

POJAVNOST I KLINIČKO ZNAČENJE BLIZANAČKE GRAVIDNOSTI KOBILA NA KLINICI ZA PORODNIŠTVO I REPRODUKCIJU TIJEKOM DESETOGODIŠNJEG RAZDOBLJA

Manjkas, Iva

Master's thesis / Diplomski rad

2021

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:178:333716>

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

IVA MANJKAS

**POJAVNOST I KLINIČKO ZNAČENJE BLIZANAČKE
GRAVIDNOSTI KOBILA NA KLINICI ZA PORODNIŠTVO I
REPRODUKCIJU TIJEKOM DESETOGODIŠNJEG RAZDOBLJA**

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, 2021.

VETERINARSKI FAKULTET SVEUČILIŠTA U ZAGREBU
KLINIKA ZA PORODNIŠTVO I REPRODUKCIJU

Predstojnik Zavoda: prof. dr. sc. Marko Samardžija

Mentori: izv. prof. dr. sc. Iva Getz
prof. dr. sc. Nikica Prvanović Babić

Povjerenstvo za obranu diplomskog rada:

1. izv. prof. dr.sc. Silvijo Vince
2. prof. dr. sc. Juraj Grizelj
3. prof. dr.sc. Nikica Prvanović Babić
4. doc. dr. sc. Ivan Folnožić (zamjena)

Zahvaljujem se mentoricama izv. prof. dr. sc. Ivi Getz i prof. dr. sc. Nikici Prvanović Babić na velikoj podršci i pomoći pri izradi ovog rada.

Također se zahvaljujem izv. prof. dr. sc. Silviju Vince na pomoći oko statističke obrade podataka za ovaj diplomski rad.

POPIS SLIKA I TABLICA

Slika 1: Prikaz broja pregledanih i gravidnih kobila te blizanačkih gravidnosti u određenih tipova konja

Slika 2: Prikaz broja pregledanih i gravidnih kobila te blizanačkih gravidnosti u kobila pacijentica Klinike za porodništvo i reprodukcije tijekom desetogodišnjeg razdoblja

Slika 3: Prikaz postotka blizanačke gravidnosti u gravidnih kobila pojedinih pasmina

Slika 4: Živi blizanci Holstein kobile, četiri dana stari, lijevo muški, desno ženski

Tablica 1: Prikaz ukupne zastupljenosti blizanačke gravidnosti po pasminama i uzgojnom tipu

POPIS KRATICA

HH - hrvatski hladnokrvnjak

HP - hrvatski posavac

OH - ostale pasmine hladnokrvnjaka

EP - engleski punokrvnjak

AP - arapski punokrvnjak

L - lipicanac

OT - ostali toplokrvni konji

SADRŽAJ

| | |
|---|----|
| 1. UVOD..... | 1 |
| 2. CILJ ISTRAŽIVANJA..... | 2 |
| 3. PREGLED LITERATURE..... | 3 |
| 3.1 Fiziologija gravidnosti u kobila | 3 |
| 3.1.1 Rani embrionalni razvoj i razvoj plodnih ovojnica | 3 |
| 3.1.2 Majčinsko prepoznavanje gravidnosti | 4 |
| 3.1.3 Fiksacija zametka | 5 |
| 3.1.4 Spontana redukcija zametka tijekom blizanačke gravidnosti..... | 5 |
| 3.1.5 Pojava endometrijskih čašica | 6 |
| 3.1.6 Stvaranje fetoplacentarnog spoja..... | 7 |
| 3.1.7 Pomoćna žuta tijela..... | 7 |
| 3.1.8 Izlučivanje estrogena i prolaktina tijekom gravidnosti | 8 |
| 3.2 Dijagnostika gravidnosti u kobila..... | 9 |
| 3.2.1 Uzgojna metoda dijagnostike | 9 |
| 3.2.2 Kliničke metode dijagnostike..... | 10 |
| 3.2.3 Laboratorijske metode dijagnostike | 15 |
| 3.3 Blizanački graviditet..... | 18 |
| 3.3.1 Monozigotni blizanci | 19 |
| 3.3.2 Dvostruka ovulacija i ostali čimbenici učestalosti pojave blizanaca | 19 |
| 3.3.3 Ishodi blizanačke gravidnosti..... | 20 |
| 3.3.4 Dijagnostika blizanačke gravidnosti | 23 |
| 3.3.5 Metode redukcije blizanaca u gravidnih kobila | 24 |
| 4. Materijali i metode..... | 29 |
| 4.1 Statistička analiza | 29 |
| 5. Rezultati..... | 31 |
| 6. Rasprava | 36 |
| 7. ZAKLJUČCI | 39 |
| 8. SAŽETAK..... | 40 |
| 9. Summary..... | 41 |
| 10. Literatura | 42 |
| 11. Životopis | 46 |

1. UVOD

Kobile su izrazito uniparne i sezonski poliestrične životinje, te je u njih pojava blizanaca rijetka uz visoku stopu pobačaja ili mrtvorodenja. Ako ne dođe do prekida blizanačkog graviditeta u ranoj fazi, često dolazi do pobačaja u kasnoj fazi graviditeta. Naime, blizanački graviditet smatra se najučestalijim uzrokom pobačaja nezarazne etiologije u kobilama, sa stopom višom od 30 % pobačaja (MAKEK i sur., 2009.). U rijetkim slučajevima kobila iznese blizance do kraja graviditeta, no tada su plodovi uglavnom slabo razvijeni ili mrtvi. Porodi blizanaca u kobilama uglavnom su teški uz neželjene posljedice kao što su zaostala posteljica, produljena involucija maternice te metritis (BRINSKO i sur., 2013.). U skladu s prethodno navedenim, blizanački graviditet kobilama smatra se nepoželjnim. Većina su blizanaca dizigoti, odnosno nastaju kao rezultat multiplih ovulacija. Dosadašnjim istraživanjima došlo se do spoznaje da su multiple ovulacije, a time i učestalost pojave blizanaca u kobilama, češće u određenih tipova konja (toplokrvni konji) i pasmina konja (engleski punokrvnjak). Multiple ovulacije također su češće u starijih i slabije plodnih kobilama i omica nego kod kobilama u laktaciji (MILLER i WOODS, 1988., BRESIŃSKA i sur., 2004.).

Gledano s ekonomskog stajališta, važno je što prije dijagnosticirati blizanačku gravidnost s ciljem pravovremenog djelovanja, odnosno prekida takvog graviditeta ili redukcije jednog zametka. Najbolji rezultati intervencije postižu se dijagnosticiranjem graviditeta prije nidacije zametaka u maternici do koje dolazi 16. dana gravidnosti, kada je moguće primijeniti manualno gnječenje jednog od zametnih mjehura. Ukoliko se blizanački graviditet dijagnosticira nakon nidacije i nakon tvorbe endometrijskih čašica (do 30. dana graviditeta), jedan od blizanaca može se uspješno ukloniti transvaginalnom ultrazvučno vođenom punkcijom i aspiracijom (TUGA). Također postoje i druge metode uklanjanja plodova, kao što su energetska dijeta kobile te transabdominalna aplikacija KCl u srce jednog ploda.

Do pobačaja blizanaca u kobilama najčešće dolazi do 10. mjeseca ždrebosti, ali postoje i rijetki slučajevi kada kobila oždrijebi oba živa i vitalna ždrebeta.

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog diplomskog rada je analizirati učestalost javljanja blizanačke gravidnosti u kobilama koje su bile pacijentice Klinike za porodništvo i reprodukciju Veterinarskog fakulteta u Zagrebu u razdoblju od 2010. do 2019. godine te s pomoću prikupljenih podataka uvidjeti postoji li pasminska predispozicija za učestaliju pojavu blizanaca kod kobilama. Također će se u istraživanju obuhvatiti i analizirati ishodi svih blizanačkih graviditeta kobilama čije smo podatke prikupili u navedenom razdoblju. Dobiveni rezultati mogli bi pomoći veterinarima konjske prakse u vidu donošenja odluke o daljnjem postupanju nakon otkrivanja blizanačkog graviditeta u kobilama.

3. PREGLED LITERATURE

3.1 Fiziologija gravidnosti u kobila

Gravidnost je razdoblje koje započinje oplodnjom jajne stanice u jajovodu, a završava porodom. U kobila gravidnost prosječno traje oko 336 dana (MAKEK i sur., 2009.). Prvih 14 dana endokrinološki status gravidnih kobila jednak je onome negravidnih kobila u diestrusu zbog prisustva žutog tijela koje luči progesteron. Ako kobila nije gravidna, 14 do 15 dana nakon ovulacije endometrij otpušta prostaglandin-F₂ α (PGF-2 α), što dovodi do regresije žutog tijela i ulaska u estrus. Ako je kobila gravidna, žuto tijelo perzistira i nastavlja izlučivati progesteron koji je odgovaran za održavanje graviditeta. Proces koji sprječava luteolizu zbog prisustva i migracije ploda u maternici naziva se majčinsko prepoznavanje gravidnosti (BRINSKO i sur., 2013.). Zametni mjehurić stacionira se i fiksira otprilike 16. dana nakon ovulacije. Nakon fiksacije počinje postepeni proces stvaranja fetoplacentarnog spoja koji traje do 150. dana gravidnosti. Specifičnost konjske placente je u tvorbi endometrijskih čašica koje luče eCG (*equine chorionic gonadotropin*), a formiraju se od 25. dana do 70. dana kada dostižu svoju maksimalnu veličinu nakon čega podliježu degeneraciji i potpuno nestaju 130. dana graviditeta. Na jajnicima stvaraju se pomoćna žuta tijela koja se dijele na sekundarna i akcesorna te su lučenjem progesterona odgovorna za održavanje gravidnosti.

3.1.1 Rani embrionalni razvoj i razvoj plodnih ovojnica

Zametak se spušta niz jajovod, zatim od 5. do 7. dana nakon oplodnje ulazi u maternicu u stadiju morule, koja se sastoji od najmanje 32 blastomere i time započinje rani embrionalni razvoj u maternici. Porastom broja blastomera, tvorbom šupljine ispunjene tekućinom koja se naziva blastocelom te preraspodjelom stanica u dvije populacije dolazi do nastanka stadija blastule. Vanjski sloj stanica uokolo blastocela naziva se trofoblast stanica i od njega nastaje veći dio posteljice ploda, dok manja kompaktna, unutarnja masa stanica koja prominira u blastocel tvori zametak i neke od membrana. Specifičnost konjskog zametka je u tvorbi kapsule, ovojnice koja se nalazi na unutarnjoj strani zone pelucide i s vremenom postaje deblja dok zona pelucida iščezava. Smatra se da kapsula ima zaštitnu

ulogu te sudjeluje u majčinskom prepoznavanju graviditeta. Embrionalni razvoj nastavlja se u stadij gastrule u kojem se odvija proces premještanja predodređenih područja na mjesta iz kojih će se razviti određeni organi (MAKEK i sur., 2009.).

Paralelno s rastom zametka razvijaju se i plodne ovojnice: korion, žumanjčana vrećica, alantois, alantokorion i amnion. Zametak se na početku razvija između žumanjčane vrećice kao unutarnje membrane i koriona kao vanjske membrane. Alantois se pojavljuje u obliku vreće iz stražnjeg crijeva zametka te brzim rastom okružuje zametak i srasta s vanjskim korionom u ovojnicu koja se naziva alantokorion i s vremenom postaje posteljica. Alantois zamjenjuje žumanjčanu vrećicu do 45. dana (ALLEN i STEWART, 2001.).

3.1.2 Majčinsko prepoznavanje gravidnosti

Zametak ulazi u lumen maternice otprilike 6. dana nakon ovulacije i endokrinološki je aktivan te stvara enzime za sintezu prostaglandina E i F (PGE i PGF). U ranijoj fazi razvoja zametak izlučuje prostaglandin E koji mu pomaže u transportu iz jajovoda u maternicu, dok u kasnijoj fazi razvoja luči prostaglandin F za koji se smatra da potiče kontrakcije miometrija. Za razliku od drugih vrsta domaćih životinja u kojih zametak ostaje u jednom rogu maternice gdje slijedi majčinsko prepoznavanje gravidnosti, konjski je zametni mjehurić vrlo pokretan te se giba po cijeloj površini rogova i tijela maternice. Pokretljivost dostiže svoj vrhunac 11. ili 12. dana, no prisutna je do 16. dana. Pomicanje zametnog mjehurića je pasivno, odnosno ovisno je o kontrakcijama maternice, no dokazano je da sam zametak aktivno stimulira maternicu. Čimbenik koji sudjeluje u majčinskom prepoznavanju gravidnosti kod konja nije još identificiran, ali su *in vitro* istraživanja pokazala da plod izlučuje protein male molekularne težine koji sprječava endometrijsko stvaranje PGF2 α (BRINSKO i sur., 2013.). Ukoliko se spriječi pokretljivost ploda u pojedinim dijelovima maternice, doći će do kompromitiranja majčinskog prepoznavanja te spontane regresije žutog tijela uzrokovane pojačanim stvaranjem PGF2 α , odnosno do posljedice rane embrionalne smrtnosti (NOAKES i sur., 2001.).

Uzorak je motiliteta jednog zametka i zametaka blizanaca sličan. Zametci blizanaca uobičajeno se gibaju, neovisno jedan o drugome, iako se ponekad gibaju zajedno. Manji zametak češće se nalazi u tijelu maternice (MILLER I WOODS, 1988.).

3.1.3 Fiksacija zametka

Zametni mjehurić prestaje se kretati po maternici otprilike 16. dana nakon ovulacije, kada dolazi do procesa koji se naziva fiksacija zametka, a koji je vjerojatno rezultat zapinjanja mjehurića na bazi jednog roga uslijed povećanja njegova promjera. Proces fiksacije ne treba pomiješati s procesom stvaranja fetoplacentarnog spoja. Ubrzo nakon fiksacije zametni mjehurić mijenja oblik poprječnog presjeka, iz kružnog prelazi u trokutasti oblik, što je lako uočiti transrektalnim ultrazvučnim pregledom. Do promjene oblika zametnog mjehurića dolazi zbog zadebljanja (hipertrofije) dorzalnog svoda maternice (BRINSKO i sur., 2013.).

Fiksacija se najčešće događa na mjestu spoja tijela maternice i njezina roga, s češćom pojavom u desnom nego u lijevom rogu omica i slabije plodnih kobilica. Kod kobilica u laktaciji zametak će se najvjerojatnije fiksirati u prethodno negravidnom rogu. Fiksacija zametaka blizanaca događa se u isto vrijeme kao i fiksacija samo jednog zametka (16. dana poslije ovulacije). Češća je fiksacija oba blizanca u jedan rog (unilateralno), nego oba blizanca u oba roga (bilateralno), (MILLER I WOODS, 1988.).

3.1.4 Spontana redukcija zametka tijekom blizanačke gravidnosti

U kobilica postoji prirodni mehanizam koji učestalo spontano uklanja jednog od blizanaca. Na njegovo se postojanje posumnjalo kada su uočene nepravilnosti između omjera dvostrukih ovulacija i pojave blizanaca (19 % naspram 2 %). Kasnije se pretpostavilo postojanje mehanizma redukcije zametka kada se neuspješno pokušalo dobiti više zametaka za ispiranje maternice kobilica davateljica u postupku embriotransfera poticanjem višestruke ovulacije. Smatra se da je najčešća pojava spontane redukcije zametka nakon njegove fiksacije (16. dana). Ispostavlja se da prirodna redukcija nema negativan utjecaj na preživjeli zametak jer su stope gubitka graviditeta tijekom tog vremena slične, bilo da se radi o graviditetu s jednim plodom ili blizancima. Kobile gravidne s jednostranim blizancima imaju veću učestalost spontane redukcije nego one s dvostranim blizancima (89 % : 11 %). Nakon embrionalne faze (40. dana) veća je vjerojatnost da će doći do pobačaja i do gubitka oba ploda (MILLER I WOODS, 1988.).

3.1.5 Pojava endometrijskih čašica

Subpopulacija stanica trofoblasta konjskog zametka diferencira se između 25. i 36. dana nakon ovulacije i stvara traku avaskularnog tkiva koja okružuje plod i naziva se korionski pojas. Za razliku od ostatka trofoblasta placente kobile, stanice korionskog pojasa počinju invadiranje na maternični epitel do 35. dana. U periodu od 48 sati stanice pojasa migriraju preko epitela maternice u endometrijsku stromu gdje stvaraju čvoriće vrlo diferenciranog tkiva, promjera 0.5 – 1.0 cm, nazvanog endometrijske čašice. Skupina endometrijskih čašica formira prsten na bazi gravidnog roga maternice. Tijekom procesa epitel endometrija uništava se, no ubrzo se regenerira i pokriva lumen endometrijskih čašica do 45. dana, ostavljajući ih potpuno odvojene od posteljice. Stanice korionskog pojasa luče eCG (*equine chorionic gonadotrophin*) od 33. do 120. dana graviditeta. Vrhunac proizvodnje eCG-a je između 55. i 70. dana te se podudara s maksimalnom veličinom endometrijskih čašica. Regresija čašica počinje između 80. i 90. dana, a njihovo odljučeno nekrotično tkivo tvori alantokorionske vrećice koje leže slobodno u lumenu maternice i strše u alantoisnu šupljinu (LUNN i sur., 1997.).

Ekstrahipofizalni hormon eCG, poznat i kao PMSG (*pregnant mare serum gonadotropin*) ili SŽK (serum ždrijebnih kobila), djeluje poput folikulostimulirajućeg hormona (FSH) i luteinizirajućeg hormona (LH). Općenito se smatra da potiče formiranje akcesornih žutih tijela i regulira lutelnu steroidogenezu u udruženom djelovanju s hipofizealnim gonadotropinima (NOAKES i sur., 2001.). Stvaranje endometrijskih čašica ima važnu ulogu u ranoj embrionalnoj smrtnosti. Ukoliko dođe do prekida gravidnosti prije formiranja endometrijskih čašica (36. do 40. dan), unutar kratkog vremena (manje od mjesec dana) kobila se vraća u estrus. Suprotno, ako dođe do prekida graviditeta nakon formiranja endometrijskih čašica, nastaviti će stvaranje eCG-a i kobila se neće moći vratiti u ciklus iduća tri mjeseca, kada će doći do degeneracije čašica i posljedične regresije pomoćnih žutih tijela. Uz to, kobila koja je izgubila plod nakon 36. do 40. dana gravidnosti, bit će pozitivna na testove gravidnosti koji uključuju detekciju eCG-a iduća tri mjeseca zbog njihove razine u krvi, iako kobila nije više gravidna. Ponavljajućim injekcijama $PGF_2\alpha$ može se uzrokovati regresija pomoćnih žutih tijela te vraćanje u estrus kobila koje su pobacile nakon 40. dana graviditeta, ali je estrus rijetko plodan uz prisustvo endometrijskih čašica. Veliki je problem u ponovnim pokušajima rasplodivanja kobile koja ima endometrijske čašice zaostale nakon pobačaja nemogućnost folikula da ovuliraju, čak i ako je kobila tretirana ponavljajućim

injekcijama $PGF_{2\alpha}$. Zabilježeno je da takve kobile ovuliraju folikule manje od normale veličine, luteiniziraju folikule koji nisu ovulirali ili tvore strukture slične hemoragičnim anovulatornim folikulima (BRINSKO i sur., 2013.).

3.1.6 Stvaranje fetoplacentarnog spoja

Nakon fiksacije, odnosno učvršćivanja zametka 16. dana nakon ovulacije, dolazi do postepenog procesa stvaranja fetoplacentarnog spoja, koji obuhvaća direktno vezanje vaskulariziranog trofoblasta na epitel maternice do 25. dana, interdigitaciju mikrovila trofoblasta i epitela maternice 38. do 40. dana, pojavu fetalnih makrovila oko 45. dana koji se pretvaraju u mikrokotiledone. 150. dana graviditeta prisutni su dobro razvijeni mikroplacentomi nastali spajanjem mikrokotiledona ploda s mikrokarunkulima majke. Svaki mikroplacentom opskrbljen je pozamašnom arterijom s majčine strane i ekvivalentnom venom s fetalne strane kako bi se povećala razmjena nutrijenata i otpadnih produkata preko krvnih kapilara između zametnih i majčinskih epitelnih slojeva. Između mikroplacentoma nalaze se prostori u obliku areola u koje se sakuplja bjelančevinama bogat sekret izlučen iz endometrijskih žlijezda. Stanice trofoblasta u tim se regijama pseudostratificiraju te su posebno prilagođene uzimanju i apsorpciji egzokrinih tvari kao sekundarnom obliku prehrane brzo razvijajućeg ploda (ALLEN i STEWART, 2001.).

Fetoplacentarni spoj sintetizira i otpušta visoke doze progestina (primarno 5α -pregnana) u cirkulaciju majke tijekom srednje do kasne gravidnosti. Progestini se u majčinoj cirkulaciji najranije pojavljuju između 30. i 60. dana i postepeno se povećava njihova koncentracija do 300. dana gravidnosti. Njihovo stvaranje neizostavno je za održavanje graviditeta srednje do kasne gestacije. Istraživanja koja su uključivala ovariotomije tijekom različitih stadija gravidnosti dovela su do zaključka kako je jajnik ključan izvor progesterona do 70. dana gestacije, no nakon 100. do 140. dana nije nužan (BRINSKO i sur., 2013.).

3.1.7 Pomoćna žuta tijela

Jajnici počinju razvijati pomoćna žuta tijela oko 40. dana graviditeta pod kontrolom hipofize i endometrijskih čašica. Kao odgovor na povećanu razinu eCG-a dolazi do povećanog stvaranja progesterona koji luče sekundarna žuta tijela (nastala iz ovulacija nakon

40. do 70. dana) i akcesornih žutih tijela (nastalih luteinizacijom postojećih folikula nakon 40. do 150. dana). Sekundarna i pomoćna žuta tijela zajednički se nazivaju pomoćnim žutim tijelima. Ona dodatno proizvode progesteron koji zajedno s progesteronom primarnog žutog tijela podržava fetus tijekom prvih pet mjeseci graviditeta. Sva su žuta tijela degenerirana 150. do 200. dana gestacije jer je do tada posteljica preuzela ulogu jedinog izlučivača progestina, a time i održavanja graviditeta do poroda. U rijetkim slučajevima kobile ne razviju pomoćna žuta tijela, te je taj fenomen opisan kao jedan od potencijalnih uzroka pobačaja u kobilu prije 100. do 150. dana graviditeta. Tijekom prijelaza ovisnosti graviditeta o progesteronu kojega luči jajnik na placentalni progestin kobilu može biti u povećanoj opasnosti od pobačaja uzrokovanih štetnim utjecajima okoliša. Od 70. do 150. dana može doći do pobačaja zbog stresnih čimbenika kao što su pretjerana vježba, prijevoz, surovo vrijeme ili majčinske bolesti (BRINSKO i sur., 2013.).

Ukoliko se izvrši ovariektomija između 25. i 45. dana graviditeta, kobilu će pobaciti ili resorbirati plod. Kada se postupak izvodi nakon 50. dana gestacije, odgovor na njega može biti različit, dok će se graviditet neprekidno nastaviti do poroda ukoliko se postupak izvrši između 140. i 210. dana. Iako postoji dokaz o postojanju progesterona koji nije proizvod jajnika već nakon 50. dana gestacije, tek od 140. dana jajnici nisu više potrebni za očuvanje graviditeta (NOAKES i sur., 2001.).

3.1.8 Izlučivanje estrogena i prolaktina tijekom gravidnosti

Koncentracije ukupnih estrogena u perifernoj cirkulaciji tijekom prvih 35 dana graviditeta slične su onima u diestrusu, iako embrij privremeno stvara estrogen od 12. do 20. dana. Nakon toga se razina estrogena povećava te dostiže vrhunac između 40. i 60. dana, u vrijednostima nešto višim u odnosu na one neposredno prije ovulacije, odnosno oko 3 ng/ml, a povišenje vrijednosti dovodi se u vezu s povećanim razvojem folikula uzrokovanog lučenjem eCG-a. Poslije 60. dana povišenje njihove koncentracije najvjerojatnije je posljedica aktivnosti ploda ili posteljice. Maksimalne vrijednosti zapažene su oko 210. dana, kada su glavni izvor estrogena gonade ploda, a postupno opadaju približavanjem vremena poroda nakon kojega slijedi nagli pad njihove koncentracije. Glavni estrogeni u kobilu su estron i ketonski steroid ekvilin, dok su estradiol-17 β , estradiol-17 α i ekvilenin također prisutni. Razine prolaktina ne pokazuju posebne uzorke jer postoje značajne razlike između

kobila, no postoje dokazi koji ukazuju na njihovo lagano povišenje prema kraju gravidnosti (NOAKES i sur., 2001.).

3.2 Dijagnostika gravidnosti u kobila

Rana dijagnostika gravidnosti u kobila ima sve veće značenje u suzbijanju neplodnosti i/ili smanjene plodnosti. Kod kobila je relativno učestala pojava rane embrionalne smrtnosti koja dodatno smanjuje njihovu plodnost (MAKEK i sur., 2009.). U slučajevima blizanačkog graviditeta u interesu nam je što ranije ga dijagnosticirati s ciljem uklanjanja jednog ploda ili namjerno uzrokovanog prekida gravidnosti kako bi se kobila čim prije vratila u redoviti ciklus.

Postoji nekoliko metoda dijagnostike graviditeta dostupnih veterinarima, a dijele se u uzgojnu, kliničke i laboratorijske metode. Izbor metode ovisi o dostupnosti opreme, iskustvu veterinarima i stadiju graviditeta (BRINSKO i sur., 2013.).

3.2.1 Uzgojna metoda dijagnostike

Negravidna kobila trebala bi pokazivati promjene u ponašanju te znakove tjeranja otprilike 16 do 20 dana nakon ovulacije (BRINSKO i sur., 2013.). Izostanak vanjskih znakova estrusa pozitivan je znak ždrebnosti kobile. Pokazivanje znakova estrusa obično zahtijeva prisutnost pastuha, iako neke kobile reagiraju i na kastrate (NOAKES i sur., 2001.). Ova uzgojna metoda ima mnogo nedostataka, a najznačajniji su lažno pozitivni nalazi. Ukoliko kobila uz sebe ima ždrijebe, veća je vjerojatnost da će se tiho tjerati ili će zbog laktacije biti u anestrusu, koji može biti izazvan i okolišnim čimbenicima. Nalaz će biti lažno pozitivan i kada je kobila u produženom diestrusu, a nije koncipirala, te ukoliko ima produženu lutealnu fazu povezanu s embrionalnom smrtnošću. Lažno negativni nalazi će se pojaviti kod malog broja kobila koje pokazuju znakove estrusa u vrijeme izvođenja probe iako su gravidne. Što se tiče blizanačkog graviditeta, ovom metodom ni na koji način ne možemo ga utvrditi.

3.2.2 Kliničke metode dijagnostike

Kliničke metode dijagnostike ždrebnosti obuhvaćaju vaginalnu, rektalnu i ultrazvučnu pretragu.

Vaginalna dijagnostika

Vaginalna pretraga s pomoću spekuluma ili dilatatora vrši se 18 do 21 dan nakon ovulacije, često zajedno s rektalnom pretragom reproduktivnog trakta. Indicirana je ukoliko je nalaz rektalne pretrage dvojbena. Smatra se nespecifičnom metodom dijagnostike gravidnosti jer ukazuje na povišenu razinu progesterona kojega luči funkcionalno žuto tijelo (BRINSKO i sur., 2013.). Vaginalni nalaz je osobito vrijedan u negativnoj fazi gravidnosti, odnosno u 5., 6. i 7. mjesecu ždrebnosti, kada se maternica spusti u abdomen i teško ju je rektalno doseći (MAKEK i sur., 2009.).

Promatraju se sluznice rodnice (vagine) i grlića maternice (cerviksa). Kod kobilu u ranom stadiju graviditeta rodnica i cerviks su prekriveni blijedim, suhim mukoznim membranama. Cerviks je zatvoren i izgleda poput onoga u kobila koje su u diestrusu. Napretkom graviditeta vanjski otvor cerviksa postaje prekriven ljepljivom, suhom sluzi i smješten je ekscentrično. U kasnijem stadiju graviditeta (nakon šest mjeseci) cerviks može biti vrlo opušten (PYCOCK i sur., 2007.). U kasnijem stadiju gravidnosti (od 5. mjeseca) rodnica je izdužena, vanjski otvor cerviksa je dorzalno usmjeren. Sluznica je i dalje suha, ali sluz postupno postaje vodenasta i ima konzistenciju meda. Na početku druge polovice ždrebnosti dobro je izražena krvožilna mreža u stijenci rodnice, s osobito izraženim venama. Poslije 8. mjeseca smanjuje se dužina rodnice jer se maternica podiže iz trbušne šupljine. U posljednjem mjesecu ždrebnosti uočljivo se mijenja vaginalna slika, sluznica postaje tamnocrvena, a sluz je vodenastija. Cerviks je crvenkast i oblika stošca, dok mu je vanjski otvor izražen (MAKEK i sur., 2009.).

Lažno pozitivni nalaz može se postaviti tijekom ranog graviditeta zbog nerazlučivosti vaginalne sluznice gravidnih i kobilu u diestrusu. Do pogreške također može doći prilikom pojave produžene lutealne faze i pseudogravidnosti (NOAKES i sur., 2001.).

Rektalna dijagnostika

Palpacija reproduktivnog trakta preko rektuma bila je najčešća i najbrža metoda dijagnostike gravidnosti prije pojave transrektalnog ultrazvuka. Njome se može dijagnosticirati graviditet u bilo kojoj fazi nakon 18. do 20. dana (BRINSKO i sur., 2013.).

Prisutnost folikula tijekom trećeg tjedna nakon pripusta ili osjemenjivanja ne mora nužno značiti da se kobila vraća u ciklus. Folikuli su uobičajeno prisutni tijekom prva tri mjeseca graviditeta i znatno pridonose veličini jajnika. Tonus maternice je naglašen od 17. do 21. dana graviditeta, kada se rogovi maternice palpiraju kao elastični cjevasti organi. Ukoliko se ne može ispalpirati proširenje uzrokovano plodom, pojačani tonus tumači se kao moguća gravidnost. Tijelo i negravidni rog maternice zadržavaju tonus najmanje do 50. dana graviditeta. Palpacija zametka najranije je moguća između 17. i 21. dana, kada je prisutno malo proširenje od 2.4 do 2.8 cm u promjeru ili je prisutna „praznina“ u inače toničnom rogu. Lakše se može osjetiti između 21. i 30. dana, no i dalje se može procijeniti samo kranioventralni dio proširenja. 25. dana proširenje zametka je veličine 3 – 3.4 cm, 30. dana 3 – 4 cm, dok mu je promjer 4.5 – 6 cm 30. dana i 6 – 7 cm 40. dana, odnosno veličine je teniske loptice. Nadalje, nemoguće je obuhvatiti cijelo proširenje dlanom ruke. Do 60. dana postaje ovalnog oblika i veličine je 13 x 9 cm, dok je do 90. dana povećana na otprilike 23 x 14 cm. Postoji prirodna razlika u veličini proširenja zametka kod kobila slične veličine i datuma ovulacije zahvaljujući volumenu prisutnih fetalnih tekućina. Međutim, proširenje koje se ispostavlja premalo za navedeni stadij graviditeta trebalo bi ponovno pregledati kasnije kako bi se isključila mogućnost resorpcije (stoga bi praktičar trebao imati zapisane podatke nalaza za kasniju usporedbu). Zametci blizanaca mogu se identificirati do 60. dana. Nakon toga, jedan plod će vjerojatno obuhvatiti oba roga i proširenje će se raširiti. Trebalo bi pripaziti kako se napunjeni mokraćni mjehur ne bi zamijenio s gravidnom maternicom tijekom 70. do 100. dana, ili napuhnutim debelim crijevom između 90. i 120. dana; u sumnji je najbolje potražiti jajnike kako bi se pronašla anatomska veza između njih i maternice preko njihovih ligamenata. Oko 100. dana je često moguće izazvati protuudar ploda („balotman“) jer on pluta unutar plodne tekućine tijela maternice. Rast zametka i smanjenje napetosti plodnih vreća onemogućuju palpaciju dijelova ploda u tijelu maternice nakon kraja 4. mjeseca pa nadalje (NOAKES i sur., 2001.).

Krajem 4. mjeseca može se osjetiti treperenje arterije uterine medije na strani gravidnog roga, koje postaje izrazitije u 5. mjesecu ždrebosti. Prednji brid širokog

materničnog ligamenta postaje napet i mijenja pravac, odnosno polaže se okomito, što je važan simptom za dijagnostiku gravidnosti. 5., 6. i 7. mjesec ždrebnosti nazivaju se negativnom fazom graviditeta jer se zbog svoje težine gravidna maternica spušta na ventralnu trbušnu stijenku i pokrivena je zavojima tankog crijeva i kolona, te se stoga teško palpira. Plod se može osjetiti preko balotmana, a dobro se osjeća treperenje arterije uterine medije. Palpiraju se i jako napeti okomiti maternični ligamenti kod kojih se prednji brid spušta koso u kranioventralnom pravcu. Pred kraj 7. mjeseca graviditeta plod se počinje dizati prema zdjelici, koja postaje sve veća, kao i maternica, a lagano se palpiraju pomični dijelovi ploda. Od 8. mjeseca ždrebnosti (240. dana) ponovno je moguće osjetiti gravidnu maternicu koja se diže prema zdjelici, ali i plod jer uslijed njegova rasta dolazi do smanjenja količine plodnih voda te se lagano palpira. Pred kraj gravidnosti plod se nalazi neposredno pred ulaz u zdjelicu, a ponekad njegovi dijelovi ulaze u nju. Na osnovi veličine ploda može se procijeniti u kojoj je fazi gravidnosti kobila, no ne može se odrediti sa sigurnošću samo na osnovi rektalne pretrage (MAKEK i sur., 2009.).

Lažno se pozitivni rezultati rektalne pretrage mogu dobiti kada se, u rijetkim slučajevima, gravidnost zamjeni s piometrom ili, u vrlo ranim stadijima, kada je prisutnost tonusa maternice rezultat nedovršene involucije, pa se smatra da kobile mogu biti gravidne jer su pripuštene u ždrebećem estrusu. Također lažno pozitivni rezultat je i u kobila koje razviju pseudogravidnost uslijed rane embrionalne smrtnosti uz očuvanje primarnog žutog tijela. Ne treba zaboraviti ni to da kobile mogu resorbirati nakon embrionalne ili fetalne smrti ili pak abortirati nakon što im je potvrđena gravidnost. Lažno negativni rezultati mogu se dobiti ukoliko je došlo do zabune oko službenih podataka, npr. krivo upisani datum pripusta ili nepotpuno palpiranje maternice (NOAKES i sur., 2001.).

Ultrazvučna dijagnostika

Prava revolucija u istraživanju reprodukcije kobila i menadžmentu ergela dogodila se 1980. godine u Francuskoj, kada je dr. Eric Palmer posudio ultrazvučni aparat svoga oca ginekologa te hrabro umetnuo pozamašnu linearnu sondu od 3.5 MHz u rektum jedne od svojih eksperimentalnih kobila. Tada je isprva vidio sliku poprječnog presjeka jajnika i maternice, s velikim folikulom ispunjenim tekućinom, a kasnije sferični zametak ispunjen tekućinom, koji se slobodno kretao po šupljini maternice u ranom stadiju graviditeta. Nakon što se shvatila efikasnost pregleda kobila ultrazvučnim uređajima, njihovi proizvođači počeli su proizvoditi manje i lakše prenosive uređaje koji mogu raditi na baterije, imaju manje

sonde za lakši ulazak u rektum te imaju povećanu snagu ultrazvučnih valova, koji se danas kreću od 3.5 do 12 MHz. Time se postigla mogućnost povećavanja ili smanjenja dubine prolaženja valova kroz tkivo i znatno se poboljšala jasnoća i kvaliteta slike na zaslonu. Mnogi uređaji danas kao dodatak tzv. B-modu imaju mogućnosti spektralnog Dopplera koji im omogućuju procijeniti protok krvi u reproduktivnom traktu. Mogu odrediti odsutnost, prisutnost, smjer i količinu protoka krvi, kako bi se procijenio razvoj žutog tijela, predvidjela ovulacija, ukazala prisutnost fetalne cirkulacije u ranoj gravidnosti i izmjerio indeks protoka krvi u materničnoj arteriji tijekom gravidnosti (ALLEN i WILSHER, 2018.).

Najpouzdanija metoda dijagnostike ranog graviditeta u kobilama je transrektalna ultrazvučna dijagnostika. Zametni mjehur može se uočiti već 9. ili 10. dana nakon ovulacije s pomoću visokokvalitetnog ultrazvučnog uređaja s transrektalnom sondom jakosti 5 do 8 MHz, kada mu je promjer 3 do 4 mm i u 60 % slučajeva nalazi se u tijelu maternice (BRINSKO i sur., 2013.). Fiksacija zametnog mjehura za bazu roga događa se 16. dana, tada mu je promjer između 19 i 24 mm (NOAKES i sur., 2001.). Početni rutinski pregledi gravidnosti izvode se između 12. i 16. dana nakon ovulacije. Ultrazvučna pretraga izvođena 16. dana ili prije korisna je u svrhu otkrivanja i daljnjeg menadžmenta blizanaca, zakazivanja ponovnog pripusta ili umjetnog osjemenjivanja praznih kobilama ili ranog otkrivanja problema povezanih s graviditetom. Temeljiti i sustavni pristup ultrazvučnoj dijagnostici graviditeta imperativ je u točnom otkrivanju stadija graviditeta te detekciji blizanaca. Preporučuje se skeniranje cijele maternice u jednom neprekinutom potezu kako bi se izbjeglo izostavljanje pojedinih dijelova maternice. Najčešće lokacije pri izostavljanju dijelova maternice u pretrazi su kaudalno tijelo maternice koje graniči s cerviksom ili vrh roga maternice. Ultrazvučni prikaz konjskog zametka mijenja se iz okruglog oblika (12. do 16. dan) do trokutastog oblika (17. do 21. dan). Stopa rasta zametnog mjehura postiže plato između 17. i 24. dana, nakon čega dolazi do laganog smanjenja stope rasta. Zametni mjehur u razvoju ima nepravilan oblik od 25. do 35. dana graviditeta. Preporuka je ponoviti rutinsku ultrazvučnu pretragu između 25. i 35. dana nakon ovulacije kako bi se potvrdio nastavak graviditeta i prisutnost otkucaja srca ploda. Također je važno kontrolnim pregledom isključiti blizanačku gravidnost, jer su zabilježeni slučajevi blizanačkog graviditeta ili pobačaja kod kobilama kojima je primijećen samo jedan zametni mjehur prilikom pretrage na gravidnost oko 14. dana (McCUE i McKINNON, 2011.). Zametak se može vidjeti oko 20. dana, a ovisno o kvaliteti i rezoluciji UZV uređaja te iskustvu praktičara, najranije 22. dana gravidnosti može se vidjeti i rad srca (*ictus cordi*). Od 21. do 40. dana zametak se postupno

diže jer se počinje puniti alantoid s njegove ventralne strane. Žumanjčana vreća, koja se nalazi s dorzalne strane, postupno regresira. 25. dana gravidnosti zametak je dugačak 5 mm, a raste otprilike 1 mm dnevno, te je 35. dana dugačak 17 mm, a 40. dana 22 mm. Tada je zametak najviše podignut unutar mjehura, nakon čega se postupno spušta i drži za pupčani tračak, a između 45. i 50. dana se spušta ventralno (MAKEK i sur., 2009.).

Uz otkrivanje gravidnosti moguće je utvrditi i spol ždrjebeta, no to osim vrlo kvalitetne oprema zahtijeva i određeno iskustvo kliničara s transrektalnom UZV pretragom te interpretacijom dobivenih slika. Metoda se zasniva na određivanju veze između genitalnog tuberkula i okolnih struktura. Genitalni tuberkul je embrionalna preteča penisa u mužjaka, odnosno klitorisa u ženki. Kako se zametak razvija, tako se tuberkul pomiče sa svoje pozicije između zadnjih nogu bliže repu kod ženki, te prema pupčanoj vrpici kod mužjaka. Optimalno vrijeme za utvrđivanje spola je između 59. i 68. dana graviditeta, no zabilježeni su rezultati uspješnosti postupka sve do 99. dana, nakon kojeg postaje znatno teže utvrditi spol (NOAKES i sur., 2001.).

U slučaju blizanačke gravidnosti uobičajeno se vide oba zametna mjehura 14. dana, čak i ako je drugi zametak podrijetla kasnije ovulacije. Ta činjenica, uz pokretljivost i relativno malu veličinu plodova, čini 14. do 15. dan graviditeta optimalnima za utvrđivanje i intervenciju blizanačke gravidnosti. Važno je shvatiti da ukoliko blizanačka gravidnost potječe od asinkronih ovulacija, vjerojatno će jedan plod biti veći od drugoga, no unatoč tome nije ga preporučljivo ostaviti. Postoji mogućnost zabune materničnih cista s blizanačkom gravidnosti. Idealno bi bilo kada bi kobila već bila pregledana prije rasplodivanja, no to nije uvijek moguće. Stoga se preporuča, u takvim slučajevima, ultrazvučno pregledati kobilu idući dan nakon prvog pregleda (14. ili 15. dan), s ciljem utvrđivanja promjene smještaja ploda ili rasta zametka. Navedena strategija trebala bi omogućiti razlikovanje ploda od ciste prije unilateralnog učvršćivanja plodova blizanaca (PYCOCK i sur., 2007.).

Transabdominalna ultrazvučna pretraga dozvoljava maksimalnu vizualizaciju zametka i placente, a najbolje je primjenjiva između 60. i 80. dana gravidnosti. U tu se svrhu koriste zakrivljene sonde nižih frekvencija (2.5 do 3.5 MHz) koje ponekad dozvoljavaju procjenu maternice i u području prepona. U kasnijoj fazi graviditeta potrebno je maksimalno prodiranje u ventralni abdomen. Često su vidljive fetalne strukture kao što su lubanja, noge i rebra, ili ovojnice, što pomaže u identificiranju gravidne maternice. Lociranje plodove

lubanje ili prsnog koša također pomaže u orijentaciji. Pri određivanju normalnosti procjenjuju se otkucaji srca i kretanje ploda, količina i karakteristike alantoisne i amnijske tekućine, maternično-placentalna debljina te dokaz o odvojenosti između maternice i posteljice. Također je moguć i pregled blizanačkih plodova ukoliko postoji sumnja (BRINSKO i sur., 2013.).

3.2.3 Laboratorijske metode dijagnostike

Opisan je niz testova za dijagnostiku gravidnosti kod kobilica, uključujući biološke, kemijske i imunološke testove. Navedeni testovi izvode se na krvnom serumu i plazmi, mlijeku i izmetu. Većina ih procjenjuje koncentraciju eCG-a u serumu ili estrogene u krvi ili urinu. Prije pojave imunoloških testova koristili su se biološki testovi na laboratorijskim životinjama, pticama, vodozemcima, pa čak i na biljkama, kako bi se otkrila prisutnost eCG-a, estrogena ili drugih faktora prisutnih u krvi ili urinu ždrebničkih kobilica (McCUE i McKINNON, 2011.).

3.2.3.1 Hormonski testovi

RIA (*radioimmunoassay*) i ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) trenutno se koriste za mjerenje razine hormona u krvi s ciljem utvrđivanja gravidnosti i nadziranja fetalno-placentalnog zdravlja. Najtočnija dijagnoza graviditeta postiže se kombinacijom više endokrinoloških parametara. Svi testovi pojedinačno imaju ograničenja u vidu lažno pozitivnih i lažno negativnih rezultata. Hormon ili neki drugi faktor smatra se izravnim pokazateljem gravidnosti ukoliko mu je izvor ograničen na zametak i/ili posteljicu (McCUE i McKINNON, 2011.).

Dokazivanje prisutnosti eCG-a

Pronalaženje povišenih razina konjskog korionskog gonadotropina (eCG), ranije poznatoga kao PMSG, odnosno gonadotropin seruma ždrijebničkih kobilica, u krvi kobilica može poslužiti kao izravni pokazatelj njihove gravidnosti. Proizvode ga endometrijske čašice oko 35. dana graviditeta, a njegova povišena razina u krvi može se izmjeriti između 35. i 42. dana, dok maksimalnu razinu postiže između 55. i 70. dana gravidnosti. Do potpune regresije čašica i odsutnosti eCG-a dolazi između 100. i 140. dana gravidnosti. Kobilica koja nosi blizance može imati izrazito povišenu razinu eCG-a, dok kobilica koja nosi zametak mule ili mazge može imati vrlo nisku ili neprepoznatljivu razinu eCG-a zbog ranog imunološkog

odbacivanja endometrijskih čašica. Postoje dva glavna problema vezana uz korištenje razine eCG-a kao pokazatelja gravidnosti. Prvi je lažno negativna dijagnoza, odnosno nije dokazan eCG kod kobila koje su ždrebne, do čega može doći ukoliko se uzima krv kobile prije 35. dana kada još nije došlo do formiranja endometrijskih čašica, ili poslije 120. dana, nakon njihove redukcije. Drugi problem je lažno pozitivna dijagnoza, kada je uočena povišena razina eCG-a kod kobile koja nije ždrebna, do čije pojave može doći uzimanjem krvi kobile koja je izgubila gravidnost nakon formiranja endometrijskih čašica. Naime, takve kobile se ne vraćaju u estrus sve do potpune degeneracije čašica te regresije svih žutih tijela. Nadalje, otkrivanje povišene razine eCG-a u krvi kobile samo će potvrditi prisutnost endometrijskih čašica i ne ukazuje na stanje gravidnosti ili zdravlje zametka. Zabilježena je i prisutnost endometrijskih čašica s produženim izlučivanjem eCG-a koju prati pobačaj u idućoj sezoni, nakon gravidnosti s porodom u terminu (McCUE i McKINNON, 2011.).

Određivanje progesterona u krvi i mlijeku

Glavni izvori progesterona prva tri mjeseca ždrebosti su primarno žuto tijelo te akcesorna žuta tijela koja su specifična za fiziologiju gravidnosti kobila. Nakon toga glavni izvor postaje fetoplacentarni spoj koji tijekom srednje i kasne gravidnosti u kobila sintetizira progesterin (5α -pregnan) u velikim količinama i izlučuje ga u cirkulaciju majke. Koncentracija progesterona u perifernoj cirkulaciji nakon ovulacije i formiranja primarnog žutog tijela (do 6. dana) naraste do 7 ng/ml. Na tim se vrijednostima zadržava ili lagano pada do 4. tjedna ždrebosti. Zbog tvorbe akcesornih žutih tijela između 40. i 60. dana koncentracija dalje raste i dostiže maksimum od 10ng/ml između 60. i 140. dana gravidnosti, nakon čega počinje padati i ostaje niska (ispod 1 ng/ml) do 300. dana, kada opet poraste. Određivanje koncentracije provodi se 18 do 20 dana nakon ovulacije, a visoka razina progesterona upućuje na postojanje žutog tijela na jajniku, odnosno gravidnost. Ukoliko je prisutno perzistentno žuto tijelo na jajniku uslijed rane embrionalne smrtnosti ili ako je nastalo spontano, dobit ćemo lažno pozitivni rezultat (MAKEK i sur., 2009.).

Određivanje estrogena

Prvobitni testovi za utvrđivanje gravidnosti kobila na temelju razine estrogena bili su kemijski testovi provedeni na uzorcima urina. Kasnije su provedeni biološki testovi utvrđivanja ždrebosti kobila na miševima i štakorima. Danas se koriste imunološke metode mjerenja razine ukupnih ili konjugiranih estrogena. Do prvotnog povišenja njihove razine dolazi između 35. i 40. dana gravidnosti. Prvo povišenje estrogena uzrokovano je njihovim

stvaranjem u jajnicima. Lučenje eCG-a od strane endometrijskih čašica odgovorno je za poticanje žutog tijela na stvaranja estrogena, no to rano povišenje estrogena ne može se uzeti u obzir kao direktan pokazatelj ždrebnosti kobilu. Drugo povišenje razine estrogena počinje nakon 55. dana gravidnosti, a izvor mu je fetoplacentarni spoj. Uzorak lučenja estrogena tijekom ove faze gravidnosti prati uzorak razvoja fetalnih gonada. Koncentracije estrogena povisuju se krajem prvog tromjesečja, dosežu vrhunac između 210. i 240. dana te se postupno snižavaju tijekom ostatka graviditeta. Posljedično se povišenje koncentracije estrogena nakon 70. do 80. dana gravidnosti može koristiti kao izravni pokazatelj ždrebnosti. Mjerenje razine estrogena nakon trećeg mjeseca gravidnosti također se može koristiti i za utvrđivanje vitalnosti ploda. Fetalna smrtnost vodi do brzog opadanja razine ukupnih i konjugiranih estrogena. Utvrđivanje razine estron-sulfata (konjugiranog estrogena) u urinu ili serumu je osnova nekolicine testova za utvrđivanje gravidnosti na terenu (MAKEK i sur., 1993., McCUE i McKINNON, 2011.).

Određivanje relaksina

Relaksin je proteinski hormon kojega u kobila prvenstveno proizvodi posteljica, koja ga počinje izlučivati oko 80. dana gravidnosti. Koncentracija relaksina dostiže vrhunac između 176. i 200. dana gravidnosti i ostaje povišena do poroda, nakon čega se ubrzano smanjuje uslijed izbacivanja posteljice. Mjerenje razine relaksina koristi se kao pokazatelj ždrebnosti te kao biomarker placentalne funkcije u kobila (McCUE i McKINNON, 2011.).

3.2.3.2 Ostali testovi

Čimbenik rane gravidnosti (EPF – early pregnancy factor)

Imunosupresivni glikoprotein nazvan čimbenik rane gravidnosti prvi je put zabilježen u miševa, a nakon toga uočen je u mnogih vrsta sisavaca. U prvim istraživanjima EPF je uočen u krvi majke s pomoću testa inhibicije rozete (RIT – *rosette inhibition test*), 7. do 10. dana nakon ovulacije. Test se izvodio prije i poslije parenja kobilu, u kobila davateljica prije i poslije ispiranja, te u kobila primateljica nakon transfera. Zabilježen je porast razine EPF-a povezanog s graviditetom 2. dana nakon ovulacije u pripuštenih kobilu. U kobila davateljica zabilježen je pad aktivnosti EPF-a do razine kao u negravidnih kobilu dva dana nakon postupka ispiranja zametka, dok se u kobila primateljica razina EPF-a povećala dva do tri dana nakon primanja embrija uz naknadnu ultrazvučnu potvrdu gravidnosti. Primijećena su dva modela aktivnosti EPF-a u kobila primateljica koje nisu ostale ždrebne. Jedan model obuhvaća nisku razinu EPF--a nakon transfera što ukazuje kako

zametak tada nije bio vitalan. U drugom modelu aktivnost EPF-a porasla je dva dana nakon transfera, no potom se posljedično smanjila do negravidne razine do 5. dana. Čimbenik rane gravidnosti najranije je uočen 24 do 72 sata nakon parenja i zabilježeno je da ostaje povišen do drugog tromjesečja. Istraživanja upućuju na početno stvaranje EPF-a u ranom razvojnog stadiju zametka dok se on još nalazi u jajovodu. EPF se koristi kao indikator gravidnosti i vitalnosti zametka. Nažalost, procjene komercijalnih lateralnih protočnih analiza čimbenika ranog zametka pokazale su kako je test nepouzdan za određivanje stanja gravidnosti u kobilu (McCUE i McKINNON, 2011.).

Proteini svojstveni graviditetu

MPP-1 (*mare pregnancy protein-1*) i β 2-protein ždrebosti zabilježeni su u gravidnih kobilu i odsutni u negravidnih kobilu. Pretpostavljeno je kako su ti proteini možda majčinskog (materničnog) podrijetla te se stvaraju kao odgovor na podražaj ploda (McCUE i McKINNON, 2011.).

Pregled cerviko-vaginalne sluzi (Kurasawa test)

Pregled cervikovaginalne sluzi, nazvan i Kurasawa test, služi za određivanje gravidnosti u kobilu i daje siguran rezultat u 90 % slučajeva već u prvom mjesecu ždrebosti. Sluz se uzima iz vagine vatom, Albrechstenovim kliještima ili se skine sa spekuluma nakon vaginalne pretrage, nakon čega se naprave dva do tri razmaza (MAKEK i sur., 2009.). Obojeni razmazi ždrebnih kobilu gusti su i tamni, s kuglicama sluzi i epitelnih stanica, dok su razmazi negravidnih kobilu rijetki i blijedi te ne sadrže kuglice sluzi. Međutim, trenutno je teško zamisliti upotrebu ovog testa jer nosi rizik unosa infekcije u rodnicu i/ili grlić maternice (McCUE i McKINNON, 2011.).

3.3 Blizanački graviditet

Već duže vrijeme poznate su tri činjenice o blizancima kobilu, od kojih je prva spoznaja da se blizanci ponovno javljaju kod kobile koja ih je imala. Druga je razlika u pojavnosti s obzirom na pasminu, a treća je njihova povezanost s plodnosti pastuha, odnosno što je pastuh plodniji, veća je očekivanost blizanaca u kobilu (McKINNON, 2011.). Povijesno su blizanci bili glavni uzrok pobačaja engleskih punokrvnjaka, no pojavnost se drastično smanjila uvođenjem rutinskih ultrazvučnih pretraga (FOOTE i sur., 2012.).

3.3.1 Monozigotni blizanci

Smatra se da su većina blizanaca kobila dizigoti i da potječu od dvostrukih ovulacija, te su češći u pasmina konja s većom stopom multiplih ovulacija (BRINSKO i sur., 2013.). Postoji i nekoliko izvještaja o prirodno identičnim blizancima, no njihov broj ne prelazi 1 % svih blizanaca. Slučajevi identičnih blizanaca uključuju i one koji su posljedica podjele zametka tijekom ili nakon transfera u kobilu primateljicu (LEBEDEVA i SOLODOVA, 2021.). Iako točan broj monozigotnih blizanaca nije poznat zbog velike vjerojatnosti da su pobačeni, njihova pojava je i dalje jako rijetka u domaćih životinja. ROONEY (1970.) je u konja zabilježio jedan slučaj identičnih blizanaca, dok su McCUE i McKINNON (2011.) izvijestili o tri slučaja nakon embriotransfera. U sisavaca razvoj monozigotnih blizanaca prati dijeljenje jedne oplođene jajne stanice ili ranog zametka. Unatoč nepoznatom uzroku i mehanizmu dijeljenja zigote u ljudi, jedna od hipoteza tvrdi kako se dijeljenje unutarnje mase stanice može odvijati tijekom izlijevanja iz zone pelucide. Međutim, posebna osobina tvorbe kapsule s vanjske strane blastule u konja, koja služi kao dodatni fizički zaštitni sloj, može bolje braniti zametak od dijeljenja u odnosu na druge vrste domaćih životinja. No do izlijevanja konjskog zametka može doći i drukčijim putem, kada opsežna sila stvorena brzim kružnim širenjem kapsule katapultira zametak izvan zone pelucida. Homozigotni blizanci trebali bi se moći razlučiti korištenjem ultrazvučnih uređaja oko 14. dana nakon ovulacije (GOVAERE i sur., 2009.). Prepoznavanje dikorionske i diamnionske monozigotne gravidnosti može se utvrditi samo korištenjem mikrosatelitnih lokusa DNK jer ih je nemoguće ultrazvučno razabrati od dizigotnih blizanaca. Gotovo uvijek se pretpostavlja da su monokorionski i diamnionski blizanci identični (McKINNON, 2007.).

3.3.2 Dvostruka ovulacija i ostali čimbenici učestalosti pojave blizanaca

Mnogi su znanstvenici proučavali podrijetlo, moguće načine prirodnog razvoja i vjerojatnost ishoda blizanačkog graviditeta kobila te uzroke i mehanizme prirodne redukcije dodatnih zametaka u maternici. Stopa učestalosti blizanačke gravidnosti izravno je povezana sa stopom poliovulatornih ciklusa u kobila, što nije neobično s obzirom na to da su blizanci skoro uvijek rezultat oplodnje dviju jajnih stanica. Stoga je veća vjerojatnost dobivanja

blizanaca prirodnim parenjem i osjemenjivanjem svježom spermom nego ohlađenim ili zamrznutim sjemenom. Pojavnost poliovulatornih ciklusa u raznih pasmina konja kreće se od 8 do 25 %. U engleskih punokrvnjaka i njihovih križanaca zabilježena je povišena stopa dvostrukih ovulacija, blizanačke gravidnosti te gubitka graviditeta. Ustanovljene su pojedinačna sklonost, opetovanje te nasljednost dvostrukih ovulacija u kobila. BRESIŃSKA i suradnici (2004.) proveli su istraživanje o genetičkim i okolišnim učincima na pojavu blizanačke gravidnosti u engleskih punokrvnih kobila te su zaključili da se određeni pastusi mogu svrstati u dvije suprotne skupine s obzirom na učestalost pojave blizanaca u njihovih kćeri. Ostali čimbenici koji povećavaju učestalost blizanačke gravidnosti su dob, godišnje doba, reproduktivni status, ishrana te korištenje lijekova za kontrolu ovulacije u kobila (LEBEDEVA i SOLODOVA, 2021.). Očekivan je manji broj multiplih ovulacija u prvom poslijeporođajnom estrusu u usporedbi s ostalim ciklusima. Kobile su u laktaciji manje sklone blizanačkoj gravidnosti u odnosu na one koje nisu u laktaciji, a vjeruje se da je uzrok tome efekt povratnog mehanizma sisanja na vezu hipotalamus-hipofiza--jajnici (SCHRAMME-JOSSON, 2009.). Multiple ovulacije češće su uočene kada se koristi indukcija ovulacije, no nije jasno dolazi li do povećane mogućnosti blizanačke gravidnosti kao rezultata više ovulacija ili zbog bolje mogućnosti uočavanja blizanaca s obzirom na sinkronizirane ovulacije (razmak između ovulacija je manji od 24 sata). Dok jedan dio istraživanja ukazuje na povezanost indukcije ovulacije na pojavnost blizanaca, drugi izvještaji tu povezanost negiraju. Razlozi nepodudarnosti mogu biti vezani uz tehniku korištenu za određivanje vremena primjene lijekova za ubrzavanje ovulacije, doziranje lijekova ili praksu upravljanja farmom, ili zbog nepoznatih zbunjujućih varijabli. Blizanci se u kobila češće javljaju kao rezultat sinkroniziranih nego nesinkroniziranih ovulacija i stopa gravidnosti po folikulu jednaka je za dvostruku ovulaciju na suprotnim jajnicima i jednostruku ovulaciju, odnosno jedan folikul. Blizanački graviditet će se također češće pojaviti ukoliko je ovulacija bila bilateralna u odnosu na unilateralnu, a sličan učinak zabilježen je kod oporavka zametka (MCKINNON, 2011.). COHRAN i suradnici (1999.) prvi su zabilježili blizanački graviditet kod kobile primateljice 14 dana nakon što su joj transferirana dva zametka dobivenih intracitoplazmatskim unosom sperme u jajnu stanicu *in vitro*.

3.3.3 Ishodi blizanačke gravidnosti

Ukoliko se blizanačka gravidnost ostavi kako bi se razvila, veterinarima, upraviteljima ergela i vlasnicima važno je razumjeti njene ishode. Kobile su vrlo učinkovite u reduciranju blizanaca u jedan plod, a to postižu konkurentnom apsorpcijom hranjivih tvari koja je povezana s veličinom i položajem zametka u ranoj gravidnosti i kasnijom orijentacijom pravog zametka unutar razvijajućeg konceptusa (McKINNON, 2011.). Orijehtacija se može definirati kao rotacija zametnog mjehura gdje je pravi zametak okrenut prema ventralnom dijelu mjehura i najdebljem dijelu stijenke konceptusa. Točan mehanizam spontane redukcije je nepoznat, no poznato je kako smještaj zametnog mjehura, ovisno o tome radi li se o jednostranoj ili dvostranoj fiksaciji, utječe na učestalost spontane redukcije. Čimbenici koji utječu na spontanu redukciju blizanaca su relativna orijentacija zametnog mjehura, sinkroniziranost ovulatornih folikula i nepodudaranje veličine zametnih mjehura. Ukoliko je pravi zametak unutar mjehura smješten do drugog mjehura, veća je vjerojatnost da će doći do redukcije nego kada je embrij u dodiru s endometrijem. Ako je došlo do nesinkronizirane ovulacije i jedan je zametni mjehur veći, on može ometati kretanje i rast manjeg mjehura, što dovodi do povećane mogućnosti redukcije. GINTHER je proveo istraživanja 1982. i 1984. na temelju kojih je pretpostavio kako bliska apozicija zametnih mjehura rezultira njihovim međusobnim pritiskom, a posljedično se gubi veza između površine endometrija i trofoblasta mjehura. Do većine jednostranih redukcija dolazi prije 26. dana gravidnosti, vjerojatno zbog nedovoljne učinkovitosti žumanjčane vreće kao izvora hranjivih tvari. Nadalje, GINTHER (1984.) je ustvrdio kako je ukupna učestalost spontane redukcije koja rezultira jednim plodom 64 %. Unatoč tome što se 83 % do 89 % blizanaca s jednostranom fiksacijom prirodno reducira do jednog ploda, reducira se samo 4 % blizanaca s dvostranom fiksacijom. U istraživanje nisu uključene kobile koje su izgubile oba ploda, što bi rezultiralo prirodnim gubitkom jednog ili oba zametka blizanaca od 77 %. Vjerojatnost spontane redukcije smanjuje se povećavanjem gestacijske dobi do 40. dana, s 53 % jednostranih redukcija prije 20. dana te 82 % do kojih dolazi prije 30. dana gravidnosti. Kada su blizanci uočeni između 40. i 42. dana gestacije, samo je 6% ždrebosti rezultiralo porodom jednog ždrebeta, a 31 % dva ždrebeta, dok je 63 % rezultiralo gubitkom oba ploda (WOLFSDORF, 2006.). Nejednakost stope preživljavanja između blizanačkog i graviditeta s jednim plodom vjerojatno je povezana s ograničenom sposobnošću maternice kobile da prehrani više od jednog ždrijebeta. Područje površinskog koriona, koje predstavlja funkcionalno područje konjske posteljice, kod blizanaca je značajno smanjeno. Zajednička korionsko placentarna površina odgovara veličini površine posteljice jednog ploda. Područje na kojem se dvije posteljice blizanaca dodiruju lišeno je mikrovila, a posljedično tome dolazi

do neadekvatne ishrane ploda, odnosno pobačaja ili male porođajne težine blizanaca (MILLER i WOODS, 1988.). Blizanačka placentacija podijeljena je u tri morfološke grupe (A, B i C) ovisno o smještaju koriona unutar maternice. Najčešći je tip A blizanačke gravidnosti gdje jedan zametak zauzima dio jednog roga te veći dio tijela maternice, dok drugi blizanac zauzima drugi rog i mali dio prilagođenog tijela maternice. Postoji različita mogućnost invaginacije koriona manjeg zametka u alantoisnu šupljinu većeg, a takva gravidnost najčešće završava pobačajem ili preranim porodom jednoga ili oba ploda, u razdoblju između 3. i 9. mjeseca gravidnosti. Tip B označava oblik blizanačke gravidnosti u kojoj su oba ploda slične veličine, zauzimaju svaki po jedan rog i polovicu tijela maternice, te se najčešće oždrjebe živi. Tip C je oblik placentacije s velikom nejednakošću između površina dvaju koriona. Manji plod zauzima samo jedan rog maternice, rano ugiba te prolazi proces mumifikacije, dok se drugi može oždrjebiti živ i ima velike šanse preživljavanja (GETZ i sur., 2011.). Postoje dvije vrste mumifikacije ploda: u kobila je najčešći takozvani papirus tip mumifikacije, kada fetus postane suh i tvrd. Drugi je hematični tip, nazvan i „čokoladni plod“ zbog prekrivenosti fetusa smeđim, viskoznim i ljepljivim materijalom bez mirisa, dobivenog iz eritrocita zbog krvarenja kotiledona, a do sada je zabilježen samo jedan takav slučaj na svijetu (PIZZIGATTI i sur., 2012.). Manji plod predstavlja manju opasnost za distociju tijekom poroda, a veći plod ima povoljniju šansu za preživljavanje. Međutim, ako su oba ploda slične veličine i oba su živa, povećava se stopa smrtnosti u više prilika. Često se takvi plodovi porađaju prerano zbog neadekvatne potpore posteljice. Kada dođe do poroda blizanaca jednake veličine blizu termina, skoro uvijek su mali i slabi. Stopa smrtnosti za živo oždrjebljene blizance je značajna (50 %). Nadalje, blizanci jednake veličine nose povećani rizik za teški porod, te je u opasnosti i kobila, koja može pretrpjeti traumu maternice, porođajnog kanala, distociju te zaostajanje posteljice (MACPHERSON, 2007.). Većina (65 %) blizanačkih gravidnosti u kasnijem stadiju završava pobačajem ili porodom dva mrtva ždrijebeta. Pobačaji uglavnom nastupaju nakon 8. mjeseca gravidnosti. Mali broj poodmaklih blizanačkih ždrebnosti dovodi do poroda jednog živog i jednog mrtvog ždrijebeta (21 %) ili dva živa ždrijebeta (14 %). Blizanci koji prežive do poroda često su mali, imaju lošu konformaciju te im je zajednička porodna težina usporediva s težinom samo jednog ždrijebeta. Također su blizanci najveći uzrok uginuća neonatalne ždrjebadi, kada stopa smrtnosti varira između 47 i 55 %, u odnosu na stopu smrtnosti kod samo jednog ždrijebeta nakon poroda koja iznosi 1 %. (MILLER i WOODS, 1988.). Iako su blizanci gotovo uvijek dizigoti, može doći do krvožilnih anastomoza između posteljica, što rezultira krvnim himerizmom. No u konja do toga dolazi kasno u razvoju nakon diferencijacije

gonada, te ne dolazi do pojave frimartinizma, koja se javlja u stoke. Pseudoanastomoze na mjestu apozicije posteljica blizanaca mogu ostati funkcionalne nakon uginuća jednog blizanca (FOOTE i sur., 2012.).

3.3.4 Dijagnostika blizanačke gravidnosti

Utvrđivanje broja i vremenskog slijeda ovulacija korisno je u kasnijem uočavanju i menadžmentu blizanačke gravidnosti. Nesinkronizirane ovulacije do kojih dolazi u razmaku od jednog do dva dana ili više mogu rezultirati blizancima koje je u početku teško uočiti. Pregled na osnovi podataka dvanaestodnevne gravidnosti može ustvrditi zametak veličine koja odgovara starosti od 12 dana, no drugi zametak podrijetlom kasnije ovulacije može biti premali kako bi se uočio. Stoga je indicirano izvesti naknadnu ultrazvučnu pretragu (McCUE i McKINNON, 2011.). Dijagnostika blizanačke gravidnosti prije fiksacije zametka (16. dan) je teška i uvelike ovisi o iskustvu kliničara, rezoluciji i jačini ultrazvučne sonde (5 MHz), jačini monitora. U obzir treba uzeti i maternične ciste, zbog čega je poželjno kobilu pregledati prije pripusta ili umjetnog osjemenjivanja, te ukoliko su ciste prisutne, utvrditi njihovu lokalizaciju i veličinu (GETZ i sur., 2011.). Unatoč tome najpoželjnije je uočiti blizance 14. ili 15. dana nakon ovulacije, odnosno prije fiksacije. Pregled u tom razdoblju smanjuje mogućnost uočavanja manjeg zametnog mjehura ukoliko je došlo do nesinkronizirane ovulacije, no omogućava dijagnozu blizanaca prije njihove fiksacije u jedan rog maternice (BRINSKO i sur., 2013.). Jedini čimbenik koji utječe na razliku u promjeru zametnih mjehura blizanaca između 11. i 15. dana je broj dana između ovulacija. Ni jedan drugi čimbenik ne utječe na nejednakost veličina između dva zametna mjehura osim njihove razlike u starosti. Bilateralno fiksirani zametni mjehuri lako se uočavaju s pomoću ultrazvučnog uređaja, no unilateralni se znaju promašiti u razdoblju od 17. do 19. dana nakon ovulacije (GINTHER, 1988.). Ispostavlja se da se u tom razdoblju ultrazvučno jedino može uočiti tanka linija koja prolazi po sredini između neznatno povećanog zametnog mjehura, te je lako zamijeniti jednostrano fiksirane blizance u dobi od 17 do 20 dana s jednim zametkom starim 28 do 30 dana. Blizance je sve lakše uočiti između 22. i 60. dana gravidnosti, s obzirom na njihove izraženije pupčane tračke, srčanu akciju te raspoznatljive organe što značajno olakšava diferencijaciju. Nakon 30. dana razvija se zajednička membrana između dva alantokoriona, nazvana blizanačkom membranom, a koja ima značajnu dijagnostičku važnost nakon 100. dana gravidnosti, kada se oba fetusa više ne

možu ni palpirati ni vidjeti transrektalnom ultrazvučnom pretragom (GETZ i sur., 2011.). U kasnijim stadijima gravidnosti dijagnostika blizanaca postaje izazovna i većinom se izvodi transabdominalnom ultrazvučnom pretragom, no debelo i slijepo crijevo znaju ometati postavljanje dijagnoze. Stoga su VERA i sur. (2018.) sa sveučilišta u Ghentu odlučili iskoristiti fetalni EKG zapis za potvrdu blizanačke gravidnosti toplokrvne kobile u 8. mjesecu gestacije. Nakon nekoliko neuspješnih pokušaja da dobiju dva fetalna EKG zapisa, došli su do zaključka kako je to moguće izvesti, no uz potrebu za konfiguracijom mnogo elektroda te veliku mogućnost lažno negativnih rezultata. VINCZE i suradnici (2016.) proveli su istraživanje o korištenju alfa-fetoproteina (AFP) kao indikatora blizanačke gravidnosti te su ustanovili njegove povišene razine u kobilama kojima je ultrazvučno utvrđena blizanačka gravidnost, no potrebna su daljnja istraživanja.

3.3.5 Metode redukcije blizanaca u gravidnih kobilama

Pri svakoj odluci o neuplitanju u blizanačku gravidnost kobilama treba procijeniti vjerojatnost uspješne redukcije koja se temelji na starosti prepoznavanja, orijentaciji i fiksaciji zametnog mjehura, te ikakvoj nejednakosti u veličini. Ostavljanje blizanaca u razdoblju prije fiksacije smatra se lošom praksom, osim u slučaju kada su jedan ili oba ploda premali za manipulaciju (McKINNON, 2011.).

Manualno gnječenje tijekom stadija pokretljivosti

Blizanačku gravidnost koja je primijećena tijekom faze pokretljivosti najbolje je riješiti manualnim gnječenjem jednog zametnog mjehura. Nakon utvrđene dvostruke ovulacije trebalo bi obaviti ultrazvučni pregled između 13. i 15. dana. Ukoliko su prisutni blizanci, postoji velika mogućnost prirodnog odvajanja zametnih mjehura i gnječenja jednog s minimalno izvođenom manipulacijom prije njihove fiksacije za endometrij. Ako su zametni mjehuri premali ili se nalaze u tijelu maternice blizu bifurkacije, teško je s njima manipulirati i reevaluacija idućeg dana ili za nekoliko sati može biti korisna. Obično se gnječi manji zametni mjehur ili onaj koji zahtijeva manje manipulacije maternice. Stopa preživljavanja preostalog mjehura prelazi 90 %. U slučaju kada oba zametna mjehura nastave biti jedan kraj drugoga, može ih se probati razdvojiti manualnom manipulacijom ili postavljanjem ultrazvučne probe između dva mjehura i korištenjem pritiska što pomiče jedan

mjehur do materničnog roga gdje ga je lakše zgnječiti pomoću daljnjeg pritiska (WOLFSDORF i MACPHERSON, 2018.).

Manualna redukcija nakon fiksacije

Pri manualnom gnječenju jednog zametnog mjehura blizanca nakon fiksacije problem nastaje ukoliko su blizanci smješteni u jednom rogu maternice te je velika mogućnost oštećivanja oba ploda. 90 % jednostranih blizanaca može se riješiti ovom metodom ako su im zametni mjehuri razdvojeni. Uspješno se može reducirati 75 % bilateralnih blizanaca u gravidnost s jednim plodom ako se jedan mjehur zgnječi prije 30. dana gestacije. U dvostranih blizanaca starijih od 35 dana postoji veći rizik od pobačaja u kasnijem stadiju gravidnosti prilikom uklanjanja jednog zametnog mjehura, vjerojatno zbog nakupljanja tekućine mjehura između alantokoriona i endometrija što uzrokuje gubitak njihova kontakta. Transrektalna manualna manipulacija između 28. i 42. dana rezultira porodom jednog zdravog ždrijebeta u 28 % kobila ukoliko prilikom postupka ne dođe do rupture jednog zametnog mjehura (WOLFSDORF i MACPHERSON, 2018.). HOROZ i suradnici (2002.) proveli su istraživanje o uspješnosti manualne redukcije blizanaca kod 21 kobile. U 15 (71.4 %) kobila uspjelo je gnječenje jednog ploda, u 4 kobile (19 %) blizanački se graviditet održao, a u 2 kobile (9.5 %) resorbirana su oba ploda, koja su bila smještena previše blizu jedan do drugoga. Dobiveni su rezultati o uspješnosti manualne redukcije od 78.9 % kada je izvedena između 16. i 22. dana, te 42.8 % između 22. i 28. dana gravidnosti.

Transvaginalna ultrazvučna aspiracija (TUGA - *transvaginal ultrasound-guided aspiration*)

Transvaginalna ultrazvučna aspiracija blizanaca uključuje probadanje zametnog mjehura uz aspiraciju žumanjčane vreće ili alantoične tekućine s ubdanjem zametka ili bez ubadanja zametka. To je tehnički zahtjevan postupak za koji je potrebna posebna i skupa oprema (CRABTREE, 2018.). Punkcija i aspiracija plodove vode jednoga od blizanaca rade se pod kontrolom ultrazvuka s pomoću transvaginalne konveksne sonde smještene u sustav za uvođenje aspiracijske igle koji se sastoji od tri komponente: ultrazvučnog uređaja sa sektorskom sondom od 5 i 7,5 MHz, aspiracijske pumpe i sustava za uvođenje igle za aspiraciju. Nakon sedacije kobile sustav za uvođenje aspiracijske igle u kojemu je smještena i sonda ultrazvuka uvodi se u rodnicu i vrh sonde se fiksira kraniodorzalno s lijeve ili desne strane vanjske osi vrata maternice. S pomoću druge ruke kliničar fiksira rog maternice *per rectum* na vrh sonde te se tako plod zajedno s plodovom vodom jasno vidi na ekranu i s

pomoću ultrazvuka vrši se aspiracija plodove vode jednoga od blizanaca (GETZ i sur., 2009.). U Nizozemskoj je provedeno retrospektivno istraživanje te se došlo do podatka da je ukupna stopa živo rođene ždrjebadi nakon primjene navedenog postupka 33 %. U većini slučajeva kada su izgubljena oba blizanca, jedan od njih više nije bio vidljiv prilikom prvog pregleda 10 do 15 dana nakon postupka. Uspjeh postupka povezan je sa stadijem gravidnosti, odnosno što se ranije tijekom graviditeta postupak izvede, veća je mogućnost uspješnosti, sa stopama od 40 % prilikom izvođenja postupka prije 35. dana, od 31 % između 36. i 45. dana, te 13 % nakon 45. dana (RAU i sur., 2018.). Najveće stope uspješnosti postižu se u bilateralnih blizanaca prije 35. dana, a najniže su u unilateralnih blizanaca nakon 45. dana (JOURNÉE i sur., 2013.). Zbog potrebnog tehničkog umijeća prilikom izvedbe ovog postupka mnogo različitih čimbenika utječe na uspješnost i ograničenja izvedbe. Ti čimbenici uključuju dan gestacije u vrijeme izvođenja redukcije, radi li se o bilateralnoj ili unilateralnoj fiksaciji zbog neposredne blizine zametaka i njegovih ovojnica, iskustvo operatera kako bi se izbjeglo oštećenje susjednog mjehura ili traumatizacija maternice, te istjecanje tekućine iz aspiriranog mjehura što uzrokuje odvajanje placentalnih ovojnica od endometrija (MARI i sur., 2004.; WOLFSDORF, 2006.). Uspješnost transvaginalne ultrazvučne aspiracije jednostranih blizanaca u kobile zahtijeva njezinu primjenu u razdoblju kada se javlja visoka stopa prirodne redukcije blizanačke gravidnosti. Stoga bi u mnogim slučajevima bilo razboritije pažljivo pratiti takve gravidnosti ne bi li došlo do spontane prirodne redukcije nego posredovati s transvaginalnom aspiracijom (HODDER i sur., 2008.). Starost kobile, broj ždrjebadi, veličina kobile, smještaj i tonus maternice mogu negativno utjecati na uspjeh postupka. Znatno je teže napraviti TUGA-u ako gravidna maternica visi u abdomenu kod starijih kobila ili odmakle gravidnosti, te njezino izvođenje u starijih, multiparnih kobila nakon 45. ili 50. dana može biti izazovno (WOLFSDORF i MACPHERSON, 2018.).

Kranio-cervikalna dislokacija (CCD)

Kranio-cervikalna dislokacija opisana je kao iščašenje prvog vratnog kralješka od lubanje, prekidanjem povezujućih ligamenata i oštećivanjem leđne moždine. Postupak se može provoditi korištenjem transrektalne ili tranabdominalne tehnike između 60. i 110. dana gravidnosti s ciljem dobivanja jednog ždrijebeta. Osnova ovog postupka je uklanjanje jednog ploda prije završetka formacije fetoplacentalnog spoja, što dozvoljava preostalom plodu da iskoristi cijelu površinu endometrija za izmjenu hranjivih tvari i kisika kako bi narastao do svog punog potencijala. Prije izvođenja postupka potrebno je sedirati kobilu. Poželjnije je

reducirati manji plod ili onaj koji je u manjem dodiru s endometrijem. Nakon što se odredi koji će se plod reducirati, trebalo bi ga izdvojiti pronalazeći mu glavu i palpirajući vilicu ili lociranjem vratnih kralježaka kaudalno. Glava ploda se stabilizira između palca i kažiprsta te se pomiče sa strane na stranu, što rezultira oštećenjem ligamenata koji povezuju glavu i vrat. Tada se palac stavlja na bazu lubanje i stvara se pritisak proksimalno i dorzalno. Ukoliko dođe do iščašenja osjetit će se karakteristično pucanje te se palac i kažiprst mogu smjestiti u nastali prostor između glave i vrata. Iako rezultati pokazuju njegovu uspješnost sa stopom od 63 % za porod jednog ždrijebeta normalne veličine, postupak je tehnički zahtijevan i često su potrebne višestruke manipulacije ploda prije no što se postigne dislokacija, te se može koristiti transabdominalni kirurški pristup (WOLFSDORF i sur., 2009.). Kranio-cervikalna dislokacija ima prednost u odnosu na druge postupke redukcije blizanaca nakon fiksacije. Rezultati ovog postupka mogu imati bolji ishod nego transkutana ultrazvučna redukcija gdje je zabilježeno nekoliko premale i slabe ždrjebadi. Nedostatci ovog postupka najčešće se odnose na izdvajanje ploda. Naime, kada je kobila u tom stadiju gravidnosti, pronalaženje određenog ploda unutar maternice jako je teško, te je od apsolutne važnosti dostatna opuštenost maternice (WOLFSDORF i MACPHERSON, 2018.).

Transkutana ultrazvučna redukcija blizanačke gravidnosti

Korištenje transkutane ultrazvučno vođene redukcije blizanaca kod kobile prvi je put zabilježeno 1988., a podatci ukazuju na 50 % šanse da se nakon postupka oždrjebi jedno živo ždrijebe. Preporučeno vrijeme kada da se izvodi ovaj postupak je između 115. i 130. dana gravidnosti, a izvodi se na snažno sediranoj kobili u stojećem položaju, kako bi se plod pomaknuo u kranijalni dio abdomena radi lakše dostupnosti i kako bi se minimalizirali pokreti ploda tijekom postupka. Slično kao i kod CCD-a određuje se plod koji želimo reducirati, no za to nam u ovom postupku pomaže ultrazvučna sonda od 2.5 do 3.5 MHz. Abdominalno područje kobile u okolini ploda koji želimo reducirati se obrije i pripremi za kiruršku obradu. Sonda se smjesti u sterilnu rektalnu rukavicu sa sterilnim lubrikantom. Može se koristiti i sustav koji se koristi kao vodič za biopsiju. U jednom pokretu se pomakne 15 cm dugu iglu kroz kožu i abdomen, a može se koristit i igla s ehogenim vrhom za bolju vizualizaciju na ultrazvučnom uređaju. Nakon što je igla ušla u peritonealni prostor, usmjerava se dalje kroz stijenkku maternice i u srce ploda brzim i snažnim pokretom. Slobodan protok krvi kroz iglu ukazuje na to da je igla unutar srca ploda, te se injektira kalijev klorid ili prokain penicilin, bilo u srce, prsni koš ili abdomen. Prednosti korištenja prokain penicilina umjesto kalijevog klorida su smanjenje mogućeg rizika od ijtrogene

infekcije, bolja vizualizacija agensa za vrijeme injekcije, smrt fetusa čak i u odsustvu unosa u srce. Nedostatak korištenja prokain penicilina je što njegovo izazivanje smrti ploda može trajati nekoliko dana, što također ovisi i o mjestu unosa. Kobilu se zbog tog razloga prati nekoliko idućih dana, kao i oba ploda. Posljedica je mumificiranje ploda na kojem je izvršen postupak te njegov porod u maloj placentalnoj vreći zajedno sa živim plodom. Okončani plod relativno rijetko ometa razvoj drugog ploda, no nagađa da zbog provođenja postupka nakon završetka formiranja posteljice dolazi do nedostatnosti posteljice što rezultira malom i slabom ždrjebadi (WOLFSDORF i MACPHERSON, 2018.).

Indukcija pobačaja

Gravidnost se može prekinuti aplikacijom prostaglandina F2 α i njihovih analoga, koje svakako treba dati prije formiranja endometrijskih čašica nakon čije su tvorbe, između 36. i 40. dana gravidnosti, metode za redukciju blizanaca prilično nepouzdanе. Naime, uginu li plod prije tvorbe endometrijskih čašica, na jajniku kobilu će biti prisutno samo primarno žuto tijelo te je dovoljna jednokratna aplikacija PGF2 α da izazove luteolizu i povratak u estrus. Dode li do uginuća ploda nakon formiranja endometrijskih čašica, nastavlja se tvorba eCG-a i kobilu se neće vratiti u ciklus sve do degeneracije endometrijskih čašica te posljedične regresije pomoćnih žutih tijela (GETZ i sur., 2011.). Nakon 100. dana gestacije prirodna redukcija ploda nije dovoljno pouzdana za kobilu da nastavi s graviditetom. Za indukciju pobačaja koriste se višekratne injekcije prostaglandina, primijenjene što prije moguće nakon 100. dana gravidnosti. U ranijem stadiju gravidnosti izazivanje pobačaja jedino je opravdano s financijske strane, no savjetuje se to učiniti manualnim oštećenjem placentalnih ovojnica što može rezultirati dobrim ishodima, a manipulacija se može izvoditi nekoliko dana, sve do potvrde razaranja obje ovojnice (McKINNON, 2011.).

4. MATERIJALI I METODE

U istraživanju smo obradili arhivske podatke o kobilama – pacijenticama Klinike za porodništvo i reprodukciju tijekom desetogodišnjeg razdoblja (od 1. siječnja 2010. do 31. prosinca 2019.). Za prikupljanje podataka o zaprimljenim i obrađenim pacijentima koristili smo aplikaciju za unos i praćenje pacijenata (Vef. protokol). Podatke smo analizirali s obzirom na uzgojni tip te pasminu kobila pregledanih na gravidnost.

Važno je napomenuti da određeni broj kobila unesenih u protokol nije bio pregledan na gravidnost u ranijem stadiju jer su se vlasnici obratili za pomoć Klinici zbog komplikacija, odnosno kasnog otkrivanja blizanačke gravidnosti ili pobačaja blizanaca bez ranijeg saznanja o njima.

Kobile pacijentice Klinike koje su pregledane na gravidnost podijelili smo u tri uzgojna tipa: hladnokrvnjaci, toplokrvnjaci i poniji. Nadalje smo hladnokrvnjake razvrstali u tri pasmine: hrvatski hladnokrvnjak (HH), hrvatski posavac (HP) te ostale, što podrazumijeva ostale pasmine hladnokrvnjaka (OH). Toplokrvnjake smo razvrstali u četiri kategorije: engleski punokrvnjak (EP), arapski punokrvnjak (AP), lipicanac (L) te ostali toplokrvni konji (OT). Sve poni pacijentice navedene su u Vef. protokolu kao poni tip konja (P), bez spominjanja određenih pasmina. Lipicance smo odvojili u posebnu kategoriju zbog njihova izrazitog udjela u ukupnom broju pregledanih kobila.

Kobile s blizanačkom gravidnošću potom su podijeljene prema tijeku i ishodu gravidnosti (pobačaj, spontana redukcija blizanaca, artificijelna redukcija blizanaca i živorođeni blizanci).

4.1 Statistička analiza

U računalnom programu Excel 2016 (Microsoft Office 2016, Microsoft Corporation, 2016., Redmond, Washington, USA) izradili smo tablice za svaku pojedinu godinu, počevši od 2010., a završavajući s 2019. godinom. U tablice smo unosili broj kobila koje su bile pacijentice Klinike navedene godine, određenih pasmina te pripadajućeg uzgojnog tipa, a koje su bile pregledane na gravidnost. Nadalje smo u iduće stupce tablice unosili redom broj utvrđeno gravidnih kobila, te broj kobila kod kojih je zabilježena blizanačka gravidnost.

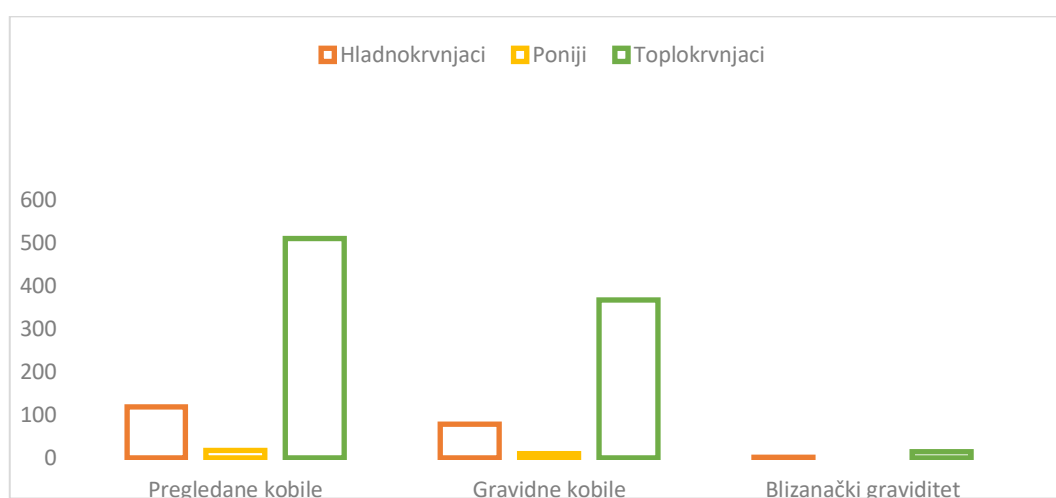
Pokraj podataka o zabilježenoj blizanačkoj gravidnosti naveli smo dan kada je utvrđena, ukoliko smo ga znali iz uzetih podataka, te opis ishoda tog graviditeta.

Statistička analiza podataka odrađena je pomoću statističkog programa SAS 9.4 (Statistical Analysis Software 2002–2012 by SAS Institute Inc., Cary, USA).

Proporcije su analizirane s pomoću modula PROC LOGISTIC. Srednje vrijednosti izračunate su metodom najmanjih kvadrata (LSM - *least squares means*) korištenjem LSMEANS naredbe i opcija EXP, ILINK i CL. Za usporedbu srednjih vrijednosti korištena je Tukey-Kramerova metoda višestrukih usporedbi na razini statističke signifikantnosti $P < 0.05$.

5. REZULTATI

U desetogodišnjem razdoblju (od 2010. do 2019. godine) pregledano je ukupno 646 kobila, pacijentica Klinike za porodništvo i reprodukciju, u svrhu dijagnostike gravidnosti. Graviditet je ustanovljen u 454 kobile (70,28 %) od ukupnog broja pregledanih kobila, od kojih je 15 kobila imalo blizance (3,3 %). Udio blizanačke gravidnosti u sveukupnom broju pregledanih kobila je iznosio 2,32 %. Na slici 1 prikazan je ukupni broj pregledanih, gravidnih te kobila s blizanačkim graviditetom po uzgojnom tipu.

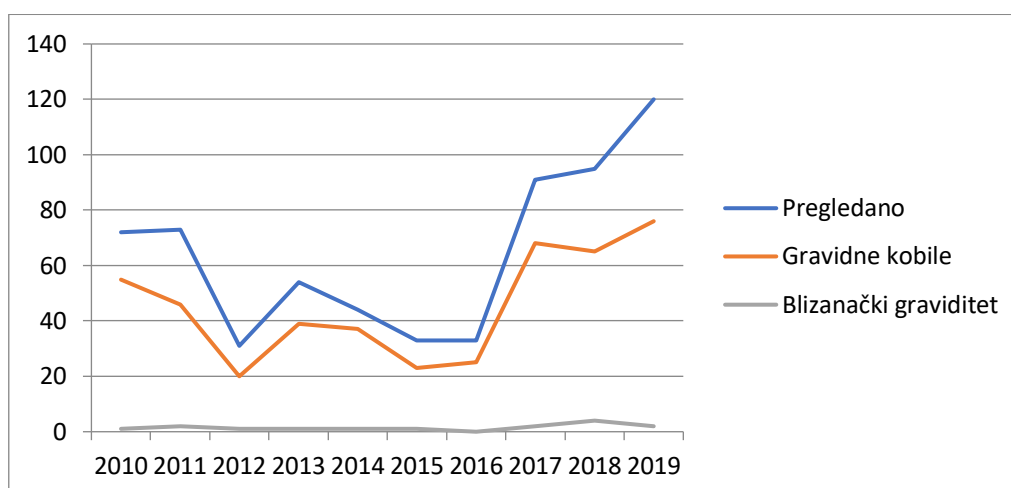


Slika 1: Prikaz broja pregledanih i gravidnih kobila te blizanačkih gravidnosti u određenih tipova konja.

Od ukupno 119 pregledanih hladnokrvnih kobila, 78 ih je bilo gravidnih, a blizanačka gravidnost zabilježena je samo kod jedne kobile. Od ukupno 17 pregledanih poni kobila, 10 je bilo gravidnih. U toplokrvnih kobila ukupno je pregledano 510, od kojih je 366 bilo gravidnih, a utvrđeno je 14 blizanaca.

Dobivene statističke rezultate podijelili smo na uspješnost koncepcije te učestalost pojave blizanaca s obzirom na uzgojni tip i pasminu. Uz to smo analizirali i ishode blizanačkih gravidnosti, odnosno učestalost spontanijh pobačaja, spontane i artificijelne redukcije blizanaca te živorođenih blizanaca. Promatrali smo samo ukupne rezultate za desetogodišnje razdoblje zato što imamo premali broj kobila i slučajeva blizanačkog graviditeta za dobru statističku interpretaciju po pojedinoj godini.

Broj pregledanih te gravidnih kobila i blizanaca po godinama (od 2010. do 2019.) prikazan je na slici 2.



Slika 2: Prikaz broja pregledanih i gravidnih kobila te blizanačkih gravidnosti u kobila pacijentica Klinike za porodništvo i reprodukcije tijekom desetogodišnjeg razdoblja.

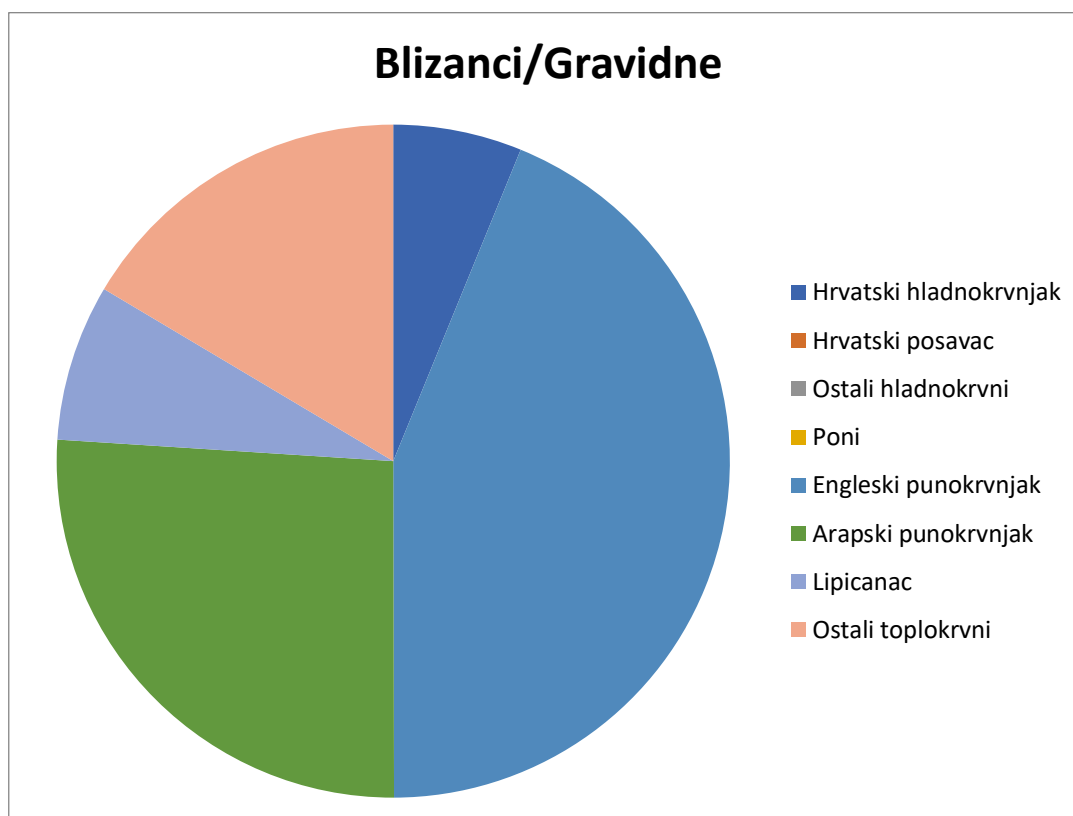
U tablici 1 prikazan je broj pregledanih, gravidnih te kobila s blizanačkim graviditetom po uzgojnom i pasminskom tipu.

Tablica 1: Prikaz ukupne zastupljenosti blizanačke gravidnosti po pasminama i uzgojnom tipu.

| Uzgojni tip | Pasmine | Pregledane kobile (N) | Gravidne kobile (N) | Blizanci (N) | Koncepcija (%) | Blizanci/Gravidne |
|----------------|---------|-----------------------|---------------------|--------------|----------------|-------------------|
| Hladnokrvnjaci | HH | 92 | 59 | 1 | 64,13% | 1,69% |
| Hladnokrvnjaci | HP | 22 | 15 | 0 | 68,18% | 0,00% |
| Hladnokrvnjaci | OH | 5 | 4 | 0 | 80,00% | 0,00% |
| Poniji | P | 17 | 10 | 0 | 58,82% | 0,00% |
| Toplokrvnjaci | EP | 37 | 25 | 3 | 67,57% | 12,00% |
| Toplokrvnjaci | AP | 24 | 14 | 1 | 58,33% | 7,14% |
| Toplokrvnjaci | L | 248 | 194 | 4 | 78,23% | 2,06% |
| Toplokrvnjaci | OT | 201 | 133 | 6 | 66,17% | 4,51% |
| UKUPNO | | 646 | 454 | 15 | 70,28% | 3,30% |

Iz dobivenih podataka odredili smo uspješnost koncepcije, koja za sve kobile zajedno iznosi 70,28 %. Gledajući prema uzgojnom tipu za hladnokrvnjake, koncepcija je iznosila 65,55 %, za toplokrvnjake 71,76 %, a za ponije 58,82 %, te je uočena statistički značajna razlika ($p < 0,05$) između njih. Što se tiče pasmina, vrijednosti za pojedine pasmine navedene su u Tablici 1. Statistički značajnu razliku, što se tiče toplokrvnjaka, možemo vidjeti između arapskih punokrvnih (58,33 %) i lipicanskih (78,23 %), te ostalih toplokrvnih (66,17 %) i lipicanskih kobila, dok je kod hladnokrvnjaka velika razlika između hrvatskih hladnokrvnih (64,13 %) i hrvatskih posavskih (68,18 %) u odnosu na ostale hladnokrvne kobile (80,0 %).

Pojavnost blizanaca kod hladnokrvnih kobila iznosi 0,84 % na broj pregledanih, odnosno 1,28 % na broj gravidnih hladnokrvnih kobila. Za toplokrvne kobile je stopa učestalosti blizanca 2,75 % od broja pregledanih, te 3,83 % od broja gravidnih toplokrvnih kobila. Kod poni kobila nije zabilježena blizanačka gravidnost. Rezultati učestalosti blizanaca kod poni kobila te pojedinih pasmina prikazani su na slici 3. Vidljiva je statistički značajna razlika ($p < 0,05$) između engleskih punokrvnih i lipicanskih kobila.



Slika 3: Prikaz postotka blizanačke gravidnosti u gravidnih kobila pojedinih pasmina.

Statistički smo obradili i učestalost pobačaja blizanaca po pojedinim pasminama te smo dobili stopu od 100 % kod hrvatskog hladnokrvnjaka ($n=1$) i engleskog punokrvnjaka ($n=3$), od 25 % za lipicance ($n=1$), te 16,67 % za ostale toplokrvnjake ($n=1$). Za preostale pasmine nije zabilježen niti jedan slučaj pobačaja blizanaca.

U kobila lipicanske pasmine su ukupno zabilježena četiri slučaja blizanačke gravidnosti. Jedna lipicanska kobila spontano je pobacila blizance, no u podacima nije navedeno u kojem stadiju gravidnosti, te joj je iduće godine ponovno dijagnosticirana blizanačka gravidnost: Nakon manualne redukcije 15. dana izvršen je kontrolni pregled 19. dana te je ustanovljena resorpcija oba ploda. Kod četvrtog slučaja blizanačke gravidnosti

lipicanskih kobila manualno je reduciran jedan plod prilikom rane dijagnostike ždrebnosti 14. dana te je kobila u terminu oždrijebila živo ždrijebe.

Engleske punokrvne kobile broje tri slučaja blizanačke gravidnosti. Jedna je engleska punokrvna kobila pobacila blizance u zadnjoj trećini gravidnosti: dijagnoza blizanačke gravidnosti postavljene je pri pregledu u 3. mjesecu graviditeta, a vlasnik je odbio pobačaj. Kod iste kobile su iduće godine ponovno dijagnosticirani blizanci 50. dan gravidnosti te je induciran pobačaj. Treći slučaj blizanaca u engleskih punokrvnih kobila zabilježen je kod kobile koja uopće nije bila pregledana na ždrebnost te je oždrijebila blizance koji su odmah nakon poroda uginuli.

U jedne arapske punokrvne kobile utvrđeni su blizanci 65. dan gravidnosti i zbog poodmakle ždrebnosti, vlasnicima je preporučeno držanje kobile na restriktivnoj hranidbi, te je kobila oždrijebila jedno živo ždrijebe u terminu.

Kod ostalih pasmina toplokrvnih kobila tijekom desetogodišnjeg razdoblja blizanci su zabilježeni kod šest kobila. Jedna kobila Holstein pasmine je u 9. mjesecu gravidnosti pobacila blizance, koji prethodno nisu dijagnosticirani jer kobila uopće nije bila pregledana. Druga kobila pasmine Holstein ultrazvučno je dva puta pregledana, 25. dana te 70. dana, ali nije dijagnosticirana blizanačka gravidnost. Kobila je iduće godine oždrijebila dva vitalna ždrijebeta različitog spola (slika 4), no imala je zaostajanje posteljice. Blizanci su višekratno dijagnosticirani tijekom iste gravidnosti (25., 30 i 43. dana) i kod jedne kobile pasmine hrvatski toplokrvni konj, ali je vlasnik odbio daljnje liječenje te je došlo do spontane redukcije oba ploda. Također su utvrđeni blizanci kod kobile KWPN pasmine (kraljevski nizozemski toplokrvni konj), kojoj je nakon dvije neuspješne manuelne redukcije zametka 14. i 21. dan, 35. dana je uspješno izvedena TUGA (transvaginalna ultrazvučna aspiracija) bilateralno smještenih blizanaca te je kobila u terminu oždrijebila vitalno žensko ždrijebe. Kobili pasmine HŠK (hrvatski športski konj) je dijagnosticirana blizanačka gravidnost 15. dan nakon ovulacije, te je napravljena manualna redukcija jednog zametka, no kobila je resorbirala oba ploda. Kobili pasmine Zangersheide su nakon utvrđivanja blizanaca 14. dan bezuspješno dva puta, 14. i 24. dan, napravljene manualne redukcije ploda, a potom i TUGA 35. dana unilateralno smještenih blizanaca. Kontrolnim pregledom nakon mjesec dana ustanovljeno je da kobila više nije gravidna.

Kod hladnokrvnih kobila jedna je kobila pasmine hrvatski hladnokrvnjak pobacila blizance 280. dan gravidnosti i zaprimljena je na kliniku zbog teškog poroda. Kod te kobile prethodno nije zatražena niti provedena dijagnostika ždrebnosti.



Slika 4: Živi blizanci Holstein kobile, četiri dana stari, lijevo muški, desno ženski.

6. RASPRAVA

Blizanački graviditet kobilu je veliki ekonomski problem jer često završava pobačajem, ranom embrionalnom smrtnosti, preranim porodom ili rađanjem mrtve, slabe ili deformirane ždrebadi. Stoga je važno što prije dijagnosticirati blizanačku gravidnost da bismo mogli pravovremeno donijeti odluku o daljnjem postupanju s blizancima s ciljem redukcije jednog zametka ili prekida takvog graviditeta.

Dobiveni rezultati ovog istraživanja ukazuju na ispodprosječnu ukupnu koncepciju (70,28 %), budući da normalna koncepcija kobilu u punoj sezoni iznosi preko 80% (MAKEK i sur., 2009.). U lipicanskih kobilu koncepcija iznosi 78,23 %, te je viša nego u ostalih pasmina toplokrvnjaka (66,17%). Uzrok tome je najvjerojatnije način vođenja rasploda lipicanskih kobilu u državnim ergelama Đakovo i Lipik, gdje su kobile redovito višekratno pregledavane prije i poslije pripusta ili osjemenjivanja. Osim toga, vodi se detaljna evidencija o pojedinoj kobili, s ciljem sprječavanja ili ranog otkrivanja određene patologije, kao što su maternične ciste, dvostruka ovulacija i blizanački graviditet. Na pojavnost blizanaca utječe pasmina, hranidba i genetska predispozicija, te se oni najčešće pojavljuju u toplokrvnih pasmina i mlađih kobilu, a stopa im iznosi između 3,5 % do 4,5 % (GETZ i sur., 2011., ANAYA i sur., 2018.), odnosno od 2,8 do 6,8 % (McKINNON, 2011.). Obradom podataka pacijentica Klinike ustvrdili smo pojavnost blizanaca od 3,83 % u toplokrvnih kobilu, te 1,28 % u hladnokrvnih kobilu, što se podudara s objavljenom literaturom. Uočena je značajna razlika između prosjeka učestalosti dvostrukih ovulacija, koje rezultiraju blizanačkom gravidnošću, svih istraživanih pasmina (9.61%) i engleskih punokrvnjaka (19%), (LEBEDEVA i SOLODOVA, 2021.). Naši rezultati ukazuju na pojavnost blizanaca u 12,0 % gravidnosti engleskih punokrvnih kobilu (n=25), što se podudara s navodima ALLEN-a i sur. (2007.) o pojavnosti blizanaca kod čak 12,1% engleskih punokrvnih kobilu. MERKT i JÖCHLE (1993.) navode da je pojavnost blizanačke gravidnosti u engleskih punokrvnih kobilu uzgojenih u Njemačkoj iznosila između 0,9 i 4,0 % u razdoblju od 1967. do 1982., a s tendencijom smanjenja u novije vrijeme. Višu stopu blizanaca kod engleskih punokrvnih kobilu u našem istraživanju možemo obrazložiti i kao rezultat prakse vlasnika i njihovog nepovjerenja u ranu ultrazvučnu dijagnostiku ždrebnosti te prekasne dijagnostike blizanaca ili javljanja vlasnika tek kada je došlo do pobačaja. U lipicanskih kobilu, većinom u vlasništvu ergela, pojavnost blizanaca je 2,06 % (n=194). Također, pojedinim kobilama koje su već jednom imale blizance, povećava se mogućnost ponovljene blizanačke

gravidnosti (16,3 %), a zabilježeni su i slučajevi kada su pojedine kobile imale blizance tri, četiri, čak i šest puta (BRESIŃSKA i sur., 2004.). Provedenim istraživanjem zapazili smo dva primjera ponovljenih blizanaca u pacijentica Klinike, jedni su bili u lipicanske kobile, a drugi u engleske punokrvne kobile.

Na Klinici je unutar destogodišnjeg razdoblja zabilježeno ukupno 5 slučajeva pobačaja blizanaca u zadnjoj trećini gravidnosti što iznosi 33,33 % od ukupnog broja utvrđenih blizanačkih gravidnosti (n=15). Zabilježen je jedan slučaj kod hrvatske hladnokrvne kobile, koji je ujedno bio i jedini slučaj blizanaca u hladnokrvnjaka. Blizanačka gravidnost engleskih punokrvnih kobila je u sva 3 slučaja završila pobačajem ili uginućem odmah po porodu, kada vlasnici ili nisu zatražili pregled gravidnosti ili nisu željeli intervenirati nakon dijagnosticiranja blizanaca. Ovi se podatci podudaraju s navodima MERKT-a i JÖCHLE-a (1993.) o 38,6% pobačenih blizanaca kod engleskih punokrvnih kobila.

Blizanačku gravidnost koja je primijećena tijekom faze pokretljivosti zametka najbolje je riješiti manualnim gnječenjem zametnog mjehura (McKINNON, 2011.). Transvaginalna ultrazvučna aspiracija jednoga od blizanaca (transvaginal ultrasound-guided aspiration, TUGA) u novije se vrijeme pokazala kao metoda izboraza redukciju jednoga od blizanaca nakon tvorbe endometrijskih čašica (GETZ i sur., 2011.). Najčešća korištena metoda redukcije u ovom istraživanju je bila manualno gnječenje ploda, a izvođena je i TUGA, te je u jednom slučaju uspješno primijenjena restriktivna hranidba. Manualna redukcija blizanaca u našem je istraživanju primijenjena ukupno 7 puta kod 5 kobila, između 14. i 24. dana gravidnosti. Jednokratna manualna redukcija 14. ili 15. dana gravidnosti bila je uspješna kod 3 kobile, ali je samo jedna oždrijebila vitalan plod u terminu, dok je kod druge dvije došlo do resorpcije oba ploda. Kod dvije kobile nakon dvokratne manualne redukcije (prvi put 14. dana, te drugi put 21., odnosno 24. dana) i dalje su utvrđena dva ploda te su obje kobile podvrgnute TUGA-i 35. dana gravidnosti. Kod jedne su blizanci bili smješteni unilateralno te je nakon TUGA-e došlo do uginuća oba ploda, dok je kod druge nakon aspiracije bilateralno smještenih blizanaca kobile oždrijebila jedno vitalno ždrijebe u terminu. Naši rezultati u skladu su s rezultatima drugih autora, s obzirom da uspjeh provođenja ove metode ovisi o različitim čimbenicima, kao što je smještaj embrija (unilaterano ili bilateralno), dužini trajanja graviditeta i naravno o iskustvu veterinaru. MACPHERSON i REIMER (2000) su opisale primjenu TUGA-e kod 19 kobila koje su nosile blizance, u razdoblju između 43. i 50. dana nakon koncepcije. Dvije od osam kobila (25%) kod kojih su blizanci bili smješteni bilateralno oždrijebile su u terminu vitalno ždrijebe. U slučaju unilateralnog

smještaja blizanaca uspješnost TUGA-e bila je niža: samo jedna od 11 kobila (9%) iznijela je do kraja graviditet. KOSEC i MRKUN (2000) opisali su transvaginalnu aspiraciju u 8 kobila gravidnih između 22 i 48 dana. U šest kobila se graviditet nakon redukcije jednog od zametaka nastavio normalno, a kod dvije je došlo do resopcije i jednog i drugog ploda.

Od 15 kobila s utvrđenom blizanačkom gravidnošću u našem istraživanju samo je jedna oždrijebila vitalne plodove u terminu koji su uz intenzivnu njegu i dodatnu prehranu nadomjesnim kobiljim mlijekom preživjeli kritično razdoblje od prvih 14 dana.

Pravovremena dijagnostika gravidnosti omogućuje postizanje više stope koncepcije. Uz to je važna za rano otkrivanje blizanaca, omogućujući njihovu redukciju prije tvorbe endometrijskih čašica, čime kobila ranije ulazi u novi estrus. Izrazito je važno educirati vlasnike kobila o redovitim kontrolama, u početku prije pripusta ili osjemenjivanja kobila, a kasnije s ciljem rane dijagnostike gravidnosti, kako bi se izbjegao nepoželjan gubitak dijela ili cijele pripusne sezone. Također bi im trebalo objasniti probleme blizanačke gravidnosti, u nadi da će steći povjerenje i na vrijeme zatražiti dijagnostiku gravidnosti njihovih kobila.

7. ZAKLJUČCI

Pojavnost blizanačke gravidnosti učestalija je u toplokrvnih pasmina kobil, osobito kod engleskih punokrvnih kobil.

Blizanačka gravidnost često završava pobačajem u zadnjoj trećini graviditeta, ranom embrionalnom smrtnosti, preranim porodom ili rađanjem mrtve ili slabo vitalne ždrebadi.

Rana dijagnostika gravidnosti omogućuje pravovremeno otkrivanje blizanaca što rezultira većim izborom metoda redukcije jednog od blizanaca i postizanje više stope koncepcije.

Izrazito je važna edukacija vlasnika o uzgojnom menadžmentu kobil koji uključuje redovite kontrole prije i nakon pripusta ili osjemenjivanja s ciljem smanjene učestalosti i povoljnog ishoda blizanačke gravidnosti.

8. SAŽETAK

Iva Manjkas

Pojavnost i kliničko značenje blizanačke gravidnosti kobila na Klinici za porodništvo i reprodukciju tijekom desetogodišnjeg razdoblja

Blizanački graviditet kobila često završava pobačajem, ranom embrionalnom smrtnosti, preranim porodom ili rađanjem mrtve, slabe ili deformirane ždrebadi, što dovodi do smanjene koncepcije kobila i ekonomskih gubitaka. Cilj rada je odrediti učestalost i pasminsku predispoziciju za pojavu blizanaca kod kobila te analizirati ishode i mogućnost intervencije. Kobile su podijeljene u tri uzgojna tipa: hladnokrvnjaci, toplokrvnjaci i poniji. Hladnokrvne kobile su razvrstane u tri pasmine: hrvatski hladnokrvnjak (HH), hrvatski posavac (HP) te ostale pasmine hladnokrvnjaka (OH). Toplokrvne su razvrstane u četiri kategorije: engleski punokrvnjak (EP), arapski punokrvnjak (AP), lipicanac (L) te ostali toplokrvni konji (OT). U desetogodišnjem razdoblju (od 2010. do 2019. godine) pregledano je ukupno 646 kobila, pacijentica Klinike za porodništvo i reprodukciju, u svrhu dijagnostike gravidnosti. Graviditet je ustanovljen u 454 kobile (70,28 % od ukupnog broja pregledanih kobila), od kojih je 15 kobila imalo blizance (3,3 %). Uočena je statistički značajna razlika ($p < 0,05$) u koncepciji između lipicanskih kobila (78,23 %) u odnosu na arapske punokrvne (58,33 %) i ostale toplokrvne kobile (66,17 %), dok je kod hladnokrvnjaka velika razlika između hrvatskih hladnokrvnih (64,13 %) i hrvatskih posavskih (68,18 %) u odnosu na ostale hladnokrvne kobile (80,0 %). Uočena je statistički značajna razlika u pojavnosti blizanaca između hladnokrvnih (1,28 %) i toplokrvnih pasmina konja (3,83 %). Kod poni kobila nije zabilježena blizanačka gravidnost. U toplokrvnih pasmina uočena je statistički značajna razlika u pojavi blizanaca ($p < 0,05$) između engleskih punokrvnih (12,0 %) i lipicanskih kobila (2,06 %). Zabilježeno je ukupno 5 slučajeva pobačaja blizanaca u zadnjoj trećini gravidnosti što iznosi 33,33 % od ukupnog broja utvrđenih blizanačkih gravidnosti ($n=15$). Opisane su korištene metode redukcije blizanaca: manualno gnječenje ploda, TUGA (transvaginal ultrasound guided aspiration) te je u jednom slučaju uspješno primjenjena restriktivna hranidba. S obzirom da blizanačka gravidnost rezultira učestalim gubicima oba ploda i posljedično smanjenom koncepcijom, važna je edukacija vlasnika o uzgojnom menadžmentu kobila koji uključuje redovite kontrole prije i nakon pripusta ili osjemenjivanja. Rana dijagnostika gravidnosti omogućuje pravovremeno otkrivanje blizanaca što rezultira većim izborom metoda redukcije jednog od blizanaca i postizanje više stope koncepcije.

Ključne riječi: blizanačka gravidnost, pobačaj, kobile, pasmina, uzgojni tip

9. SUMMARY

Iva Manjkas

Prevalence and clinical importance of twin pregnancy in mares at Clinic for obstetrics and reproduction during a ten-year period

Twin pregnancy in mares often ends in abortion, early embryonic loss, premature birth or in birth of dead, weak or deformed foals, which leads to reduced conception of mares and economic loss. The purpose of this thesis is to determine the frequency and predisposition of the breed for prevalence of twins in mares, as well as to analyze the outcomes and the possibility of intervention. The mares are categorized according to three horse types: cold-blooded, warm-blooded and ponies. Cold-blooded mares are divided into three breeds: Croatian coldblood (HH), Croatian Posavina horse (HP) and the rest of cold-blooded horses (OH), while the warm-blooded are divided into four breeds: Thoroughbred (EP), Arabian horse (AP), Lipizzan horse (L) and other warm-blooded horses (OT). In the ten-year period (from year 2010 to 2019) a total of 646 mares, patients from Clinic for obstetrics and reproduction, have been examined with the purpose of pregnancy diagnostics. Pregnancy was established in 454 mares (70,28 %) out of the total number of the examined mares, 15 of which had twins (3,3 %). A significant statistical contrast in conception ($p < 0,05$) between Lipizzan mares (78,23 %) compared to Arabian (58,33 %) and other warm-blooded mares (66,17 %) was observed. Additionally, there is a significant contrast in conception between Croatian coldblood (64,13 %) and Croatian Posavina mares compared to other cold-blooded mares (80,0 %). There is a significant statistical contrast in prevalence of twins between cold-blooded (1,28 %) and warm-blooded horse breeds (3,83 %). Meanwhile, twin pregnancy was not recorded in pony mares. A significant statistical contrast was observed in twin prevalence ($p < 0,05$) in warm-blooded breeds between Thoroughbreds (12,0 %) and Lipizzan mares (2,06 %). A total of 5 cases of abortion of the twins was recorded in the last third of pregnancy, which amounts to 33,33 % of the total number of diagnosed twin pregnancies ($n=15$). Following reduction methods used on twin pregnancies were described: manual embryo crushing, TUGA (transvaginal ultrasound guided aspiration) and, in one case, a successfully applied restrictive diet. Considering that twin pregnancy often results in loss of both embryos and consequently, in reduced conception, it is important to educate the owners on breeding management of mares, which includes frequent controls before and after mating or artificial insemination. Early diagnosis of pregnancy allows for timely detection of twins, resulting in greater choice of one twin reduction method and in accomplishing a higher conception rate.

Key words: twin pregnancy, abortion, mare, breed, horse type

10. LITERATURA

1. ALLEN, W.R., F. STEWART (2001): Equine placentation. *Reprod. Fertil. Dev.* 13: 623–634.
2. ALLEN, W.R., L. BROWN, M. WRIGHT, S. WILSHER (2007): Reproductive efficiency of Flatrace and National Hunt Thoroughbred mares and stallions in England *Equine vet. J.* 39 (5) 438-445.
3. ALLEN, W.R., S. WILSHER (2018): Half a century of equine reproduction research and application: A veterinary tour de force. *Equine Veterinary Journal* 50 (2018): 10–21.
4. ANAYA, G., M.E. FERNÁNDEZ, M. VALERA, A. MOLINA, F. AZCONA, P. AZOR, M. SOLÉ, M. MORENO-MILLÁN, S. DEMYDA-PEYRÁS (2018): Prevalence of twin foaling and blood chimaerism in purebred Spanish horses. *The Veterinary Journal* 234 (2018): 142–144.
5. BRESIŃSKA, A., L. WACHOWSKA, T. SZWACZKOWSKI (2004): Genetic and environmental effects on twin pregnancy and length of reproduction in Thoroughbred mares. *Arch. Tierz., Dummerstorf* 47 (2004) 2: 119-127.
6. BRINSKO, S.P., T.L. BLANCHARD, D.D. VARNER, J. SCHUMACHER, C.C. LOVE, K. HINRICHS, D. HARTMAN (2013): *Manual of Equine Reproduction*. 3rd Edition, Mosby, Maryland Heights, Missouri, USA.
7. COCHRAN, R., B. REGGIO, J. CARTER, D. HYLAN, D. PACCAMONTI, C. PINTO, B. EILTS. A. GUITREAU, R.A. GODKE (1999): Pregnancies resulting from the transfer of sperm-injected equine oocytes harvested from altrenogest-treated mares. *Theriogenology* (1999): 181.
8. CRABTREE, J.R. (2018): Management of twins in horses. *In Practice* 40: 66-74.
9. FOOTE, A.K., S.W. RICKETTS, K.E. WHITWELL (2012): A racing start in life? The hurdles of equine feto-placental pathology. *Equine Veterinary Journal* 44, Suppl. 41 (2012): 120–129.
10. GETZ, I., N. PRVANOVIĆ, T. DOBRANIĆ, T. KARADJOLE, Z. MAKEK, N. MAĆEŠIĆ, A. MAGOČI (2009): Transvaginalna ultrazvučna aspiracija blizanaca u kobilama – prikaz iz prakse. *Veterinarska stanica* 40 (6): 389-398.

11. GETZ, I., T. DOBRANIĆ, A. ORAK, N. PRVANOVIĆ, J. GRIZELJ i I. FOLNOŽIĆ (2011): Otkrivanje i redukcija blizanaca u gravidnih kobila. *Veterinar* 49 (2): 34-39.
12. GINTHER, O.J. (1982): Twinning in mares: a review of recent studies. *J Eq Vet Sci* 2: 127-135.
13. GINTHER, O.J. (1984): Postfixation embryo reduction in unilateral and bilateral twins in mares. *Theriogenology* 22: 213-223.
14. GINTHER, O.J. (1988): Using twinning tree for designing equine twin-prevention programs. *J Eq Vet Sci* 8(2): 101-107.
15. GOVAERE, J., M. HOOGEWIJS, C. De SCHAUWER, A. VAN ZEVEREN, K. SMITS, P. CORNILLIE, A. De KRUIF (2009): An abortion of monozygotic twins in a warmblood mare. *Reprod Dom Anim* 44, 852–854.
16. HODDER, A.D.J., I.K.M. LIU, B.A. BALL (2008): Current methods for the diagnosis and management of twin pregnancy in the mare. *Equine Veterinary Education* 20 (9): 493-502.
17. HOROZ, H., M.R. KILIÇARSLAN, S. ALKAN, K. AK, G. KAŞIKÇI, Ç. TEK (2002): Reduction of early twin pregnancy to single pregnancy in the mare by crushing. *J. Fac. Vet. Med. Univ. Istanbul* 28(1): 81 – 84.
18. JOURNÉE, S.L., M. de RUIJTER-VILLANI, W.K. HENDRIKS, T.A.E. STOUT (2013): Efficacy of transvaginal ultrasound-guided twin reduction in the mare by embryonic or fetal stabbing compared with yolk sac or allantoic fluid aspiration. *Theriogenology* 80: 346–349.
19. KOSEC, M., J. MRKUN (2000): Ultrasound guided surgical reduction of twin pregnancies in the horse up to the 46th day of pregnancy. *Dtsch Tierarztl Wochenschr.* 107(4):139-41.
20. LEBEDEVA, L.F., E.V. SOLODOVA (2021): Technological approaches to the problem of double ovulation and twin pregnancies in mares. *IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science* 624 (2021) 012036.
21. LUNN, P., K.E. VAGNONI, O.J. GINTHER (1997): The equine immune response to endometrial cups. *Journal of Reproductive Immunology* 34 (1997) 203–216.
22. MACPHERSON, M.L. (2007): Identification and management of the high-risk pregnant mare. *AAEP Proceedings* 53 (2007): 293-304.

23. MACPHERSON, M.L., J.M. REIMER (2000): Twin reduction in the mare: current options. *Animal Reproduction Science* 60–61: 233–244.
24. MAKEK, Z., M. HERAK, M. CERGOLJ, A. TOMAŠKOVIĆ, D. GEREŠ, M. SUKALIĆ, I. GECEG, B. PREMZL, I. BARAC (1993): Dokazivanje estrogena u mokraći gravidnih kobila Lunaas-ovom metodom. *Vet. stanica* 24 (6): 323-327.
25. MAKEK, Z., I. GETZ, N. PRVANOVIĆ-BABIĆ, A. TOMAŠKOVIĆ, J. GRIZELJ (2009): Rasplodivanje konja, Veterinarski fakultet, Zagreb.
26. MARI, G., E. IACONO, B. MERLO, C. CASTAGNETTI (2004): Reduction of twin pregnancy in the mare by transvaginal ultrasound-guided aspiration. *Reprod Dom Anim* 39: 434–437.
27. McCUE, P.M. i A.O. McKINNON (2011.): 231 Pregnancy examination. U: McKINNON A.O., E.L. SQUIRES, W.E. VAALA i D.D. VARNER (Eds): *Equine Reproduction*. 2nd edn., Volume 2, Blackwell Publishing Ltd (Wiley-Blackwell), Chichester, Oxford (UK), Ames (USA); 2245-2261.
28. McKINNON, A.O. (2007): Chapter 54; Twin Reduction Techniques. U: SAMPER, J.C., J.F., PYCOCK, A.O. McKINNON: *Current Therapy in Equine Reproduction*, Saunders, Elsevier, St. Louis, Missouri, USA; 357-373.
29. McKINNON, A. O. (2011.): 220 Management of twins. U: McKINNON A.O., E.L. SQUIRES, W.E. VAALA i D.D. VARNER (Eds): *Equine Reproduction*. 2nd edn., Volume 2, Blackwell Publishing Ltd (Wiley-Blackwell), Chichester, Oxford (UK), Ames (USA); 2099-2117.
30. McKINNON, A. O. (2011.): 241 Origin and outcome of twin pregnancies. U: McKINNON A.O., E.L. SQUIRES, W.E. VAALA i D.D. VARNER (Eds): *Equine Reproduction*. 2nd edn., Volume 2, Blackwell Publishing Ltd (Wiley-Blackwell), Chichester, Oxford (UK), Ames (USA); 2350-2358.
31. MERKT, H., W. JÖCHLE (1993): Abortions in thoroughbreds: rate of occurrence, treatments and prevention. *Journal of Equine Veterinary Science* 13(12): 690-694.
32. MILLER, A., G.L. WOODS (1988): Diagnosis and correction of twin pregnancy in the mare. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice* 4(2): 215-220.
33. NOAKES, D.E., T.J. PARKINSON, G.C.W. ENGLAND (2001): *Arthur's Veterinary Reproduction and Obstetrics*. 8th Edition, Saunders, Elsevier Limited, Philadelphia, USA.

34. PIZZIGATTI, P., F. A. BATISTA, C. FERREIRA MARTINS, T. RINALDI MÜLLER, C. A. HUSSNI (2012): Haematic mummification in a mare with twin pregnancy. *Journal of Equine Veterinary Science* 32: 305-308.
35. PYCOCK, J.F. (2007): Chapter 52; Pregnancy Diagnosis in the Mare. U: SAMPER, J.C., J.F., PYCOCK, A.O. McKINNON: *Current Therapy in Equine Reproduction*, Saunders, Elsevier, St. Louis, Missouri, USA; 335-342.
36. RAU, J., D. TIEDEMANN, J. SIELHORST, A. TÖNISSEN, D. BURGER, G. MARTINSSON, K. ROHN, H. OLDENHOF, H. SIEME (2018): Effects of mares' age and day of gestation on efficacy of transvaginal ultrasound-guided twin reduction. *Tierärztliche Praxis Großtiere* 3 (2018): 172-177.
37. ROONEY, J.R. (1970): *Autopsy of the Horse*, Baltimore, Williams & Wilkins.
38. SCHRAMME-JOSSON, A. (2009): Diagnosis and management of twinning in mares. *In Practice* (2009) 31; 226-231.
39. VERA, L., A. DECLOEDT, G. Van STEENKISTE, D. De CLERCQ, J. GOVAERE, G. Van LOON (2018): Electrocardiographic confirmation of a twin pregnancy in a mare at 8 months of gestation. *Journal of Veterinary Cardiology* 20(4): 294-299.
40. VINCZE, B., A. GÁSPÁRDY, O. SZENCI (2016): Serum equine alpha-fetoprotein (AFP) levels as an indicator of twin pregnancy in the mare. <https://www.researchgate.net/publication/318361043>
41. WOLFSDORF, K.E. (2006): Management of Postfixation Twins in Mares. *Vet Clin Equine* 22 (2006): 713–725.
42. WOLFSDORF, K.E., D. RODGERSON, R. HOLDER, A. SCHOERGENDORF (2009): Success rate of post-fixation twin reduction using cranio-cervical dislocation. *AAEP Proceedings* 55 (2009): 257-261.
43. WOLFSDORF, K.E. i M.L. MACPHERSON (2018): *Management of Twins*, Hagyard Equine Medical Institute, Lexington, Kentucky.

11. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 20. 7. 1994. u Bjelovaru, gdje sam pohađala III. osnovnu školu Bjelovar, a kasnije i Gimnaziju Bjelovar. 2013. godine maturiram i upisujem Veterinarski fakultet u Zagrebu. Dugi niz godina me interesiraju konji te se na fakultetu pridružujem volonterima konjske prakse u sklopu Klinika fakulteta. Također sam dobitnica dviju CEEPUS-ovih stipendija za razmjenu, u Beču i Ljubljani. U slobodno vrijeme se bavim jahanjem te se natječem na preponskim, a i dresurnim natjecanjima. Sudjelovala sam i na izvanstudijskim ERASMUS + programima, odnosno razmjenama mladih.