

# Asistirana reprodukcija u govedarskoj proizvodnji

---

Karajić, Natko

Master's thesis / Diplomski rad

2014

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:178:046855>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-25**



Repository / Repozitorij:

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



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU**

**VETERINARSKI FAKULTET**

**NATKO KARAJIĆ**

**ASISTIRANA REPRODUKCIJA U GOVEDARSKOJ  
PROIZVODNJI**

**DIPLOMSKI RAD**

**Zagreb, 2014**

# 1. UVOD

Asistirana reprodukcija podrazumijeva zahvate kojima u kontroliranim uvjetima rasplodujemo životinje i utječemo na genetsku selekciju širenjem poželjne genetike prema željenim proizvodnim svojstvima.

Tijekom proteklih 50 godina intenzivna istraživanja na području endokrinologije, reproduktivne fiziologije, stanične biologije i embriologije omogućila su razvoj novih biotehnologija koje su uspješno uvedene u rasplodivanje domaćih životinja. Sinkronizacija i indukcija estrusa, umjetno osjemenjivanje (UO), multipla ovulacija i embriotransfer (MOET) i *in vitro* proizvodnja zametaka (IVP) predstavljaju postupke asistirane reprodukcije koje uzimaju sve većeg maha u govedarskoj proizvodnji, a s ciljem bržeg genetskog napretka dobivanjem velikog broja potomaka od najkvalitetnijih životinja i skraćivanjem generacijskog intervala. Poznavanje ovih tehnologija omogućuje pak razvoj i primjenu naprednijih biotehnologija poput kloniranja s transferom jezgre (NT) i proizvodnje transgenetskih životinja.

Osim velikog i brzog utjecaja na genetsku selekciju, važno je naglasiti da su životinje u postupcima asistirane reprodukcije pod strogom sanitarnom kontrolom, čime je mogućnost prijenosa bolesti svedena na najmanju moguću mjeru. Isto tako, primjena ovih biotehnologija olakšava međunarodni transport i trgovinu genetskim materijalom, te tako smanjuje rizik prenošenja zaraznih bolesti, jer više nije potreban transport živih životinja.

Postupci asistirane reprodukcije poput embriotransfera i *in vitro* proizvodnje zametaka zajedno s krioprezervacijom, od izuzetne su važnosti u očuvanju izvornih i ugroženih pasmina goveda. Njihova primjena nezaobilazna je u programima uspostave banke gena koji pomažu u očuvanju farmskih genetskih resursa. Biotehnoški postupci mogu poslužiti i za rekonstrukciju pasmine/linije u slučajevima nestanka ili ugroženosti od bolesti ili prirodnih katastrofa.

## **2. CILJ RADA**

Postupci asistirane reprodukcije razvijaju se zadnjih 50 godina prema potrebama i mogućnostima svakog razdoblja. Cilj ovog diplomskog rada je prikazati biotehnoške postupke koji se danas primjenjuju, njihove prednosti, ograničenja i mogućnosti u očuvanju i unaprjeđenju genetskog potencijala u govedarstvu.

## **3. PREGLED BIOTEHNOLOGIJA**

### **3.1. Sinkronizacija estrusa**

Kontrola estrusa uvedena je kako bi se olakšalo otkrivanje estrusa i postiglo osjemenjivanje u točno određeno vrijeme. Sinkronizacijom estrusa izjegavaju se problemi oko otkrivanja estrusa čime se povećava postotak koncepcije. Osim toga, sinkronizacija je neizostavan dio u primjeni embriotransfera u domaćih životinja. Kako bi umjetno kontrolirali estrus, krave moraju dosegnuti pubertet i imati normalnu cikličku aktivnost (NOAKES, 1997.). Metode sinkronizacije temelje se na dva osnovna principa, produživanju lutealne faze primjenom progestagena i skraćanju lutealne faze regresijom žutog tijela nakon aplikacije žutog tijela (GORDON, 1996.).

Metode se provode primjenom:

- prostaglandina
- progestagena
- kombiniranom upotrebom hormona

Estrus se javlja kao rezultat rasta dominantnog folikula usporedno s regresijom žutog tijela. Varijacije u učinkovitosti sinkronizacijskih protokola baziranih na primjeni progestagena i/ili prostaglandina ovise o stadiju rasta folikula u trenutku započinjanja tretmana. Stoga, sinkronizacija rasta folikula i regresija žutog tijela može povećati preciznost sinkronizacije estrusa, optimalizirati kvalitetu folikula i pospješiti gravidnost (THATCHER i sur., 2001.).

#### **3.1.1. Sinkronizacija estrusa upotrebom prostaglandina**

Dužina interestrusnog perioda u krava ovisi o trajanju života žutog tijela. Aplikacijom prostaglandina ili njegovih analoga izaziva se regresija žutog tijela, čime se upravlja cikličnom aktivnošću jedinke (NOAKES, 2001.).

Žuto tijelo krava i junica osjetljivo je na aplikaciju egzogenog prostaglandina (PGF2 $\alpha$ ) i njihovih analoga između 5. i 16. dana nakon ovulacije (TOMAŠKOVIĆ i sur., 2007.). Aplikacija PGF2 $\alpha$  u tom razdoblju izazvati će luteolizu, pojavu novog folikularnog vala i ovulaciju. Period od primjene PGF2 $\alpha$  do pojave estrusa i ovulacije ovisi o stadiju razvoja

dominantnog folikula u trenutku primjene PGF2 $\alpha$ . Životinje s funkcionalnim dominantnim folikulom u trenutku aplikacije ulaze u estrus za 2-3 dana, dok aplikacija u ranijoj fazi uzrokuje duži i varijabilniji period do početka estrusa (4-5 dana).

Primjeno dvije injekcije PGF2 $\alpha$  ili njegovog analoga u intervalu od 10 do 12 dana na grupi krava i/ili junica koje se nalaze u različitim stadijima spolnog ciklusa postiže se pojava estrusa i ovulacije kod svih krava i junica 3 do 5 dana nakon zadnje aplikacije (NOAKES, 2001.).

Prostaglandini se koriste za sinkronizaciju estrusa skupine krava ili junica za pripremu umjetnog osjemenjivanja, za pripremu davateljica i primateljica u postupku embriotransfera, za regulaciju spolnog ciklusa i prilikom problema s otkrivanjem estrusa (tiho gonjenje). Prostaglandini se mogu koristiti samo kod krava i junica koje imaju izraženu cikličku aktivnost jajnika (TOMAŠKOVIĆ i sur., 2007.). Za sinkronizaciju estrusa primjenom prostaglandina krave moraju biti dobre kondicije i u ciklusu, što znači da je od zadnjeg telenja prošlo minimalno 40 dana. Za sinkronizaciju estrusa primjenom prostaglandina kod junica bitno je provjeriti da je životinja imala najmanje dva normalna ciklusa prije započinjanja tretmana.

### **3.1.2. Sinkronizacija estrusa primjenom progestagena**

Primjena progestagena ili egzogenog progesterona temelji se na spoznaji da progestagen djeluje na isti način kao žuto tijelo. Aplikiran u organizam goveda progestagen će blokirati oslobađanje gonadotropina preko negativne povratne sprege i time odgađati cikličku aktivnost, odnosno folikularni rast sve dok se njegov izvor ne ukloni ili se njegov učinak smanji (NOAKES, 2001.). Zbog kratkog biološkog poluživota potrebna je kontinuirana primjena preparata kako bi se postigao učinkoviti biološki učinak (GORDON, 1996.). Duža primjena progestagena (14 do 16 dana) dovodi do smanjene plodnosti zbog stvaranja perzistirajućeg folikula. Bolji rezultati su zabilježeni kraćom primjenom (7 do 9 dana), pa je nužna primjena određene luteolitičke tvari poput estrogena na početku tretmana ili prostaglandina na kraju (YÁÑIZ i sur., 2004.). Osim na dužinu života žutog tijela estradiol djeluje i na dinamiku folikula.

Progestageni se mogu koristiti i kod krava koje nisu u ciklusu jer senzibiliziraju hipotalamusno-hipofizarno-jajničku vezu. Dozrijevanje folikula i ovulacija postiže se aplikacijom korionskog gonadotropnog hormona kobilica (eCG) nakon prestanka djelovanja progestagena.

Postoje različiti načini aplikacije progestagenskih preparata u organizam životinje u svrhu sinkronizacije estrusa: oralno, parenteralno i lokalno: intravaginalnim spužvicama, subkutanom implantantom, intravaginalnim PRID (Progesteron releasing intravaginal device) spiralama, te CIDR (Controlled internal drug release device) umetcima. Estrus nastupa 48-72 sata nakon prestanka aplikacije.

### **3.1.3. Sinkronizacija estrusa kombiniranom primjenom hormona**

#### **3.1.3.1. GnRH ili analozi GnRH (buserelin)**

Primjena gonadotropnog realising hormona (GnRH) ili njihovih agonista izaziva porast koncentracije folikulostimulirajućeg (FSH) i luteinizirajućeg hormona (LH). LH će izazvati ovulaciju ili luteinizaciju većih folikula prisutnih u vrijeme tretmana, što će omogućiti endogeni porast FSH te dovesti do stvaranja novog folikularnog vala (THATCHER i sur., 2001.). Sintetički gonadotropini (buserelin) se mogu koristiti za poticanje izlučivanja endogenih GnRH kako bi se izazvao estrus u krava u periodu nakon porođaja (NOAKES, 2001.).

#### **3.1.3.2. GnRH – progestagen – PGF2 $\alpha$**

Koncentracija progesterona u kasnoj lutealnoj fazi prije osjemenjivanja u pozitivnom je odnosu sa stupnjem začeća. Primjena progesterona u kombinaciji s GnRH i PGF2 $\alpha$  pospješuje pojavu estrusa i koncepciju (XU i BURTON, 1998.). GnRH se aplicira istovremeno s aplikacijom CIDR umetka. Nakon 10 dana aplicira se PGF2 $\alpha$ , 24 sata prije vađenja umetka. GnRH potiče folikulogenezu kako bi u trenutku davanja PGF2 $\alpha$  na jajniku bio prisutan dominantni folikul. Ovulacija je moguća nakon prestanka djelovanja negativne povratne sprege progesterona uklanjanjem CIDR umetka (NOAKES, 2001.).

#### **3.1.3.3. GnRH – PGF2 $\alpha$ (Ovsynch/TAI metoda)**

Ova metoda uključuje primjenu GnRH i PGF2 $\alpha$ . Prva injekcija GnRH aplicira se u bilo kojoj fazi ciklusa, slijedi aplikacija PGF2 $\alpha$  sedmog dana, te ponovna aplikacija GnRH devetog dana. Prva injekcija GnRH osigurava prisutnost novog dominantnog folikula u vrijeme primjene PGF2 $\alpha$  tako što potiče ovulaciju i formiranje novog ili akcesornog žutog

tijela te novi folikularni val. Isto tako, produžava životni vijek žutog tijela kako bi bio osjetljiv na primjenu PGF2 $\alpha$  7 dana kasnije. Druga injekcija GnRH osigurava bolju sinkronizaciju ovulacije potičući predovulatorno otpuštanje LH (NOAKES, 2001.). Ovsynch protokol omogućuje umjetno osjemenjivanje u točno određeno vrijeme bez prethodnog otkrivanja estrusa (TAI = Timed Artificial Insemination) (GORDON, 1996.).

### **3.2. Umjetno osjemenjivanje**

Umjetno osjemenjivanje već se duže od 50 godina primjenjuje u stočarstvu, s najvećim učinkom na genetski napredak širenjem genoma najkvalitetnijih rasplodnjaka. UO ima važnu ulogu u kontroli spolno prenosivih bolesti te omogućuje jednostavni prijenos i trgovinu genetskim materijalom.

Umjetno osjemenjivanje stručni je zahvat kojim se spermiji unose u određene dijelove spolnih organa ženki na umjetan način. Temelji se na tri osnovne pretpostavke: da spermiji mogu preživjeti izvan tijela, da se nakon toga mogu aplicirati u spolne organe ženke na način koji će rezultirati prihvatljivim uspjehom koncepcije i da se može otkriti plodni period ženke (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.).

Od osobite je važnosti medicinski značaj UO jer se prilikom svakog osjemenjivanja sve životinje ginekološki pregledavaju, pa se na vrijeme mogu dijagnosticirati eventualne spolne bolesti i patološka stanja organa spolnog sustava (prirodna ili stečena). Duboko se smrzava samo sperma zdravih rasplodnjaka, povećava se plodnost, izlučuju se neplodne životinje i kontrolira se puerperij (TOMAŠKOVIĆ i sur., 2007.).

Za umjetno osjemenjivanje krava i junica upotrebljavaju se stočarski i genski najkvalitetniji bikovi. Kvalitetnim ejakulatom bika, nakon razrjeđenja može se osjemeniti 150 do 200 i više krava. Godišnje se na taj način sjemenom jednog bika osjemeni i do 20.000 krava. To omogućuje držanje najkvalitetnijih bikova koji mogu vrlo brzo promijeniti proizvodna svojstva populacije goveda.

Procjenjuje se da je porast mliječnosti zabilježen u drugoj polovici 20. stoljeća u najvećoj mjeri uzrokovan velikim genetskim napretkom upravo zbog upotrebe umjetnog osjemenjivanja (GORDON, 1994.).



### **3.2.1. Organizacija umjetnog osjemenjivanja**

Bikovi čije se sjeme koristi za umjetno osjemenjivanje smješteni su u specijaliziranim centrima koji raspolažu stručnim osobljem i laboratorijem za ocjenu, razrjeđivanje i smrzavanje sjemena. Duboko smrznuto sjeme pohranjeno je u velikim posudama za tekući dušik, tzv. depo kontejnerima. Sjeme za konzerviranje uzima se od bikova deset mjeseci u godini, a dva ljetna mjeseca, kada sjeme nije kvalitetno, bikovi miruju. Svaka stanica i veterinarska ambulanta mora raspolagati kontejnerima za tekući dušik manje zapremine (15 do 20 L) u kojima je pohranjeno sjeme. Takvi se kontejneri do terena prevoze automobilom do mjesta uporabe sjemena. Zbog isparavanja, razinu tekućeg dušika u kontejneru treba redovito kontrolirati, a svakih 20 do 30 dana kontejner dopunjavati tekućim dušikom. Krave i junice uglavnom se osjemenjuju u vlastitoj štali, na poziv vlasnika koji obavijesti stanicu ili ambulantu da se plotkinja goni. Na taj način osjemenjivanje se može obavljati u optimalno vrijeme i ukoliko je potrebno ponoviti. Doza za umjetno osjemenjivanje krava i junica mora sadržavati najmanje 20 do 30 milijuna spermija od čega ih najmanje 15 do 20 milijuna mora biti progresivno pokretljivo (KARADJOLE, 2009.).

#### **3.2.1.1. Umjetno osjemenjivanje krava i junica**

Ovulacija se kod krave i junice događa 1-16 sati nakon prestanka vanjskih znakova estrusa. Većina krava, njih oko 75% počinje se tjerati noću i rano ujutro, a idealno vrijeme za umjetno osjemenjivanje je 6 do 24 sati prije ovulacije. Plotkinje čije se gonjenje otkrije ujutro osjemenjuju se poslijepodne, a one s početkom gonjenja poslijepodne osjemenjuju se slijedeće jutro. Ako se ne zna točan početak estrusa, plotkinje treba osjemeniti odmah po uočenim znakovima estrusa. Prije samog zahvata potrebno je plotkinje pregledati vaginalno i rektalno. Na osnovu nalaza na spolnim organima (hiperemija, otvorenost cerviksa, kvaliteta estrusne sluzi, F3 na jajniku) donosi se odluka o tome treba li plotkinju osjemeniti ili ne.

Tehnika umjetnog osjemenjivanja koja se najčešće koristi naziva se dvoručna (bimanualna) metoda s fiksacijom cerviksa. Krave se osjemenjuju polaganjem sjemena u tijelo maternice. Vaginalno i plitko cervikalno osjemenjivanje treba izbjegavati jer su rezultati osjemenjivanja vrlo loši (HERAK, 1989; TOMAŠKOVIĆ i sur., 2007.), dok je dublja

inseminacija u rog maternice rizična zbog mogućnosti ozljede endometrija (PARKINSON, 2001.).

Otkrivanje estrusa predstavlja ključni čimbenik koji utječe na uspješnost umjetnog osjemenjivanja, a time i optimalno rasplodivanje. Netočno otkrivanje estrusa vodi nepravovremenom osjemenjivanju, smanjenom postotku gravidnosti i produljenom međutelidbenom razdoblju. Umjetno osjemenjivanje potaknulo je veću primjenu sinkronizacijskih programa koji ne zahtijevaju otkrivanje estrusa, čime je UO postalo još učinkovitije.

### **3.3. Embriotransfer**

Embriotransfer (MOET = multipla ovulacija i embriotransfer) metoda je asistirane reprodukcije koja se već preko 30 godina sustavno koristi kod goveda, malih preživača, konja te divljači za genetsko poboljšanje stada i proizvodnju velikog broja potomaka od najkvalitetnijih ženskih životinja.

Embriotransfer je biotehnološki postupak kojim se kravama u ranoj gravidnosti ispiru zametci iz maternice koji se zatim premještaju u maternicu sinkronizirane primateljice kako bi se nastavio unutarmaternični razvoj, te se naposljetku rodila normalna i za život sposobna mladunčad.

Primjena embriotransfera u rasplodivanju goveda omogućuje brži genetski napredak stada uz znatno skraćivanje generacijskog intervala upotrebom rasplodnog potencijala elitnih plotkinja (GORDON, 1996.). Embriotransferom dobiveno potomstvo potječe od genetski najvrednijih plotkinja, čime se postiže bolja kvaliteta stada. Postupak progenog testiranja bikova ubrzan je, inducira se rađanje blizanaca, sprečava se prijenos zaraznih bolesti te postoji mogućnost da slabo plodne i neplodne životinje mogu imati potomstvo (GETZ i sur., 2001.). Osim toga, ET omogućuje lakši međunarodni transport i trgovinu duboko smrznutim zametcima čime se smanjuju troškovi i pomaže aklimatizacija živih životinja. Zametci su jeftiniji za transport od odraslih životinja, a manji je i rizik od prijenosa zaraznih bolesti. Presađeni u domaće primateljice, ET zametci imaju prednosti nad odraslim životinjama jer primaju pasivni imunitet preko kolostruma, a imaju fiziološku i prirodnu adaptaciju u novoj sredini (GORDON, 1996.). Nadalje, embriotransfer je od iznimne važnosti za očuvanje autohtonih i ugroženih pasmina te primjenu drugih metoda asistirane reprodukcije kao što je

dijeljenje zametaka u svrhu dobivanja blizanaca te određivanje spola zametaka (GORDON, 1996.).

Embriotransferom se dobiva prosječno 5 do 8 zametaka pogodnih za transfer, a postupak se kod iste krave davateljice može ponoviti 3 do 4 puta godišnje. Postotak gravidnosti u primateljica iznosi oko 60% (MAKEK i sur., 1997.), što znači da se od jedne davateljice može dobiti preko 10 teladi godišnje. Premda je MOET sazrela i stabilna biotehnološka metoda čiji su protokoli gotovo isti već 20 godina, ipak postoje ograničavajući čimbenici poput varijacije u broju dobivenih zametaka, te neodgovarajućeg superovulacijskog odgovora kod nekih davateljica. Osim toga, primjena MOET je zbog troškova rada i upotrebe hormona skupa, pa se ova tehnologija uglavnom koristi za dobivanje bikova u centrima za UO, te na farmama elitnih proizvođača.

Embriotransfer obuhvaća izbor i superovulaciju krava davateljica, njihovo umjetno osjemenjivanje, ispiranje maternice nakon sedam dana, te transfer svježih ili duboko zamrznutih zametaka u sinkronizirane primateljice.

### **3.3.1. Izbor krava davateljica i krava ili junica primateljica**

#### **3.3.1.1. Izbor davateljica**

Krave davateljice odabiru se na osnovu uzgojnih i reproduksijskih vrijednosti. One obuhvaćaju niz parametara poput proizvodnih rezultata davateljica i njihovih potomaka, kondiciju i eksterijer, podrijetlo i nasljedstvo, te eventualno prethodni uspjeh u postupku embriotransfera. Pod reproduksijskim vrijednostima vodi se računa o najboljoj reproduksijskoj dobi s visokim stupnjem plodnosti, zdravlju spolnih organa i dobro razvijenom vimenu. Nakon poroda i puerperija treba odlučiti o provedbi embriotransfera. Prednost se daje plotkinjama u optimalnoj reproduksijskoj dobi (3-8 godina) s urednim ciklusima, normalnim teljenjima, urednim puerperijem i zdravim spolnim organima (KARADJOLE, 2012.).

#### **3.3.1.2. Izbor krava ili junica primateljica**

Primateljice su surogat majke koje omogućuju unutarmaternalni razvoj ploda i othranu zdravog teleta s kojim nemaju nikakvu genetsku poveznicu. Stoga, za odabir krava primateljica najvažnije su njene reproduktivne vrijednosti (KARADJOLE, 2012.).

Primateljice moraju biti dobrog zdravlja i kondicije, zdravih spolnih organa sposobnih za prihvatanje zametka i razvoj ploda do poroda, moraju dati potomstvo bez komplikacija i othraniti tele sve do odbića, biti dobre mliječnosti, koncipirati lagano i brzo, te poslije teljenja normalno ući u ciklus (MAKEK i sur., 1997.). Junice se često koriste kao primateljice radi niže cijene, bolje sinkronizacije, te zbog toga što nemaju eventualnih komplikacija nakon prijašnjih teljenja.

Na jednu kravu davateljicu odabiremo prosječno 5-7 primateljica, a prije ulaska u program embriotransfera potrebno je isključiti eventualnu gravidnost primateljica.

I za davateljice i za primateljice je važno da su dobro hranjene, držane u dobrim zoohigijenskim uvjetima, dehelmintizirane, vakcinirane i markirane.

### **3.3.2. Priprema davateljica i primateljica**

#### **3.3.2.1. Superovulacija i sinkronizacija**

Superovulacija je postupak kojim se davateljicama apliciraju hormonski pripravci koji uzrokuju dozrijevanje više većih folikula na jajniku i posljedično oslobađanje većeg broja jajnih stanica u jajovod nakon ovulacije. Superovulacija se postiže primjenom gonadotropnih hormona, eCG ili FSH (folikulostimulirajući hormon) koji se apliciraju između 9. i 12. dana ciklusa, kada ginekološkim i ultrazvučnim pregledom utvrdimo žuto tijelo na jajniku. Budući da je biološki poluživot eCG-a dugačak, on se primjenjuje jednokratno, dok je FSH potrebno aplicirati višekratno, najčešće dva puta dnevno tijekom 4 do 5 dana (GETZ, 2004.). Četrdeset i osam sati nakon početka tretmana, davateljice se tretiraju s luteolitičkom dozom prostaglandina (PGF $2\alpha$ ) i normalno su u estrusu nakon 36 do 48 sati.

#### **3.3.2.2. Umjetno osjemenjivanje davateljica**

Davateljice se višekratno osjemenjuju jer se multiple ovulacije događaju u periodu od 24 sata. Osjemenjuje se 3-4 puta u 48 sati, svakih 12 sati sa po 50 – 100 miliona spermija (jedna doza spermija).

#### **3.3.2.3. Superovulacijski odgovor**

Sedmog dana nakon umjetnog osjemenjivanja provjerava se superovulacijski odgovor rektalnim ili ultrazvučnim pregledom. Potrebno je na svakom jajniku pronaći najmanje 2 do 3 žuta tijela da bi davateljicu ispirali (MAKEK i sur., 1996.).

### **3.3.3. Ispiranje i ocjena zametaka za transfer i duboko smrzavanje**

Krave davateljice ispiramo 6.-8. dana ciklusa. Davateljice se prije ispiranja sediraju i daje im se epiduralna anestezija. Maternica se ispiru pomoću gumenog Foleyevog katetera i puferirane izotonične otopine (npr. DPBS). Izolirani zametci klasificiraju se i ocjenjuju na osnovu razvojnog stadija i kvalitete pomoću stereomikroskopa pod povećanjem 40 do 100x (IETS Manual, 1998.). Prema kvaliteti, zametci se svrstavaju u one prve, druge i treće klase, neoplođene jajne stanice i degenerirane zigote i zametke. Goveđi zametci klase I i II u stadiju razvoja od kasne morule do blastociste daju najviši postotak koncepcije nakon embriotransfera (IETS Manual, 1998.). U tablici 1. prikazan je postotak gravidnosti nakon transfera zametaka različite kvalitete.

Tablica 1. Postotak gravidnosti nakon transfera zametaka različite kvalitete (SIEDEL i SIEDEL, 1991.).

KVALITETA	BROJ	% ZAMETAKA	% GRAVIDNOSTI
Izvrсна	275	54	63
Dobra	152	30	58
Srednja	42	8	31
Loša	42	8	12

### **3.3.4. Transfer zametaka u sinkronizirane primateljice (transfer svježih i duboko smrznutih zametaka) i duboko smrzavanje zametaka**

#### **3.3.4.1. Transfer zametaka u sinkronizirane primateljice**

Transfer zametaka provodimo tehnikom beskrvnog transfera između 6. i 8. dana ciklusa primateljice. Odabrani zametci aspiriraju se u pajete, te pomoću katetera smještaju u prednju trećinu ipsilateralnog roga maternice, na stranu na kojoj se na jajniku nalazi žuto tijelo. Pregled na gravidnost obavlja se 6 do 10 tjedana nakon transfera zametaka.

### 3.3.4.2. Duboko smrzavanje zametaka goveda

Duboko smrzavanje zametaka omogućuje dugotrajnu pohranu vrijednog genetskog materijala, transport i učinkovitije iskorištavanje biotehnoloških postupaka poput embriotransfera ili proizvodnje zametaka *in vitro*. Za duboko smrzavanje odabiru se zametci kvalitete klase I i II i smrzavaju se neposredno nakon ispiranja davateljice. Kako bi izbjegli stvaranje intracelularnog leda zametci se hlade na optimalnoj brzini hlađenja (0,5°C po minuti), uz dodavanje krioprotektora (glicerol, etilen glikol) koji osiguravaju preživljavanje zametaka nakon smrzavanja.

## 3.4. Proizvodnja zametaka *in vitro*

Proizvodnja zametaka *in vitro* (IVP) predstavlja treću generaciju biotehnologije rasplodivanja i primjenjuje se u cijelom svijetu s obećavajućim rezultatima u humanoj i veterinarskoj medicini. *In vitro* proizvodnja govedih zametaka omogućuje dobivanje velikog broja potomaka od genetski najkvalitetnijih plotkinja, pa se koristi u svrhu što bržeg genetskog napretka u govedarstvu, kao alternativa ili pak sastavni dio klasičnog embriotransfera. U veterinarskoj medicini ova se tehnologija počela primjenjivati krajem osamdesetih godina, a rođeno je na tisuće teladi dobivenih nakon oplodnje i uzgoja *in vitro*.

Proizvodnja zametaka *in vitro* obuhvaća dobivanje jajnih stanica iz živih životinja ili klaoničkih jajnika, njihovo dozrijevanje (IVM) i oplodnju (IVF) *in vitro*, te uzgoj (IVC) oplođenih jajnih stanica do stadija morule/blastociste (LU i sur., 1987.).

Proizvodnja zametaka *in vitro* omogućuje dobivanje zametaka od plotkonja koje ne mogu dati potomstvo konvencionalnim putem. Može se primijeniti u reproduktivno zdravih krava i junica, a isto tako i u krava s ne odgovarajućim superovulacijskim odgovorom i krava koje zbog različitih abnormalnosti spolnih organa ne mogu proizvesti zametak. Isto tako, omogućuje dobivanje potomstva od visoko vrijednih plotkinja u agoniji ili neposredno nakon uginuća ili klanja, gravidnih životinja tijekom prva tri mjeseca gravidnosti, plotkinja u puerperiju i ženske teladi (KARADJOLE, 2012.). Razvoj ove tehnologije, osim ubrzanog genetskog napretka dobivanjem više potomstva od visokovrijednih krava davateljica, omogućuje i razvoj drugih biotehnologija kao što su određivanje spola zametaka lančanom

reakcijom polimerazom (PCR = Polymerase Chain Reaction), te kloniranje i proizvodnja transgenih životinja (HOSHI, 2003.).

U govedarstvu IVP ima brojne primjene poput jeftine masovne proizvodnje zametaka iz kloničkog materijala za transfer u mliječne krave čija telad ide u tov, zaobilaženje nepredvidivog superovulacijskog odgovora i nekih poremećaja u spolnim organima davateljica, proizvodnje zametaka genetski visokovrijednih jedinki, kontrolu i sprečavanje širenja zaraznih bolesti, skraćenje generacijskog intervala, utvrđivanje plodnosti bikova koji se koriste za UO i ubrzanje postupka progenog testiranja bikova, te konačno proizvodnje transgenih životinja i kloniranje (GALLI i sur., 2001.).

### **3.4.1. Dobivanje govedih jajnih stanica za oplodnju *in vitro***

U proizvodnji govedih zametaka *in vitro* koristi se heterogena populacija jajnih stanica koje potječu iz folikula različitih veličina i stadija folikularnih valova. Jajne stanice za dozrijevanje *in vitro* (IVM) mogu se dobiti od živih životinja postupkom transvaginalne punkcije folikula koju još nazivamo i Ovum pick-up (OPU) te usisavanjem jajnih stanica iz folikula jajnika sakupljenih na klaonici neposredno nakon klanja krava i junica. Postupci proizvodnje govedih zametaka *in vitro* razrađeni su na jajnicima sakupljenim izravno na liniji klanja. U postupak ulaze jajne stanice sakupljene iz folikula vidljivih na površini jajnika u svim razvojnim stadijima, pa je klonički materijal bogat i jeftin izvor nezrelih jajnih stanica. Ipak, kako bi se potencijal ove biotehnologije mogao iskoristiti, izvor jajnih stanica trebaju biti visokovrijedne davateljice kod kojih se postupak može ponavljati. Primjenom OPU tehnike kod zdravih davateljica tijekom 6 mjeseci može se dobiti i do 50 zametaka, odnosno 3 do 4 puta više nego klasičnim embriotransferom (BOLS i sur., 1995.). Primjenom OPU tehnike jajne stanice mogu se aspirirati kod krava u ciklusu dva puta tjedno kroz više tjedana (HIDALGO i sur., 2000.). Ovom metodom mogu se dobiti jajne stanice od gravidnih junica i krava u prvoj trećini gravidnosti, od krava u puerperiju, te čak i od ženske teladi prije puberteta (MAJERUS i sur., 1999.).

### **3.4.2. Dozrijevanje govede jajne stanice *in vitro***

Dozrijevanje govedih jajnih stanica *in vitro* obuhvaća usisavanje kompleksa jajne stanice i stanica kumulusa iz antralnih folikula i njihov uzgoj u staničnoj kulturi kroz 24 sata dok ne dostignu stadij druge metafaze. U postupak dozrijevanja *in vitro* uzimaju se jajne

stanice iz folikula vidljivih na površini jajnika promjera većeg od 3 mm potpuno okružene s više slojeva kumulusnih stanica i homogenom ooplazmom (MAKEK i sur., 1998.).

Prilikom dozrijevanja goveđih jajnih stanica dolazi do ekspanzije stanica kumulusa, nastavka mejoze te reorganizacije citoplazmatskih organela. Nezrela jajna stanica zakočena je u diplotenu profaze prve mejotske diobe, a dozrijevanjem mejoza se nastavlja (mejotsko dozrijevanje).

Jajna stanica prolazi i kroz citoplazmatsko dozrijevanje tijekom kojeg dolazi do reorganizacije citoplazmatskih organela, što je neophodno tijekom oplodnje jajne stanice (CHIAN i sur., 1994.).

Tijekom dozrijevanja odvija se i ekspanzija stanica cumulusa oophorusa, što je nužno za normalno odvijanje ovulacije (CHEN i sur., 1993.) i oplodnje (VANDERHYDEN i ARMSTRONG, 1989.).

Za dozrijevanje jajnih stanica *in vitro* najčešće se koristi TCM 199 (Tissue culture medium). TCM se najčešće koristi s dodatkom fetalnog telećeg seruma (FCS), te hormona (FSH, LH, Estradiol), te cisteamina. Dodatak FCS-a, gonadotropnih (FSH/LH) i steroidnih hormona u medij, stimulira dozrijevanje i sposobnost oplodnje *in vitro* goveđih jajnih stanica (STUBBINGS i sur., 1990.). Protokoli za uzgoj razlikuju se od laboratorija do laboratorija tako da se jajne stanice uzgajaju ili u „kapljicama“ u kojima ima 10 do 20 jajnih stanica prekrivenih parafinskim uljem ili u posudicama ili kušalicama s 0,6 do 1 ml medija u skupinama po 50 jajnih stanica u jednoj kušalici. Inkubacija traje 24 sata na 39 stupnjeva i 5% CO<sub>2</sub> (MAKEK i sur., 2000.). Uspjeh dozrijevanja jajnih stanica *in vitro* mjeri se morfološkom procjenom ekspanzije stanica kumulusa, te stanica korone radijate, a stupanj dozrelosti jezgre postotkom jajnih stanica koje su dostigle metafazu II (MII) s izbačenim prvim polarnim tjelešcem. Uspjeh dozrijevanja goveđih jajnih stanica *in vitro* iznosi oko 90% (LONERGAN i sur., 2003.).

### **3.4.3. Oplodnja govede jajne stanice *in vitro***

Oplodnja *in vitro* predstavlja zajednički uzgoj zrelih jajnih stanica sa spermatozoidima u strogo kontroliranim laboratorijskim uvjetima. U postupku oplodnje *in vitro* koristimo smrznutu/odmrznutu bičju spermu, koja nakon odmrzavanja ima 30-70% progresivno pokretljivih spermija s 85% morfološki normalnih oblika te zrele jajne stanice dobre kvalitete.

Uspjeh oplodnje *in vitro* povezan je s vremenom dozrijevanja jajnih stanica, kvalitetom sperme, uvjetima uzgoja, vremenom osjemenjivanja, prisustvu kumulusa



oophorusa, kvaliteti jajne stanice i vremenu ko-inkubacije spermija s jajnim stanicama (GASPARRINI, 2007.). Ko-inkubacija spermija s jajnim stanicama odvija se tijekom 24 sata, nakon čega nastupa prva stanična dioba.

Uspjeh oplodnje goveđih jajnih stanica *in vitro* procjenjuje se 48 sati nakon oplodnje jajnih stanica, određivanjem broja brazdanih zametaka (GREVE i sur., 2003.), te nalazom muškog i ženskog pronukleusa koji je vidljiv nakon 18-22 sata ko-inkubacije spermija s jajnim stanicama (SHAMSUDDIN i sur., 1993.). Najčešće abnormalnosti oplodnje goveđih *in vitro* uzgojenih jajnih stanica su asikroni razvoj muškog i ženskog pronukleusa (XU i GREVE, 1988.), polispermija i partenogeneza (CROZET, 1991.).

#### **3.4.3.1. Kapacitacija spermija, akrosomska reakcija i oplodnja**

Kako bi mogla oploditi jajnu stanicu, bičja sperma mora proći proces kapacitacije i akrosomske reakcije (YAGANIMACHI, 1994.). Tijekom kapacitacije dolazi do destabilizacije membrane spermija što ih čini sposobnima za oplodnju (VAN SOOM i DE KRUIF, 1996.). Nakon kapacitacije spermiji postaju hiperaktivno pokretljivi što im omogućuje penetraciju cumulusa oophorusa i pripremu za akrosomsku reakciju (ROLDAN i GOMENIDO, 1992.). Nakon prolaska kroz cumulus oophorus, spermij se veže na receptore zone pelucide koji induciraju akrosomsku reakciju. Pri tome, ovojnica glave spermija i vanjska ovojnica akrosome stapaju se na nekoliko mjesta, omogućavajući izlazak hidrolitičkih i proteolitičkih enzima koji su smješteni u akrosomi glave spermija (POMER i sur., 2002.). Enzimatskom razgradnjom i aktivnim pokretima repa, spermij prodire kroz zonu pelucidu i dolazi do stanične membrane jajne stanice (ŠVAJGER, 2004.), s kojom se spaja. Prilikom spajanja aktivira se kortikalna i zonalna reakcija koje sprječavaju pojavu polispermije (CRAN i ESPER, 1990.). Nakon spajanja, jezgra jajne stanice nastavlja mejozu tvoreći ženski pronukleus, uz izdvajanje drugog polarnog tjelešca. Glava spermija čini muški pronukleus. Kromosomi muškog i ženskog pronukleusa međusobno se pomiješaju i pomoću centriola formiraju diobeno vreteno prve diobe brazdanja. Stanica se priprema za prvu mitotsku diobu, čime završava proces oplodnje i započinje embrionalni razvoj (HYTTEL i sur., 1988.).

#### **3.4.3.2. Metode pripreme sjemena u postupku oplodnje *in vitro***

U postupcima oplodnje *in vitro* koristimo smrznutu/odmrznutu bičju spermu. Kako zrele govedu jajnu stanicu oplodujemo samo pokretljivim spermijima, danas su razrađene

brojne metode kojima se može odvojiti progresivno pokretljiva sperma. Tim metodama povećavamo broj morfološki normalnih i progresivno pokretljivih spermija, odstranjujemo krioprotektore, ostatke tkiva i razne mikroorganizme (ZAVOS, 1992.), a istovremeno potičemo i kapacitaciju spermija (CENTOLA i sur., 1998.). Postoje brojne metode za odvajanje spermija od sjemene plazme, a najčešće su:

- Metoda razrjeđenja i ispiranja spermija
- Metode migracije sperme (klasični swim up, swim up kroz hijaluronsku kiselinu)
- Metode selektivnog frakcioniranja sperme centrifugiranjem na gradijentu gustoće (Percoll™, BoviPure™)

#### **3.4.4. Uzgoj oplodjenih jajnih stanica *in vitro***

Oplodjene jajne stanice uzgajaju se *in vitro* do stadija blastociste, kada takvi zametci mogu biti presađeni u primateljice ili zamrznuti i pohranjeni u tekućem dušiku. Uzgoj se odvija kroz 7 dana, poželjno u definiranim sekvencijalnim medijima koji zadovoljavaju energetske potrebe predimplantacijskog zametka.

Kakvoća *in vitro* proizvedenih zametaka još je uvijek slabija u odnosu na one dobivene *in vivo*. To se odražava u njihovoj morfologiji (tamniji su, ranije se formira blastocel, imaju manje stanica po zametku), te u njihovoj povećanoj osjetljivosti prema dubokom smrzavanju. Nakon transfera IVP zametaka učestalija je pojava embrionalne smrtnosti. Osim toga, svaka dodatna mikromanipulacija zametcima uzgojenim *in vitro* umanjuje njihovo preživljavanje, što je i glavna zapreka njihovom učinkovitijem korištenju. Premda uvjeti uzgoja imaju značajnu ulogu u postizanju zadovoljavajuće kvalitete *in vitro* uzgojenih govedih blastocista, na razvojni potencijal govedih zametaka uvelike utječe i porijeklo jajnih stanica za IVP. Poznavanje uvjeta u kojima rastu i dozrijevaju jajne stanice neophodno je za učinkovitiju primjenu oplodnje i uzgoja *in vitro* govedih jajnih stanica (GETZ, 2004., KARADJOLE, 2012.).

#### **3.4.5. Rani embrionalni razvoj**

Razvoj zametka započinje spajanjem spermija s plazmatskom membranom jajne stanice, nakon čega dolazi do aktivacije jajne stanice, završetka mejoze i odbacivanja drugog polarnog tjelešca. Novooformljena jedinka započinje razvoj nizom mitotskih dioba. Diobom se blastomere smanjuju, ostajući pritom unutar zone pelucide. Kompakcija govedeg zametka

nastupa 5 do 6 dana nakon oplodnje, u stadiju od 32 stanice (VAN SOOM i sur., 1997.). Kompakcija nastupa nakon formiranja čvrstih međustaničnih veza koje omogućuju izmjenu iona i manjih molekula između stanica (BAYER, 1993.), a neophodne su za formiranje blastocela, ekspanziju blastociste te konačnu diferencijaciju stanica zametnog čvorića i stanica trofoblasta. Tijekom procesa kompakcije zametak nazivamo morula ili rana morula, dok nakon kompakcije postaje zrela morula. Zbog stvaranja međustaničnih veza u zametku se formiraju unutarnji i vanjski sloj stanica. Zbog aktivnog transporta natrija kroz vanjski sloj stanica zametka nastaje ionski gradijent, što dovodi do nakupljanja tekućine i stvaranja blastocela (GRARDINER i MENINO, 1993.), 6. do 7. dana nakon oplodnje (WATSON, 1992.). Ovaj razvojni stadij zametka nazivamo rana blastocista. U ranoj blastocisti razlikujemo dva tipa stanica: vanjske epitelne, diferencirane stanice (trofoblast) i unutarnje ne diferencirane stanice zametnog čvorića (embrioblast). Stanice embrioblasta su pluripotentne i od njih će, uz neka izvanembrionalna tkiva, nastati i sam zametak. U ranoj blastocisti blastocel obuhvaća manje od 50% zametka, dok u blastocisti zauzima više od 50% zametka. Zbog porasta osmotskog tlaka unutar blastocela, blastocel i zametak postaju veći. Istovremeno, zona pelucida postaje tanja i rasteže se. Stadij ekspanzije traje 24-48 sati, a tvorba se naziva ekspanzirana blastocista. Pucanje zone pelucide nastaje zbog porasta tlaka unutar zametka i enzimatske razgradnje podrijetlom od stanica trofoblasta. Zona pelucida puca devetog do jedanaestog dana nakon oplodnje i zametak se izliježe. Ovu tvorbu nazivamo izlegnuta blastocista. Izlijevanjem zametka iz zone pelucide završava njegov uzgoj *in vitro*.

#### **3.4.6. Određivanje embrionalnog razvoja i uspjeha uzgoja govedih zametaka *in vitro***

Unatoč brojnim istraživanjima u cilju unaprijeđenja uvjeta uzgoja govedih zametaka *in vitro*, svega 30-40% jajnih stanica oplodjenih *in vitro* razvije se do stadija blastociste i pogodno je za transfer u primateljicu (LONERGAN i sur., 2003.), a uspjeh gravidnosti nakon transfera ne premašuje 40% (MASSIP i sur., 1995., VAN SOOM i sur., 2003.). Zametci proizvedeni *in vitro* imaju promijenjenu morfologiju i gensku ekspresiju od zametaka uzgojenih *in vivo* (LAZZARI i sur., 2002.), teže preživljavaju duboko smrzavanje zbog toga što posjeduju veću količinu lipida, malu zametnu masu i druge promjene u odnosu na *in vivo* uzgojene zametke. Čest je i razvojni blok prije formiranja blastociste ili se zametak ne izliježe iz zone pelucide (GONZALES i BRAVISTER, 1995.). Određivanjem uspjeha uzgoja govedih zametaka *in vitro* ocjenjujemo kvalitetu sistema uzgoja *in vitro* i proizvedenih zametaka.

Ustaljeno je da se kvaliteta goveđih zametaka uzgojenih *in vitro* određuje na osnovu morfološke ocjene i razvojnog stadija (WRIGHT, 1998.). Kod ove ocjene, pomoću mikroskopa proučavamo morfološke karakteristike zametka poput izgleda zone pelucide, staničnih odlomaka, stupnja kompakcije, boje i kakvoće blastomera, asinkronog brazdanja i naravno razvojnog stadija. Svaki zametak pažljivo se pregledava, mjenjajući fokus i rotirajući zametak, kako bismo ga vidjeli u cijelosti. Glavni nedostatak morfološke ocjene je njena subjektivnost, no jasno propisani kriteriji od strane Međunarodnog društva za embriotransfer osiguravaju uniformnu klasifikaciju koja se koristi na svjetskoj razini. Ovu ocjenu možemo nadopuniti i drugim pokazateljima poput broja stanica u zametku (SHAMSUDDIN i sur., 1993.), odnosa stanica zametnog čvorića i stanica trofoblasta (VAN SOOM i sur., 2001., LOJKIĆ i sur., 2012.), pojavnosti apoptoze (GJORRET i sur., 2003.), uspjehu izlijevanja iz zone pelucide (MASSIP i sur., 1982.), kromosomskih nepravilnosti (VIUFF i sur., 1999.), genske ekspesije (EL-SAYED i sur., 2006.) i kinetike brazdanja (HOLM i sur., 1998., KARADJOLE, 2009., SUGIMURA i sur., 2012.). Najobjektivniji pokazatelj kvalitete uzgojenih zametaka je broj oteljene teladi nakon transfera IVP zametaka (VAN SOOM i DE KRUIF, 1996.). Tablice 2 i 3 pokazuju klasifikaciju zametaka prema stadiju razvoja i stupnju kvalitete. Ova klasifikacija koristi se za *in vivo* i *in vitro* proizvedene zametke.

Tablica 2. Klasifikacija goveđih zametaka prema stupnju embrionalnog razvoja

KLASA	STADIJ	MORFOLOŠKI OPIS
3	Rana morula	16-32 nekompaktnih, velikih blastomera
4	Morula	32-64 kompaktnih, manjih blastomera
5	Rana blastocista	Blastocel <50%
6	Blastocista	Blastocel >50%
7	Ekspandirana blastocista	Promjer zametka raste, a ZP postaje tanja
8	Izlegnuta blastocista	ZP je pukla, a zametak je djelomično ili potpuno izlegnut

Tablica 3. Klasifikacija govedih zametaka prema stupnju kvalitete

KLASA	OPIS
Klasa 1 Zametci izvrsne ili dobre kvalitete	Zametci simetrične i sferične mase s blastomerama uniformne veličine, boje i gustiće. Maksimalno 15% staničnih odlomaka. ZP je intaktna i glatka, bez konkavnih ili ravnih dijelova.
Klasa 2 Zametci osrednje kvalitete	Zametci s umjerenom nepravilnošću u obliku stanične mase ili u veličini, boji i gustoći blastomera. Najmanje 50% staničnog materijala je intaktno i vijabilno.
Klasa 3 Zametci loše kvalitete	Zametci s jakom nepravilnošću u obliku stanične mase ili u veličini, boji i gustoći blastomera. Najmanje 25% staničnog materijala je intaktno i vijabilno.
Klasa 4 Mrtvi ili degenerirani zametci	Degenerirani zametci, neoplođene jajne stanice i jednostanični zametci.

### 3.4.7. Preživljavanje zametaka poslije dubokog smrzavanja

Brojna istraživanja pokazala su da su zametci uzgojeni *in vitro* manje vitalni od *in vivo* uzgojenih zametaka, a njihovo smrzavanje često je manje uspješno. Mediji za uzgoj zametaka *in vitro* ne utječu samo na njihov razvoj, nego imaju značajan utjecaj na njihovo preživljavanje nakon smrzavanja (LEIBO i LOSKUTOFF, 1993.). Primjerice, dodatak seruma u medij za IVC uzrokuje nakupljanje lipida u stanicama trofoblasta (FERGUSON i LEESE, 1999.), što utječe na nižu toleranciju *in vitro* zametaka na zamrzavanje. Kod *in vitro* uzgojenih zametaka česta su morfološka oštećenja poput nepotpune kompakcije, nepotpunih međustaničnih veza, abnormalnosti mitohondrija i fragmentacije, što utječe na njihovo preživljavanje nakon zamrzavanja. *In vitro* uzgojeni zametci imaju promijenjeni lipidni metabolizam (ABD EL RAZEK i sur., 2000.). Promijenjeni sadržaj lipida uzrok je povećanoj osjetljivosti zametka na djelovanje slobodnih kisikovih radikala nakon smrzavanja i odmrzavanja. Razvojni stadij zametaka isto utječe na posljedice zamrzavanja, pa zametci višeg razvojnog stadija imaju veću toleranciju na smrzavanje od zametaka u ranijem

razvojnem stadiju (DINNYES i sur., 1999.). Brzina i metoda smrzavanja, te odabir krioprotektora isto tako utječu na preživljavanje zametka tijekom smrzavanja. Iako se uspjeh smrzavanja zametka može povećati ovisno o metodi krioprezervacije, kvaliteta *in vitro* uzgojenog zametka ostaje glavni čimbenik koji utječe na njegovu kriotoleranciju.

### **3.5. Pregled ostalih biotehnologija**

Učinkovita proizvodnja zametaka *in vitro* preduvjet je za primjenu naprednijih biotehnologija poput kloniranja, transgeneze, određivanja spola potomstva i dr. Ove biotehnologije omogućuju izravno manipuliranje genomom životinja da proizvedu nešto poželjno ili da odstranimo nepoželjno. Primjenom različitih biotehnologija poput seksiranja, multiplikacija genoma zametka bližnjem ili transferom jezgre (kloniranje) može se postići još brži genetski napredak prijenosom genoma iz nukleusnih stada u proizvodne jedinice.

#### **3.5.1. Određivanje spola spermija i zametaka (seksiranje)**

Kontrola spola mladunčadi izuzetno je važna u govedarskoj proizvodnji. U prirodnoj reprodukciji, omjer spolova je otprilike 50:50. Mesna industrija preferira mušku telad zbog boljih tovnih karakteristika i prirasta, dok u mliječnom govedarstvu ženska telad predstavlja najpoželjniju i najprofitabilniju jedinku. Iz tog razloga razvijene su metode kojima možemo kontrolirati spol buduće jedinke, a osnivaju se na određivanju spola spermija ili zametka.

Spermij koji nosi X kromosom kod goveda sadrži 3,8% više DNK od spermija s Y kromosomom. Na osnovu ove činjenice spermiji se mogu odvojiti citometrijskom analizom DNK u glavi spermija. Protočnom citometrijom omogućeno je odvajanje X spermija i Y spermija s točnošću od 90% i više (GARNER i SEIDEL, 2008.). Seksirano sjeme se pakira u pajete i osim za IVF može se koristiti i za konvencionalni UO (JOHNSON i WELCH, 1999.).

Nedostatak ove tehnologije je nešto lošija plodnost prilikom primjene ovakvog sjemena uglavnom radi oštećenja spermija, te kratak životni vijek seksiranog sjemena u genitalnom traktu. Jedan od ograničavajućih čimbenika koji utječe na širu primjenu je cijena seksiranog sjemena koja je znatno viša u odnosu na cijenu komercionalnog sjemena (SEIDEL, 2009.).

Druga mogućnost je određivanja spola zametka lančanom reakcijom polimerazom (Polymerase Chain Reaction, PCR). Ovom se tehnikom ispituje specifična DNK Y

kromosoma koja se umnožava pomoću PCR. Ova tehnika zahtijeva biopsiju zametka kako bi se izdvojile 2-3 blastomere koje se koriste za replikaciju zfx i zfy fragmenta gena s pomoću PCR ( THIBIER i NIBART, 1995.). Seksiranje zametka predstavlja najprecizniju metodu određivanja spola, no invazivnost postupka biopsije te skupa tehnologija usporavaju širu primjenu.

Ovim se postupcima može izabrati spol potomaka i time u potpunosti iskoristiti potencijal proizvedene mladunčadi, uglavnom za izmjenu u matičnom stadu ili za bikovske majke (HOHENBOKEN, 1999.).

### **3.5.2. Multipliciranje genomom**

Za multipliciranje genoma jedne životinje (ili zametka) koriste se dvije metode: bližnjenje (splitting) ili transfer jezgre (nuclear transfer).

#### **3.5.2.1. Bližnjenje**

Klonirane ovce, koze i goveda dobivene su prije 15 godina tehnikom cijepanja zametaka. Naime, sposobnost skupine stanica odstranjenih iz zametka da nastave razvoj iskorišteno je za dobivanje genetski identičnih jedinki koje potječu iz istog zametka. Višestanični goveđi zametci cijepaju se s pomoću mikromanipulatora na dva ili četiri dijela, a polovice ili četvrtine zametka mogu se prije transfera opet staviti u nadomjesne zone pelucida ili se transferiraju gole (CHRISTIE, 1996.). Kako se ovom tehnologijom može proizvesti 2 teleta od jednog zametka, koristi se komercijalno i poboljšava rezultate embriotransfera (KIPPAX i sur., 1991.). Uz uspjeh gravidnosti od 50%, ovom tehnologijom moguće je dobiti preko 100% teladi više nego samo MOET-om (GRAY i sur., 1991.).

Bližnjenje omogućava proizvodnju identičnih životinja (kloniranje) te ima specifičnu primjenu samo za određene proizvodnje. Uz druge manipulacije genomom (transgenezu) bližnjenje ima aplikaciju u farmaceutskoj industriji (TURNER, 1999., PIEDRAHITA, 2000.). U mliječnim krava mogu se proizvesti tovnii blizanci od jajnih stanica iz jajnika sakupljenih na klaonici i osjemenjenih *in vitro* s mesnatim bikom, tako da se može garantirati da ta telad ima barem 75% tovnne genetike, a proizvedeni su na najjeftiniji način (MATKOVIĆ i sur., 2000.).

### **3.5.2.2. Kloniranje**

Kloniranje je tehnika nuklearne transplantacije koja uključuje fuziju stanica embrionalnog ili somatskog podrijetla s enukleiranom jajnom stanicom (iz koje je uklonjena jezgra s njezinim genetskim materijalom), te transfer blastomera i aktivaciju jajne stanice, predimplantacijski razvoj zametaka i embriotransfer (STICE i sur., 1998.).

Kloniranje odrasle ovce (WILMUT i sur., 1997.) izazvalo je golemi interes i potaknulo mnoge rasprave o mogućnostima i opasnostima primjene ove moćne tehnologije. Slijedeći uspjeh klonirane Dolly, proizvedeni su i goveđi klonovi koristeći fetalne stanice fibroblasta, stanice jajovoda, granulosa stanice, stanice fibroblasta kože, te stanice mišića (HASLER, 2003.).

Kloniranje somatskih stanica (SCNT) predstavlja vrijednu tehnologiju u smislu umnožavanja superiornog genotipa i proizvodnje identičnih transgenih jedinki. Ipak, unatoč brojnim istraživanjima, uspješnost kloniranja vrlo je niska. Zajedno s IVF, SCNT je povezan s visokom embrionalnom i fetalnom smrtnošću, teškim teljenjima, velikom porođajnom masom i slabim postnatalnim preživljavanjem. Svega 1-5% kloniranih zametaka preživi do porođaja, trećina preživjelih ne doživi odbice, a preko 8% ne doživi 4. godinu života (WELLS i sur., 2004.).

### **3.5.3. Transgeneza**

Transgeneza je postupak genetske modifikacije životinja. Razvoj rekombinantne DNK tehnologije omogućio je izolaciju i modifikaciju gena, te unošenje novih gena u genom životinja. Strana DNK može se stabilno integrirati genom sisavaca i dalje nasljeđivati prema Mendeljevima zakonima.

Transgene životinje nisu uključene u komercijalne programe rasplodivanja, no njihova je uloga značajna u farmaceutskoj industriji i medicini. Proizvedene su linije transgenetskih koza koje izlučuju terapijske proteine u svojem mlijeku. Nexia Biotechnologies Inc. primjerice proizvodi transgenetske BELE® (Breed Early, Lactate Early) koze koje u mlijeku izlučuju humani rekombinantni protein (TURNER, 1999.). BELE koze su u proizvodnji cijele godine, uz dnevnu proizvodnju od 1L mlijeka, plodne su s 3-6 mjeseci starosti i male su tjelesne mase što smanjuje troškove hranidbe.



Proizvodnja transgenih životinja usmjerena je i k uzgoju životinja s organima imunološki kompatibilnim za humanu transplantaciju (ksenotransplantacija).

Transgenetska tehnologija može se koristiti za proizvodnju kloniranih zametnih linija (BRINK i sur., 2000., NIEMANN i KUES, 2003., ROBL i sur., 2003., STICE i sur., 1998., WALL, 1996.) koje su genetski modificirane za:

- poboljšanje učinkovitosti mesa ili mlijeka u proizvodnji,
- mijenjanje sastava mlijeka,
- poboljšavanje otpornosti prema bolestima.

S obzirom na visoku cijenu postupka i uzgoja transgenih životinja i činjenicu da su proizvodna svojstva životinja uglavnom regulirana ne jednim, nego s više gena, vjerojatno je da će se ova tehnologija više koristiti u farmaceutskoj nego u govedarskoj industriji.

### **3.6. Kontrola zaraznih bolesti**

Proizvodnja velikog broja ET i IVP zametaka i mogućnosti međunarodne trgovine, postavila je pitanje regulacije zakonskih normativa. Zdravstveni savjetodavni odbor za sigurnost (HASAC), unutar IETS-a, je odigrao značajnu ulogu u prikupljanju i širenju znanstvenih informacija o prijenosu zaraznih bolesti embriotransferom (THIBIER, 1998.). Međunarodno Društvo za Embriotransfer je donijelo propise vezane uz sanitarnu kontrolu proizvodnje zametaka da bi se smanjio rizik mogućeg prijenosa zaraznih bolesti (STRINGFELLOW i SEIDEL, 1998.). Brojna istraživanja su pokazala da se goveđim zametcima ne prenose zarazne bolesti. Prema riziku prijenosa, patogeni su svrstani u nekoliko kategorija (STRINGFELLOW i sur., 2004.).

Kategorija 1 obuhvaća bolesti ili uzročnike bolesti za koje postoji dovoljno dokaza da je rizik od prijenosa zanemariv, pod uvjetom da se s goveđim zametkom pravilno rukovalo prilikom prikupljanja i prijenosa. Pravilno rukovanje uključuje mikroskopski pregled zone pelucide s povećanjem barem od 50x kako bi se osiguralo da ostane netaknuta i bez prijanjanja ikakvih stranih tvari, ispiranje zametka i prema potrebi ispiranje u tripsinu.

Uzročnici koji spadaju u kategoriju 1 su:

- Enzootska leukoza goveda
- Slinavka i šap
- Bolest plavog jezika
- Brucella abortus
- Virus infektivnog goveđeg rinotraheitisa (obavezni ispiranje s tripsinom)

- Bolest Aujetzkog
- Goveđa spongiformna encefalopatija

Kategorija 2, 3 i 4 su bolesti o kojima je provedeno manje istraživanja o mogućnostima prijenosa i potrebna su daljnja *in vivo* i *in vitro* istraživanja (npr. goveđa virusna diareja). Zanemarivi rizik od prijenosa zaraznih bolesti putem embriotransfera omogućuje očuvanje vrijedne genetike u slučaju izbijanja epidemija (WRATHALL i sur., 2004.) i omogućuje uzgoj stada slobodnog od zaraznih bolesti.

## 4. ZAKLJUČCI

1. Postupci asistirane reprodukcije u govedarskoj proizvodnji važni su jer imaju za cilj brži genetski napredak dobivanjem velikog broja potomaka od najkvalitetnijih životinja.
2. Sinkronizacijom estrusa izbjegavaju se problemi oko detekcije estrusa čime se povećava postotak koncepcije.
3. Umjetno osjemenjivanje ima učinak na genetski napredak širenjem genoma najkvalitetnijih rasplodnjaka.
4. Embriotransfer i proizvodnja zametaka *in vitro* omogućuju širenje genoma najkvalitetnijih plotkinja.
5. Određivanjem spola zametka možemo kontrolirati spol buduće jedinke i time u potpunosti iskoristiti potencijal proizvedene mladunčadi.
6. Kloniranje predstavlja vrijednu tehnologiju u smislu umnožavanja superiornog genotipa i proizvodnje identičnih jedinki.
7. Proizvodnja transgenih životinja ima veliku važnost u farmaceutskoj industriji i transplantacijskoj medicini.
8. Primjena reproduktivnih tehnologija pomaže u očuvanju ugroženih i autohtonih pasmina i vrsta životinja.
9. Primjenom reproduktivnih biotehnologija olakšava se međunarodni transport i trgovina genskim materijalom čime se smanjuje rizik od prenošenja zaraznih bolesti.

## 5. SAŽETAK

### Asistirana reprodukcija u govedarskoj proizvodnji

Asistirana reprodukcija podrazumijeva zahvate kojima u kontroliranim uvjetima rasplodujemo životinje i utječemo na genetsku selekciju širenjem poželjne genetike prema željenim proizvodnim svojstvima.

Usvajanje i primjena postupaka asistirane reprodukcije u rasplodivanju domaćih životinja ima dalekosežne posljedice u komercijalnom uzgoju stoke. Umjetno osjemenjivanje, embriotransfer i proizvodnja zametaka *in vitro* stabilne su tehnologije koje se sustavno primjenjuju u uzgojnim programima diljem svijeta omogućavajući brzi genetski napredak, skraćenje generacijskog intervala, kontrolu zaraznih bolesti i smanjenje proizvodnih troškova.

Osim genetskog napretka, primjena ovih biotehnologija u rasplodivanju životinja omogućuje i trgovinu zamrznutim zamecima, povećava ponudu visokokvalitetne stoke te omogućava aplikaciju naprednih tehnologija koje imaju dodatne primjene. Razvoj naprednih biotehnologija poput određivanja spola zametaka i sperme, bližnjenja zametaka, kloniranja i proizvodnje transgene stoke donijeti će daljnji napredak u rasplodivanju i genetici domaćih životinja.

## 6. SUMMARY

### Assisted reproduction in cattle production

Assisted reproduction technologies include manipulation of animal reproduction under controlled conditions and influence genetic selection by spreading desirable genetics according to desired traits.

The application of assisted reproductive technology in stockbreeding has tremendously changed the rate of genetic improvement in breeding programs and strategies. Artificial insemination, embryo transfer and *in vitro* embryo production are stable technologies that are systematically applied in breeding programs around the world. They enable rapid genetic progress, shortening of generation interval, control of diseases transmission and reduction of production costs.

In addition to genetic progress, the application of these biotechnologies in animal breeding enables international trade and transport of frozen embryos, permits high quality breeding stock to be available for sale in much larger numbers and enables the application of advanced technologies that have additional applications. The development of advanced biotechnology such as sex determination of embryos and sperm, embryo twinning, cloning and production of transgenic livestock will bring further progress in genetics and reproduction of animals.

## 7. POPIS LITERATURE

1. ABD EL RAZEK, I. M., G. CHARPIGNY, S. KODJA, B. MARQUANT-LEGUIENNE, P. MERMILLOD, C. GUYADER-JOLY, P. HUMBLLOT (2000): Differences in lipid composition between *in vivo*- and *in vitro*- produced bovine embryos. *Theriogenology*, 53, 346.
2. BAYER, E. C. (1993): Gap functions. *Int. Rev. Cell. Biol.*, 137, 1-29.
3. BOLS, P. E. J., A. VAN SOOM, A. DE KRUIF (1995): Transvaginal ovum pick-up (OPU) in the cow: a new disposable needle guidance system. *Theriogenology*, 43, 677-687.
4. BRINK, M. F., M. D. BISHOP, F. R. PIEPER (2000): Developing efficient strategies for the generation of transgenic cattle which produce biopharmaceuticals in milk. *Theriogenology*, 53, 139-148.
5. CENTOLA, G. M., R. HERKO, E. ANDOLINA, S. WEISENSEL (1998): Comparison of sperm separation methods: effect on recovery, motility, motion parameters and hyperactivation. *Fertil. Steril.*, 70, 1173-1175.
6. CERGOLJ, M., M. SAMARDŽIJA (2007): Veterinarska andrologija. Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, Hrvatska. pp.73-122.
7. CHEN, L., P. T. RUSELL, W. J. LARSEN (1993): Functional significance of cumulus expansion in the mouse: Roles Roles for the preovulatory synthesis of hyaluronic acid within the cumulus mass. *Mol. Reprod. Dev.*, 34, 87-93.
8. CHIAN, R. C., K. NIWA, M. A. SIRARD (1994): Effects on cumulus cells on male pronuclear formation and subsequent early development of bovine oocytes *in vitro*. *Theriogenology*, 41, 1499-1508.
9. CHRISTIE, W. B. (1996): Embryo Transfer In Large Domestic Animals, In: Arthur G. H., D. E. Noakes, H. Pearson, T. J. Parkinson: *Veterinary Reproduction and Obstetrics*. Seventh Edition. London, Philadelphia, Toronto, Sydney, Tokio: WB Saunders Company Limited. pp. 677-693.
10. CRAN, D. G., C. R. ESPER (1990): Cortical granules and cortical granule reaction in mammals. *J. Reprod. Fertil.*, 42, (Suppl.), 177-188.
11. CROZET, N. (1991): Manipulation of oocytes and *in vitro* fertilization. *J. Reprod. Fertil.*, 43, (Suppl.), 235-243.
12. DINNYES, A., P. LONERGAN, T. FAIR, M. P. BOLAND, X. Z. YANG (1999): Timing of the first cleavage post-insemination affects cryosurvival of *in vitro* produced blastocysts. *Mol. Reprod. Dev.*, 53, 318-324.
13. EL-SAYED, A., M. HOELKER, F. RINGS, D. SALILEW, D. JENNEN, E. THOLEN, M. A. SIRARD, K. SCHELLANDER, D. TESHAYE (2006): Large-scale transcriptional analysis of bovine embryo biopsies in relation to pregnancy success after transfer to recipients. *Physiol. Genomics*, 28, 84-96.
14. FERGUSON, E. M., H. J. LEESE (1999): Triglyceride content of bovine oocytes and early embryos. *J. Reprod. Fert.*, 116, 373-378.

15. GALLI, C., G. CROTTI, C. NOTARI, P. TURINI, R. DUCHI, G. LAZZARI (2001): Embryo production by ovum pick-up from live donors. *Theriogenology*, 59, 1341-1357.
16. GARDINER, C. S., A. R. MENINO JR (1993): In: Preimplantation embryo development. (Bravister, B.D., Ed.), Springer-Verlag, New York, pp. 200-211,
17. GARNER, D. L., G. E. SEIDEL (2008): History of commercializing sexed semen for cattle. *Theriogenology*, 69, 886-895.
18. GASPARRINI, B. (2007): *In vitro* embryo production in buffalo (*Bubalus Bubalis*) species: potencies and limitations. Proceedings of the 23th Scientific Meeting of the European Embryo Transfer Association, 7.-8. September. Alghero, Italy. pp. 91-105.
19. GETZ, I., M. MATKOVIĆ, Z. MAKEK, A. TOMAŠKOVIĆ, M. CERGOLJ, M. LOJKIĆ (2001): Asistirana reprodukcija u govedarskoj proizvodnji. Zbornik radova "Veterinarski dani", Opatija 2001., 83-92.
20. GETZ, I. (2004): Uspješnost stimulacije jajnika krava u postupku transvaginalne ultrazvučne punkcije i uzgoja *in vitro* govedih zametaka. Doktorska disertacija. Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Zagreb, Hrvatska.
21. GJORRET, J. O., H. M. KNIJN, S. J DIELEMAN, B. AVERY, L. I. LARSSON, P. MADDOX-HYTTEL (2003): Chronology of apoptosis in bovine embryos produced *in vivo* and *in vitro*. *Biol. Reprod.*, 69, 1193–1200.
22. GONZALES, D. S., B. D. BRAVISTER (1995): Zona pellucida escape by hamster blastocysts *in vitro* delayed and morphologically different compared with zona escape *in vivo*. *Biology of Reproduction*, 52, 470-480.
23. GORDON, I. (1994): Laboratory Production of Cattle Embryos. *Biotechnology in Agriculture*, Cab International, pp. 11.
24. GORDON, I. (1996): Controlled Reproduction in Cattle and Buffaloes. CAB International, Wallingford.
25. GREVE, T., V. MADISON, B. AVERY, H. CALLEDEN, P. HYTTEL (1993): *In vitro* production of bovine embryos: A progress report and the consequences on the genetic upgrading of cattle populations. *Anim. Reprod. Sci.*, 33, 51-69.
26. GRAY, K. R., K. R. BONDIOLI, C. L. BETTS (1991): The commercial application of embryo splitting in beef cattle. *Theriogenology*, 35, 37-44.
27. HASLER, J. F. (2003): The current status and future of commercial embryo transfer in cattle. *Anim. Reprod. Sci.*, 79, 245-264.
28. HERAK, M. (1989): U: Veterinarski priručnik, 4. obnovljeno i dopunjeno izdanje, Reprodukcija domaćih životinja, Umjetno osjemenjivanje domaćih životinja, JUMENA, Zagreb.
29. HIDALGO, C. O., J. MENENDEZ, L. PRIETO, J. A. GARCIA-PALOMA, N. FACAL, E. DIAZ, P. DUQUE, E. GOMEZ, C. DIEZ (2000.): Pregnancies after bovine ovum pick-up in Spain: preliminary results. Proceedings of the 16th scientific meeting of the European Embryo Transfer Association, Santander, 8.-9. September 2000, 164.
30. HOHENBOKEN, W. D. (1999): Application of sexed semen in cattle production. *Theriogenology*, 52, 1421-1433.

31. HOLM, P., N. N. SHUKRI, G. VAJTA, P. BOOTH, C. BENDIXEN, H. CALLESEN (1998): Developmental kinetics of the first cell cycles of bovine *in vitro* produced embryos in relation to their *in vitro* viability and sex. *Theriogenology*, 50, 1285-1299.
32. HOSHI, H. (2003): *In vitro* production of bovine embryos and their application for embryo transfer. *Theriogenology*, 59, 675-685.
33. HYTTEL, P., T. GREVE, H. CALLESEN (1988): Ultrastructure of *in vivo* fertilization in superovulated cattle. *J. Reprod. Fertil.*, 82, 1-13.
34. IETS Manual (Manual of International Embryo Transfer Society) 3rd edition. Savoy, IL., USA. pp. 106-107.
35. JOHNSON, L. A., G. R. WELCH (1999): Sex preselection: high-speed flow cytometric sorting of X and Y sperm for maximum efficiency. *Theriogenology*, 52, 1323-1342.
36. KARADJOLE, M. (2009): Utjecaj veličine folikula na kvalitetu goveđih jajnih stanica i razvoj zametaka u postupku oplodnje *in vitro*. Disertacija. Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Zagreb, Hrvatska.
37. KARADJOLE, M. (2012): Biotehnologija rasploda. U: Veterinarski priručnik 6. izdanje. (Herak-Perković, V., Ž. Grabarević, J. Kos, ur.). Medicinska naklada. p.p.1773-1778.
38. KIPPAX, I., W. CHRISTIE, T. G. ROWAN (1991): Effects of method of splitting, stage of development and presence or absence of zona pellucida on foetal survival in commercial bovine embryo transfer of bisected embryos. *Theriogenology*, 35, 25-36.
39. LAZZARI, G, C. WRENZYCKI, D. HERRMANN , R. DUCHI, T. KRUIP, H. NIEMANN, C. GALLI (2002): Cellular and molecular deviations in bovine *in vitro*-produced embryos are related to the large offspring syndrome. *Biology of Reproduction*, 67, 767-775.
40. LEIBO, S. P., N. M. LOSKUTOFF (1993): Cryobiology of *in vitro* derived embryos. *Theriogenology*, 39, 81-94.
41. LOJKIĆ, M., I. GETZ, M. SAMARDŽIJA, M. MATKOVIĆ, G. BAČIĆ, T. KARADJOLE, N. MAČEŠIĆ, I. FOLNOZIĆ, B. ŠPOLJARIĆ (2012): Effect of cysteamine supplementation during *in vitro* culture of early stage bovine embryos on blastocyst rate and quality. 81, 229-234.
42. LONERGAN, P., D. RIZOS, T. FAIR, M. P. BOLAND (2003): *In vitro* production of bovine embryos: factors affecting blastocyst yield and quality. Zbornik radova 4. Srednjeeuropskog bujatričkog kongresa, 23.-27. travnja 2003., 33-38.
43. LU, K. H., I. GORDON, M. GALLAGHER, A. MCGOVERN (1987): Pregnancy established in cattle by transfer of embryos derived from *in vitro* fertilization of oocytes matured *in vitro*. *Vet. Rec.*, 121, 259-260.
44. MAJERUS, V., R. DE ROOVER, D. ETIENNE, S. KAIDI, A. MASSIP, F. DESSY, I. DONNAY (1999.): Embryo production by ovum pick up in unstimulated calves before and after puberty. *Theriogenology*, 52, 1169-1179.
45. MAKEK, Z., M. HERAK, M. CERGOLJ, I. BARAC-GETZ, D. RUDAN (1996.): A comparison rectal palpation and ultrasonography for the evaluation of superovulatory response on the ovaries in beef heifers. *Acta Veterinaria Hungarica*, 44, 467-476.



46. MAKEK, Z., M. CERGOLJ, I. GETZ, M. HERAK, A. TOMAŠKOVIĆ, T. DOBRANIĆ (1997.): Embriotransfer u goveda. *Praxis veterinaria*, 45, 153–159.
47. MAKEK, Z., I. GETZ, M. CERGOLJ, M. HERAK, A. TOMAŠKOVIĆ, K. STIPETIĆ, T. DOBRANIĆ, V. SUŠIĆ (1998): Selection of immature bovine oocytes as the preliminary phase of *in vitro* fertilization. *Vet. Arhiv.*, 68, 109-119.
48. MAKEK, Z., M. MATKOVIĆ, I. GETZ, M. LOJKIĆ (2000): *In vitro* production of bovine embryos for transfer: comparison between co-culture with granulosa cells and culture in defined medium. *Vet. Arhiv.*, 70, 105-111.
49. MASSIP, A., J. MULNARD, P. VANDERZWALMEN, C. HANZEN, F. ECTORS (1982): The behaviour of cow blastocyst *in vitro*: cinematographic and morphometric analysis. *J. Anat.* 134, 399–405.
50. MASSIP, A., P. MERMILLOD, A. DINNYES (1995): Morphology and biochemistry of *in vitro* bovine embryos: implications for cryopreservation. *Hum. Reprod.*, 10, 3004-3011.
51. MATKOVIĆ, M., I. GETZ, Z. MAKEK, P. BOŽIĆ, A. TOMAŠKOVIĆ, M. CERGOLJ (2000): Biotehnologija rasplodivanja: mogućnosti primjene u stočarstvu Hrvatske. Zbornik radova, Drugi hrvatski veterinarski kongres Cavtat, 10.-12. listopada 2000., 215-224.
52. NIEMANN, H., W. A. KUES (2003): Application of transgenesis in livestock for agriculture and biomedicine. *Anim. Reprod. Sci.*, 79, 291-317.
53. NOAKES, D. E. (1997.): Normal non-pregnant animal. pp. 3-16. U: *Fertility and obstetrics in cattle second edition*. Blackwell Science Ltd.
54. NOAKES, D. E. (2001.): Normal oestrus cycles: Endogenous and exogenous control of ovarian cyclicity. pp. 3-53. U: *Arthur's Veterinary Reproduction & Obstetrics eighth edition*. W.B. Saunders Company Ltd.
55. PARKINSON, T. (2001): Artificial insemination, U: *Arthurs Veterinary Reproduction and Obstetrics, 8th Edition*, Saunders Company, USA, 751-778.
56. PIEDRAHITA, J. A. (2000): Targeted modification of the domestic animal genome. *Theriogenology*, 53, 105-116.
57. POMMER, A. C., J. J. LINFOR, S. A. MEYERS (2002): Capacitation and acrosomal exocytosis are enhanced by incubation of stallion spermatozoa in a commercial semen extender. *Theriogenology*, 57, 1493-1501.
58. ROBL, J. M., P. KASINATHAN, E. SULLIVAN, Y. KUROIWA, K. TOMIZUKA, I. ISHIDA (2003): Artificial chromosome vectors and expression of complex proteins in transgenic animals. *Theriogenology*, 59, 107-113.
59. ROLDAN, E. R. S., M. GOMENIDO (1992): Morphological, functional and biochemical changes underlying the preparation and selection of fertilising spermatozoa *in vivo*. *Anim. Reprod. Sci.*, 28, 69-78.
60. SEIDEL, G. E. (2009): Sperm sexing technology The transition to commercial application An introduction to the symposium "Update on sexing mammalian sperm". *Theriogenology*, 71, 1-3.
61. SHAMSUDDIN, M., B. LARSSON, H. RODRIGEZ-MARTINEZ (1993): Maturation-related changes in bovine oocyte under different culture conditions. *Anim. Reprod. Sci.*, 31, 49-60.

62. SIEDEL, J. E., S. M. SIEDEL (1991): Training manual for embryo transfer in cattle. FAO Animal production and Health, Rome, Italy, pp. 77.
63. STICE, S. L., J. M. ROBL, F. A. PONCE DE LEON, J. JERRY, P. G. GOLUEKE, J. B. CIBELLI, J. J. KANE (1998.): Cloning: new break throughs leading to commercial opportunities. *Theriogenology*, 49, 129-138.
64. STUBBINGS, R. B., R. M. LIPTRAP, K. J. BETTERIDGE, J. S. WALTON, D. T. ARMSTRONG, P. K. BASRUR (1990): Requirements for bovine oocyte maturation *in vitro*. *Reprod. Dom. Anim.* 25, 158-166.
65. STRINGFELLOW, D. A., S. M. SEIDEL (eds) (1998): Manual of the International Embryo Transfer Society: a procedural guide and general information for the use of embryo transfer technology, emphasizing sanitary procedures, 3rd Ed. International Embryo Transfer Society, Savoy, Illinois, 170 pp.
66. STRINGFELLOW, D. A., M. D. GIVENS, J. G. WALDROP (2004): Biosecurity issues associated with current and emerging embryo technologies. *Reprod. Fertil. Dev.*, 16, 93-102.
67. SUGIMURA, S., T. AKAI, Y. HASHIYADA, T. SOMFAI, Y. INABA, M. HIRAYAMA, T. YAMANOUCHI, H. MATSUDA, S. KOBAYASHI, Y. AIKAWA, M. OHTAKE, E. KOBAYASHI, K. KONISHI, K. IMAI (2012): Promising system for selecting healthy *in vitro*-fertilized embryos in cattle. *PLoS One* 7:e 36627
68. ŠVAJGER, A. (2004): Ključna zbivanja u gametogenezi i ranoj embriogenezi. [HTTP: //www.VMS.HR/School/Embrio.htm](http://www.VMS.HR/School/Embrio.htm).
69. THATCHER, W. W., F. MOREIRA, J. SANTOS, R. C. MATTOS, F. L. LOPES, S. M. PANCARCIL, C. A. RISCO (2001.): Effects of hormonal treatments on reproductive performance and embryo production. *Theriogenology*, 55, 75-89.
70. THIBIER, M., M. NIBART (1995.): The sexing of bovine embryos in the field. *Theriogenology*, 43, 71-80.
71. THIBIER, M. (1998): Introduction. The establishment and evolution of the International Embryo Transfer Society: personal observations. In *Manual of the International Embryo Transfer Society: a procedural guide and general information for the use of embryo transfer technology, emphasizing sanitary procedures* (D.A. Stringfellow & S.M. Seidel, eds), 3rd Ed. International Embryo Transfer Society, Savoy, Illinois, 1-6.
72. TOMAŠKOVIĆ, A., Z. MAKEK, T. DOBRANIĆ, M. SAMARDŽIJA (2007.): Rasplodivanje krava i junica. Veterinarski fakultet, Zagreb.
73. TURNER, J. D. (1999): Production of commercial valuable products using transgenic technology. *Theriogenology*, 51, 6.
74. VANDERHYDEN, B. C., D. T. ARMSTRONG (1989): Role of cummulus cells and serum on the *in vitro* maturation, fertilization and subsequent development of rat oocytes. *Biol. Reprod.*, 40, 720-728.
75. VAN SOOM, A., A. DE KRUIF (1996): Oocyte maturation, sperm capacitation and pre-implantation development in the bovine: Implications for *in vitro* production of embryos. *Reprod. Dom. Anim.*, 31, 687-701.

76. VAN SOOM, A., M. L. BOERJAN, P. E. J. BOLS, G. VANROOSE, A. LEIN, M. CORYN, A. DE KRUIF (1997): Timing of compaction and inner cell allocation in bovine embryos produced *in vivo* after superovulation. *Biol. Reprod.*, 57, 1041-1049.
77. VAN SOOME, A., G. VANROOSE, A. DE KRUIF (2001): Blastocyst evaluation by means of differential staining: a practical approach. *Reprod. Dom. Anim.*, 36, 29-35.
78. VAN SOOM, A., B. MATEUSEN, J. LEROY, A. DE KRUIF (2003): Assessment of mammalian embryo quality: what can we learn from embryo morphology? *Reprod. Biomed. Online.*, 7, 664-667.
79. VIUFF, D., L. RICKORDS, H. OFFENBERG, P. HYTTEL, B. AVERY B, T. GREVE, I. OLSAKER, J. L. WILLIAMS, H. CALLESEN, P. D. THOMSEN (1999): A high proportion of bovine blastocysts produced *in vitro* are mixoploid. *Biol. Reprod.*, 60, 1273–1278.
80. WALL, R. J. (1996): Transgenic livestock: progress and prospects for the future. *Theriogenology*, 45, 57-68.
81. WATSON, A. J. (1992): The cell biology of blastocyst development. *Mol. Reprod. Dev.*, 33, 492-504.
82. WELLS, D. N., J. T. FORSYTH, V. McMILLAN, B. OBACK (2004): The health of somatic cell cloned cattle and their offspring. *Cloning & Stem Cells 2004*, 6: 101-110.
83. WILMUT, I., A. E. SCHNIEKE, J. McWHIR, A. J. KIND, K. H. S. CAMPBELL (1997.): Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 385, 810-813.
84. WRATHALL, A. E., H. A. SIMMONS, D. J. BOWLES, S. JONES (2004): Biosecurity strategies for conserving valuable livestock genetic resources. *Reprod. Fertil. Dev.*, 16, 103-112.
85. WRIGHT, J. M. (1998): Photographic illustrations of embryo developmental stage and quality codes. In: *Manual of the International Embryo Transfer Society*, 3<sup>rd</sup> ed. (Stringfellow, D. A. and S. M. Siedel, Eds.). IETS, Savoy, Illinois. p.p.167-170.
86. XU, Z. Z., L. J. BURTON (1999.): Estrus synchronization of lactating dairy cows with GnRH, progesterone, and prostaglandin F2 $\alpha$ . *J. Dairy Sci.*, 83, 471-476.
87. XU, K. P., T. GREVE (1988): A detailed analysis of early events during *in vitro* fertilization of bovine follicular oocytes. *J. Reprod. Fertil.*, 82, 127-134.
88. YANAGIMACHI, R. (1994): Mammalian fertilization. U: Knobil E., Neil J. D. (editors). *Physiology of reproduction*. New York: Raven Press, pp. 189-317.
89. YÁNIZ, J. L., K. MURUGAVEL, F. LÓPEZ-GATIUS (2004.): Recent developments in oestrous synchronization of postpartum dairy cows with and without ovarian disorders. *Reprod. Dom. Anim.*, 39, 86-93.
90. ZAVOS, P. M. (1992): Preparation of human frozen-thawed seminal specimens using SpermPrep filtration method: improvements over the conventional swim up method. *Fertil. steril.*, 57, 1326-1330.

## 8. ŽIVOTOPIS

Rođen sam 25. lipnja 1983. godine u Velikoj Kladuši, Republika Bosna i Hercegovina, gdje sam proveo dio svoga djetinjstva i završio četiri razreda osnovne škole. Godine 1994. napuštam svoje rodno mjesto i zajedno s obitelji selim u Zagreb, gdje nastavljam svoje osnovnoškolsko obrazovanje koje završavam 1999. godine. Tijekom odrastanja i početkom školovanja u meni se probudila velika ljubav prema životinjama što je rezultiralo odlukom o pohađanju Srednje Veterinarske škole. Srednju Veterinarsku školu upisujem 1999. godine u Zagrebu. Tijekom srednjoškolskog obrazovanja pohađao sam praksu u Veterinarskoj ambulanti Dubrava, gdje je moja ljubav prema veterinarskoj struci još više porasla i postala još snažnija. Nakon završetka Srednje Veterinarske škole, 2003. godine upisujem Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Tijekom studija velik interes sam pokazao za malu praksu i želja mi je nakon diplome raditi u struci.