

# Metode biotehnologije rasplodivanja u govedarstvu Republike Hrvatske

---

Ivelić, Tea

Master's thesis / Diplomski rad

2024

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:178:594257>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-04-03**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
VETERINARSKI FAKULTET

SVEUČILIŠNI INTEGRIRANI PRIJEDIPLOMSKI I DIPLOMSKI  
STUDIJ *VETERINARSKA MEDICINA*

DIPLOMSKI RAD

Tea Ivelić

METODE BIOTEHNOLOGIJE RASPLOĐIVANJA U GOVEDARSTVU  
REPUBLIKE HRVATSKE

Zagreb, 2024

Tea Ivelić

Odjel klinika Veterinarskog fakulteta

Klinika za porodništvo i reprodukciju

Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

**Predstojnik:** prof. dr. sc. Tugomir Karadjole

**Mentori:** izv. prof. dr. sc. Iva Getz

prof. dr. sc. Marko Samardžija

**Članovi Povjerenstva za obranu diplomskog rada:**

1. prof. dr. sc. Martina Lojkić
2. prof. dr. sc. Marko Samardžija
3. izv. prof. dr. sc. Iva Getz
4. izv. prof. dr. sc. Ivan Folnožić (zamjena)

Rad sadržava 40 stranica, 10 slika, 59 literaturnih navoda

## ZAHVALA

*Prije svega, zahvaljujem svojim mentorima izv. prof. dr. sc. Ivi Getz i prof. dr. sc. Marku Samardžiji na stručnom vodstvu, korisnim savjetima i strpljenju tijekom pisanja rada. Hvala što ste bili na raspolaganju kada mi je bila potrebna pomoć.*

*Veliko hvala cijeloj mojoj obitelji na podršci. Nesebično ste me bodrili tijekom ovih osam godina i prolazili sa mnom sve moje prolaskе i padove na ispitima, odlaske i dolaske kući, omogućili da idem studirati neopterećena i uvijek punog zamrzivača. Čestitam šta ste izdržali. Da vas nema tribalo bi vas izmislit.*

*Hvala mom momku na savjetima, podršci, strpljenju te podizanju morala i rečenici: „Samo ti pomalo, nije priša“.*

*Također, hvala i mojim Škarpinama i blaženom među ženama, cijelom Joj-u i Nanijevima na svim druženjima, izlascima i fronti dobrog raspoloženja koju ste držali u kojem god gradu se nalazila.*

*Didi, karta je tu!*

## POPIS I OBJAŠNJENJE KRATICA:

CIDR - *controlled internal drug device*, kontrolirani unutarnji hormonalni uređaj

CASA - *computer assisted sperm analysis*

CL - *corpus luteum*, žuto tijelo

DNK - deoksiribonukleinska kiselina

eCG - *equine chorionic gonadotropin*, konjski korionski gonadotropin

ET - embriotransfer

FSH - folikulostimulirajući hormon

GnRH - *gonadotropin-releasing hormone*

HAPIH – Hrvatska agencija za poljoprivredu i hranu

IETS- *International Embryo Technology Society*

IJ - internacionalna jedinica

LH - luteinizirajući hormon

MOET - multipla ovulacija i embriotransfer

OPU - ovum pick-up

PGF - prostaglandin F

PGF<sup>2α</sup> - prostaglandin F 2 alfa

PRID - *progesteron releasing intrvaginal device*, progesteron otpuštajući intravaginalni uređaj

SOFaaBSA - *synthetic oviductal fluid with amino acids and bovine serume albumine*

UO - umjetno osjemenjivanje

## POPIS PRILOGA:

Slika 1. Bimanualna (rektovaginalna) metoda umjetnog osjemenjivanja - slika preuzeta s [https://www.researchgate.net/figure/Rectovaginal-technique-for-artificial-insemination-of-cows-target-of-the-inseminator\\_fig7\\_356068675](https://www.researchgate.net/figure/Rectovaginal-technique-for-artificial-insemination-of-cows-target-of-the-inseminator_fig7_356068675)

Slika 2. Cassou pistolet - slika preuzeta s <http://www.livestocktool.com/product/cattle-farming-equipments1/veterinary-instruments-for-cattle/artificial-insemination-gun-in-cattle-equipment.html>

Slika 3. Ghent pistolet - slika preuzeta s <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0093691X05001214>

Slika 4. Vaginalni spekulum - slika preuzeta s <http://www.livestocktool.com/product/cattle-farming-equipments1/veterinary-instruments-for-cattle/vaginal-speculum-for-cattle-cow.html>

Slika 5. CIDR, PRID i PRID Delta/E uređaji - slika preuzeta s <https://quizlet.com/ie/539198733/8-synchronization-of-oestrus-flash-cards/>

Slika 6. Pozicija PRID – slika preuzeta s <https://www.priddelta.ca/vhp.php>

Slika 7. Pozicija CIDR – slika preuzeta s <https://www.priddelta.ca/vhp.php>

Slika 8. Spremnik sa tekućim dušikom – slika preuzeta s <https://www.cncdcryogenictank.com/cryogenic-liquid-tank/liquid-nitrogen-tank/20l-small-capacity-freezing-bull-semen-tank.html>

Slika 9. Seksiranje sperme- slika preuzeta s <https://ansci.wisc.edu/jjp1/equine/technology/spsex.html>

Slika 10. Transvaginalna aspiracija jajnih stanica - slika preuzeta s <https://transova.com/2017/07/in-vitro-fertilization-embryo-transfer-a-comparison>

## SADRŽAJ:

1.	<b>UVOD</b> .....	1
2.	<b>PREGLED REZULTATA DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA</b> .....	3
2.1.	Znakovi i otkrivanje estrusa.....	3
2.2.	Umjetno osjemenjivanje.....	4
2.3.	Sinkronizacija estrusa.....	8
2.4.	Protokoli za sinkronizaciju estrusa.....	8
2.4.1.	OVSYNCH.....	9
2.4.2.	Dupli OVSYNCH.....	9
2.4.3.	Intravaginalne spužvice.....	9
2.4.4.	PRID i CIDR.....	10
2.4.5.	Progesteron i eCG.....	12
2.4.6.	Implatanti s norgestometom.....	12
2.5.	Plodnost bikova.....	13
2.5.1.	Polučivanje ejakulata.....	14
2.5.2.	Ocjena ejakulata i spermija.....	14
2.6.	Razrjeđivači i zamrzavanje sperme.....	16
2.7.	Seksiranje sperme.....	19
2.8.	Multipla ovulacija i embriotransfer (MOET).....	21
2.9.	Ovum pick-up.....	23
2.10.	<i>In vitro</i> oplodnja i proizvodnja zametaka.....	25
2.11.	Kloniranje, mikromanipulacija i dijeljenje zametaka.....	26
2.12.	Ugrožene pasmine goveda u Republici Hrvatskoj.....	27
2.13.	Biotehnologija rasplodivanja u Republici Hrvatskoj.....	28
3.	<b>ZAKLJUČCI</b> .....	31
4.	<b>LITERATURA</b> .....	32
5.	<b>SAŽETAK</b> .....	38
6.	<b>SUMMARY</b> .....	39
7.	<b>ŽIVOTOPIS</b> .....	40

## 1. UVOD

Biotehnologija se definira kao znanost koja koristi žive organizme za stvaranje, modifikiranje ili poboljšanje proizvoda. Sama pojava i brzi razvoj biotehnologije rasplodivanja je rezultat ekonomske dobiti koja se pojavljuje kada se poveća broj genetski superiornijih potomaka čiji roditelji imaju dobra genetska obilježja. Unaprjeđuje se proizvodnja stoke tako što se poboljšava reprodukcija različitim metodama te se smanjuju novčani gubici smanjivanjem pojave bolesti, omogućava se održavanje ugroženih životinja te je transport genetskog materijala brži, lakši i jeftiniji (HADGU i FESSEHA, 2020.).

Metode koje spadaju u biotehnologiju rasplodivanja su: umjetno osjemenjivanje (UO), smrzavanje sperme i zametaka, sinkronizacija estrusa, multipla ovulacija i embriotransfer (MOET), aspiracija jajne stanice (OPU- *ovum pick-up*), oplodnja *in vitro* i seksiranje sperme. Prvi podatci o umjetnom osjemenjivanju datiraju još iz 14. stoljeća. Prema legendama, jedan Arap je u kobilu, neposredno prije koitusa, stavio klupko vune koje je upilo ejakulat te ga potom stavio u vaginu svoje kobile koja je nakon toga ostala gravidna (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.). Tijekom tridesetih i četrdesetih godina prošlog stoljeća pojava razrjeđivača sjemena, izum elektroejakulatora i dodatak antibiotika u spermiju dovodi do razvoja umjetnog osjemenjivanja. Godine 1949., otkrićem postupka krioprezervacije sperme, napravljen je najveći iskorak u umjetnom osjemenjivanju. Tijekom pedesetih i šezdesetih godina razvijeni su protokoli za superovulaciju u kojima se koriste gonadotropini i FSH, otkrivena je kapacitacija spermija, uspješno je obavljen prvi embriotransfer u goveda i izumljen je izolirani spremnik tekućeg dušika. Poboljšani su razrjeđivači sjemena i staklene ampule za sjeme su zamijenjene plastičnima. Početni uspjesi *in vitro* razvojem zametaka, rođenja teladi nakon seksiranja, rođenja blizanaca nakon dijeljenja zametka i razvoj računalno potpomognute analize sjemena su obilježili sedamdesete godine. Tijekom osamdesetih godina prošlog stoljeća razvilo se odvajanje X i Y spermija protočnom citometrijom, rodila se telad koja je nastala *in vitro* oplodnjom, nastali su klonovi prijenosom nukleusa iz embrionalnih stanica te uzimanje jajne stanice putem folikularne aspiracije vođene ultrazvukom. U dvadeset prvom stoljeću vidjeli smo uvođenje najmoćnije biotehnologije od razvoja umjetne oplodnje i krioprezervacije. Brza i jeftina analiza genoma i čipovi za genotipizaciju vode revoluciju u industriji rasplodivanja goveda te uvođenjem tehnologije za uređivanje genoma promjene u razvoju se događaju jako brzo (MOORE i HASLER, 2017.).

Reproduktivne tehnologije koje su primjenjive na goveda su klasificirane u one koje zahtijevaju nisku, srednju i visoku tehnološku razinu. U kategoriju niske tehnologije ulazi



određivanje dobi goveda za prvo parenje, odabir pasmine i križanje određenih jedinki, kontrola teljenja i servis perioda te dijagnoza gravidnosti. U srednju kategoriju ulaze opcije kao što je sinkronizacija estrusa, a u visoku razinu spada proizvodnja blizanaca, kontrola spola teladi pri rođenju i kloniranje (GORDON, 1996.).

Mapiranje gena i selekcija uz pomoć markera mogu omogućiti nove genetske varijacije koje se prenose iz jedne pasmine u drugu iste vrste. Odabir uz pomoć markera može povećati točnost selekcije i također smanjiti generacijski interval, osobito ako se koristi u kombinaciji s reproduktivnim tehnologijama koje su u razvoju. Parenje u srodstvu tj. *inbreeding* se ne može izbjeći u potpunosti u stočarstvu, ali je cilj uzgajivača njegovo maksimalno ograničavanje uz maksimalizaciju napretka (WILMUT i sur., 1992.).

Stočna industrija u Europi je doživjela veliku reorganizaciju nakon pojave goveđe spongiformne encefalopatije i epidemije slinavke i šapa 2001. godine. Najveći pokretači biotehnologije rasplodivanja su genetske kompanije te uzgajivačke zadruge koje profitiraju od prodaje genetskog materijala kao što je sperma, zametci itd. Veliki problem s kojim se nosi Europa je i negativan stav prema tehnologiji rasplodivanja te je potrebno dokazati pozitivne strane i bitnu ulogu ovih metoda (GALLI i sur., 2003.).

## 2. PREGLED REZULTATA DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA

### 2.1. Znakovi i otkrivanje estrusa

Otkrivanje estrusa jedan je od najvažnijih čimbenika koji utječe na reproduktivnu učinkovitost u mliječnim goveda, posebno na farmama gdje vrše umjetno osjemenjivanje. Najkarakterističniji znak estrusa u krava je kada stoje i dopuštaju da ih se zaskoči (REITH i HOY, 2018.). Aktivno opasivanje obuhvaća njuškanje vulve druge krave i zaskakivanje, a pasivno dopuštanje da ju njuška druga krava i dopuštanje zaskakivanja (DOBSON i sur., 2018.). Krava koja je u estrusu će stajati nepomično kada se na nju sa stražnje strane popne bik ili druga krava te lagano izvije leđa. Također će pokušati zaskočiti i druge krave, ali ako druge krave nisu u estrusu one će se odmaknuti. Ponekad će krava zaskočiti drugu kravu s prednje strane, gdje je drugoj kravi glava, a ne sa stražnje strane. U toj situaciji krava koja je u estrusu je ona koja je zaskočila drugu, a ne ona koja je zaskočena. Mogu se vidjeti i ostali znakovi kao što su: prozirni iscjedak iz vulve, podizanje i prebacivanje repa, lizanje, njuškanje i trljanje o drugu stoku, oticanje i crvenilo stidnice, nemir i povećana aktivnost te povećana pozornost na aktivnost ostale stoke i ljudi, mršenje dlake na korijenu repa i blaga abrazija kao posljedica zaskakivanja te je često i privremeno smanjenje mliječnosti (GORDON, 1996.). U razdoblju estrusa krave se više uključuju u agonističke reakcije nego kada nisu u estrusu. Te reakcije su: udaranje glavom o glavu, češće pristupanje drugim kravama, pojačano hodanje i viša očitavanja na pedometrima, pokušavanje zaskakivanja i odgurivanje. Agresivne interakcije su intenzivnije na dan estrusa u odnosu na druge dane, a najčešće je bilo udaranje glavom u glavu. U usporedbi onih krava koje nisu u estrusu, krave koje jesu pokazale su smanjenje vremena preživljanja. Trajanje se postupno smanjivalo počevši 2 dana prije početka, a minimalno vrijeme preživljanja utvrđeno je na dan estrusa. (REITH i HOY, 2018.).

Otkrivanje estrusa predstavlja ograničavajući čimbenik za optimalno rasplodivanje i pravovremeno umjetno osjemenjivanje (TOMAŠKOVIĆ i sur., 2007.). Vrijeme umjetnog osjemenjivanja u odnosu na opažene znakove estrusa u mliječnim pasmina goveda je aktivno područje reproduktivnih istraživanja preko 50 godina jer vrijeme UO u odnosu na ovulaciju ima značajan učinak na ishode gravidnosti (FRICKE i sur., 2014.). Tehnike koje trebaju dati učinkovit odgovor na problem otkrivanja estrusa trebale bi osigurati kontinuirani nadzor goveda, osigurati točnu i automatsku identifikaciju krava koje su u estrusu, raditi u korist produktivnosti i životnog vijeka krave, zahtijevati minimalne troškove i biti vrlo točne u prepoznavanju odgovarajućih fizioloških i bihevioralnih događaja koji su povezani s ovulacijom. Upotreba boja na bazi ulja ili vode nanesenih na korijen repa tj. točku koja se

najčešće trlja prsima krave ili bika koja je zaskočila je jako učinkovit način otkrivanja, ali se treba uzeti u obzir da se boja može skinuti i drugim načinima. Bikovi, volovi i krave tretirane hormonima koriste se kao životinje markeri. Opremljene su uređajem za označavanje na bradi. Kad životinja pritisne dolje s bradom na leđa ili zadnjicu krave koju je zaskočila, ventil s oprugom u uređaju se otvori i ispusti se tekućina markera. Bikovi probači koriste se za otkrivanje estrusa nakon što su prvo postali nesposobni za oplodnju krava, primjerice vazektomijom. Također se koriste i vaginalne sonde za detekciju promjena u električnom otporu tekućine u vagini koji varira u različitim fazama ciklusa, a najniže vrijednosti se javljaju u estrusu. Progesteronski testovi su jako korisni i mogu biti ključni za otkrivanje tjeranja pogotovo kada je prisutno tiho tjeranje (prisutna ovulacija bez znakova estrusa). Iako nisu uočeni znakovi, testiranjem razine progesterona u mlijeku moguće je detektirati niske razine ovog hormona te postići zadovoljavajuće stope koncepcije. Još se za otkrivanje estrusa koriste kamere u nastambama, praćenje tjelesne temperature, promjene u aktivnosti krava i fluktuacije u mliječnosti (GORDON, 1996.).

U posljednjih nekoliko godina postoji jasan trend prema korištenju tehnoloških metoda za točnu detekciju estrusa u mliječnim goveda pa se montažni detektor koristi za otkrivanje zaskakivanja, a pedometri (pričvrste se za nogu krave i broje korake) i akcelerometri (pričvrste se za ogrlicu i mjere horizontalne akceleracije koje se događaju zbog pokreta glave krave dok hoda) se koriste za otkrivanje povećane aktivnosti tijekom proestrusa. Elektronički uređaji osjetljivi na pritisak kao što je HeatWatch, temelje se na otkrivanju početka i duljine zaskakivanja. Sustav se sastoji od odašiljača osjetljivog na pritisak koji je zalijepljen na sakralnu regiju ispred korijena repa. Senzor se aktivira pomoću težine životinje koja zajaše kravu i treba trajati najmanje dvije sekunde da bi se ograničio broj lažnih potvrda. Putem radio signala podatci se šalju do prijemnika i zabilježavaju na softveru za upravljanje na računalu (REITH i HOY, 2018.).

## 2.2. Umjetno osjemenjivanje

Umjetno osjemenjivanje je prva metoda biotehnologije koja se koristila u rasplodivanju goveda (MOORE i HASLER, 2017.). Prvo detaljno znanstveno opisano umjetno osjemenjivanje proveo je talijanski fiziolog i svećenik Lazzaro Spallanzani 1780. godine. Polučio je pseći ejakulat i prenio ga u spolne organe kuje koja je okotila 3 štenca. Njegov pokus je dvije godine nakon ponovio P. Rossi, ali nakon toga više od sto godina nema provođenja istraživanja na ovu temu. Krajem 19. stoljeća E. Millais osjemenjuje kuje te istovremeno W.

Heape, engleski veterinar, umjetno osjemenjuje kuje i kobile. Sand i Stribol 1902. u Danskoj za umjetno osjemenjivanje kobila koriste kondom. Najznačajniji istraživač i pionir umjetnog osjemenjivanja bio je E. I. Ivanov koji je između 1899. i 1912. godine provodio istraživanja i uveo nove metode koje su se primjenjivale u praksi za osjemenjavanje kobila, krava, ovaca, ptica i pčela (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.). Primarna pokretačka snaga UO-a je njegov potencijal povećanja stope genetskog dobitka stoke tako što se koriste bikovi sa najboljim genetskim obilježjima (MOORE i HASLER, 2017.).

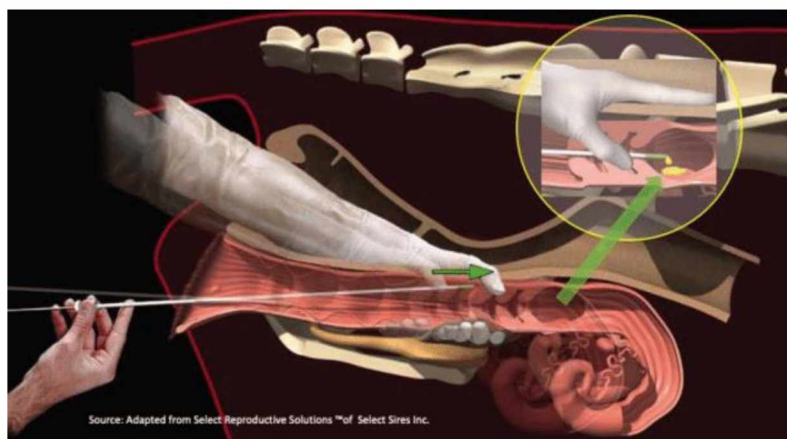
Mliječna industrija ima duboku povijest sustava ispitivanja potomstva zbog identifikacije elitnih bikova koji će se koristiti u daljnjoj oplodnji plotkinja. Plodnost bikova se prati putem rane oplodnje u više stada te se onda pušta u širu upotrebu. S druge strane, profitabilnost komercijalnog mliječnog krda ovisi i o sposobnosti individualnih visoko vrijednih krava da što brže budu spremne za iduću oplodnju tj. ovisi o trajanju servis perioda. Upotreba UO je bila od ogromne ekonomske koristi kroz genetsko poboljšanje proizvodnje mlijeka, kontrolu spolnih i drugih bolesti te kroz smanjenje prijenosa smrtonosnih gena (VISHWANATH, 2003.).

Prva metoda za umjetno osjemenjivanje stoke je bilo polaganje sjemena u vaginu, kao što je slučaj oplodnje i prirodnim putem. Zatim je razvijena metoda sa spekulom (Slika 4) koja je uključivala promatranje cervikalnog otvora sa svjetlom te se plotkinja osjemenjuje tako što se sjeme položi plitko u grlić maternice. Zajedno s ovom metodom uveden je i koncept inseminacije sa niskim dozama sperme. Izvješteno je da su slične stope plodnosti nakon osjemenjivanja sa 0,2 ml i 4 ml ejakulata. Iako su ove dvije metode jednostavne za korištenje, nisu bile vrlo učinkovite zbog količine sperme koja je potrebna, male stope koncepcije te napora da se održi dobra higijena. Transformacija UO se dešava razvojem bimanualne (rektovaginalne) metode od strane danskih veterinara 1937. koja se i danas koristi. Ovom metodom jednom rukom u rektumu se drži cerviks te se kroz njega uvodi pistolet za oplodnju koji se nalazi u drugoj ruci koja ga polagano gura (Slika 1). Primjenom ove metode sjeme se polaže duboko intracervikalno. Stopa oplodnje ovim putem se povećala te je potreban puno manji broj spermija (MOORE i HASLER, 2017.).

Prosječno trajanje estrusa je 18 sati, a generalno je prihvaćeno da do ovulacije dolazi 10 do 12 sati nakon završetka estrusa. Plotkinje koje su osjemenjene u periodu između 6 do 24 sata nakon početka estrusa pokazale su zadovoljavajuću stopu koncepcije, a najbolji rezultati postižu se kada se krave osjemene sredinom ili krajem estrusa. Ako se detektirao estrus ujutro, treba ju umjetno osjemeniti popodne, a ako se tjeranje primijetilo poslije podne treba provesti

osjemenjivanje iduće jutro. UO jednom dnevno je pokazalo zadovoljavajuće stope uspjeha pod odgovarajućim uvjetima. Potrebno je kvalitetno sjeme ili svježe sjeme, ali mnogo toga može utjecati na oplodnju. Faktori koji utječu na oplodnju su: optimalno vrijeme oplodnje, plodnost bikova, iskustvo osobe koja provodi inseminaciju te doza sperme. U nekim slučajevima potrebno je osjemeniti kravu više puta dnevno (GORDON, 1996.).

Profesor Hoffman je u Stuttgartu konstruirao prvi komplet instrumenata za umjetno osjemenjivanje 1905. godine (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.). Većina umjetnih osjemenjivanja kod goveda se izvodi pomoću Cassou pistoleta (inseminator po Cassou) od nehrđajućeg čelika (Slika 2). Provedeno je mnogo istraživanja kako bi se procijenio učinak dubokog osjemenjivanja i u većini slučajeva nije pronađena značajna razlika između inseminacije duboko u cerviks i inseminacije u tijelo maternice. Ghent pistolet (Slika 3) je razvijen kako bi se olakšalo polaganje sperme u blizini uterotubalnog spoja bez oštećenja endometrija. Sastoji se od krutog dijela za prolazak cerviksa i savitljivog dijela koji prati zavoje maternice. Izrađen je od netoksičnih materijala za jednokratnu upotrebu da bi se spriječilo širenje bolesti ponovnom uporabom na više krava te mu je cijena jako niska (VERBERCKMOES i sur., 2005.).



Slika 1. Bimanualna (rektovaginalna) metoda umjetnog osjemenjivanja – slika preuzeta s [https://www.researchgate.net/figure/Rectovaginal-technique-for-artificial-insemination-of-cows-target-of-the-inseminator\\_fig7\\_356068675](https://www.researchgate.net/figure/Rectovaginal-technique-for-artificial-insemination-of-cows-target-of-the-inseminator_fig7_356068675)



Slika 2. Cassou pistolet – slika preuzeta s <http://www.livestocktool.com/product/cattle-farming-equipments/veterinary-instruments-for-cattle/artificial-insemination-gun-in-cattle-equipment.html>



Slika 3. Ghent pistolet – slika preuzeta s <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0093691X05001214>



Slika 4. Vaginalni spekulum – slika preuzeta s <http://www.livestocktool.com/product/cattle-farming-equipments/veterinary-instruments-for-cattle/vaginal-speculum-for-cattle-cow.html>

### 2.3. Sinkronizacija estrusa

Otkrivanje estrusa ključno je za sinkronizaciju estrusa i zahtjeva dobru praksu uzgoja krava. Sinkronizacija estrusa je alternativna strategija za zaobilaženje problema u otkrivanju estrusa. Ovim procesom ženke se dovode u stanje predovulacijske folikularne aktivnosti pomoću hormona te se tako povećava vjerojatnost otkrivanja estrusa i stopa koncepcije (HADGU i FESSEHA, 2020.). Sinkronizacija estrusa skraćuje sezonu teljenja, povećava uniformnost teladi i olakšava provođenje umjetnog osjemenjivanja (LAMB i sur., 2010.).

Početni programi sinkronizacije estrusa nisu uspjeli riješiti primarno ograničenje, a to je nedostatak normalnih ciklusa kod junica prije ili poslije puberteta te postpartalni anestrus kod doводи do manje sinkronizacije sazrijevanja folikula i regresije žutog tijela. Kao rezultat, početak estrusa se događao tijekom više dana u kojem je njegova detekcija bila neophodna. Nedostatak sinkronizacije estrusa i ovulacije sprječava umjetno osjemenjivanje sa fiksnim vremenom i samim time postizanje prihvatljive stope koncepcije (LAMB i sur., 2010.).

### 2.4. Protokoli za sinkronizaciju estrusa

Jedan od prvih pokušaja sinkronizacije estrusa bila je aplikacija jedne injekcije PGF-a za induciranje luteolize u junica nakon čega je slijedilo otkrivanje estrusa i UO. Izazivanje luteolize ovim putem moguće je samo aplikacijom dok je životinja u diestrusu, kada je prisutno žuto tijelo. Ako su u krave i junice u metestrusu ubrizgavanje hormona neće imati učinka jer je CL refraktoran tijekom ove faze (LAMB i MERCADANTE, 2016.).

Kada su sustavi s jednom injekcijom postali uspješni, znanstvenici su se usredotočili na višestruke injekcije da bi još više smanjili vrijeme potrebno za otkrivanje estrusa. Protokol PGF<sub>2α</sub> se izvodi pomoću dvije injekcije kojima je doza 25 mg po injekciji, a razmak između njih 11 do 14 dana. Simultano su provedena istraživanja gdje su korišteni subkutani implantati koji sadrže norgestomet koji je sprečavao pojavu estrusa i ovulacije. Sustav treće generacije je stvoren tek nakon što je otkriveno da folikuli jajnika rastu u različitim obrascima koji su poput valova s jednim dominantnim folikulom. Kontrola folikularnih valova jednom injekcijom GnRH u nasumičnim fazama ciklusa potiče oslobađanje LH što dovodi do ovulacije ili luteinizacije dominantnog folikula. Posljedično tome novi val nastupa 1.5 do 2 dana nakon aplikacije. (LAMB i sur., 2010.).

#### 2.4.1. OVSYNCH

Najčešći vremenski ograničen sustav umjetnog osjemenjivanja je sedmodnevni Ovsynch protokol. Sastoji se od davanja GnRH (100 mg) kako bi se induciralo otpuštanje luteinizirajućeg hormona koji uzrokuje ovulaciju. Nakon 5 do 7 dana aplicira se PGF<sup>2α</sup> (jedna injekcija za sedmodnevni program ili dvije za petodnevni program gdje je razmak između njih 24 sata) da bi došlo do lize žutog tijela. Zatim se aplicira druga doza GnRH (56 sati nakon prve doze PGF<sup>2α</sup> za sedmodnevni, a 48 sati nakon druge za petodnevni program) (STEVENSON, 2016.).

Protokol nije uspješno korišten za sinkronizaciju mesnih pasmina krava koje su u postporođajnom anestrusu. Stope graviditeta kod anestričnih krava (14,9%) su znatno niže nego kod krava koje su u ciklusu (46,3%). Korištenje Ovsynch protokola u mesnim stadima rezultiralo je puno nižim stopama graviditeta (15%) u usporedbi sa stopom koncepcije kod krava kojima su davani progesterin i estradiol (53%). Što se tiče mliječnih pasmina krava, ovaj protokol inducira ovulaciju kod visokog postotka anestričnih krava, ali neke posljedično imaju kratku lutealnu fazu (BÓ i BARUSELLI, 2014.).

#### 2.4.2. Dupli OVSYNCH

Drugi pristup povećanja koncentracije progesterona tijekom Ovsynch protokola uključuje primjenu GnRH 6 ili 7 dana prije početka protokola i to se zove *Double Ovsynch* tj. Dupli Ovsynch. Zabilježen je porast u gravidnosti kod visoko proizvodnih mliječnih krava. No navedeni tretmani mogu biti previše komplicirani da bi se primijenili kod tovnih goveda koji se drže na pašnjacima (BÓ i BARUSELLI, 2014.).

#### 2.4.3. Intravaginalne spužvice

Metodom intravaginalnih spužvica se rješavaju razni problemi koji proizlaze iz ubrizgavanja hormona ili oralne primjene jer se kontinuirano primjenjuje progestagen. Ova tehnika se prvo koristila u ovaca, a tijekom sedamdesetih se počela primjenjivati u goveda. Spužve su impregnirane s 3 g prirodnog steroida ili 200 mg fluorogeston acetata. Najbolji rezultati u pogledu sinkronizacije i stope koncepcije postignuti su u zapadnoj Irskoj korištenjem navedene metode.

Spužvice su bile učinkovite samo u kombinaciji s progestagenom i estradiolom koji se apliciraju u isto vrijeme umetanja spužve. Estrogen pojačava regresiju žutog tijela, a



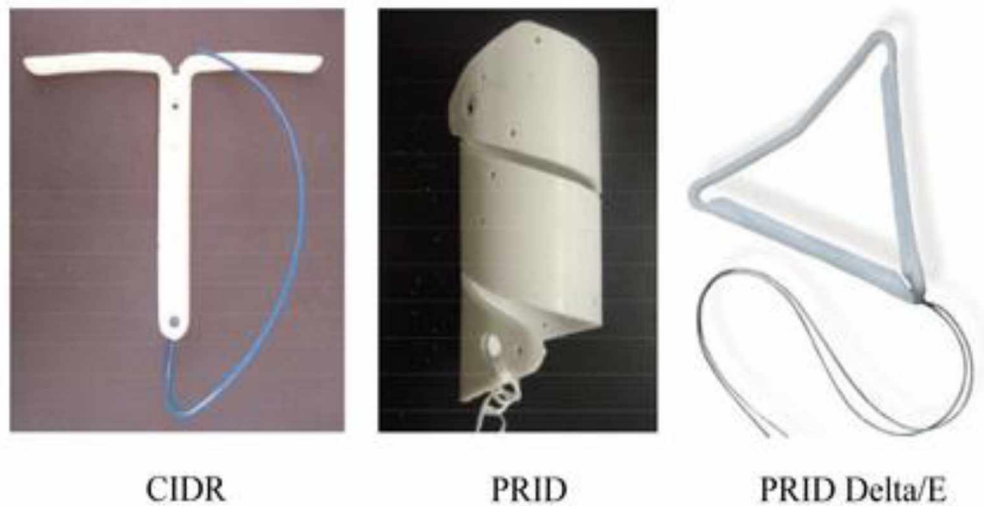
progestagen skraćuje životni vijek novonastalog CL na početku intravaginalne primjene (GORDON, 1996.).

#### 2.4.4. PRID i CIDR

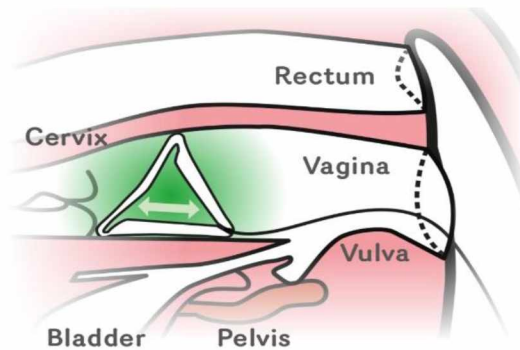
Intravaginalni umetci ili spirale koje otpuštaju progesteron pojavile su se tijekom sedamdesetih godina prošlog stoljeća s razvojem PRID-a zatim i CIDR-a (Slika 5). Oblici mogu biti različiti, a njihov dizajn mora omogućiti jednostavno umetanje i uklanjanje s minimalnom nelagodom za životinju, osigurati zadržavanje na određeno vrijeme bez izazivanja neprihvatljivih razina iritacije te otpuštati dovoljno progesterona za postizanje učinkovite razine u plazmi (DE GRAAFF i GRIMARD, 2017.). Razvijeni su kao alternativa spužvicama te omogućavaju aplikaciju većih koncentracija hormona, uklanjanje smrdljive sluzi koja se otpušta pri njihovom uklanjanju te ugradnju sintetskog progesterona sličnog po strukturi prirodnom hormonu (KNIGHTS i SINGH-KNIGHTS, 2016.). Ovi uređaji uspješno se koriste za sinkronizaciju estrusa i liječenje poremećaja jajnika. Umetanjem dvije spirale otkrila se viša koncentracija progesterona u plazmi u usporedbi primjene samo jedne spirale te posljedično tome izrazitija supresija oslobađanja LH (HANDLER i sur., 2007.). Koriste se zbog svoje dokazane učinkovitosti u liječenju anestrinih krava te smanjenju broja krava i junica koje pokazuju preuranjeni estrus tijekom protokola za umjetno osjemenjivanje. Također spirale poboljšavaju reproduktivne performanse krava koje su u ciklusu i koje nisu. GÜMEN i WILTBANK (2005.) dokazali su da hipotalamus kod krava u laktaciji mora biti izložen progesteronu najmanje 3 do 5 dana prije da bi mogao reagirati na estradiol, nakon čega slijedi normalno otpuštanje LH i ovulacija. Fiziološki mehanizam blokiranja odgovora anovularnih krava na visoki estrogen vjerojatno je povezan s nižom ekspresijom estrogenskih receptora u hipotalamusu. Progesteron može uspješno povećati broj ovih receptora u mozgu (VAN WERVEN i sur., 2013.).

PRID i CIDR se sastoje od polimerne faze koja sadrži homogenu disperzirane čestice čvrstog lijeka nanesenog u tankom sloju preko polimernog tijela ili metalne zavojnice (GRAAFF i GRIMARD, 2017.). PRID je metalna spirala koja je presvučena silikonskim elastomerom koji je impregniran progesteronom. Također otpušta učinkovite količine progesterona tijekom razdoblja od 2-3 tjedna, a uobičajena doza je 1.55 g. Preporučuje se umetanje PRID-a sa pričvršćenom želatinskom kapsulom koja sadrži estrogen te se ostavlja 12 dana (Slika 6). Poznato je da je doza estradiola od 10 mg primijenjena intravaginalno jednako učinkovita kao i doza od 5 mg aplicirana injekcijom. CIDR je najlonski uređaj u obliku slova

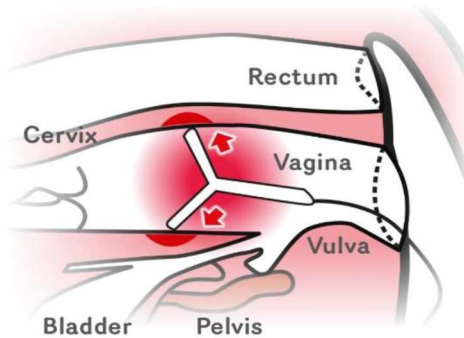
Y, dug je oko 15 cm i prekriven je silikonskim elastomerom koji sadrži progesteron. Uspješno se koristi za sinkronizaciju estrusa krava u programima embriotransfera. CIDR je lakše ukloniti nego druge intavaginalne naprave (Slika 7), a uobičajeno vrijeme za UO je 48-52 sata nakon uklanjanja uređaja (GORDON, 1996.).



Slika 5. CIDR, PRID i PRID Delta/E uređaji - slika preuzeta s <https://quizlet.com/ie/539198733/8-synchronization-of-oestrus-flash-cards/>



Slika 6. Pozicija PRID – slika preuzeta s <https://www.priddelta.ca/vhp.php>



Slika 7. Pozicija CIDR – slika preuzeta s <https://www.priddelta.ca/vhp.php>

#### 2.4.5. Progesteron i eCG

Konjski korionski gonadotropin ima aktivnost sličnu FSH te sličnu aktivnost LH kod goveda s produljenim poluživotom u cirkulaciji. Time se povećava proizvodnja estrogena kako bi se osigurao estrus i ovulacija. Gonadotropin se uvodi u protokole na samom kraju u svrhu poticanja ovulacije kod anestričnih krava s dobrim rezultatima na stopu gravidnosti i preživljavanja zametaka. Poticanje ovulacije uspijeva povećanjem kapaciteta folikula za proizvodnju estradiola kako bi se osiguralo zdravije sazrijevanje folikula i intrafolikularno okruženje i zbog toga dolazi do indukcije GnRH i LH vala. Kombinira se korištenje PRID-a i progesterona te se eCG aplicira pri vađenju uređaja. Doza gonadotropina varira te ovisi o proizvodnom sustavu, dobi krave, ciklusu prije tretmana i pasmini. Primjena eCG-a se povezuje s multiplom ovulacijom i blizancima što nije poželjno u krava. Doza od 400 IJ nije uzrokovala multiplu ovulaciju, a doza od 500 do 750 IJ značajno su povećale blizanačku trudnoću u mliječnih pasmina krava (GRAAFF i GRIMARD, 2017.).

#### 2.4.6. Implatanti s norgestometom

Norgestomet je jedan od sintetskih progestagena koji je 100 do 200 puta jači od progesterona. Pošto ima samo minimalnu učinkovitost kada se primjenjuje oralno, korišten je u obliku implantanta u uhu te se koristi za suzbijanje i sinkronizaciju estrusa (GEARY i sur., 1997.). Implantat se postavlja potkožno i ostavlja se 7 do 9 dana. Sadrži 6 mg norgestometa i ima progestacijski učinak na reproduktivni trakt i hipotalamus supresijom estrusnog ponašanja i ovulacije. Nakon postavljanja implantata daje se injekcija 3 mg norgestometa i 5 mg estrogena. Krave kojima su aplicirani navedeni hormoni uđu u estrus unutar 120 sati nakon uklanjanja implantata. Usprkos uspjeha tretmana njegovi učinci na kasniju plodnost su promjenjivi i ovise o vremenu tretmana u odnosu na raniji porod, prisutnosti teleta, metabolički i prehrambeni status životinje (MOFFAT i sur., 1993.).

## 2.5. Plodnost bikova

Plodnost bikova ključna je za učinkovitu, profitabilnu i održivu govedarsku industriju. Unatoč činjenici da korištenje sperme bikova niske plodnosti uzrokuje velike ekonomske gubitke, konvencionalne metode koje su dostupne za točno predviđanje plodnosti bikova još uvijek su ograničene. Iako rasplodni bikovi proizvode milijarde spermija s uglavnom normalnom pokretljivošću i morfologijom, neki su slabije plodni zbog molekularnih i staničnih defekata u spermi. Plodnost je jedini limitirajući faktor u govedarskoj industriji i može biti pod utjecajem okoliša, uvjeta uzgoja te muških i ženskih faktora (MEMILI i sur., 2020.).

Uzgojna vrijednost se odnosi na sposobnost bika da uspješno oplodi kravu. Iako 20-40% bikova imaju smanjenu plodnost, malo ih je koji su potpuno sterilni. Neplodni bikovi odgađaju koncepciju, produžuju sezonu teljenja, smanjuju težinu teladi pri odbiću te povećavaju broj krava koje se izbacuju iz uzgoja. Uzgojni potencijal bikova je utvrđen brojem osjemenjenih steonih krava te praćenjem stope gravidnosti ili provođenjem procjene uzgojne vrijednosti. Ocjena uzgojne vrijednosti bikova uključuje procjenu veličine, mišićavosti, kondicije te progenu i genomsko testiranje, kao i testiranje na spolno prenosive bolesti. Ne postoji samo jedno mjerenje koje pouzdano predviđa plodnost pa se koristi nekoliko kriterija. Procjenjuje se vjerojatnost koncepcije u više od 25 zdravih krava u ciklusu, steonih od 65 do 70 dana. Klasifikacija bikova se temelji na fizičkoj evaluaciji i prihvatljivim pragovima za razvoj testisa, pokretljivosti spermija i njihovoj morfologiji. Opseg skrotuma u visokoj je korelaciji sa zajedničkom težinom testisa koja je povezana s dnevnom proizvodnjom sperme i kvalitetom sjemena. Bikovi koji imaju velik opseg daju junice koje ranije idu u pubertet te imaju veću plodnost. Mjeri se tako što se testisi poguraju na dno skrotuma i savitljivom trakom se primjeni umjerena napetost na najvećem opsegu. Skrotum bi trebao imati jasan vrat, testisi bi trebali pokretni, slični veličinom, čvrsti i elastični s normalnim epididimisom i sjemenom vrpcom (KASTELIC i THUNDATHIL, 2008.).

Pošto vrući i vlažni uvjeti mogu nepovoljno utjecati na plodnost bikova, trenutni porast globalne temperature je zabrinjavajući za buduću stočarsku proizvodnju. Toplinski stres javlja se kada se normalni fiziološki mehanizmi za regulaciju tjelesne temperature ne mogu nositi s vanjskim uvjetima. Oštećenje DNK spermija, kao i antioksidansa u sjemennoj plazmi, događa se pri blagim do umjerenim razinama toplinskog stresa, dok na morfologiju spermija utječe ekstremniji toplinski stres. Međutim, učinci mogu varirati od jedne životinje do druge. Učinci toplinskog stresa mogu se minimizirati osiguravanjem ventilacije i hlađenja kako bi se smanjile temperature u staji i planiranjem uzgojnih aktivnosti za hladnije mjeseci u godini. Gravidnost

u krava treba tempirati kako bi se izbjegao srčani stres u kasnijim mjesecima gestacije, a telad se treba hraniti kako bi se proizvela optimalna stopa rasta. Pasmine se trebaju odabrati na temelju njihove prilagodljivosti klimi kako bi se optimizirala plodnost (MORRELL, 2020.).

#### 2.5.1. Polučivanje ejakulata

Rani pokušaji polučivanja ejakulata od bikova bili su zamarajući s velikim gubicima i visokim rizikom od prijenosa bolesti. Nakon što je bik zajahao kravu i ejakulirao u vaginu, spužvice ili vrećice su se uklanjale iz rodnice nakon što su tamo već bile postavljene te se sjeme uklanjalo iz njih sa žlicom ili špricom. Kao alternativa, sjeme je polučeno masažom *per rectum* ampula sjemenovoda u bikova, ali kontaminacija uzorka urinom i niske koncentracije sperme su bili učestali problemi. Umjetna vagina bila je veliki napredak u polučivanju čistog ejakulata. Amantea ju je razvila 1914. za pse, a 1930. je modificirana u Rusiji za upotrebu kod bikova. Bikovi zajašu fantom i ejakuliraju u umjetnu vaginu što omogućuje prikupljanje čistih uzoraka koji nisu onečišćeni vaginalnim sekretom. Elektroejakulatori su izumljeni tijekom tridesetih godina prošlog stoljeća te se tehnika koristi kod bikova koji nisu prikladni za korištenje umjetne vagine. Dulje vrijeme provedeno sa ženkama i lažno zaskakivanje pokazalo je povećanje koncentracije i pokretljivosti spermija. Uzorci se prikupljaju 2-3 puta dnevno u intervalima od 3 do 4 dana (MOORE i HASLER, 2017.).

#### 2.5.2. Ocjena ejakulata i spermija

Sperma se ocjenjuje zbog određivanja svojstava ejakulata, kontrole preživljavanja spermija nakon pohrane, konzerviranja i prije osjemenjivanja te zbog ocjene plodnosti. Postoji sanitarna i makroskopska ocjena ejakulata, a ocjena sperme može biti izvrsna, vrlo dobra i dobra. Makroskopska ocjena obuhvaća ocjenu volumena, boje, konzistencije i mirisa ejakulata. Prosječni volumen ejakulata bika je 5 do 7 ml, fiziološka konzistencija odgovara konzistenciji vrhnja, boja je bijela do žućkasta ako je ejakulat gušći. Ima miris pečenog kestena, ali ako je polučen pomoću umjetne vagine osjeti se specifičan miris gume. Nakon makroskopske ocjene određuje se Ph koji bi fiziološki trebao biti od 6,2 do 6,8. Mikroskopskom ocjenom ocjenjujemo pokretljivost ili motilitet spermija (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.). U mnogim centrima za umjetno osjemenjivanje pokretljivost spermija se procjenjuje vizualno nakon što se kapljica sjemena stavi na stakalce koje je zagrijano na temperaturu tijela, ali je ova metoda vrlo subjektivna (GORDON, 1996.). Ocjena koncentracije spermija u ejakulatu se broji u komorici

po Thoma-i, a spermiji se broje u 4 velika kvadrata dijagonalno odozgo prema dolje te u petom koji je u suprotnom lijevom ili desnom kutu (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.). Ove procjene daju važne informacije o prikladnosti ejakulata za obradu, reproduktivnoj sposobnosti očeva, broju doza koje se mogu proizvesti i koje su potrebne za točno razrjeđivanje i pakiranje sjemena. Kriterije za procjenu morfologije spermija razvio je Williams 1920. godine, također je otkrio povezanost između abnormalne sperme i plodnosti. Zbog toga se morfologija spermija rutinski procjenjuje u komercijalnim laboratorijima za obradu sjemena, a ejakulati obično moraju imati jednako ili više od 65% morfološki normalne sperme koja se obrađuje (MOORE i HASLER, 2017.). Abnormalnosti se dijele prema mjestu nastanka. Glava može biti premala, prevelika, kruškasta, uska, kijačasta, deformirana i može nedostajati u potpunosti. Kapa može biti granulirana, kosa, otpala, deformirana, a vrat prelomljen ili zakržljao. Spojni dio može biti tanak, kratak, debeo, spiralno zavijen, deformiran, prelomljen ili presavijen. Rep se može prikazati kao prebačen u petlju, zavrnut, smotan oko glave ili rudimentiran. Preparati za morfološku ocjenu spermija su najčešće najobičniji tzv. tuš preparati ili nigrozinski preparati, a za ocjenu finijih promjena u građi koriste se posebne metode fiksiranja i bojanja kao što su metoda bojanja po Blumenscheinu i po Karrasu (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.). Razvojem protočne citometrije, tijekom šezdesetih godina, razvrstavanje stanica postalo je izvedivo. Sposobnost sortiranja, brojanja i procjene stanice spermija, centrima za obradu sjemena pružila je glavni poticaj za automatizaciju aspekata kvalitete kontrolnih postupaka. To je bilo ključno za seksiranje sperme. Kombinira se bojanje i protočna citometrija kako bi se procijenili različiti aspekti kvalitete sperme, a danas se koristi za procjenu integriteta membrane, statusa akrosoma, energije i integriteta DNK sperme (MOORE i HASLER, 2017.). Pokretljivost spermija tradicionalno se procjenjuje svjetlosnim mikroskopom, no procjena je subjektivna. Ova metoda otkriva velike abnormalnosti, ali ne i suptilne varijacije u motilitetu koje mogu utjecati na plodnost. Računalom potpomognuta analiza sperme (CASA) mnogo je objektivnija metoda. Mjeri specifične karakteristike kretanja povezane s funkcionalnošću sperme, frekvenciju, prosječni put spermija, brzinu i linearnost (KASTELIC i THUNDATHIL, 2008.).

## 2.6. Razrjeđivači i zamrzavanje sperme

Osnovne komponente razrjeđivača za zamrzavanje sjemena u biti su iste kao i one koje se koriste za skladištenje sperme na temperaturi okoline. Moraju sadržavati ionske ili neionske tvari za održavanje osmolarnosti i puferiranja medija, izvor lipoproteina ili materijal visoke molekularne težine za sprečavanje hladnog šoka, krioprotektant, glukozu ili fruktozu kao izvor energije te druge dodatke kao što su antibiotici (VISHWANATH i SHANNON, 2000.). Istraživačima je rano postalo jasno da jedan ejakulat sadrži dovoljno sperme za tisuće inseminacija, a samo 10 do 20 doza za osjemenjivanje moglo se dobiti od nerazrijeđenog (MOORE i HASLER, 2017.). Od prijelaza stoljeća, bilo je mnogo izvještaja o razrjeđivačima sjemena za stoku, a većina radova potječe iz Rusije. Svaki razrjeđivač, bila to jednostavna otopina soli ili složeniji puferirani medij, imao je svoje prednosti. Prihvaćeno načelo tehnologije razrjeđivanja bilo je da je preživljavanje spermija tijekom duljeg razdoblja obrnuto proporcionalno njihovoj metaboličkoj aktivnosti. Kako bi sjeme bilo korisno za UO moralo je imati minimalni rok trajanja između 2 do 4 dana da bi se omogućio lak transport i korištenje na udaljenim lokacijama. To je bio vodeći princip koji je doveo do početne temperature skladištenja od 5°C. Učinak skladištenja na ovoj temperaturi je smanjenje brzine metabolizma, što pridonosi produženju opstanka. Na prve razrjeđivače značajno je utjecalo otkriće žumanjka kao korisnog aditiva, a primarna puferirana komponenta u njima bio je fosfat. Kasnije je utvrđeno da citrat ima odgovarajuću sposobnost puferiranja s produženim preživljavanjem spermija te je tada postao prvi izbor soli jer su njegova svojstva poboljšala topljivost proteinskih frakcija u žumanjku jajeta. Žumanjak je češći dodatak, no za očuvanje plodnosti spermija korišteni su još i homogenizirano punomasno mlijeko, svježe ili obrano mlijeko te kokosovo mlijeko. Važan aspekt skladištenja u razrjeđivačima na bazi mlijeka bila je inaktivacija laktenina (toksičnog čimbenika) zagrijavanjem, a dodavanje glicerola mlijeku imalo je prednost u održavanju plodnosti. Dodavanjem žumanjka mlijeku inaktivira se laktenin, ovaj proces prevladava problem zagrijavanja prije dodavanja sjemenu (VISHWANATH i SHANNON, 2000.). Tijekom 1940-ih povećala se svijest o mikroorganizmima u ejakulatu obogaćenog žumanjkom i njihovog utjecaja na plodnost. Negativan učinak nekih mikroorganizama na plodnost jasno je utvrđen kada je dodavanje antibiotika, kao što su penicilin i streptomycin, u razrijeđen ejakulat smanjilo rast bakterija te pospješilo plodnost. Dodavanje antibiotika od tada je standardna praksa. U kombinaciji s poboljšanim sanitarnim postupcima antibiotici su značajno doprinijeli iskorjenjivanju spolnih bolesti (MOORE i HASLER, 2017.).

U nedostatku krioprotektora, dva mehanizma putem kojih proces zamrzavanja i odmrzavanja oštećuje spermu su stvaranje unutarnjih kristala leda koji utječu na strukturu sperme i povećanje osmotskog tlaka (MOORE i HASLER, 2017.). Navedeni proces smanjuje integritet plazmatske membrane i akrosoma, pokretljivost, metaboličku i mitohondrijsku aktivnost te povećava proizvodnju reaktivnih vrsta kisika (YANEZ-ORTIZ i sur., 2022.). Krioprotektivna svojstva glicerola objavljena su 1949. godine. Sperma peradi smrznuta na  $-79^{\circ}\text{C}$  (temperatura krutog ugljičnog dioksida) imala je normalnu pokretljivost nakon odmrzavanja, a isti uspjeh kasnije je pokazan i s goveđom spermom. Pogodnost glicerola se u velikoj mjeri pripisuje njegovoj sposobnosti puferiranja elektrolita u spermi (MOORE i HASLER, 2017.).

Krioprezervacija sjemena sastoji se od različitih koraka među kojima su hlađenje i zamrzavanje čije stope značajno utječu na kvalitetu odmrznute sperme. Različiti sustavi s promjenjivim stupnjevima smrzavanja koriste se na terenu za spermu bikova, a njihove stope uspjeha variraju. Na terenu se općenito koriste jednostavni materijali za generiranje krivulje hlađenja kao što su toplinske kutije s ledom ili hladnjaci i kutije od stiropora sa tekućim dušikom. Unatoč njihovoj niskoj cijeni, problem ovih metoda je nedostatak standardizacije hlađenja zbog širokih varijacija u veličini i debljini opreme, vremenu korištenja, marke, modela, uvjeta korištenja hladnjaka ili kutije od stiropora te to rezultira varijacijama rezultata (DIAS i sur., 2018.). Sporo hlađenje tijekom razdoblja od nekoliko sati poboljšava pokretljivost i plodnost spermija nakon otapanja jer dopušta spermi prilagodbu niskim temperaturama prije krioprezervacije (MOORE i HASLER, 2017.). Zamrzavanje sjemena bika u pajetama kapaciteta od 0,25 ml u uobičajenoj je uporabi od ranih sedamdesetih godina. Iako se čini da nema razlike u uspješnosti oplodnje ako se pakira u pajete od 0,50 ml, veći broj doza se može dobiti koristeći mini pajete (GORDON, 1996.). U izvornom radu Polgea i Rowsona 1952. sjeme s glicerolom je zamrznuto s krutim ugljikovim dioksidom i alkoholom, ali je bilo glomazno i spermiji su oštećeni kristalima. Čuvanje sjemena u tekućem dušiku bilo je teško dok staklene vakuumske posude nisu zamijenili izolirani spremnici tekućeg dušika (Slika 8). Kasnije je proces zamrzavanja modificiran tako da je sjeme zamrznuto parama tekućeg dušika na  $-196^{\circ}\text{C}$ . Dušik je postao preferirano rashladno sredstvo jer je održivost spermija nakon odmrzavanja bila veća. Time je olakšano skladištenje na duže vrijeme te je smanjeno održavanje u usporedbi s krutim ugljikovim dioksidom (MOORE i HASLER, 2017.).

Opća teorija ukazuje da je brzo odmrzavanje sjemena korisno za sprječavanje štete tijekom ponovnog zagrijavanja. Mazur 1984. primjećuje da brzo otapanje sprječava mogućnost



ponovne kristalizacije molekula vode što bi moglo biti štetno za stanične membrane. Potencijalni problem kod sporog odmrzavanja je osmotska promjena zbog ulaska vode tijekom odmrzavanja što se smatra štetnijim od izlaska vode tijekom smrzavanja (VISHWANATH i SHANNON, 2000.). Sjeme u pajetama bi se trebalo odmrzavati na temperaturi od 35°C i mora se držati na toj temperaturi sve do inseminacije (GORDON, 1996.).

Zamrznuto sjeme donijelo je mnoge prednosti uključujući neograničeno skladištenje sperme, jednostavnost transporta, veći izbor bikova i međunarodnu trgovinu sjemenom elitnih bikova. Međutim proces zamrzavanja i odmrzavanja rezultira oštećenjem oko 50% sperme te je posljedično plodnost ovog sjemena lošija od tekućeg i svježeg sjemena (MOORE i HASLER, 2017.).



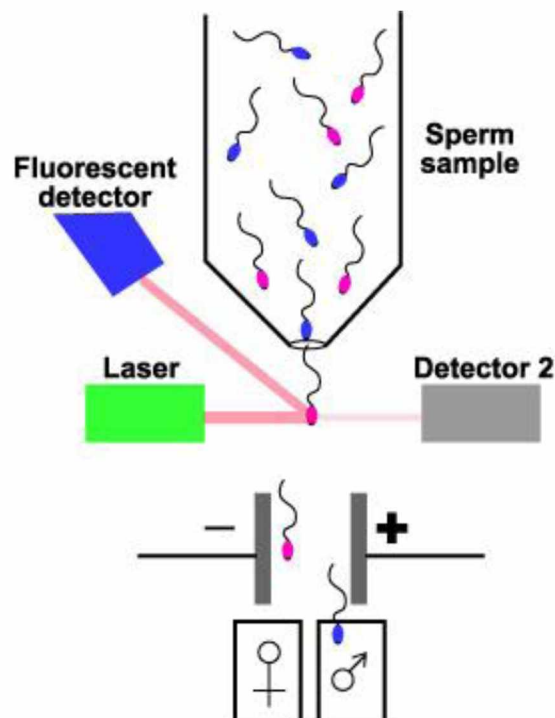
Slika 8. Spremnik sa tekućim dušikom – slika preuzeta s <https://www.cncdcryogenictank.com/cryogenic-liquid-tank/liquid-nitrogen-tank/20l-small-capacity-freezing-bull-semen-tank.html>

## 2.7. Seksiranje sperme

Selekcija potomaka promjenom omjera spolova stoljećima je prioritet. Glavni cilj proizvođača u stočarskoj industriji generacijama je predodređivanje spolova. Ženke su neophodne za mliječne proizvode i proizvodnju teladi, dok su mušjaci potrebni za mesnu industriju zbog bolje učinkovitosti pretvorbe hrane, omjera mesa i masti. Također, mušjaci visoke genetske vrijednosti su potrebni u programima umjetnog osjemenjivanja. Razvoj najsvremenijih reproduktivnih tehnika omogućio je određivanje spola što uključuje odvajanje spermija s X kromosomom od onih sa Y kromosomom te korištenje navedene sperme za UO, *in vitro* oplodnju i embriotransfer. Nekoliko je znanstvenika pokušalo razdvojiti spermije po spolu korištenjem različitih tehnika koje su se temeljile na različitoj masi, pokretljivosti, obrascima plivanja, volumske razlike, centrifugalne distribucije protustruje i imunološki relevantnih svojstava. Međutim, niti jedna od ovih metoda nije uspjela dati statistički značajne rezultate (ESPINOSA-CERVANTES i CORDOVA-IZQUIERDO, 2012.). Prvi veliki napredak u seksiranju sperme došao je otkrićem da spermij koji nosi X kromosom ima 3-4% više DNK od onoga koji nosi Y. Iako je ova razlika vrlo mala, ipak je dovoljna da se razvije metoda koja bi omogućila odvajanje sperme na temelju spola (MORRIS i sur., 2001.). Jedina dokazana metoda za seksiranje sperme je odabir i odvajanje spermija čija je DNK obojena fluorokromovima kao što su akridin narančasta, etijev bromid ili mitramicin. Kasnije su bisbenzimidazol boje uvedene kao kvantitativne fluorescentne boje za DNK. Točna identifikacija nositelja X i Y kromosoma prvi put je postignuta pomoću protočne citometrije od strane Garnera i suradnika 1983. godine, a kasnije ju je potvrdio Johnson 1989. s prvim živorođenim potomkom koji je nastao putem predviđanja spola. Ova metoda funkcionira jer je X kromosom veći od Y kromosoma pa posljedično prima više boje. Obojeni spermiji se zatim stavljaju u protočni citometar te jedan po jedan ulaze u protočnu komoru, a zatim se svaki pojedinačno procjenjuje. Obojeni spermiji podvrgavaju se laserskoj zruci. Spermiji koji nose X kromosome emitiraju intenzivniju svjetlost zbog visoke apsorpcije fluorescentne boje. Računalo prepoznaje intenzitet svjetla te može odvojiti spermu kao X,Y ili neodređenu. Zatim sperma pada kroz ovratnik aparata za punjenje kapljica gdje im se dodjeljuje pozitivan i negativan naboj. Spermiji sekvencionalno prolaze kroz elektromagnetsko polje gdje su privučeni ili na pozitivnu ili negativnu stranu na temelju dodijeljenog naboja (Slika 9) (ESPINOSA-CERVANTES i CORDOVA-IZQUIERDO, 2012.).

Unatoč ekonomskim prednostima korištenja ovakve sperme, rutinska upotreba je bila ograničena. Jedan od razloga je što je stopa koncepcije obično 25% niža u usporedbi s

konvencionalnom spermom. Kod *in vitro* oplodnje i proizvodnje zametaka, korištenje spermija s određenim spolom rezultira s različitim stopama ugrojenih blastocista te posljedično kasnijim stopama steonosti u rasponu od 26 do 40%. Također kod superovuliranih krava rezultira znatno manjim brojem zametaka koji se mogu iskoristiti, ali telad koja je rođena ne pokazuje nikakve abnormalnosti te ih je 89% rođeno s onim spolom koji je i predodređen. Postoje naznake o većoj učestalosti mrtvorodenosti kod teladi pogrešnog spola, a ova telad proizvodi manje mlijeka, masti i proteina u svojoj prvoj laktaciji. Određivanje spola povezano je i s brojnim molekularnim promjenama kao što su povećane razine reaktivnih vrsta kisika, povećana propusnost membrane i smanjenje unutarstanične razine ATP-a što uzrokuje smanjenu pokretljivost, održivost i dugovječnost sperme. Uočeno je da reaktivne vrste kisika induciraju fragmentaciju DNK što dovodi do poremećene fuzije membrana i niske stope oplodnje. Analiza kromatinske strukture spermija otkrila je da goveđa seksirana sperma ima više oštećenja DNK od uobičajene sa smanjenom homogenošću kromatina i višim indeksom fragmentacije (STEELE i sur., 2020.). Alternativni pristup razvoju isplative i praktične metode nudi proteomika. Proteini specifični za spolne kromosome su identificirani na površini spermija te to omogućuje razvoj manje invazivnog imunološkog pristupa za određivanje spola koji bi manje oštetio spermu. U ovoj metodi antitijelo uzrokuje aglutinaciju tj. sljepljivanje spermija jednog spola te se slobodna sperma suprotnog spola može lako odvojiti i obraditi za upotrebu u umjetnoj oplodnji (MORRIS i sur., 2001.).



Slika 9. Seksiranje sperme- slika preuzeta s <https://ansci.wisc.edu/jjpl/equine/technology/spsex.html>

## 2.8. Multipla ovulacija i embriotransfer (MOET)

MOET je dobro uhodana tehnologija i koristi se za dobivanje preko 80% zametaka proizvedenih u komercijalne svrhe (GALLI i sur., 2003.). Embriotransfer je postupak kojim se kravama davateljicama u ranoj gravidnosti ispiru zametci iz maternice koji se zatim premještaju u maternicu sinkronizirane primateljice kako bi se nastavio razvoj. Takvi zametci imaju prednost nad odraslim životinjama jer primaju pasivni imunitet preko kolostruma, a imaju fiziološku i prirodnu adaptaciju novoj sredini (LOJKIĆ i sur., 2018.). To je najčešće korištena biotehnologija nakon umjetne oplodnje i sinkronizacije estrusa. Embriotransfer je vrlo koristan uzgajivačima čistokrvnih životinja jer genetski visokokvalitetnim plotkinjama omogućuje da imaju više potomaka nego što bi to bile u mogućnosti postići prirodnom reprodukcijom. Tijekom ovog procesa postupci koji trebaju biti uključeni su priprema davateljica, ispiranje zametaka, rukovanje, procjena i skladištenje zametaka, odabir i priprema primateljica te prijenos (transfer) zametaka u maternicu primateljice (HADGU i FESSEHA, 2020.).

Slijed događaja koji dovede do transfera zametaka obično počinje superovulacijom (MOORE i HASLER, 2017.). Cilj tretmana za induciranje superovulacije u programima embriotransfera je dobivanje maksimalnog broja zametaka koji se mogu prenijeti u maternicu primateljica, što rezultira uspješnijom stopom graviditeta (BÓ i MAPLETOFT, 2014.). U ranim pokušajima superovulacije goveda tijekom 1970-ih korišten je eCG sve dok nije postao dostupan FSH. Konjski korionski gonadotropin imao je brojne nedostatke kao što su dugo vrijeme poluraspada, visoka tvorba antigena i potrebno reproduktivno mirovanje nakon njegovog korištenja. Kada se FSH pojavio na tržištu bio je svinjskog porijekla. Hipofizni ekstrakt FSH kontaminiran je LH hormonom u različitom omjeru, a utvrđeno je da povećane razine LH u FSH proizvodima zapravo smanjuju superovulacijski odgovor i održivost zametka. Međutim, smatra se da su endogene razine luteinizirajućeg hormona primjerene za uspjeh. Drugo stajalište pokazalo je da FSH s različitim razinama LH na kraju protokola povećava stope ovulacije. Krave davateljice se uvode u superovulacijski raspored najranije 45 dana nakon teljenja. Početak superovulacijskog protokola ovisi o induciranju ciklusa i ovulacije u davateljice s formiranjem žutog tijela 9 do 13 dana nakon ovulacije. Pošto svinjski FSH ima vrlo kratko vrijeme poluraspada (oko 5 sati) potrebna mu je primjena dva puta dnevno tijekom protokola. Tijekom vremena razvijene su mnoge druge metode. Najčešće se koristio protokol opadajuće doze s primjenom PGF<sup>2α</sup> istodobno s FSH na kraju, ali ova vrsta protokola u potpunosti ovisi o normalnom ciklusu krave ili junice u vrijeme ovulacije (PHILIPS i JAHNKE, 2016.). Superovulacijski odgovor je smanjen kada se FSH počne aplicirati u prisutnosti

dominantnog folikula (GORDON, 1996.). Nedavno su razvijeni protokoli koji su povećavaju stopu uspješnosti prikupljanja i kvalitete zametaka upotrebom egzogenih progestagena kao što je CIDR i uklanjanje dominantnog folikula. Ovo je omogućilo fleksibilnost započinjanja procesa superovulacije bilo kada tijekom ciklusa krave. Uklanjanje dominantnog folikula omogućuje razvoj antralnih folikula te superovulacijski odgovor nakon primjene FSH rezultira većim brojem predovulacijskih folikula (PHILIPS i JAHNKE, 2016.). Krava davateljica se može osjemeniti prirodnim ili umjetnim putem, a zametci se ispiru iz maternice davateljice nekirurškim putem 6 do 8 dana nakon osjemenjivanja (HADGU i FESSEHA, 2020.).

Prikupljanje zametaka se prvo izvodilo kirurškim putem, ali je zahvat bio invazivan, skup, vremenski zahtjevan i rad je bio naporan za ljude. Za to su bili potrebni kirurški objekti i nije se moglo izvoditi na farmi te veliko vime mliječnih krava je otežavalo vađenje zametaka. Osim toga čest je razvoj ozbiljnih priraslica jajnika i fimbrija kod životinja u oporavku nakon kirurškog zahvata (MOORE i HASLER, 2017.). Tijekom sedamdesetih godina prelazi se na nekirurški način prikupljanja zametaka ispiranjem maternice krava davateljica. Danas se koriste posebno proizvedeni silikonski kateteri koji imaju promjer i dužinu koja odgovara svim pasminama goveda. Oni se mogu višekratno koristiti i sterilizirati u autoklavu za razliku od izvorno korištenog Foleyevog katetera. Postoje dva načina prikupljanja. Prvi je gravitacijski sustav pri kojem se s 1 do 2 litre specijaliziranog medija, kao što je Dulbeccova fiziološka otopina s fosfatnim puferom, nježno ispiru svaki rog maternice s 50 ili 200 ml odjednom te ispirak maternice prolazi kroz sistem s filterom u kojem se sakupljaju zametci. Drugi način je sa štrcaljkom gdje se medij ubrizgava u svaki rog i vraća preko štrcaljke u filter. Za uspješno prikupljanje i kasnije uspostavljanje graviditeta ključno je osigurati netoksičnost i sterilnost svih površina i proizvoda koji mogu doći u dodir sa zametcima ili medijem (PHILLIPS i JAHNKE, 2016.).

Nakon prikupljanja zametci se moraju identificirati, ocijeniti i čuvati u prikladnom mediju prije transfera. U ovom trenutku mogu biti podvrgnuti mikromanipulaciji kao što su dijeljenje i određivanje spola (HADGU i FESSEHA, 2020.). Prema Međunarodnom društvu za prijenos zametaka treba ih morfološki procijeniti pod mikroskopom s povećanjem od 50 puta kako bi se identificirale bilo kakve abnormalnosti kao što je napuknuta zona pellucida (PHILLIPS i JAHNKE, 2016.). Kvaliteta zametaka je jedan od ključnih čimbenika koji utječe na uspjeh postupka pa je potrebno razviti objektivne metode koje je moguće primijeniti u terenskim uvjetima (LOJKIĆ i sur., 2018.). ET se ne mora izvršiti odmah. Zametci se mogu zamrznuti konvencionalno sporim zamrzavanjem etilen glikolom ili vitrifikacijom koristeći

visoke koncentracije krioprotektora te zatim potapanjem u tekući dušik (RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2012.).

Jedan od najvažnijih, ali nedovoljno cijenjenih aspekata za uspješan MOET program su krave primateljice. Potencijalne primateljice su krave koje su reproduktivno zdrave, lako se tele, dobro se muzu te imaju dobru majčinsku sposobnost. Moraju biti na pravilnoj razini prehrane i uključene u program zdravog stada. Kako bi se maksimalno povećalo preživljavanje zametka u primateljici nakon prijenosa, uvjeti u reproduktivnom traktu trebali bi biti vrlo slični onima u donoru, što zahtjeva sinkronizaciju estrusa između donora i primateljice (optimalno u razmaku od jednog dana) (HADGU i FESSEHA, 2020.).

## 2.9. Ovum pick-up

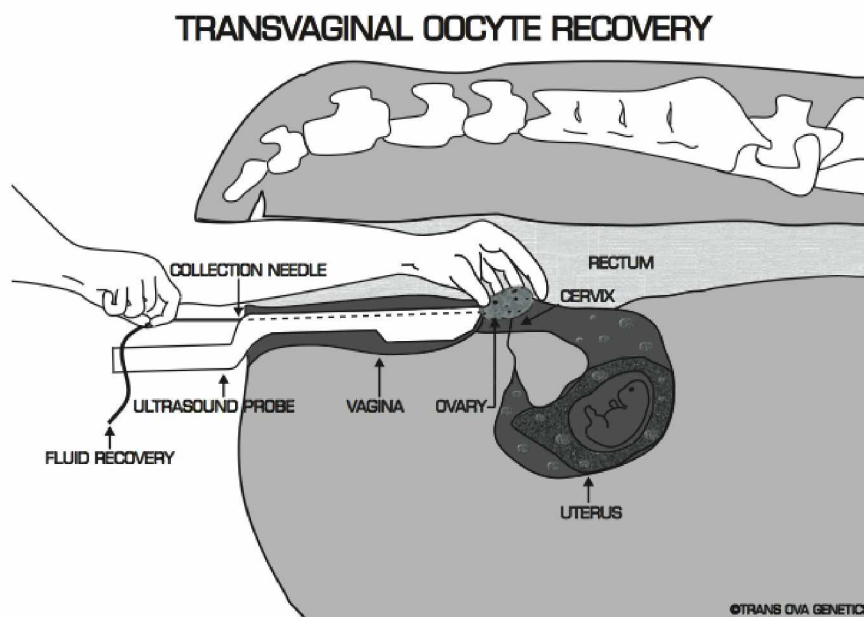
Pieterse je razvio metodu aspiracije jajnih stanica (OPU) za dobivanje jajnih stanica iz živih davateljica (MOORE i HASLER, 2017.). Koristio je humanu endovaginalnu sondu koja je prilagođena za primjenu kod goveda. Stopa uspješnosti aspiracije bila je 55%, postupak se mogao ponavljati i nije bilo nikakvih nuspojava. Iako su postupci u to doba još uvijek zahtijevali velika poboljšanja, osnove su iste koje se koriste i danas. Stope uspješnosti su podignute za više od 70% zahvaljujući upotrebi bolje ultrazvučne opreme s konveksnim sondama od 6 ili 7 MHz koje pružaju bolju rezoluciju manjih folikula (Slika 10). Primjenja gonadotropina povećava veličinu folikula te se iz tog razloga koristi u njihovoj pripremi za aspiraciju (GALLI i sur., 2014.). Najznačajnije tehnološko poboljšanje bila je zamjena izvorne igle od nehrđajućeg čelika duge 50 cm s kratkim, jednokratnim, standardnim iglama koje su sterilne i lako zamjenjive čime se smanjuje rizik kontaminacije tj. prijenos patogena s jedne na drugu kravu. Dodatna prednost im je što su jeftine, ne trebaju čišćenje, ne tupe se lako, jednostavno je rukovati s njima te se smanjuje vrijeme tijekom kojeg su kumulirajući kompleksi oocita izloženi nepovoljnom utjecaju okoliša (VAN WAGTENDONK-DE LEEUW, 2006.). Igla je spojena na cjevčicu i epruvetu koje su spojene na vakuumsku pumpu. Vakuum je postavljen na brzinu protoka između 15 i 25 ml po minuti kako bi se osigurao maksimalni broj prikupljenih oocita uz najmanje oštećenja. Danas se za OPU koriste jednostavni mediji za ispiranje i prijenos zametka nadopunjeni heparinom kako bi se izbjeglo zgrušavanje folikularne tekućine ili krvi (GALLI i sur., 2014.).

Najznačajnije poboljšanje u pogledu prinosa i bolje kvalitete jajnih stanica, a time i kasnije proizvodnje zametaka je hormonska predstimulacija prije aspiracije primjenom gonadotropina (GETZ, 2004., VAN WAGTENDONK-DE LEEUW, 2006.). U odraslih goveda stimulacija s FSH će pospješiti razvoj folikula promjera oko 2 mm ili više i potaknuti njihov



rast, no ne povećava ukupan broj folikula dostupnih za OPU. Međutim, primjena FSH u teladi staroj 5 mjeseci pospješuje rast folikula promjera manjeg od 2 mm i značajno povećava ukupan broj folikula dostupan za OPU (FRY, 2020.). Nedostatak korištenja gonadotropina je ponovno uvođenje hormona, a izostanak potrebe za hormonima kod izvođenja OPU-a se smatra prednošću u usporedbi s MOET-om (VAN WAGTENDONK-DE LEEUW, 2006.). Da bi se dobili folikuli od 4 do 10 mm često se koristi jedna doza FSH 2 dana prije zahvata ili dvodnevna FSH stimulacija s ili bez progesterona, no zbog učestalosti zahvata intravaginalni progesteronski umetci se ne koriste često. Stimulacija jajnika s FSH i aspiracija jajnih stanica svaki drugi tjedan je najčešće korišteni protokoli za dobivanje maksimalnog broja zametaka u što kraćem roku (FRY, 2020.).

OPU bez hormonske predstimulacije se rutinski radi dva puta tjedno i može se provoditi dulje vrijeme bez ikakvih štetnih posljedica na kravu davateljicu. Izvođenje 2 puta tjedno rezultirati će većim brojem proizvedenih zametaka po kravi nego kada se izvodi jednom tjedno. Najbolji rezultati postižu se kada je interval između aspiracija 3 i 4 ili 2 i 5 dana. S obzirom da se dominantni folikul pojavljuje otprilike 3 dana nakon OPU-a, interval od 2 i 3 dana spriječiti će negativni učinak dominantnog folikula na razvojnu sposobnost oocita iz manjih folikula (VAN WAGTENDONK-DE LEEUW, 2006.). Tijekom posljednjih nekoliko desetljeća, laparoscopska aspiracija jajne stanice je zlatni standard kod živih životinja koje su premale za transvaginalnu aspiraciju jajne stanice pomoću ultrazvuka (BALDASSARRE, 2021.).



Slika 10. Transvaginalna aspiracija jajnih stanica - slika preuzeta s <https://transova.com/2017/07/in-vitro-fertilization-embryo-transfer-a-comparison>

## 2.10. *In vitro* oplodnja i proizvodnja zametaka

*In vitro* proizvodnja zametaka objedinjuje postupak *in vitro* dozrijevanja jajnih stanica, *in vitro* oplodnje i prve dane *in vitro* kulture zametaka. Kod domaćih životinja nezrele jajne stanice najčešće uzimamo iz jajnika bilo nakon normalne kastracije pri kojoj su uklonjeni jajnici, u OPU postupku kod živih životinja ili nakon smrti životinje (zbog klanja, eutanazije ili fatalne traume). Prema Međunarodnom društvu za tehnologiju zametaka (IETS) 2017. godine u cijelom svijetu proizvedeno je milijun *in vitro* zametaka za transfer. Nažalost sve zemlje svijeta ne pridonose ovom izvješću pa su ti brojevi podcijenjeni (SJUNNESSON, 2020.).

Morfološki događaji povezani s *in vitro* dozrijevanjem oocita vrlo su slični onima *in vivo* osim što je proces *in vitro* brži. *In vitro* sazrijevanje uglavnom rezultira jajnim stanicama s manjim potencijalom za razvojni kapacitet u usporedbi s onima koje sazrijevaju *in vivo* (GREVE i MADISON, 1991.). U ovim uvjetima jajna stanica dovršava nuklearno sazrijevanje unutar razdoblja od 20 do 24 sata te će biti spremna za oplodnju. Uz nuklearno sazrijevanje, jajne stanice dovršavaju i citoplazmatsko sazrijevanje, ali su u uvjetima *in vitro* primijećene promjene u preciznoj migraciji kortikalnih granula koje su važne za sprječavanje oplodnje s više spermija (FERRÉ i sur., 2020.). KATSKA i SMORAG (1985.) sugerirali su da temperatura inkubacije od 35 do 37°C osigurava veću održivost goveđih oocita, no trenutno gotovo svi održavaju temperaturu od 39°C. Ph medija treba biti od 7,2 do 7,4 i osmolarnost od 285-300 Osm/l. Uzgajaju se u atmosferi koja sadržava 5% CO<sub>2</sub>. Tijekom procesa sazrijevanja od najveće važnosti je da hormonsko okruženje (osobito steroidi) bude dobro uravnoteženo. Kako bi se postigao navedeni cilj, u medij su dodani različiti hormoni kao što su FSH, LH, estradiol te čak i progesteron. Dodavanje seruma je jedan od uvjeta za postizanje ekspanzije kumulusa, potpunog sazrijevanja oocita i normalnog embrionalnog razvoja (GREVE i MADISON, 1991.). Najčešće se dodaje fetalni goveđi serum, nadomjesci za serum ili goveđi serumski albumin (FERRÉ i sur., 2020.).

Nakon dozrijevanja dolazi red na oplodnju *in vitro*. Spermiji se obično ispiru i odabiru pomoću metode isplivavanja tj. aktivnom migracijom spermija u mediju kako bi se uklonili sjemena plazma, medij za smrzavanje, ostatci i mrtvi spermiji te kako bi se odabrali pokretljivi spermiji za oplodnju *in vitro*. Također moraju biti tretirani faktorima kapacitacije kako bi stekli sposobnost prodiranja u zonu pellucidu. Minimalni broj spermija nije definiran zbog velikih razlika između bikova i pasmina. Najčešće se koristi doza od 1 do 2 milijuna spermija po mililitru. Uzgoj *in vitro* u ko-kulturi s epitelnim stanicama goveđeg jajovoda uzgojenih u obliku



jednostanične kulture stanica izazvalo je spontano vezanje spermija za navedene stanice, otpuštanje progesterona i veći potencijal oplodnje od onih koji nisu vezani (FERRÉ, 2020.).

Oplođene jajne stanice uzgajaju se 7 dana dok ne dosegnu stadij blastociste. Nakon toga prijenos zametka provodi se sličnim postupcima kao i kod *in vivo* blastocista ili se zamrzavaju (FERRÉ, 2020.). Za uzgoj *in vitro* goveđih zametaka postoji nekoliko protokola. Oni uključuju različite sustave ko-kulture i sustave bez stanica te također *in vivo* postupak kulture u surogatnom jajovodu ovaca. Zadnji sustav daje zametke kvalitete usporedive s MOET zametcima, posebice ako se moraju zamrznuti i odmrznuti prije transfera. Ovaj postupak zahtijeva posebnu kiruršku stručnost i odgovarajuću opremu, ali je opravdan kvalitetom proizvedenih zametaka. Koristi se uglavnom u istraživačkim okruženjima, a manje u komercijalnim okruženjima. Ovom metodom im se obično dopušta brazdanje *in vitro* i 48-72 sata nakon oplodnje se prijenos u ovčji jajovod. S praktičnog i ekonomičnog gledišta najjednostavnija opcija je nastavak kulture *in vitro*. U novije vrijeme uporaba definiranih medija uz dodatak ili bez dodanog seruma u uvjetima s niskim udjelom kisika gotovo je u potpunosti zamijenila uzgoj zametaka u ko-kulturi s različitim somatskim stanicama (GALLI i sur., 2003.).

#### 2.11. Kloniranje, mikromanipulacija i dijeljenje zametaka

Kloniranje kao tehnika umnožavanja koristi se u malih preživača od kasnih sedamdesetih (RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2012.). Kloniranje se odnosi na proizvodnju identične jedinice koristeći stanice donora i kopiranjem gena, što podrazumijeva stvaranje jedinice koja sve svoje gene dobija od jedne jedinice, a također se naziva i aseksualna reprodukcija. Dijeljenje zametka i prijenos jezgre su metode kloniranja (HADGU i FESSEHA, 2020.). Dijeljenje zametka tj. *splitting* odnosi se na stvaranje blizanaca umjetnim mikrokirurškim dijeljenjem zametaka. Nakon odvajanja, genetski identični zametci mogu se nastaviti razvijati. Stadij morule ili blastociste može se prerezati na dvije jednake polovice pomoću invertnog mikroskopa povezanog s mikromanipulatorom i mikrokirurškim nožem prije prijenosa surogat ženki. Ovom se metodom mogu proizvesti genetski identične životinje te ovaj proces kopira prirodni proces proizvodnje jednojajčanih blizanaca (SAID i sur., 2020.).

Kloniranje se može, zajedno s drugim oblicima asistiranе reprodukcije, koristiti za očuvanje autohtonih pasmina stoke koje imaju dobru proizvodnu sposobnost i prilagodljivost lokalnim sredinama. Omogućuje brzo širenje superiornih genotipova iz uzgoja i ima potencijal

potaknuti razvoj životinjske biotehnoške industrije u mnogim nerazvijenim zemljama svijeta. Također može poslužiti kao dodatni alat u očuvanju kritično ugroženih vrsta svijeta (HADGU i FESSEHA, 2020.).

## 2.12. Ugrožene pasmine goveda u Republici Hrvatskoj

Ugrožene i zaštićene pasmine stvarane su tisućama godina te su neponovljive i čine jedinstveno genetsko nasljeđe. Njihovim nestajanjem biološka raznolikost u ekološkom sustavu se smanjuje. Njihovo očuvanje bitno je zbog kulturnih, gospodarskih i znanstvenih razloga. Zbog nesigurnosti što donose klimatske promjene i razvoji bolesti posjedovanje originalnih genoma u *in vivo* ili *in vitro* obliku daje sigurnost zbog njihove sposobnosti prilagodbe na izazove u kojima su se razvijale. Brzo ih možemo uključiti u proizvodni proces. Hrvatska ima 3 pasmine goveda koje su ugrožene i zaštićene. Istarsko govedo i slavonsko-srijemski podolac su uključeni u programe očuvanja tijekom devedesetih godina, a buša je pod programom zaštite od 2003. godine. Trenutni stupanj ugroženosti istarskog goveda i slavonsko-srijemskog podolca je ugrožen, a buše ranjiv. Način njihove zaštite određen je „Nacionalnim programom očuvanja izvornih i ugroženih pasmina domaćih životinja u Republici Hrvatskoj 2021-2025“ (APPRRR, 2021.). Osim uzgojnih udruženja (Udruga uzgajivača buše, Savez uzgajivača istarskog goveda i Udruga uzgajivača slavonsko-srijemskog podolca), specifične aktivnosti iz uzgojnog programa provodi i Centar za stočarstvo Hrvatske agencije za poljoprivredu u hranu, HAPIH (IVKIĆ i sur., 2024.). Simentalska pasmina krava je najbrojnija u Hrvatskoj, holstein je druga najzastupljenija, a treća po brojnosti je smeđa pasmina. Broj krava mesnih pasmina se kontinuirano povećava u našoj zemlji, a najbrojnije su: Angus, Limousine, Charolais i Salers (IVKIĆ i sur., 2024.).

Za očuvanje populacije autohtonih pasmina domaćih životinja u Republici Hrvatskoj poduzimaju se različiti znanstveno stručni postupci koji su sukladni najnovijim znanstvenim spoznajama. Potreban je multidisciplinarni pristup i timski rad za optimizaciju rezultata primjenjivih postupaka. Autohtone pasmine moguće je zaštititi pomoću banke gena (*ex situ*) ili postupcima *in situ* (PRVANOVIĆ BABIĆ i sur., 2023.). Zaštita *in situ* znači očuvanje živih životinja u okolini prilagođenoj njihovim potrebama. Ne zahtijeva skupu i visoko specijaliziranu opremu, ali je potreban prostor i radna snaga, što je često ograničavajući čimbenik (GETZ i sur., 2004.). Razvoj i korištenje genetskog resursa je najracionalnija strategija očuvanja. Međutim postoje slučajevi gdje su *ex situ* pristupi jedina alternativa (REGE, 1995.). *Ex situ* znači očuvanje izvan njihovih prirodnih staništa. Očuvanje *ex situ* je bitno jer je

glavni razlog smanjenja broja ili čak izumiranja pojedine pasmine temeljito i korjenito nestajanje sredine iz koje je pasmina potekla i za koju je uzgajana (PRVANOVIĆ BABIĆ i sur., 2023.). Ovakav oblik očuvanja uključuje održavanje malih populacija u zoološkim vrtovima, krioprezervaciju sjemena, jajnih stanica i zametaka te kombinacije ovih metoda. Krioprezervacija spolnih stanica, zametaka ili segmenata DNK može biti vrlo učinkovit i siguran pristup za pasmine ili sojeve čije su populacije premale da bi se mogle konzervirati na bilo koji drugi način (REGE, 1995.). Uspostava sustavne pohrane uzoraka u banci gena radi očuvanja što veće biološke raznolikosti je ključna i trebala bi se koristiti kad god je to moguće (PRVANOVIĆ BABIĆ i sur., 2023.). Akreditirani laboratorij HAPIH-a u Osijeku pruža uslugu genotipizacije i potvrđivanja roditeljstva domaćih životinja. Tijekom 2023. godine zaprimio je 2800 bioloških uzoraka domaćih životinja. Rezultati laboratorijske analitike doprinose poboljšanju uzgoja u provedbe uzgojnih programa u Republici Hrvatskoj. Potvrđivanje roditeljstva na molekularnoj razini u skladu s uzgojnim programima priznatih uzgojnih udruženja povećava točnost podataka u banci gena (IVKIĆ i sur., 2024.).

### 2.13. Biotehnologija rasplodivanja u Republici Hrvatskoj

U našoj zemlji, stručnjaci s Klinike za porodništvo i reprodukciju domaćih životinja izveli su prvo umjetno osjemenjivanje krave još 1943. godine. To potvrđuje Zahvalnica stočara iz Remeta Božidaru Oklješi, predstojniku klinike, nakon poroda te krave. Rad i rezultate u liječenju i suzbijanju neplodnosti krava i junica te iskorištavanju bikova u Hrvatskoj možemo pratiti tek od 1948. godine jer od tada postoje sustavni podatci o umjetnom osjemenjivanju (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006., TOMAŠKOVIĆ i sur., 2007.).

Ministarstvo znanosti i tehnologije je financiralo projekt "Embriotransfer u krava" koji je trajao od 1992. do 1996. godine, a glavni istraživač je bio prof. dr.sc. Zdenko Makek. Početkom ovog projekta, s radom započinje Laboratorij za asistiranu reprodukciju na Klinici za porodništvo i reprodukciju Veterinarskog fakulteta u Zagrebu. U sklopu projekta bili su istraživani postupci superovulacije i superovulacijski odgovor, duboko smrzavanje sperme i zametaka te embriotransfer (GETZ i sur., 2001.). Rupčić i suradnici 1990. godine istražuju utjecaj prirodne i kirurške inseminacije kod ovaca pasmine domaća pramenka tijekom izvođenja embriotransfera (GETZ i sur., 2004.). U rujnu 1995. godine je rođeno prvo tele nakon embriotransfera u Hrvatskoj (MAKEK i sur., 1996.). Zatim je u Križevačkom Lemešu rođeno prvo vitalno žensko tele nakon *in vitro* oplodnje 3. svibnja 2001. godine (MAKEK i sur., 2001.). Laboratorij danas obuhvaća mogućnost izvođenja MOET-a, *in vitro* proizvodnje zametaka iz

klaoničkog materijala, OPU superovuliranih krava ili onih u ciklusu, embriotransfer, krioprezervaciju sperme i zametaka, ranu dijagnostiku graviditeta putem ultrazvuka (MATKOVIĆ i sur., 2000.), proizvodnju medija za *in vitro* uzgoj, krioprezervaciju te morfološku ocjenu zametaka prema standardima IETS-a (GETZ i sur., 2001.).

Standardni protokol za dozrijevanje, oplodnju i uzgoj *in vitro* goveđih zametaka postavljen je u Laboratoriju za asistiranu reprodukciju te su rezultati u nizu postupaka u skladu i ujednačeni s rezultatima koje postižu i drugi svjetski laboratoriji. Ultrazvučnom aspiracijom jajnika krava simentalke pasmine dobivene su prosječno 6.3 kvalitetne jajne stanice koje su išle u proces *in vitro* oplodnje od onih krava koje su bile stimulirane s FSH te prosječno 4.1 jajnih stanica od nestimuliranih krava. Broj zametaka dobivenih u ovom procesu je bio 3 kod stimuliranih te 2 kod nestimuliranih plotkinja (GETZ i sur., 2004.).

U Republici Hrvatskoj sjeme bikova se čuva isključivo dubokim smrzavanjem pa se uvođenjem ove tehnologije i organizacija UO uvelike promijenila. U centrima za proizvodnju i/ili skladištenje sjemena se nalaze bikovi europske kvalitete te se u njima vrši ocjena, razrjeđivanje i smrzavanje sperme, a duboko zamrznuto sjeme bikova čuva se u velikim specijalnim posudama za tekući dušik tj. depo kontejnerima (IVKIĆ i sur., 2024.). Također svaka ambulanta i veterinarska stanica mora raspolagati kontejnerima manjeg volumena od 15 do 20 l u kojima je pohranjeno sjeme (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.).

U Hrvatskoj se metode asistirane reprodukcije koriste i za očuvanje genoma ugroženih divljih i autohtonih pasmina. Tijekom 2000. godine uspješno je zamrznuto sjeme mužjaka crvenog jelena u Hrvatskoj. Ispiranjem epididimisa 8 do 14 sati nakon odstrela polučivano je sjeme i zamrznuto je u komercijalnom razrjeđivaču Tryladil. Po mužjaku je dobiveno od jedne do šest doza, a nakon sinkronizacije košute su osjemenjenje bimanualnom metodom duboko u cerviks, ali nije dobiveno potomstvo. Kada se sjeme apliciralo direktno u rog maternice laparoskopskom metodom dobili su se zadovoljavajući rezultati. Također su uspješno laparoskopski osjemenjene i ovce ugrožene autohtone pasmine istarske pramenke tijekom 2001. godine. Naš istraživački tim je izvršio laparoskopski transfer kod 4 košute crvenog jelena uvezenim zametcima. Anestezirali su ih ksilazinom, zolazepamom i tiletaminom. Uveli su troakar i laparoskop u području bijele linije te su kontrolirali žuto tijelo i ako je ono bilo prisutno izvršen je embriotransfer nakon što su zametci ocijenjeni po kvaliteti (GETZ i sur., 2004.). Programom zaštite mađarske vlade koji je uključivao embriotransfer, smrzavanje sjemena i zametaka spašena je autohtona pasmina mađarski sivi podolac, koji je srodnik našeg slavonsko-srijemskog podolca koji trenutno broji 1000 jedinki. Godine 1993. Varga i suradnici su oplodili

i uzgojili prosječno 1.7 zametaka od plotkinja mađarskog sivog podolca te su izvršili embriotransfer u primateljice drugih pasmina i otelila se vitalna telad (VARGA i sur., 1993.). U posljednjih tridesetak godina, uzgoj autohtonih i zaštićenih pasmina u Hrvatskoj potiče se sustavom poticaja. Poticaji su već dali rezultate jer broj jedinki eksponencijalno raste. Neke uzgojne organizacije uspjele su provesti i takozvano brendiranje pa je meso istarskog boškarina sve više traženo na tržištu Europske Unije. U farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji vrlo je velika potražnja za magarećim mlijekom, a velik broj ždrebadi i mladih konja sa posavskih pašnjaka se izvozi u Italiju. Iako su usvojeni novi zakoni i planovi kojima se uspostavlja banka gena autohtonih pasmina te su osigurana sredstva, situacija je lošija prije 30 do 40 godina u praksi. Zbog jačanja tržišne ekonomije, globalizacije prometa robe i usluga te strožih uvjeta kojima trebaju udovoljavati, značajno pada broj centara za UO, laboratorija za reprodukciju i stručnjaka koji rade u tom području (PRVANOVIĆ BABIĆ i sur., 2021.).

Tijekom perioda od 10 godina (od 2000. do 2010.) u Hrvatskoj je izvedeno 230 aspiracija jajnih stanica kod ukupno 63 krave i junice nakon prethodne superovulacije jajnika ili u ciklusu (GETZ i sur., 2011.). Korišteni su različiti protokoli sinkronizacije, a to su: aplikacija PGF<sup>2α</sup> s ili bez aspiracije dominantnog folikula te implantant koji sadrži norgestomet koji je bio apliciran u uho. Standardni protokol uzgoja goveđih zametaka *in vitro* Laboratorija za asistiranu reprodukciju Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu podrazumijeva pripremu sperme za oplodnju na gradijentu BoviPure<sup>®</sup> te primjenu definiranog SOFaaBSA medija. U desetogodišnjem razdoblju rezultat su 578 goveđih zametaka uzgojenih *in vitro* pogodnih za transfer (GETZ i sur., 2011.).

Lojkić i suradnici provode istraživanje o utjecaju pasmine na učinkovitost aspiracije jajnih stanica i kasniji uzgoj goveđih zametaka u Republici Hrvatskoj. U istraživanju je sudjelovalo 14 krava, a od toga 4 krave su bile simentalne pasmine, 5 ih je bilo Charolais pasmine i 5 holstein- frizijska. Kravama je sinkroniziran estrus tako što su aplicirali dva puta PGF<sup>2α</sup> kroz period od 11 dana. Gonadotropin su aplicirali između 9. i 10. dana nakon inducirano estrusa. Provedene su 4 aspiracije po kravi te je provedena klasifikacija jajnih stanica. One jajne stanice koje su spadale u 1. razred (jajna stanica kompletno okružena sa više od 3 sloja kumulusnih stanica i prisutna ujednačena granulacija plazme koja potpuno ispunjava zonu pellucidu) i 2. razred (jajne stanice sa 1 do 3 sloja stanica sa ujednačenom granulacijom plazme) su uzgajane *in vitro*. Zaključili su da pasmina utječe na proces. Krave simentalne i Charolais pasmine dale su više aspiriranih jajnih stanica od holstein-frizijskih, no pasmina nije utjecala na *in vitro* oplodnju i daljnji uzgoj zametaka (LOJKIĆ i sur., 2013.).

Pomoću biotehnologije rasplodivanja postoji mogućnost odabiranja i širenja genoma najkvalitetnijih životinja, kontroliranje zdravlja ljudi i životinja zbog sanitarnih kontrola koje rizik prijenosa bolesti svode na minimum (GETZ i sur., 2001.).

### 3. ZAKLJUČCI

1. Različite metode biotehnologije rasplodivanja omogućuju lakšu manipulaciju genetskim materijalom, biranje elitnih grla za daljnje razmnožavanje, svode prijenos bolesti na minimum zbog sanitarnih kontrola i mjera opreza u izvođenju nekog postupka, a transport jajnih stanica, sperme i zametaka je lakši, jeftiniji i brži od transporta jedinki. Zbog širokog spektra ovih metoda svatko može izabrati najprihvatljiviju opciju koja odgovara njegovim potrebama.
2. Ekonomski značaj sinkronizacije estrusa, testiranja bikova, umjetnog osjemenjivanja, MOET-a, smrzavanja sperme i zametaka, seksiranja sperme, oplodnje *in vitro* i ostalih postupaka je neizmjeran, jer omogućuje biranje genetskih svojstava i goveda koje daju najbolje rezultate ovisno o potrebama uzgajivača bilo zbog mesne i mliječne industrije ili zbog znanstvenih istraživanja.
3. U Republici Hrvatskoj se metode biotehnologije razmnožavanja koriste jako dugo, a uspostavljeni su i centri za primjenu metoda asistirane reprodukcije te se mogu koristiti u svrhu očuvanja zaštićenih i ugroženih pasmina. Bez spomenutih centara bilo bi iznimno teško provesti sve potrebne postupke asistirane reprodukcije za što bolju kvalitetu banke gena, a potrebno je i strateško planiranje svih njegovih aspekata te ulaganje u veterinarsku struku.
4. Naše ugrožene i zaštićene pasmine, kao što su istarsko govedo, slavonsko-srijemski podolac i buša, prilagođene su našem podneblju i prilagodile su klimatskim i prirodnim promjenama kojima svjedočimo. Osim ekonomskog potencijala u spašavanju ovih pasmina i njihovom češćem korištenju u poljoprivredi i prehrambenoj industriji ne smije se zanemariti da su dio naše kulturne baštine.
5. Veterinarska struka jedina posjeduje znanja i tehnike koje su neophodne za očuvanje autohtonih pasmina te je potreban multidisciplinarni pristup ovom problemu.

#### 4. LITERATURA

1. APPRRR (2021): Nacionalni program očuvanja izvornih i zaštićenih pasmina domaćih životinja u Republici Hrvatskoj 2021. - 2025.  
<https://stocarstvo.mps.hr/app/uploads/2021/12/nacionalni-program-izvornih-i-ugrozenih-pasmina-2021-2025-final.pdf> (preuzimanje: 2. 5. 2024.)
2. BALDASSARRE, H. (2021): Laparoscopic Ovum Pick-Up Followed by In Vitro Embryo Production and Transfer in Assisted Breeding Programs for Ruminants. *Animals* 11, 216.
3. BÓ, G. A., P. S. BARUSELLI (2014): Synchronization of ovulation and fixed-time artificial insemination in beef cattle. *Animal* 8, 144–150.
4. BÓ, G. A., R. J. MAPLETOFT (2014): Historical perspectives and recent research on superovulation in cattle. *Theriogenology* 81, 38–48.
5. CERGOLJ, M., M. SAMARDŽIJA (2006): VETERINARSKA ANDROLOGIJA. Veterinarski fakultet, Zagreb, str. 73-118.
6. DE GRAAFF, W., B. GRIMARD (2017): Progesterone-releasing devices for cattle estrus induction and synchronization: Device optimization to anticipate shorter treatment durations and new device developments. *Theriogenology* 112, 34-43.
7. DIAS, E. A. R., S. P. CAMPANHOLI, G. F. ROSSI, C. P. FREITAS DELL'AQUA, J. A. JUNIOR DELL'AQUA, F. O. PAPA, M. F. ZORZETTO, C. C. P. DE PAZ, L. Z. OLIVEIRA, M. E. Z. MERCADANTE, F. M. MONTEIRO (2018): Evaluation of cooling and freezing systems of bovine semen. *Anim. Reprod. Sci.* 195, 102-111.
8. DOBSON, H., J. WILLIAMS, J. E. ROUTLY, D. N. JONES, J. CAMERON, A. HOLMAN-COATES, R. F. SMITH (2018): Short communication: Chronology of different sexual behaviors and motion activity during estrus in dairy cows. *J. of dairy sci.* 101, 8291-8295.
9. ESPINOSA-CERVANTES, R., A. CÓRDOVA-IZQUIERDO (2012): Sexing sperm of domestic animals. *Trop. Anim. Health and Prod.* 45, 1–8.
10. FERRÉ, L. B., M. E. KJELLAND, L. B. STRØBECH, P. HYTTEL, P. MERMILLOD, P. J. ROSS (2020): Review: Recent advances in bovine in vitro embryo production: reproductive biotechnology history and methods. *Animal* 14, 991-1004.
11. FRICKE P. M., P. D. CARVALHO, J. O. GIORDANO, A. VALENZA, G. JR. LOPES, M. C. AMUNDSON (2014): Expression and detection of estrus in dairy cows: the role of new technologies. *Animal* 8, 134-43.

12. FRY, R. C. (2020): Gonadotropin priming before OPU: What are the benefits in cows and calves? *Theriogenology*. 150, 236-240.
13. GALLI, C., R. DUCHI, G. CROTTI, P. TURINI, N. PONDERATO, S. COLLEONI, I. LAGUTINA, G. LAZZARI (2003): Bovine embryo technologies. *Theriogenology* 59, 599-616.
14. GALLI, C., R. DUCHI, S. COLLEONI, I. LAGUTINA, G. LAZZARI (2014): Ovum pick up, intracytoplasmic sperm injection and somatic cell nuclear transfer in cattle, buffalo and horses: from the research laboratory to clinical practice. *Theriogenology*, 81, 138–151.
15. GEARY, T. W., J. J. REEVES, D. W. SCHAFER, R. R. EVANS, R. D. RANDEL, L. M. RUTTER, R. G. SASSER, R. GUARDIA, B. ALEXANDER, D. HOLCOMBE, D. R. HANKS, D. B. FAULKNER (1997): Norgestomet implants prevent pregnancy in beef heifers on pasture. *J. of anim. Sci.* 75, 3089–3093.
16. GETZ, I. (2004): Uspješnost stimulacije jajnika krava u postupku transvaginalne ultrazvučne punkcije i uzgoja in vitro govedih zametaka. Doktorska disertacija. Sveučilište u Zagrebu, Veterinarski fakultet, Zagreb, Hrvatska.
17. GETZ, I., M. MATKOVIĆ, Z. MAKEK, A. TOMAŠKOVIĆ, M. CERGOLJ, M. LOJKIĆ (2001): Asistirana reprodukcija u govedarskoj proizvodnji. *Proceedings Vet. Dani. Hrvatska veterinarska komora*, str. 83-92.
18. GETZ, I., M. MATKOVIĆ, Z. MAKEK, Z. JANICKI, A. TOMAŠKOVIĆ, M. CERGOLJ, J. PETRIĆ, G. BAČIĆ, T. KARADJOLE, M. KARADJOLE (2004): Primjena metoda asistiranе reprodukcije za očuvanje ugroženih divljih vrsta i autohtonih pasmina preživača. *Zbornik radova Trećeg hrvatskog veterinarskog kongresa, 17.-21. studeni, Opatija*, str. 113-119.
19. GETZ, I., M. KARADJOLE, M. SAMARDŽIJA, M. MATKOVIĆ, Z. MAKEK, T. DOBRANIĆ, T. KARADJOLE, J. GRIZELJ, N. MAĆEŠIĆ, I. FOLNOŽIĆ (2011): Transvaginalna aspiracija jajnih stanica za uzgoj in vitro govedih zametaka – osvrt na desetljeće istraživanja u Hrvatskoj. *Veterinarska stanica* 42, 38-45.
20. GORDON, I. (1996): *Controlled Reproduction in Cattle and Buffaloes*. CAB International, Wallingford, str. 9, 65-75, 49-50, 142-145, 60, 44-45, 258.
21. GREVE, T., V. MADISON (1991): In vitro fertilization in cattle: a review. *Reproduction Nutrition Développement*, 31, 147–157.
22. GÜMEN, A., M. C. WILTBANK (2005): Length of progesterone exposure needed to resolve large follicle anovular condition in dairy cows. *Theriogenology* 63, 202-218.



23. HADGU, A., H. FESSEHA (2020): Reproductive biotechnology options for improving livestock production: A review. *Adv. Food. Technol. Nutr. Sci. Open J.* 6, 13-20.
24. HANDLER, J., S. SCHÖNLIEB, H. O. HOPPEN, C. AURICH (2007): Influence of reproductive stage at PRID insertion on synchronization of estrus and ovulation in mares. *Anim. Reprod. Sci.* 97, 382-393.
25. IVKIĆ, Z., M. ŠPEHAR, D. SOLIĆ, M. MOLNAR, D. PAŠALIĆ, J. PAVIČIĆ, D. UDBINAC, D. BLAŽEK, Z. MIKIĆ, V. TISSAUER, J. CRNČIĆ, J. CVITAŠ (2024): *Govedarstvo - Godišnje izvješće za 2023. godinu*. Hrvatska agencija za poljoprivredu i hranu. Centar za stočarstvo, Osijek, 2024.  
<https://www.hapih.hr/wp-content/uploads/2024/06/Govedarstvo-Godisnje-izvjesce-2023.pdf>
26. KASTELIC, J. P., J. C. THUNDATHIL (2008): Breeding soundness evaluation and semen analysis for predicting bull fertility. *Reprod. Domest. Anim.* 43, 368-73.
27. KATSKA, L., Z. SMORAG (1985): The influence of culture temperature on in vitro maturation of bovine oocytes. *Anim. Reprod. Sci.* 9, 205-212.
28. KNIGHTS, M., D. SINGH-KNIGHTS (2016): Use of controlled internal drug releasing (CIDR) devices to control reproduction in goats: A review. *Anim Sci J.* 87, 1084-1089.
29. LAMB, G. C., C. R. DAHLEN, J. E. LARSON, G. MARQUEZINI, J. S. STEVENSON (2010): Control of the estrous cycle to improve fertility for fixed-time artificial insemination in beef cattle: A review. *J. Anim. Sci.* 88, 181-192.
30. LAMB, G. C., V. R. MERCADANTE (2016): Synchronization And Artificial Insemination Strategies In Beef Cattle. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 32, 335-47.
31. LOJKIĆ, M., I. GETZ, M. SAMARDŽIJA, N. MAĆEŠIĆ, M. MATKOVIĆ, T. KARADJOLE, G. BAČIĆ, N. PRVANOVIĆ BABIĆ, J. GRIZELJ, S. VINCE (2013): Effect of bred on efficiency of oocyte collection and subsequent bovine embryo production // Congress Proceedings 8<sup>th</sup> Middle European Buiatrics Congress, 5.-8. lipnja, Beograd, str. 426-431.
32. LOJKIĆ, M., I. GETZ, N. KARAJIĆ, M. SAMARDŽIJA, N. MAĆEŠIĆ, T. KARADJOLE, N. PRVANOVIĆ BABIĆ, G. BAČIĆ, D. ŽELJEŽIĆ, V. MAGAŠ (2018): Primjena asistirane reprodukcije u govedarstvu, *Vet. stanica* 49, 91-104.
33. MAKEK, Z., D. RUDAN, M. HERAK, D. VIDUČ (1996): Rođeno je prvo tele postupkom embriotransfera i Republici Hrvatskoj. *Vet. stanica* 27, 147-150.

34. MAKEK, Z., M. MATKOVIĆ, I. GETZ, M. LOJKIĆ, A. TOMAŠKOVIĆ, T. DOBRANIĆ, M. SAMARDŽIJA, P. BOŽIĆ, Z. TUČEK (2001): Oplodnjom in vitro začeto je i porođeno prvo tele u Republici Hrvatskoj. Proceedings Veterinarski dani 2001. Zagreb: Hrvatska veterinarska komora; Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, str. 101-103.
35. MATKOVIĆ, M., I. GETZ, Z. MAKEK, P. BOŽIĆ, A. TOMAŠKOVIĆ, M. CERGOLJ (2000): Biotehnologija rasplodivanja: mogućnosti primjene u stočarstvu Hrvatske. Proceedings of the Second Croatian Veterinary Congress, Zagreb, 215-224.
36. MEMILI, E., A. A. MOURA, A. KAYA (2020): Metabolomes of sperm and seminal plasma associated with bull fertility. Anim. Reprod. Sci. 220, 106355.
37. MOFFATT, R. J., W. G. JR. ZOLLERS, W.V. WELSHONS, K.R. KIEBORZ, H. A. GARVERICK, M. F. SMITH (1993): Basis of norgestomet action as a progestogen in cattle. Domest. Anim. Endocrinol. 10, 21-30.
38. MOORE, S. G., J. HASLER (2017): A 100-Year Review: Reproductive technologies in dairy science. J. Dairy sci. 100, 10314-10331.
39. MORRELL, J. M. (2020): Heat stress and bull fertility. Theriogenology 153, 62-67.
40. MORRIS, D.G., M. G. DISKIN, J. M. SREENAN (2001): Biotechnology in Cattle Reproduction, End of Project Reports, Teagasc.  
<https://t-stor.teagasc.ie/handle/11019/1368>
41. PHILLIPS, P. E., M. M. JAHNKE (2016): Embryo Transfer (Techniques, Donors, and Recipients). Vet. Clin. North. Am.: Food. Anim. Pract. 32, 365–385.
42. PRVANOVIĆ BABIĆ, N., I. GETZ, S. VINCE, B. ŽEVRNJA, M. SAMARDŽIJA (2021): Vrsne specifičnosti i ograničenja prilikom uspostavljanja banke gena za očuvanje autohtonih rasa životinja. ZBORNIK PREDAVANJA TREĆEG SIMPOZIJUMA ZAŠTITA AGROBIODIVERZITETA I OČUVANJE AUTOHTONIH RASA DOMAĆIH ŽIVOTINJA, 25.-27. lipnja, Dimitrovgrad, str. 13-20.
43. PRVANOVIĆ BABIĆ, N., M. LOJKIĆ, S. VINCE, N. MAČEŠIĆ, I. GETZ, I. BUTKOVIĆ, J. ŠAVORIĆ, B. ŠPOLJARIĆ, I. FOLNOŽIĆ, S. MENČIK (2023): Izazovi očuvanja, popularizacije i kontrole populacije izvornih pasmina domaćih životinja – preliminarna iskustva referentne mreže stručnjaka za banku gena Hrvatske. ZBORNIK PREDAVANJA TREĆEG SIMPOZIJUMA ZAŠTITA AGROBIODIVERZITETA I OČUVANJE AUTOHTONIH RASA DOMAĆIH ŽIVOTINJA, 29. lipnja-01. srpnja, Dimitrovgrad, str. 39-45.

44. REITH, S., S. HOY, (2018): Behavioral signs of estrus and the potential of fully automated systems for detection of estrus in dairy cattle. *Animal* 12, 398-407.
45. REGE, J. E. O. (1995): Application of biotechnology in genetic improvement, characterization and conservation of livestock - Proceedings of the international symposium on livestock production through animal breeding and genetics, 10.-11. svibnja, Harare, Zimbabwe: University of Zimbabwe.  
<https://cgspace.cgiar.org/rest/bitstreams/88489/retrieve>
46. RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. (2012): Assisted Reproductive Techniques for Cattle Breeding in Developing Countries: A Critical Appraisal of Their Value and Limitations. *Reprod. Dom. Anim.* 47, 21-26.
47. SAID, S., P. P. AGUNG, W. P. B. PUTRA, E. M. KAIIN (2020): The role of biotechnology in animal production. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 492, 012035.  
<https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1755-1315/492/1/012035/pdf>
48. SJUNNESSON, Y. (2020). In vitro fertilisation in domestic mammals-a brief overview. *Upsala Journal of Med. Sci.* 125, 68–76.
49. STEELE, H., D. Makri, W. E. MAALOUF, S. REESE, S KÖLLE (2020): Bovine Sperm Sexing Alters Sperm Morphokinetics and Subsequent Early Embryonic Development. *Scientific Reports* 10, 6255.
50. STEVENSON, J. S. (2016): Synchronization and Artificial Insemination Strategies in Dairy Herds. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* 32, 349-364.
51. TOMAŠKOVIĆ, A., Z. MAKEK, T. DOBRANIĆ, M. SAMARDŽIJA (2007): RASPLOĐIVANJE KRAVA I JUNICA, Veterinarski fakultet, Zagreb, str. 55-71.
52. VAN WAGTENDONK-DE LEEUW, A. M. (2006): Ovum pick up and in vitro production in the bovine after use in several generations: a 2005 status. *Theriogenology* 65, 914-925.
53. VAN WERVEN, T., F. WALDECK, A. H. SOUZA, S. FLOCH, M. ENGLEBIENNE (2013): Comparison of two intravaginal progesterone releasing devices (PRID-Delta vs CIDR) in dairy cows: Blood progesterone profile and field fertility. *Anim. Reprod. Sci.* 138, 143-9.
54. VARGA, Z., Z. BARANDI, Z. MACHATY, L. SOLTI, S. CSEH, J. SEREGI, T. CSAKI, G. VAJTA (1993): In Vitro Fertilization in Hungarian Grey Cattle. *Reprod. Dom. Anim.* 28, 252-257.

55. VERBERCKMOES, S., A. VAN SOOM, J. DEWULF, M. THYS, A. DE KRUIF (2005): Low dose insemination in cattle with the Ghent device. *Theriogenology* 64, 1716-28.
56. VISHWANATH, R., P. SHANNON (2000): Storage of bovine semen in liquid and frozen state. *Anim. Reprod. Sci.* 62, 23–53.
57. VISHWANATH, R. (2003): Artificial insemination: the state of the art. *Theriogenology* 59, 571-584.
58. WILMUT, I., C. S. HALEY, J. A. WOOLLIAMS (1992): Impact of biotechnology on animal breeding. *Anim. Reprod. Sci.* 28, 149–162.
59. YÁNEZ-ORTIZ, I., J. CATALÁN, J. E. RODRÍGUEZ-GIL, J. MIRÓ, YESTE M. (2022): Advances in sperm cryopreservation in farm animals: Cattle, horse, pig and sheep. *Anim. Reprod. Sci.* 246, 106904.

## 5. SAŽETAK

### METODE BIOTEHNOLOGIJE RASPLOĐIVANJA U GOVEDARSTVU REPUBLIKE HRVATSKE

Tea Ivelić

Biotehnologija rasplodivanja je naziv koji objedinjuje metode koje koriste žive organizme kako bi napravili, modificirali i poboljšali proizvod. U kontroliranim uvjetima se rasploduju životinje i tako se kontrolira genetska selekcija prema željenim svojstvima proizvodnje. Metode kao umjetno osjemenjivanje, smrzavanje sperme i zametaka, sinkronizacija estrusa, multipla ovulacija i embriotransfer (MOET), aspiraciju jajne stanice (OPU- *ovum pick-up*), oplodnja *in vitro*, seksiranje sperme se konstantno koriste u uzgoju u cijelom svijetu jer omogućuju kontrolu prijenosa bolesti, smanjuju troškove proizvodnje i transporta, skraćuju generacijski interval, omogućuju razmnožavanje i dobivanje grla sa elitnim genetskim svojstvima te su brze i efikasne. Još jedna od mogućnosti je i trgovina genetskim materijalom te pristupačnost ponude visokokvalitetne sperme i zametaka u zemljama u kojima nije moguće dovesti stoku. Ove metode imaju velik potencijal u očuvanju zaštićenih i ugroženih vrsta zbog kulturne baštine i zbog ekonomskih razloga. U Hrvatskoj se ove metode koriste jako dugo te je pionir u njihovom korištenju Laboratorij za asistiranu reprodukciju na Klinici za porodništvo i reprodukciju na Veterinarskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu.

Ključne riječi: biotehnologija rasplodivanja, umjetno osjemenjivanje, MOET, oplodnja *in vitro*, smrzavanje sperme, smrzavanje zametaka, estrus, plodnost bikova

## 6. SUMMARY

### METHODS OF BIOTECHNOLOGY OF PROPAGATION IN CATTLE BREEDING OF THE REPUBLIC OF CROATIA

Tea Ivelić

Reproductive biotechnology is a name that brings together methods that use living organisms to make, modify and improve a product. Animals are bred under controlled conditions of selection and thus genetic selection is controlled according to the desired production characteristics. Methods such as artificial insemination, freezing of sperm and embryos, synchronization of estrus, multiple ovulation and embryo transfer (MOET), ovum pick-up (OPU), *in vitro* fertilization, sperm sexing are constantly used in breeding all over the world because they enable control disease transmission, reduce production and transportation costs, shorten the generation interval, enable breeding and obtaining cattle with elite genetic properties, and are faster and more efficient. Another possibility is the trade in genetic material and the availability of high-quality sperm and embryos in countries where it is not possible to bring livestock. These methods have great potential in the preservation of protected and endangered species for cultural heritage and economic reasons. In Croatia, these methods have been used for a very long time, and the Laboratory for assisted reproduction at the Reproduction and obstetrics clinic at the Faculty of Veterinary Medicine of the University of Zagreb is a pioneer in their use.

Key words: reproductive biotechnology, artificial insemination, MOET, *in vitro* fertilization, sperm freezing, embryo freezing, estrus, bull fertility

## **7. ŽIVOTOPIS**

Rođena sam 14.5.1996. godine u Splitu. Završila sam Prirodoslovnu školu, gimnazijski smjer u Splitu te 2016. godine upisala Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Opređijelila sam se u X. semestru za smjer Farmske životinje i konji. Na šestoj godini fakulteta stručnu praksu sam odradila u ambulanti Veterina Branimir u Zagrebu te nakon završetka obavezne prakse sam ostala i volonirati. Također sam iste godine volontirala i u Veterinarskoj praksi Delonga u Splitu tijekom ljeta. Kao apsolventica sam radila u srebrnarnici Charm u Splitu i u trgovini Peek & Cloppenburg u Zagrebu.