i lagano aplicirati sjeme (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.). Pipeta bi trebala biti uvedena što je dublje moguće. Tako kod gigantskih pasmina ona najčešće ulazi cijelom svojom dužinom od 25 cm. Kod velikih pasmina 20-24 cm, kod srednjih i malih 15-18 cm, a patuljastih 5-10 cm. Starija literatura navodi da je potrebno dignuti stražnje noge kuje i držati ih u zraku oko 10 minuta, novija istraživanja su dokazala da to nije potrebno (PRVANOVIĆ BABIĆ i sur., 2016.).



## 9. ZAKLJUČAK

Umjetno osjemenjivanje ohlađenom spermom vrlo je jednostavan postupak. Važna je usklađenost veterinaru koji uzima spermu i veterinaru koji umjetno osjemenjuje. Da bi umjetno osjemenjivanje dalo zadovoljavajući rezultat bitno je odrediti točno vrijeme ovulacije kod kuje.

Umjetno osjemenjivanje ohlađenom spermom se vrši na jednak način kao i svježom i daje jednak postotak koncepcije, što joj daje prednost u primjeni pred smrznutom spermom. Zbog jednostavnijeg zahvata umjetnog osjemenjivanja, jeftinijeg i jednostavnijeg transporta, ovaj način osjemenjivanja pronalazi sve veću primjenu u praksi od strane veterinaru, ali i samih vlasnika pasa.

## 10. SAŽETAK

Umjetno osjemenjivanje ohlađenim sjemenom postaje sve češći način rasplodivanja kuja. Glavnu prednost ove tehnologije predstavlja dobivanje potomstva od jedinki koje žive u različitim krajevima svijeta, bez troškova i stresa koje izaziva putovanje životinje na parenje. Ohlađeno sjeme čuva se na temperaturi od 4-5°C gdje ovisno o vrsti razrjeđivača, ostaje vijabilno 2-10 dana. Prednosti korištenja ohlađenog sjemena, osim već spomenutog, su jednostavnost postupka, niski troškovi opreme i zadovoljavajući postotak koncepcije nakon intravaginalnog osjemenjivanja.

# **ARTIFICIAL INSEMINATION WITH CHILLED CANINE SEMEN**

## **11. SUMMARY**

Artificial insemination with chilled semen has become a common practice in canine breeding. The main advantage of this technology is possibility to obtain litters from a male and female living in different countries without the costs and the stress of a long travel. Chilled canine semen is preserved at temperatures of 4-5°C and used for 2-10 days from collection, depending on extender used. The advantages of using chilled semen are that technique and equipment are rather simple, and good pregnancy rate can be obtained with vaginal insemination.

## 12. LITERATURA

1. AROKIA ROBERT, M., G. JAYAPRAKASH, MAYUR PAWSHE, T. TAMILMANI, M. SATHIYABARATHI (2016): Colletion and evaluation of canine semen-a review. *Int. J. Sci. Environ.Tech.* 5,1586-1595.
2. AXNER, E., C. LINDE-FORSBERG (2002): Semen collection, assessment, and artificial insemination in the cat, International Service, Ithaca, NY.
3. BLENDINGER, K. (2007): Collection and evaluation of the semen in the dog. *Proceedings of the SCIVAC Congress, Rimini, Italy*, pp. 83-84.
4. CERGOLJ, M., M. SAMARDŽIJA (2006): Veterinarska andrologija. Odabrana poglavlja. Medicinska naklada, Zagreb. 34-39; 47;73-99;112;139-142;169-194.
5. CHRISTIANSEN, I. J. (1984): *Reproduction in the Dog & Cat*.Bailliere Tindall, London, pp. 225-262.
6. CONCANNON, P. W. (2011): Reproductive cycles of the demostic bitch. *Anim Reprod Sci.*, 124, 200-210.
7. CONCANNON, P. W., N. WEIGAND, S. WILSON (1979): Sexual behavior in ovariectomized bitches in response to estrogen and progesterone treatments. *Biol. Reprod.* 20, 799-809.
8. EDENS, M. S. D., A. M. HEATH (2003): *Breeding Management in the Bitch and Queen*. Small Animal Theriogenology. Margaret V. Rott Kustritz. Elsevier Science 2003. pp. 33-61.
9. ENGLAND, G. C., W. E. ALLEN (1991): Effect of synthetic androgen mesterolone upon seminal characteristics of dogs. *J. Small Anim. Pract.* 32, 271-274.
10. ENGLAND, G. C., P. W. CONCANNON (2002): Determination of the Optimal Breeding Time in the Bitch: Basic Considerations. In *Recent Advances in Small Animal Reproduction*, Concannon P. W., G. England, J. Verstegen and C. Linde-Forsberg (Eds.), International Veterinary Information Sevice ([www.ivis.org](http://www.ivis.org)), Documet No. A1231.0602.
11. FARSTAD, W. K. (2010): Artificial insemination in dogs. U: *BSAVA Manual of Canine and Feline Reproduction and Neonatology*, 2<sup>nd</sup> edition.British Small Animal Veterinary Association, Gloucester, UK, pp. 80-83.
12. FELDMAN, E. C., R. W. NELSON (1996): *Canine and Feline Endocrinology and Reproduction*. Saunders, Philadelphia, pp. 718-733.

13. FRESHMAN, J. L. (2002): Semen Collection and Evaluation. *Clin. Tech. Small Anim. Pract.* 17, 104-107.
14. GÜNZEL-APEL, A. R. (1994): Fertilitätskontrolle und Samenübertragung beim Hund. Enke/Gustav Fischer Verlag, Jena, pp. 11-48.
15. JOHNSTON S. D., M. V. ROOT KUSTRITZ, P. N. S. OLSON (2001): Canine and Feline Theriogenology, Saunders, Philadelphia, p.592
16. KUTZLER, M. A. (2005): Semen collection in the dog. *Theriogenology* 64, 747–754.
17. LINDE-FORSBERG, C. (1991): Achieving canine pregnancy by using frozen or chilled extended semen. *Vet. Clin. North Am. (Small Anim. Pract.)* 21, 467-485.
18. LINDE-FORSBERG, C. (2005): Artificial Insemination. U: ESAVS-EVSSAR Course Reproduction in companion, exotic and laboratory animal, Nantes 12<sup>th</sup>-17<sup>th</sup> September 2005. Dostupno na: [http://www.esavs.net/course\\_notes/reproduction\\_05/artificial\\_insemination.pdf](http://www.esavs.net/course_notes/reproduction_05/artificial_insemination.pdf)
19. LINDE-FORSBERG, C. (2010): Canine artificial insemination: State of the Art. In: Proceedings 7th EVSSAR Congress, Louvain-La-Neuve, Belgium, p. 22-26.
20. LINDSAY, F. E. F, P. W. CONCANNON (1986): In: Small animal reproduction and infertility (T. Burkefed), p.p. 112-120. Lea and Febiger, Philadelphia
21. LOJKIĆ, M., N. MAĆEŠIĆ, G. BAČIĆ, T. KARADJOLE, M. SAMARDŽIJA, I. GETZ, I. FOLNOŽIĆ, M. CERGOLJ, T. DOBRANIĆ, B. ŠKRLIN, Z. VRBANAC (2012): Uporaba duboko smrznute i ohlađene pseće sperme na Klinici za porodništvo i reprodukciju Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Zbornik radova 5. hrvatskog veterinarskog kongresa s međunarodnim sudjelovanjem, Zagreb, Hrvatska veterinarska komora, Veterinarski fakultet, pp. 423-429.
22. OKKENS, A. C., H. S. KOOISTRA (2006): Anoestrus in the dog: a fascinating story. *Reprod. Domest. Anim.* 41, 291-296.
23. OLSEN, P. N., P. W. HUSTED (1986): Breeding management for optimal reproductive efficiency in the bitch and stud dog. U: Current therapy in theriogenology. 2<sup>nd</sup> edition, Morrow D.A., Saunders, Philadelphia, pp. 563-466.
24. PAYAN-CARREIRA, R., S. MIRANDA, W. NIZANSKI (2011): Artificial Insemination in Dogs, Artificial Insemination in Farm Animals, InTech, 51-61.
25. PO-YIN, CHU, P. J. WRIGHT, C. S. LEE (2006): Apoptosis of endometrial cells in the bitch. *Reprod. Fertil. Devel.* 14, 297-305.

26. PRVANOVIĆ BABIĆ, N., T. KARADJOLE, N. MAČEŠIĆ, M. LOJKIĆ, G. BAČIĆ (2016): Upravljanje rasplodivanjem pasa metodama asistiranе reprodukcije. Vet. stn.47, 395-401.
27. PURSWELL, B.J., ALTHOUSE G., and ROOT, M.V. (1992): Guidelines for Using the Canine Breeding Soundness Evaluation Form. Hastings, Nebraska, Theriogenology Handbook, Society for Theriogenology.
28. RIJSSELAERE, T., D.MAES, F. VAN DEN BERGHE, A. VAN SOOM (2011): Preservation and shipment of chilled and cryopreserved dog semen. Vlaams Diergeneeskunding Tijdschrift, 248-253.
29. RIJSSELAERE, T., A. VAN SOOM., S. TANGHE, M. CORYN D. MAES, A. DE KRUIF (2005): New techniques for the assessment of canine semen quality: A review. Theriogenology 64, 706-719
30. ROTA, A. (2001): Frozen canine semen Proceedings of the EVSSAR annual meeting, Milano, 2001, pp 69-81.
31. SEAGER, S.W.J. (1986): Artificial insemination in dogs. In: Burke, T.J. ed, Small Animal Reproduction and Infertility. Lea and Febiger, Philadelphia, pp. 2007-2017.
32. TSUTSUI, T.T., T.T.TEZUKA, Y.Y. MIKASA, H.H. SUGISAWA, N.N. KIRIHARA, T.T. HORI, E.E. KAWAKAMI (2003): Artificial insemination with canine semen stored at low temperature. J. Vet. Med. Sci. 65, 307-312.
33. VERSTEGEN, J., M. IGUER-OUADA, K. ONCLIN (2001): Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. Theriogenology57, 149-179.

<http://veterinaronline.blogspot.hr/2011/12/reprodukcija-psi-spolni-ciklus-kod-kuje.html>

[www.staro.vef.unizg.hr/org/porodnistvo/studenti/materijali/spolni\\_ciklus\\_kuja\\_macka.pdf](http://www.staro.vef.unizg.hr/org/porodnistvo/studenti/materijali/spolni_ciklus_kuja_macka.pdf)

## ŽIVOTOPIS

Rođena sam 02. listopada 1984.g. u Zagrebu gdje sam pohađala osnovnu i srednju školu. Tijekom srednje škole zbog velike ljubavi prema konjima, ali i želje za pomaganjem volontirala sam u Udruzi za terapijsko jahanje "Kрила".

Nakon završetka školovanja u XII. Općoj gimnaziji i položene mature, 2003.g. upisujem Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Za vrijeme studija nekoliko godina sam provela volontirajući u Veterinarskoj ambulanti za male životinje "NOA", što mi je pomoglo u lakšem razumijevanju i usvajanju gradiva tijekom studija.