

# Heterospermično osjemenjivanje kuja

---

Raič, Iva

Master's thesis / Diplomski rad

2020

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:178:234802>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-09**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
VETERINARSKI FAKULTET

**IVA RAIČ**

**Heterospermično osjemenjivanje kuja**

Diplomski rad

Zagreb, 2020.

Ovaj diplomski rad izrađen je u Klinici za porodništvo i reprodukciju Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Predstojnik klinike: prof. dr. sc. Marko Samardžija

Mentori: izv. prof. dr. sc. Martina Lojkić

izv. prof. dr. sc. Nino Maćešić

Članovi povjerenstva za obranu diplomskog rada:

1. Prof. dr. sc. Goran Bačić
2. Izv. prof. dr. sc. Martina Lojkić
3. Izv. prof. dr. sc. Nino Maćešić
4. Prof. dr. sc. Tugomir Karadjole (zamjena)

## **ZAHVALA**

*Veliko hvala mojim mentorima izv. prof. dr. sc. Martini Lojkić i izv.prof. dr. sc. Ninu Maćešiću na ogromnom strpljenju, pomoći, podršci i savjetima izradi ovog diplomskog rada, zatim prof.dr.sc.Goranu Bačiću i prof.dr.sc.Tugomiru Karadjoli za sudjelovanju u istraživanju.*

*Posebnu zahvalu dugujem izv.prof.dr.sc. Martini Lojkić bez koje nebi niti nastavila studij.*

*Od srca zahvaljujem mojoj mami, bratu, Marku Ljutiću i svim prijateljima i kolegama koji mi nikad nisu dopustili da odustanem.*

## **POPIS KRATICA/SLIKE/TABLICE**

ABP (*androgen binding protein*) = androgen vežući protein

CASA (*computer assisted sperm analysis*) = računalno potpomognuta analiza spermija

CL (*corpus luteum*) = žuto tijelo

ELFA (*Enzyme-linked Fluorescence Assay*)

FSH (*follicle stimulating hormone*) = folikulostimulirajući hormon

GnRH (*gonadotropin-releasing hormone*) = gonadotropni hormon

ICSH (*interstitial cell-stimulating hormone*) = hormon stimulacije intersticijskog tkiva

ISAG (*International Society for Animal Genetics*) = međunarodno društvo za genetiku životinja

LH (*luteinizing hormone*) = luteinizirajući hormon

TCI (*transcervical insemination*) = transcervikalna inseminacija

## **POPIS SLIKA I TABLICA**

Slika 1. Vitalnost spermija po Bloom-u

Slika 2. Anketni listić o korištenju heterospermičnog osjemenjivanja

Slika 3. Štenad prvog heterospermičnog osjemenjivanja

Slika 4. Primjer nalaza dokazivanja očinstva

Slika 5. Uspjeh heterospermičnog osjemenjivanja

Slika 6. Odnos metode osjemenjivanja/parenja i tipa sjemena na uspjeh heterospermičnog osjemenjivanja

Slika 7. Utjecaj kvalitete sjemena na uspjeh heterospermičnog osjemenjivanja

Slika 8. Uspjeh heterospermičnog osjemenjivanja

Tablica 1. Prikaz ocjene ejakulata pasa potencijalnih donora sjemena u postupku heterospermičnog osjemenjivanja

Tablica 2. Rezultati testa preživljavanja pomiješanih uzoraka sjemena potencijalnih donora nakon pohrane na 37 °C

Tablica 3. Rezultati testa preživljavanja pomiješanih uzoraka sjemena potencijalnih donora nakon pohrane na 4 °C

Tablica 5. Rezultati ocjene sjemena drugog dana osjemenjivanja

Tablica 6. Rezultati ocjene sjemena trećeg dana osjemenjivanja

Tablica 7. Rezultati ocjene nativnog sjemena prije smrzavanja

Tablica 8. Rezultati ocjene sjemena nakon smrzavanja

Tablica 9. Rezultati ocjene sjemena prvog dana osjemenjivanja

Tablica 10. Rezultati ocjene sjemena drugog dana osjemenjivanja

## Sadržaj

1. UVOD .....	1
2. ENDOKRINOLOGIJA REPRODUKCIJE KUJE .....	3
2.1. Neurohormonalna regulacija .....	3
2.2. Pubertet .....	4
2.3. Spolni ciklus .....	4
2.3.1. Anestrus .....	4
2.3.2. Proestrus .....	5
2.3.3. Estrus .....	5
2.3.4. Diestrus .....	6
2.3.5. Sezonski monoestrične pasmine – iznimke od pravila .....	6
2.3.6. Određivanje optimalnog vremena za osjemenjivanje .....	7
3. ENDOKRINOLOGIJA RASPLOĐIVANJA MUŽJAKA .....	9
3.1. Neurohormonalna regulacija .....	9
3.2. Pubertet .....	10
3.3. Polučivanje i pregled ejakulata .....	11
3.4. Tehnike umjetnog osjemenjivanja .....	13
4. POČETCI HETEROSPERMIČNOG OSJEMENJIVANJA U PASA .....	16
5. DOKAZIVANJE OČINSTVA .....	19
6. MATERIJALI I METODE .....	20
6.1. Dizajn istraživanja i postupak sa životinjama .....	20
6.2. Klinički i androloški pregled mužjaka .....	21
6.3. Uzimanje ejakulata .....	21
6.4. Ocjena ejakulata .....	21
6.4.2. Koncentracija i ukupan broj spermija .....	22
6.4.3. Ocjena integriteta stanične membrane spermija .....	22
6.4.4. Metoda supravitalnog bojenja spermija po Bloom-u .....	23
6.4.5. Morfologija spermija .....	23

6.4.6.	Test preživljavanja spermija.....	24
6.4.7.	Klinički i ginekološki pregled kuja .....	24
6.4.8.	Određivanje optimalnog vremena osjemenjivanja.....	24
6.4.9.	Tehnike osjemenjivanja.....	25
6.4.10.	Dijagnostika gravidnosti i štenjenje .....	26
6.4.11.	Dokazivanje očinstva .....	26
6.4.12.	Rezultati ankete .....	26
7.	REZULTATI.....	28
7.1	Prvo heterospermično osjemenjivanje.....	28
7.1.1.	Rezultati ocjene ejakulata pasa .....	28
7.1.2.	Rezultati koncentracije progesterona na dane osjemenjivanja kuje.....	30
7.1.3.	Rezultati dijagnostike gravidnosti .....	30
7.1.4.	Rezultati dokazivanja očinstva.....	30
7.2.	Drugo heterospermično osjemenjivanje .....	31
7.2.1.	Rezultati ocjene ejakulata.....	31
7.2.2.	Rezultati koncentracije progesterona na dane osjemenjivanja kuje.....	32
7.2.3.	Rezultati dijagnostike gravidnosti .....	32
7.2.4.	Rezultati dokazivanja očinstva.....	32
7.3.	Treće heterospermično osjemenjivanje .....	33
7.3.1.	Rezultati ocjene ejakulata.....	33
7.3.2.	Rezultati koncentracije progesterona na dane osjemenjivanja kuje.....	34
7.3.3.	Rezultati dijagnostike gravidnosti .....	34
7.3.4.	Rezultati dokazivanja očinstva.....	34
7.4.	Rezultati ankete .....	35
8.	RASPRAVA .....	38
9.	ZAKLJUČCI.....	42
10.	LITERATURA .....	43
11.	SAŽETAK .....	51
12.	SUMMARY .....	53
13.	ŽIVOTOPIS .....	54



# 1. UVOD

Domestikacija pasa (*Canis familiaris*) je započela prije 12 – 15 000 godina. Pas je izravni potomak vuka (*Canis lupus, L.*), a u pratnji čovjeka je duže nego bilo koja druga životinjska vrsta. Opće je prihvaćeno da su psi nastali od sivog vuka, a nedavna evolucija pasmina pasa predstavlja iterativni proces koji se temeljio na ograničenom genetskom materijalu za stvaranje nevjerojatne fenotipske raznolikosti (VON HOLDT i sur., 2010.). S obzirom na pretpostavku da su nastali od svega nekoliko divljih kanida, može se zaključiti da je do fenotipskih varijacija došlo uslijed djelovanja niza mutacija kroz 14 000 godina (OLSEN, 1985.). Suprotno navedenoj pretpostavci, ukoliko su psi nastali od velike populacije divljih kanida i dugo se križali kroz evoluciju, velika raznolikost može se objasniti uslijed većeg priljeva različitog genetskog bazena (WAYNE i sur., 1987.). Međutim, genetska izolacija među nekim pasminama uslijed selekcije morala je biti dovoljna kako bi uzrokovala divergenciju u učestalosti alela.

Danas postoji više od 400 različitih pasmina pasa, čime pas postaje jedna od najraznolikijih vrsta u carstvu životinja. Aktivno se selekcijski uzgajaju zadnjih 200 godina s obzirom na namjenu i njihovu ulogu u društvu. Poznato je da su ovčarski psi u službi čovjeka već 7 000 godina, a smatra se da su stanovnici Sibira prvi započeli uzgoj pasa još prije 9 000 godina (SINDING i sur., 2020.). Iako uzgoj pasa seže daleko u prošlost, tek u 19-om stoljeću su se počela zapisivati imena pasa unutar pojedinih pasmina u rodovne knjige, čime je započeo uzgoj u „čistoj krvi“. Selekcija uzgojno vrijednih jedinki od velikog je značaja u svrhu dobivanja stabilnih pasa s obzirom na namjenu, stoga je važno pratiti reproduktivni i klinički potencijal reproduktivnih pasa koji će omogućiti uzgoj najkvalitetnijih jedinki.

Genetski bazen pojedinih pasmina je vrlo malen, a sam reproduktivni vijek kuje je kratak. Vrhunac rasplodne moći kuja doseže s dvije godine, a traje do šeste ili sedme godine. U ovom periodu kuja može proizvesti leglo pri svakom estrusu, ali zbog etičkih razloga se to ne prakticira već se gotovo redovito preskače barem jedan ili dva estrusa između legala. Nakon sedme godine pada postotak koncepcije kao i veličina legla (ENGLAND, 2010.).

S obzirom na relativno malen genetski bazen pojedinih pasmina i mali broj dostupnih parnjaka, uslijed specifičnog spolnog ciklusa kuje, uzgajivačima je dana mogućnost heterospermičnog osjemenjivanja kuja. Cilj istraživanja je dobivanje legala od dva različita oca što daje mogućnost veće genetske raznolikosti unutar istraživane pasmine, Petit Basset Griffon

Vendeen, koja ima mali genetski bazen i mali broj predstavnika pasmine na svjetskoj razini. Uspješna heterospermična osjemenjivanja uslijed specifičnog spolnog ciklusa kuje potencijalno daju veću kombinaciju gena unutar jednog legla, bez pretjeranog iskorištavanja kuje. To je posebice korisno kod kratkoživućih pasmina. Heterospermično osjemenjivanje daje podjednake šanse mužjacima za proizvodnju legla, jer je uslijed snažne prirodne selekcije (BIRKHEAD i PIZZARI, 2002.), primijećen je utjecaj i na kompeticijsko ponašanje spermija (GÓMEZ MONTOTO i sur., 2011., LEIVERS i sur., 2014.) čime se povećavaju šanse za dobivanje legla. Heterospermično leglo prvi se puta spominje u literaturi 1987. godine, tada nazvano „superfekundacija“, koje su eksperimentalno napravili japanski znanstvenici (TSUITSUI i EJIMA, 1987.). Prvi puta je priznato od strane američkog saveza (AKC – *American kennel club*) 1998., nakon čega je uslijedila Skandinavija, a u Hrvatskoj je ovaj način osjemenjivanja priznat krajem 2017. godine.

## 2. ENDOKRINOLOGIJA REPRODUKCIJE KUJE

Kuje su monoestrične životinje, imaju samo jedan estrus tijekom sezone parenja. Faze ciklusa su proestrus, estrus, diestrus i anestrus. Spolni ciklus kuja se razlikuje od uobičajenog spolnog ciklusa. Proestrus i estrus traju znatno duže nakon kojih slijedi duga lutealna faza bez obzira je li kuja gravidna ili ne. Nakon lutealne faze kuja ulazi u fazu anestrusa koja nije povezana sa fotoperiodom tj. godišnjim dobom. Prosječna duljina spolnog ciklusa je 7 mjeseci i varira ovisno o pasmini (TSUTSUI i sur., 2009.).

### 2.1. Neurohormonalna regulacija

Kod domaćih životinja primarna kontrola spolnog ciklus se odvija interakcijom okoliša i mozga, odnosno osjetilnih podražaja koje životinja registrira putem osjetila (vid, njuh) koji se prenose do mozga koji pristigle podražaje interpretira te prenosi putem živaca do hipotalamusa. Hipotalamus je nadređeni centar vegetativnog živčanog sustava i žlijezda s unutrašnjim lučenjem, nadzire niz životno važnih funkcija kao što su tjelesna temperatura, rad srca, krvni tlak, hranjenje i pijenje, ponašanje, nadzire aktivnosti autonomnog živčanog sustava zatim samu hipofizu i preko nje upravlja cijelim endokrinim hormonalnim sustavom. Hipotalamus sintetizira i luči gonadotropni hormon (*GnRH – gonadotropin-releasing hormone*) koji putem portalnog krvotoka dolazi do hipofize, odnosno adenohipofize, koju stimuliraju na lučenje gonadotropnih hormona. Hipofiza je mali neparni organ smješten u hipofiznoj jami, ima vlastiti portalni krvotok, a sastoji se od dva dijela koja su embrionalno različitog porijekla i imaju odvojene funkcije, a to su neurohipofiza i adenohipofiza. Adenohipofiza se sastoji od 3 režnja. Prednji režanj hipofize luči hormon rasta, adrenokortikotropni hormon, tireostimulirajući hormon zatim prolaktin, folikulostimulirajući hormon (FSH) i luteinizirajući hormon (LH) koji su nam važan dio neurohormonalne regulacije ciklusa. Neurohipofiza pohranjuje i otpušta hormone (adiuretin i oksitocin) koji se stvaraju u neurosekretornim stanicama, dolaze u obliku zrnaca neurosekreta i provode se duž aksona neurosekretornih stanica te se otpuštaju prema potrebi u neurohipofiznu kapilarnu mrežu (KONIG i LIEBICH, 2005.). Hipotalamus i hipofiza kreiraju sustav povratne sprege na način da sam hormon svojom koncentracijom povratno regulira i svoje izlučivanje, lučenje tih hormona se odvija pulzatorno, odnosno u obliku valova.

GnRH stimulira izlučivanje gonadotropnih hormona, FSH i LH koji djeluju na jajnike. LH se veže na receptore koji se nalaze u unutarnjoj folikularnoj teki (*theca folliculi interna*), a FSH na receptore u granulosa stanicama folikula. Djelovanjem FSH dolazi do rasta folikula do

zrelog, tercijalnog folikula koji se naziva Graafov folikul. Folikuli luče estrogen koji je odgovoran za vanjske znakove tjeranja. Rastom folikula podiže se razina estrogena čija koncentracija padne neposredno pred ovulaciju što uzrokuje pulsatorni LH val nakon čega dolazi do ovulacije. U vrijeme lutealne faze, velike i male lutealne stanice luče progesteron koji negativnom povratnom spregom djeluje na hipotalamus i hipofizu kako ne bi došlo do razgradnje žutog tijela (CL - *corpus luteum*). Kod kuja se javlja luteinizacija folikula i prije same ovulacije (TSUTSUI i sur., 2009.).

## **2.2. Pubertet**

Prvi estrus kod kuja ovisi o pasmini, odnosno veličini životinje. Estrus se javlja prosječno u dobi od 9 mjeseci sa rasponom od 6 mjeseci pa 2 godine. Početak puberteta se povezuje s masom kuje i mužjaka, odnosno ulaze u pubertet kada dosegnu 80% odrasle težine. Ženske životinje se za razliku od muških rađaju sa određenim brojem jajnih stanica, a kako mali broj jajnih stanica zapravo ovulira tijekom svakog estrusa, nije jednaka potreba za mitotičkih diobama spolnih stanica kao kod mužjaka kod kojih se diobe konstantno odvijaju (spermatogeneza). Shodno tome, spolne stanice kuje prestaju se dijeliti kada dođu do faze primordijalnih folikula (oogonije), oognije se zatim dijele te bivaju zakočene u prvoj mejotskoj diobi unutar primordijalnog folikula (TSUTSUI i sur., 2009.). Kuja uđe u prvi estrus tek tada su zadovoljeni uvjeti za nastavak odnosno regrutaciju primordijalnih folikula u rastuće, primarne, sekundarne i tercijarne folikule sa svakim sljedećim estrusom.

## **2.3. Spolni ciklus**

Spolni ciklus kuje započinje nakon spolnog sazrijevanja u dobi od 6 do 24 mjeseci starosti. Kuja je monoestrična životinja te se ciklus javlja u bilo koje doba godine. Faze ciklusa su proestrus koji traje 10 dana (1-27), estrus koji traje 10 dana (4-24) te predstavljaju folikularnu fazu ciklusa, a diestrus predstavljaja lutealnu fazu koja traje 60 dana nakon čega slijedi anestrus koji traje 4 do 5 mjeseci (TSUTSUI i sur., 2009.).

### **2.3.1. Anestrus**

Anestrus je period od kraja lutealne faze do početka proestrusa. U tom periodu hormoni su na bazalnoj vrijednosti. Dolazi do pada progesterona, a ukoliko je kuja bila gravidna, rana faza anestrusa obuhvaća laktaciju i djelovanje hormona prolaktina, a sam anestrus je tada produžen te kuja neće biti u proestrusu ni estrusu dok doji mladunčad.

Anestrus traje minimalno 7 tjedana, a prosječno 18-20 tjedana. Spolni organi tada miruju te su podložniji ozljedama uslijed grube manipulacije kod ginekološkog pregleda. Folikule na jajnicima ultrazvučno možemo vidjeti 60 dana prije slijedeće ovulacije, a povišene koncentracije estrogena možemo zabilježiti otprilike 10-20 dana prije početka proestrusa (TSUTSUI i sur., 2009.).

### **2.3.2. Proestrus**

Proestrus predstavlja početak folikularne faze spolnog ciklusa kuje djelovanjem FSH i LH koji stimuliraju rast folikula, granulosa stanice folikula luče estrogen koji uzrokuje vaskularizaciju i edem vanjskih i unutarnjih spolnih organa, povećava aktivnost žlijezda, a unutar same maternice kapilare su propustljive te dolazi do prolaska krvi i plasma stanica u lumen maternice. Također dolazi do promjene u ponašanju kuje, privlače mužjake, označavaju, ali ne dozvoljavaju parenje.

Na svakom jajniku rastu 2 do 8 folikula, a izbočiti će se na površini jajnika 10 dana prije ovulacije kada su veličine 4 mm. Neposredno prije predovulatornog LH vala dosegnu veličinu od 6 do 9 mm. Povišene koncentracije LH i FSH su važne za stimuliranje rasta folikula, ali folikuli luče hormon inhibin koji je selektivni inhibitor sekrecije FSH što uzrokuje pad FSH pred kraj proestrusa. FSH ima važnu ulogu u sazrijevanju folikula i pretvorbni stanica u lutealne nakon ovulacije (TSUTSUI i sur., 2009.).

### **2.3.3. Estrus**

Estrus predstavlja fazu kada dolazi do značajnih promjena u ponašanju kuje. Kuja na početku estrusa dopušta parenje a na kraju najčešće ne dozvoljava naskakivanje. Karakterizira ga porast koncentracije estrogena čija koncentracija počinje padati prije ovulacije. Djelovanjem estrogena folikuli narastu od 9 do 12 mm, a obično dosegnu svoju maksimalnu veličinu između LH vala i ovulacije. Porastom koncentracije estrogena dolazi do inhibicije sekrecije LH i FSH zbog negativne povratne sprege estradiola i inhibina. Koncentracija estrogena značajno pada i nakon 24 sata dolazi do predovulatornog LH vala. Vrhunac koncentracije LH se događa 48 do 60 sati prije same ovulacije paralelno sa porastom koncentracije progesterona koji se počinje lokalno lučiti. Interesantno je da je za promjenu ponašanja kod kuje odgovoran estrogen čija koncentracija krajem estrusa pada, a u vrijeme kada kuja dozvoljava parenje. U tom periodu dolazi do smanjivanja vaginalnog iscjetka, stidnica je edematozna i naborana uslijed pada koncentracije estrogena ali i porasta koncentracije progesterona. Navedene promjene pomažu

kod procjene idealnog vremena za osjemenjivanje kuje. Pojedine kuje će još uvijek dozvoljavati parenje u ranoj lutealnoj fazi (TSUTSUI i sur., 2009.).

Osim specifičnog spolnog ciklusa, kuja ima multiple ovulacije od kojih se većina događa 48 do 60 sati nakon LH vala, ali folikuli mogu ovulirati čak i 96 sati nakon LH vala. Kuja ovulira nezrele jajne stanice (primarne oocite) zakočene u metafazi I prve mejotičke diobe te kao takve ne mogu biti odmah oplodene. Oplodnja se može dogoditi tek kada dođe do odbacivanja prvog polarnog tjelešca nakon čega je prva mejotička dioba završena i formirana je sekundarna oocita. Navedeno sazrijevanje jajne stanice se događa u distalnom dijelu jajovoda i traje 48-60 sati, a jajne stanice podliježu degeneraciji 9 do 10 dana nakon ovulacije (ENGLAND, 2010.).

#### **2.3.4. Diestrus**

Diestrus predstavlja lutealnu fazu spolnog ciklusa kuje. Ostale domaće životinje svega nekoliko sati nakon ovulacije prestaju pokazivati seksualno ponašanje odnosno ne dozvoljavaju parenje za razliku od kuje koja zadržava estrusno ponašanje još 7 dana nakon ovulacije. Uzrok tome je porast koncentracije progesterona prije ovulacije kao i dugi period plodnosti u trajanju od 5 dana. Jajna stanica sazrijeva 2 dana nakon ovulacije, a narednih 3 dana nakon sazrijevanja spremna je za oplodnju. Degeneracija jajnih stanica koje nisu oplodene se događa nakon 10 do 12 dana. U lutealnoj fazi razina progesterona nastavlja rasti, a glavni izvor su žuta tijela. Koncentracija progesterona ostaje visoka do 35. dana neovisno o graviditetu, a nakon toga počinje padati, a istodobno dolazi do porasta koncentracije prolaktina. LH i prolaktin imaju snažan luteotropni faktor već od drugog tjedna diestrusa, a imaju važnu luteotropnu ulogu od 25. dana (TSUTSUI i sur., 2009.).

#### **2.3.5. Sezonski monoestrične pasmine – iznimke od pravila**

Vuk, predak pasa, je sezonski monoestrična životinja. Ženka je u estrusu samo jednom godišnje od siječnja do ožujka, a mužjaci su plodni samo u tom periodu za razliku od pasa koji su plodni kroz čitavu godinu. (ORTEGA-PACHECO, 2007.) Međutim, postoje pasmine, najčešće primitivnog tipa koje su djelomično zadržale sezonsko parenje kao što su basenji, chow-chow i azawak .

U Africi, matičnoj zemlji basenjija, većina kuja je u estrusu u jesen, a smatra se da je do toga došlo kada su preci basenjija migrirali sa ljudima u prašume uslijed promjene klime i hrane. Većina basenjija koji žive na sjevernoj polutci su estrusu u rujnu i listopadu, a tek ponekad u ožujku ili travnju. Postoje genetski dokazi da je basenji nastao od vuka. Njihov predak je migrirao od istočne Azije prema Africi, također basenji dijeli genetske sekvence sa chow-chow-om, primitivne azijske pasmine koja je također najplodnija u jesen (JOHANNES, 2002.).

### 2.3.6. Određivanje optimalnog vremena za osjemenjivanje

Određivanje optimalnog vremena za osjemenjivanje može biti otežano zato jer postoje velike individualne razlike u danima kada će doći do ovulacije. Metode koje se koriste za određivanje optimalnog vremena parenja su određivanje koncentracije progesterona i LH u serumu, vaginalna citologija i vaginoskopija. (JOHNSTON i sur, 2001.)

Fiziologija rasplodivanja pasa je zahtjevna zato što kuja ovulira nezrele jajne stanice koje nisu odmah sposobne za oplodnju, nego tek 2 dana nakon ovulacije. Jednom kad su jajne stanice zrele, spremne su za oplodnju sljedeća 2 do 3 dana. Paralelno sa dugim periodom plodnosti kuje, spermiji mužjaka mogu preživjeti 7 i više dana u reproduktivnom sustavu ženke (JOHNSTON i sur, 2001.).

Određivanje koncentracije LH je vrlo pouzdana metoda za određivanje ovulacije, ali je skupa pa se u praksi ne koristi na dnevnoj bazi. Nadalje, zahtjeva svakodnevno vađenje krvi jer LH val traje kratko. Ukoliko postoje već prethodno analizirani podaci, parenje ili osjemenjivanje se treba napraviti 3 do 4 dana nakon što je zabilježen LH val (JOHNSTON i sur, 2001.)

Druga metoda koja se najčešće koristi u praksi je određivanje koncentracije progesterona čiji porast sa bazalne razine počinje 2 dana prije ovulacije. Porast koncentracije progesterona se može pratiti redovnim mjerenjem u serumu svaka dva do tri dana što nam omogućava predviđanje, a zatim i potvrdu ovulacije. Najčešća laboratorijska metoda analize je automatizirana ELFA metoda (*Enzyme-linked Fluorescence Assay*) koja daje precizan rezultat izražen u ng/mL. Koncentracija progesterona može isto tako biti izražena u nmol/L (1ng/mL = 3.17 nmol/L). Koncentracija progesterona u vrijeme LH vala (36 do 48 sati prije ovulacije) je 1.5 do 2.5 ng/mL i 5 do 8ng/mL u vrijeme ovulacije. Koncentracija progesterona nakon završetak ovulacije iznosi 10 do 25 ng/mL (ENGLAND, 2010.).

Vaginalna citologija je metoda koja se često primjenjuje u praksi zbog toga što je jednostavna, jeftina i brza, ali nedovoljno precizna u određivanju optimalnog vremena parenja. Danas se više smatra orijentacijskom metodom. Porast razine estrogena na početku ciklusa uzrokuje edem vagine kao prirodnu zaštitu od ozljeda prilikom parenja, prije svega uzrokuje porast broja stanica (ENGLAND, 2010.). Priprema mikroskopskog preparata vrlo je jednostavna i izvodi se na način da se vaginalni obrisak osuši na predmetnici nakon uzimanja, a zatim oboji metodom po Giemsi i promatra pod mikroskopom. Ako je kuja u anestrusu, uočavaju se parabazalne i male intermedijarne stanice i pokoji leukocit. Na početku proestrusa uočava se prisutnost parabazalnih i velikih intermedijarnih stanica s jezgrom i eritrociti. Tijekom estrusa su prisutne superficijalne stanice bez jezgre (>75%), mali broj eritrocita, a neutrofili nisu prisutni. Kako bi ova metoda bila što pouzdanija potrebno je nekoliko puta ponoviti briseve (FOLNOŽIĆ i sur., 2009.).

Optimalno vrijeme za osjemenjivanje ohlađenim sjemenom je 48 sati nakon što je razina progesterona dosegla 5 ng/mL, što je otprilike 10-15 ng/mL, a u spolnim organima kuje, spermiji žive 48 sati dok je optimalno vrijeme za osjemenjivanje duboko smrznutim sjemenom 72 sata nakon što je razina progesterona iznad 5 ng/mL . Duboko smrznuto sjeme ima vrlo kratak biološki život od 12-24 sata, stoga je potrebno precizno odrediti razinu progesterona kod kuje (ENGLAND, 2010.).



### 3. ENDOKRINOLOGIJA RASPLOĐIVANJA MUŽJAKA

Muški reproduktivni sustav ima dvije osnovne uloge, a to su proizvodnja spermija i steroidnih hormona.

Spermatogeneza se odvija u sjemenim kanalićima (*tubuli seminiferi*) testisa koji su popločani sa slojem spermatogonija (zametne stanice) između kojih se nalaze potporne Sertolijeve stanice koje su veće i manje brojne od spermatogonija. Nakon stimulacije s FSH, Sertolijeve stanice proizvode estrogene, inhibin i androgen vezujući protein (engl. *androgen binding protein*, ABP). Između režnjića parenhima testisa nalazi se intersticij s krvnim i limfnim žilama i živcima koji je usko povezan sa Leydigovim stanicama. Leydigove stanice luče testosteron i druge androgene (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.). Spermatogonije mogu proizvoditi nekoliko milijuna spermija dnevno, dok se zametne stanice regeneriraju. Mitotičkom diobom nastaju primarni spermatociti koji ulaze u mejotičku (I) diobu, nakon koje nastaju sekundarni spermatociti koji se opet mejotički (II) dijele i nastaju spermatide. One se procesom spermiogeneze diferenciraju u stanice spermija (LOJKIĆ, 2016.).

Leydigove stanice su jedine stanice testisa koje imaju receptore za LH, koji nakon vezanja na receptore stimulira steroidogenezu, proces koji je posredovan s cikličkim adenzin fosfatom (cAMP). Androgeni hormoni su esencijalni za razvoj sekundarnih spolnih značajki, normalno ponašanje, funkciju akcesornih žlijezda, proizvodnju spermija i održavanje muškog spolnog trakta (ENGLAND, 2010.).

#### 3.1. Neurohormonalna regulacija

Sekrecija i proizvodnja hormona kod mužjaka se odvija pod utjecajem hipotalamusa i hipofize koji kreiraju sustav povratne sprege. Sekrecija gonadotropina LH i FSH je pod djelovanjem GnRH koji se luče pulzatorno, na način da GnRH stimulira otpuštanje FSH koji stimulira spermatogenezu u sjemenim kanalićima, a Sertolijeve stanice na lučenje estrogena, inhibina i ABP. Inhibin negativnom povratnom spregom djeluje na lučenje FSH. GnRH stimulira također i otpuštanje LH koji stimulira Leydigove stanice na izlučivanje testosterona i manju količinu drugih androgena kao što su androsteron i dihidrosteron (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.). Sekrecija LH je pulzirajuća, s nepravilnim epizodama otpuštanja svaka 2 do 4 sata, a koncentracije variraju tijekom dana. LH se kod mužjaka još zove i hormon

stimulacije intersticijskog tkiva (ICSH). Leydigove stanice izlučuju testosteron u pulsirajućim naletima, prateći vrhunac LH s otprilike 40 minuta zakašnjenja, a koji se vraća na normalne vrijednosti nakon 40 do 80 minuta. Poslije aromatizacije u estrogen, testosteron je odgovoran za regulaciju sekrecije LH negativnom povratnom spregom. Testosteron i 5-dihidrotosteron vežu se u lumenu sjemenih kanalića s ABP iz Sertolijevih stanica, čija je zadaća održati visoku koncentraciju androgena u lumenu sjemenih kanalića i epididimisu. Ciljne stanice FSH su Sertolijeve stanice, koje pod njegovim utjecajem izlučuju ABP, aromatiziraju testosteron u estrogen, proizvode tekućinu u sjemenim kanalićima, potiču proizvodnju inhibina (suprimira FSH) i transferina (osigurava transport željeza do zametnih stanica). Adekvatna FSH stimulacija potrebna je za održavanje Sertolijevih stanica tijekom spermatogeneze. Sertolijeve stanice predstavljaju barijeru krv-testis, čime su napredne stanice spermatogeneze zaštićene od tvari koje dolaze iz krvi, uključujući i imunološku zaštitu. Budući da su spermatoцитe barijerom krv-testis lišene opskrbe krvlju, one ovise o Sertolijevim stanicama pa možemo reći da Sertolijeve stanice imaju potpunu, zaštitnu i nutritivnu funkciju u razvoju spermija. Osim toga, Sertolijeve stanice fagocitiraju višak citoplazme koje spermatoцитe odbacuju kao rezidualno tjelešće (LOJKIĆ, 2016.). Usljed ovakvog načina kontrole lučenja hormona, kod mužjaka možemo lako testirati sustav povratne sprege hipotalamus-hipofiza. Primjerice, ako hipotalamus ne luči dovoljno GnRH biti će smanjeno lučenje i FSH, LH i testosterona, a ukoliko hipofiza ne funkcionira, koncentracije GnRH će biti visoke, a niske koncentracije FSH, LH i testosterona. U slučaju da postoji patološki proces na testisima ili ukoliko je mužjak kastrat, koncentracija GnRH, LH i FSH biti će povišene, a koncentracija testosterona će biti smanjena ili u potpunosti odsutna.

### **3.2. Pubertet**

Ulazak mužjaka u pubertet ovisan je o pasmini. Male pasmine sazrijevaju ranije od velikih i gigantskih pasmina. Leydigove stanice sazrijevaju s otprilike 5 mjeseci starosti, od kada se povisuju koncentracije testosterona u krvi. Spermije se može naći već sa 6-7 mjeseci u sjemenim kanalićima, a mužjaci obično ulaze u pubertet u prosjeku s 10-12 mjeseci kada mogu ejakulirati normalne spermije. Mužjaci ulaze u pubertet kasnije nego ženke. Koncentracija spermija u ejakulatu raste u sljedećih nekoliko mjeseci i doseže vrhunac s otprilike 2 godine (ENGLAND, 2010.).

### 3.3. Polučivanje i pregled ejakulata

Uzimanje ejakulata i njegova pretraga sastavni je dio pregledna rasplodnih pasa, s obzirom da kvaliteta ejakulata izravno utječe na reproduktivni potencijal pasa. Sjeme se uzima neposredno nakon kliničkog i ultrazvučnog pregleda tehnikom manualne fiksacije penisa, uz ili bez prisutnosti kuje (ENGLAND, 1999.). Uzimanje ejakulata u prisustvu kuje je uspješnije, jer se povećava hormonalna sekrecija u očekivanju parenja (PURSWELL i sur., 2010.). Ejakulat se uzima u stabilnom stojećem položaju psa, s lijeve strane (SEAGER, 1986., JOHNSTON i sur., 2001., FRESHMAN, 2002.). Uzimanje ejakulata započinje masiranjem bulbosa penisa preko prepucija. Kada je došlo do djelomične erekcije penisa i bulbosa glandisa, prepucij se povuče natrag preko bulbosa kako psu ne bi uzrokovali bol, prije postizanja pune erekcije, što također oponaša prirodno parenje pasa. Pritiskom na penis, naročito na području neposredno iznad bulbosa pojača se erekcija i pas poslije nekoliko koitalnih pokreta počne ejakulirati (BLENDINGER, 2007.). Prilikom koitalnih pokreta važno je spermohvatač držati podalje od mužjaka kako bi se izbjegle ozljede penisa (LINDE-FORSBERG, 1995.). Čvrstim pritiskom iza bulbosa glandisa omogućen je nastavak ejakulacije. Psi ejakuliraju u 3 frakcije od kojih je druga bogata spermom, fiziološki mliječno bijele boje. Volumen psećeg ejakulata ovisi o veličini psa, a psi srednje veličine mogu ejakulirati i oko 40 mL. Prva frakcija je obično volumena 0.5-2 mL i gotovo da ne sadrži spermije, druga spermom bogata frakcija je volumena 0.5-3 mL, dok je treća frakcija volumena 5-35 mL, podrijetlom je iz prostate te može biti dobar pokazatelj patoloških promjena na prostati. Nakon prestanka ejakulacije i detumescencije, psima se obavezno pregleda prepucij kako bi bili sigurni da se penis adekvatno vratio u svoj položaj unutar prepucija.

Kod procjene kvalitete sjemena treba uzeti u obzir starost psa jer psi starije životne dobi uslijed staračke atrofije testisa kao i suviše mladi psi proizvode veći postotak morfološki abnormalnih spermija (HESSER i sur., 2017.).

Standardna ocjena sjemena uključuju makroskopsku (volumen, boja, pH) i mikroskopsku ocjenu sjemena (broj živih spermija u ejakulatu, pokretljivost, morfologija i ocjena integriteta membrane spermija) te određivanje koncentracije spermija u ejakulatu (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.). Normalno sjeme psa volumena je 1 do 30 mL, ovisno o pasmini, te sadrži 300 milijuna do 2 milijarde spermija, od kojih je više od 70% morfološki normalnih i progresivno pokretljivih (JOHNSTON, 1991., AROKIA ROBERT i sur., 2016.).

Progresivna pokretljivost predstavlja jedan od najvažnijih parametara ocjene sjemena povezanih s oplodnim potencijalom spermija jer pokazuje vitalnost i strukturni integritet

spermija (MURPHY i sur., 2018.). Zato procjena pokretljivosti spermija predstavlja nezaobilazni dio ocjene ejakulata. Prilikom ocjene pokretljivosti utvrđuje se ukupan postotak pokretljivih spermija, postotak progresivne pokretljivosti te brzina kretanja spermija. Ocjena sjemena tradicionalno se u laboratorijima obavlja manualno. Zadnjih je godina sve popularnija računalno potpomognuta analiza spermija (engl. *computer assisted sperm analysis*, CASA) (AMAN i WABERSKI, 2014.). Kod pasa i mačaka računalno potpomognuta analiza spermija izvorno je opisana prije 20 godina (GUNZEL-APEL i sur., 1993.). CASA sustavi nude točnu, brzu, objektivnu i istodobnu procjenu različitih parametara sjemena koji omogućuju vizualizaciju suptilnih promjena karakteristika spermija, što se ne može prepoznati konvencionalnom analizom. Pokretljivost je u pozitivnoj korelaciji s integritetom membrane spermija i normalnom morfologijom (JOHNSTON i sur., 2001.). Integritet membrane procjenjuje se testom hipoosmotskog bubrenja (HOS test), gdje se spermiji izlažu hipoosmotskoj otopini. Spermiji s intaktnom membranom bubre zbog priljeva tekućine u stanicu pa dolazi do savijanja njihova repa (SILVA i GADELLA, 2006., MOCÉ i GRAHAM, 2008., ZELLI i sur., 2013.), što je vidljivo pod mikroskopom. Integritet membrane moguće je utvrditi supravitalnim bojenjem po Bloom-u, koje se temelji se na činjenici da mrtvi spermiji imaju oštećenu staničnu membranu koja propušta eozin. Prema tome, postotak eozin pozitivnih spermija smatra se postotkom mrtvih spermija (DOBRANIĆ i sur., 2005.).

Pregled morfologije spermija jedna je od najčešće korištenih metoda u analizi sjemena, a zahtjeva stručnost i iskustvo u prepoznavanju anomalija spermija. Najčešće korištena metoda je eozin-nigrozin test te bojanje po Giemsi (KRUGER i sur., 1987.), dok Spermac<sup>®</sup> omogućuje dobru vizualizaciju akrosomske membrane (GOERICKE-PESCH i FAILING, 2013.).

Postoji nekoliko sustava za kategorizaciju morfoloških abnormalnosti spermija kao što su primarne nepravilnosti koje nastaju tijekom spermatogeneze i spermiogeneze, a uzrokovane su patološkim procesima u sjemenim kanalicima testisa te sekundarne nepravilnosti koje nastaju posttestikularno, radi abnormalne funkcije epididimisa ili nakon ejakulacije zbog nepropisnog rukovanja sa ejakulatom (KOLSTER, 2018.). Patološki oblici spermija obuhvaćaju gigantske spermije s velikom glavom, mikrospermije sitne glave, višeglave spermije te ostale deformacije glave (osmica, polumjesec, okrugla ili šiljasta glava, kratka i široka, preuska, premalena, prevelika, normalna otpala glava), promjene na srednjem dijelu (spiralno oštećenje, protoplazmatska kapljica), promjene na repu (dvostruki repovi, savijeni, prekinuti, zavrnuti rep, prekratki itd.) i promjene na lipoproteinskoj ovojnici ili akrosomi (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.). Drugi sustav klasificira abnormalnosti u značajne, koje

uzrokuju neplodnost, te manje značajne za koje se pretpostavlja da ne utječu na plodnost (BARTH i OKO, 1989.).

### 3.4. Tehnike umjetnog osjemenjivanja

Umjetno osjemenjivanje (UO) je postupak kojim se na umjetan način unosi sjeme psa u spolne organe kuje. Osim osjemenjivanja sa svježim sjemenom, koristi se još rashlađeno i duboko smrznuto pseće sjeme.

Umjetno osjemenjivanje sa svježe uzetim sjemenom od mužjaka obavlja se odmah nakon polučivanja. Preporuča se, prije korištenja mužjaka, napraviti ocjenu ejakulata, a također se može utvrditi je li sjeme dovoljno dobro za rashlađivanje i duboko smrzavanje. Mužjaka se isto može testirati na spolno prenosive bolesti. Osjemenjivanje se izvodi kada je koncentracija progesterona iznad 5 ng/mL. Prednost osjemenjivanja sa svježim sjemenom je što kvalitetno sjeme psa živi četiri do sedam dana u spolnim organima kuje pa ju možemo osjemeniti i prije nego što je jajna stanica u potpunosti zrela, za razliku od rashlađenog (kod kojeg sjeme živi do 48 sati) i zamrznutog (kada sjeme preživljava svega 12-24 sata). Sjeme se aplicira u rođnicu, uz pomoć katetera i brizgalice.

Umjetno osjemenjivanje s rashlađenim sjemenom najčešće se koristi kod velike udaljenosti mužjaka i kuje. Veterinar uzima sjeme, procjenjuje kvalitetu, razrjeđuje ga zaštitnim ekstenderom i hladi ga na 4 °C. Razrjeđivači čuvaju plodnost spermija, štite ih od toksina, temperaturnog i osmotskog šoka. Plodnost ohlađenog sjemena osigurana je kroz 5-10 dana, a kuja se osjemenjuje 48 h nakon potvrđene ovulacije (LOJKIĆ i sur., 2015.).

Umjetno osjemenjivanje duboko smrznutim sjemenom. Polučeno i pregledano sjeme smrzava se na -196 °C i drži u kontejnerima s tekućim dušikom. Za transport smrznutog sjemena koriste se tzv. *dry shipperi*, koji omogućuju preživljavanje spermija tijekom dugotrajnog transporta (LINDE FORSBERG, 1995.). Jednokratni *dry shipperi* koriste se za kraće relacije (do maksimalno 4 dana transporta), a višekratni kada put od mužjaka do kuje traje dulje, npr. Australija, Novi Zeland. Duboko smrznuto sjeme ima vrlo kratak biološki život od 12-24 sata, stoga je potrebno precizno odrediti razinu progesterona kod kuje. Kuju osjemenjujemo s prethodno zagrijanim sjemenom na 37°C, 72 sata nakon što je razina progesterona iznad 10 ng/mL.

Sjeme se može polagati transvaginalno ili intrauterino, transcervikalno ili kirurški.

Transvaginalna inseminacija je jednostavna, koristi se jednostavan plastični kateter i brizgalica. Kateter, koji mora biti dovoljno dugačak s obzirom na veličinu kuje, se aplicira kroz vaginu do paracerviksa, pri čemu treba paziti na ulaz u uretru, gdje se sjeme aplicira. Prilikom osjemenjivanja može se koristiti balon kateter koji ima dio koji se napuhuje i zadaća mu je da oponaša bulbus penisa kod erekcije i sprječava povrat sjemena (FARSTAD, 2010.). U istu svrhu može se primijeniti i *Foley* kateter koji je fleksibilan, s balonom za napuhavanje na distalnom dijelu te je dostupan u različitim veličinama (MANSON, 2018.). Vaginalno osjemenjivanje prikladno je za svježe ili svježe ohlađeno sjeme, ali ne i za duboko smrznuto sjeme (LINDE-FORSBERG i sur., 1999.).

Polaganje sjemena intrauterino se koristi kada kvaliteta svježeg sjemena nije dovoljno dobra, zatim kod osjemenjivanja s duboko smrznutim sjemenom zbog skraćenog života i smanjene pokretljivosti spermija te kod osjemenjivanja s ohlađenim sjemenom (LINDE-FORSBERG, 1995.).

Nekirurške metode osjemenjivanja su korištenje skandinavskog katetera i endoskopsko osjemenjivanje uz pomoć kamere za bolju vidljivost. Norveška metoda u ranim sedamdesetima prošlog stoljeća početno se koristila za osjemenjivanje lisica, a kasnije je prilagođena za kuje. Norveški kateter se sastoji od nehrđajućeg čelika i zaštitne navlake za navođenje koja služi kao zaštita unutarnjih organa kuje. Cerviks se fiksira palpacijom preko abdomena, a sjeme se nakon prolaska cerviksa aplicira u maternicu. Nedostatak ove metode je što nema vizualizacije na ekranu kao što je to kod endoskopskog osjemenjivanja.

Kod endoskopskog osjemenjivanja sjeme se unosi pod kontrolom kamere, a koristi se fleksibilni kateter koji se stavi unutar endoskopa. Ova metoda zahtjeva skupu opremu i dobro obučeni stručnjaci. Za potrebe endoskopskog osjemenjivanja koristi se humani produženi cistoureteroskop, hladni izvor svjetla, TCI kateter, kamera i monitor (ROMAGNOLI i LOPATE, 2014.). Endoskop uvodimo kroz dorzalnu komisuru stidnih usana kako bismo izbjegli klitoris koji se nalazi unutar ventralne komisure. Karakteristični nabori potvrđuju poziciju cistoureteroskopa unutar vagine (FOLNOŽIĆ, 2009.). Ulaz u područje paracerviksa potvrđuje nam nalaz dorzalnog medijalnog nabora i polumjesečasti vaginalni lumen. Cervikalni tuberkul je posebna struktura na kranijalnom dijelu dorzalnog medijalnog nabora, odvojena od njega s transverzalnim naborom. Cervikalna os nije odmah uočljiva zbog njezinog ventralnog položaja (FOLNOŽIĆ, 2009.). Endoskop na ovoj poziciji treba okrenuti za 40-60 ° prema gore u odnosu na horizontalnu liniju. Ponekad olakšava pronalazak cervikalne osi da se prati izlazak krvavog iscjetka ili zračnih mjehurića iz nje. Jednom kad je lociran, vrh katetera uvodimo u os cerviksa

zajedničkom manipulacijom cistouretruskopa i katetera (FOLNOŽIĆ, 2009.). Sjeme se polako aplicira kroz kateter prateći istjecanje iz cervikalne osi uz masažu stidnice kako bi se potaknule kontrakcije maternice (MANSON, 2018.). Kuja u estrusu, koja pokazuje uobičajeno ponašanje odlično podnosi zahvat, bez potrebe za sedacijom (WILSON, 2003., FOLNOŽIĆ, 2009.).

Kirurško osjemenjivanje korisno je zbog mogućnosti da operater pregleda maternicu i isključi patološke promjene poput endometrijskih cista, tonusa miometrija, i debljine stjenke (VERSTEGEN i sur., 2008.). Kirurška metoda trebala bi se uzimati kao izbor kod starijih životinja, slabije plodnih kuja, u slučajevima gdje se sumnja na patološke promjene na maternici ili kod kuja koje treba osjemeniti s malom dozom sjemena ili sjemenom slabije kvalitete (MAKLOSKI, 2012.). Kirurško osjemenjivanje može se učiniti klasičnom ili laparoskopskom metodom. Klasično kirurško osjemenjivanje je česta tehnika, jer je mjesto reza maleno s minimalnom manipulacijom, a pas se nakon nekoliko sati otpušta kući. Kuju za ovaj postupak treba uvesti u opću anesteziju, smjestiti na leđa te se u bijeloj liniji dužinom oko 3 cm učini rez. Maternica i maternični rogovi se izoliraju te se postavi sterilni hipodermalni kateter na materničnom tijelu ili na oba maternična roga. Nakon toga se aplicira sjeme kroz postavljeni kateter u maternicu, a maternica se pritisne iznad cerviksa palcem i kažiprstom da se spriječi istjecanje prema rodnici (MANSON, 2018.). Trbušna stjenka i koža se rekonstruira i životinja se budi iz anestezije te nakon oporavka otpušta kući (BRITTAIN i sur., 1995., MAKLOSKI, 2012.). Laparoskopsko osjemenjivanje kao minimalno invazivni postupak opisuje se kao poželjna metoda, ali zbog skupe opreme, potrebne dodatne edukacije i više cijene zahvata nešto je slabije bila zastupljena. Nadalje, oprema se brzo nadograđuje te se u posljednje vrijeme na tržištu pojavljuju novi proizvođači i oprema postaje dostupnija. Očekuje se veća zastupljenost laparoskopске metode u narednim godinama (KARADJOLE i sur., 2015.).

#### 4. POČETCI HETEROSPERMIČNOG OSJEMENJIVANJA U PASA

U Japanu, znanstvenici Toshihiko Tsuitsui i Hiroyasu Ejima 1987. godine su izveli eksperimentalnu indukciju superfekundacije u pasa što je zapravo prvo zabilježeno heterospermično osjemenjivanje kuja. Superfekundacija (lat.) je oplodnja dvaju ili više jajašaca iz istog spolnog ciklusa spermijima koji potječu od dva ili više koitusa, česta je u glodavaca, a u čovjeka vrlo rijetka. Prema istraživanju u Americi, postotak djece odnosno dvojajčanih blizanaca porijeklom od dva različita oca je iznimno rijetko kod čovjeka (WENK i sur., 1992.). Do sada je zabilježeno svega 24 takva slučaja u cijelom svijetu, ali bi se broj heteropaternalnih blizanaca mogao povećati u budućnosti iz nekoliko razloga. Prvo, istovremena povećana frekvencija partnera i povećan postotak koitusa (za koje se vjeruje da potiču sekundarne ovulacije) (JAMES, 1984., FORREST i SINGH, 1990.). Drugo, upotreba lijekova za plodnost povećala je učestalost kojim se oslobađa više jajnih stanica. Treće, doniranje spolnih stanica može povećati broj višestrukih, heteropaternalnih gestacija. Do danas su se u američkom laboratoriju (Rh Typing Laboratory, Baltimore, Maryland, USA) susreli sa tri slučaja heteropaternalnih blizanaca u 39 000 slučajeva dokazivanja očinstva (WENK i sur, 1992.).

TSUITSUI i EJIMA (1987.) laparotomijom su prosuđivali veličinu i broj folikula i žutih tijela, a u istraživanju su koristili 11 kuja biglova i 7 kuja križanaca, 2 mužjaka bigla i 2 mužjaka križanaca. Svaka kuja je parena 2 puta, prvi put po protokolu 36 ili 48 sati nakon početka estrusa, a drugi put 24 do 96 sati nakon prvog, što je rezultiralo parenjem 12, 24, 36, 48, 60, 72 ili 84 sati nakon ovulacije. Od sveukupno 21 legla, 7 legala je rezultiralo dvostrukim očinstvom, a dokazivanje očinstva se radilo na temelju krvnih grupa, veličine štenaca i tipa dlake. Utvrđeno je da će leglo imati sličan broj štenaca od oba oca ukoliko se osjemenjivanje radi najkasnije 48h nakon ovulacije.

Američki kinološki savez je prvi implementirao registraciju štenaca koji su ošteñeni u istom leglu od dva različita oca još 1998. godine. Naime, ponekad su se događala slučajna i neplanirana legla unutar uzgajivačnica od potencijalna dva oca, pa kako bi se izbjegle prijeverne radnje s rodovnicama, dozvoljeno je genetsko testiranje i registracija takvih štenaca. Ovakav način uzgoja ima brojne koristi, kao što je veća genetsku raznolikost od visoko vrijedne kuje, a posebno kratkoživućih pasmina, bez pretjeranog iskorištavanja same kuje. U Americi ovakva



legla čine oko 1% ukupno registriranih legala. (izvor: <https://www.akc.org/expert-advice/dog-breeding/stud-double/>).

Nakon Amerike ovu metodu uzgoja je prihvatila Skandinavija, te Hrvatska krajem 2017.godine.

Princip heterospermičnog osjemenjivanja zasniva se na kompeticijskim osobinama spermija od dva ili više mužjaka. Posljednja tri desetljeća svjedočimo o razvoju teorije o kompeticiji sperme, što znači da se javlja kada spermiji iz više od jednog mužjaka imaju priliku oploditi jajne stanice jedne ženke tijekom istog spolnog ciklusa (PARKER, 1970., 1998.), odnosno kada se nekoliko mužjaka pari ili osjemenjuje s jednom ženkom. U ovakvim situacijama, mužjak koji može proizvesti najviše i najkvalitetnije spermije ima prednost u odnosu na svoje suparnike i nekoliko studija pokazalo je da veći testisi imaju veći kapacitet proizvodnje spermija što je osobina vrsta koje pokazuju sustave parenja sa više mužjaka (HARCOURT i sur, 1981.). Socijalna dominacija, odnosno hijerarhija u čoporu je također važna u takvim sustavima parenja. Osim toga, dob, tjelesna masa i razlike u ponašanju utječu na relativni broj spermija koje proizvode mužjaci (HARCOURT i sur, 1981.).

Eksperimentalna heterospermična osjemenjivanja sa spermijima bika, kunića i nerasta, gdje se jednak broj spermija od dva ili više mužjaka miješaju i osjemenjuju u jednakim omjerima, pokazala su da spermiji pojedinih mužjaka mogu biti poredani po redoslijedu učinkovitosti oplodnje (BEATTY i sur., 1969., STEWART i sur., 1974., PARRISH i FOOTE, 1985., BERGER i sur., 1996.). Takva zapažanja snažno ukazuju da neki aspekti kvalitete ejakulata sami po sebi određuju uspjeh oplodnje ili neki spermiji posjeduju „prednost oplodnje“ nad drugima (BIRKHEAD i PIZZARI, 2002.).

Razvijeno je nekoliko hipoteza koje objašnjavaju evolucijske koristi koje ženke imaju kod parenja s više različitih mužjaka u jednom ciklusu parenja (ZEH i ZEH, 2001.) i kompeticije spermija (KELLER i REEVE, 1995.). Neki autori smatraju da ženke mogu procijeniti genetsku kvalitetu spermija različitih mužjaka i odabrati one ("dobre" spermije ili "dobre" gene) koji potencijalno daju genetske koristi svom potomstvu (YASUI, 1997.). Drugi su istaknuli da bi ženke mogle 'birati' spermije s imunološki kompatibilnim karakteristikama (ZEH i ZEH, 2001.), možda na temelju glavnog antigena histokompatibilnosti. Za vrste kod kojih do oplodnje dolazi unutar reproduktivnog sustava, ove i druge hipoteze sugeriraju postojanje suptilnih, ali učinkovitih mehanizama za odabir spermija u ženskom reproduktivnom traktu. Jezgra s kompletnim genetskim materijalom koja se nalazi u glavi spermija je vrlo

nepristupačna i nevjerojatno je zaključiti da postoji mehanizam za skeniranje DNK koji omogućava ženki da bira između mužjaka ili između različitih spermija (HOLT i FAZELI, 2004.).

## 5. DOKAZIVANJE OČINSTVA

Dokazivanje očinstva, individualna identifikacija (DNA profil) i istraga forenzičkih slučajeva može se dokazati pomoću lokusa kratkog tandemskog ponavljanja (engl. *short tandem repeats*, STR). Lokusi kratkog tandemskog ponavljanja (STR) ili mikrosateliti su markeri koji se sastoje od tandemski ponavljajućih sekvenci duljine od dva do sedam osnovnih parova. Aleli STR lokusa razlikuju se prema broju puta, a dani motiv sekvence se ponavlja. STR aleli su otkriveni pomoću lančane reakcije polimerazom (PCR) i odvajanjem pomoću elektroforeze (DAYTON, 2009.). Zbog njihove visoke razine polimorfizma i mendelovskog nasljeđa, mikrosateliti su postali markeri izbora za testiranje roditeljstva i individualnu identifikaciju. Upotreba STR za karakterizaciju bioloških dokaza pasa postala je uobičajena koristi se i u forenzičkim slučajevima (OGDEN, 2012.). Mikrosateliti su slični kod bliskih srodnika, ali su različiti u cijeloj populaciji neke pasmine i vjerojatnost da su isti kod dvije slučajno odabrane jedinke je izuzetno mala. Za DNK profile koristi se Thermo Scientific Canine Genotypes Panel 1.1 i on obuhvaća 19 takvih mikrosatelitnih lokusa koji se zovu redom: AHTk211, CXX279, REN169O18, INU055, REN54P11, INRA21, AHT137, REN169D01, AHTTh260, AHT253, INU005, INU030, Amelogenin, FH2848, AHT121, FH2054, REN162C04, AHTTh171 i REN247M23. Ti su markeri uključeni u „glavni panel“ lokusa, a preporučeni su od ISAG-a (DAYTON, 2009., KANTHASWAMY, 2009., OGDEN, 2012.).

## 6. MATERIJALI I METODE

Fakultetsko vijeće Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu temeljem članka 40. Statuta Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, na prijedlog Povjerenstva za etiku u veterinarstvu, na 6. redovitoj sjednici održanoj 18. ožujka 2020. godine donijelo je odluku da se odobrava provođenje ovog istraživanja (klasa 640-01/20-17/32, ur. broj 251-61-01/139-20-33).

### 6.1. Dizajn istraživanja i postupak sa životinjama

Istraživanje je provedeno u razdoblju od 2 godine na 2 spolno zrele ženke u dobi od 3 do 5 godina i 5 spolno zrelih mužjaka u dobi od 1 do 5 godina, s ukupno 3 ošteњena legla. Jedna ženka je prije istraživanja već imala leglo, dok druga do tada nije bila korištena u uzgoju. Dva mužjaka su dokazane plodnosti, a preostala tri nikada prije nisu parili. Psi koji su uključeni u istraživanje su reprezentativni predstavnici svoje pasmine i svi posjeduju DNK profil prema ISAG standardu koji je napravljen prije istraživanja radi dokazivanja očinstva. Za jedno osjemenjivanje, uzorci sjemena pasa su uzimani u periodu od mjesec dana prije očekivanog estrusa kuja kako bi se napravila pojedinačna, a zatim i ocjena pomiješanih ejakulata 3 potencijalna parnjaka (A, B i C) kako bi odabrali dva podjednake kvalitete. Uzorci ejakulata su nakon pojedinačne evaluacije pomiješani na principu A+B, A+C i B+C, a zatim su podvrgnuti testu preživljavanja na 37 °C tijekom 5 sati te testu preživljavanja u komercijalnom razrjeđivaču na 4 °C tijekom 5 dana. Za drugo i treće osjemenjivanje odabrana su dva mužjaka prema željama vlasnika, te nije rađena prethodna ocjena pomiješanih ejakulata, već samo ocjena na dane osjemenjivanja.

Optimalno vrijeme osjemenjivanja kuja određivano je mjerenjem koncentracije progesterona (P4). Kuje su osjemenjivanje TCI metodom ili laparoskopskom inseminacijom. U svrhu dobivanja većeg uzorka heterospermičnih legala napravljena je internacionalna anketa koju su ispunili uzgajivači iz Amerike, Danske, Finske i Australije.

## **6.2. Klinički i androloški pregled muškara**

U sklopu općeg kliničkog i androloškog pregleda uzeta je detaljna reproduktivna anamneza te podatci o eventulanim bolestima. Opći klinički pregled obuhvaćao je uzimanje vrijednosti trijasa, sluznice konjunktiva, nosa i usta te palpaciju limfnih čvorova.

Androloški pregled uključivao je palpaciju i ultrazvučni pregled testisa, mjerenje volumena testisa, palpaciju i ultrazvučni pregled prostate te inspekciju penisa, skrotuma i prepucija. Prilikom palpacije skrotuma posebna se pažnja obraćala na simetričnost i veličinu testisa i repa epididimisa te na eventualne patološke promjene na testisima.

## **6.3. Uzimanje ejakulata**

U prostoriji Klinike za porodništvo i reprodukciju uzeti su uzorci ejakulata uz prethodno upoznavanje prostora. U svrhu lakšeg postizanja erekcije psi su olfaktorno stimulirani obriscima vaginalnog sekreta kuja, a ako su bile dostupne, korištene su kuje u estrusu. Ejakulat je polučan u stabilnom stojećem položaju psa, s lijeve strane (SEAGER, 1986., JOHNSTON i sur., 2001., FRESHMAN, 2002.). Uzimanje ejakulata započeto je masiranjem bulbusa penisa preko prepucija. Kada je došlo do djelomične erekcije penisa i bulbusa glandisa, prepucij je povučen natrag preko bulbusa, prije postizanja pune erekcije. Čvrstim pritiskom iza bulbusa glandisa omogućen je nastavak ejakulacije. Druga i treća frakcija skupljane su u zasebne 15 mL epruvete (Falcon™, SAD) spojene s lijevkom (MiniTube™, Njemačka). Nakon prestanka ejakulacije i detumescencije, psima je pregledan prepucij kako bi bili sigurni da se penis adekvatno vratio u svoj položaj unutar prepucija.

## **6.4. Ocjena ejakulata**

Ocjena ejakulata provedena je na drugoj, spermom bogatoj frakciji. Ejakulat je pregledan odmah nakon uzimanja, pažljivim rukovanjem, kako bi izbjegli utjecaj temperature ili predugog čekanja na rezultate. Pregled druge frakcije ejakulata obuhvaćao je standardnu ocjenu koja obuhvaća provjeru volumena, makroskopsku i mikroskopsku procjenu te određivanje koncentracije spermija u ejakulatu. Volumen druge frakcije ejakulata određen je

pomoću graduirane epruvete. Boja, konzistencija i miris procijenjeni su organoleptički. Očitavanje pH učinjeno je pomoću indikator papira na koji je stavljena kapljica sjemena.

#### **6.4.1. Ocjena pokretljivosti**

Progresivno gibanje spermija procijenjeno je subjektivno pomoću binokularnog fazno-kontrastnog mikroskopa (Olympus BX51, Tokyo, Japan) s grijanim postoljem (37 °C). Kapljica sjemena volumena 10 µL stavljena je na zagrijanu predmetnicu i prekrivena zagrijanom pokrovnicom. Uzorci su pregledani pod povećanjem 200 x (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.). Postupak ocjenjivanja pokretljivosti temelji se na procjeni prosječnog postotka progresivno pokretljivih spermija u nekoliko različitih vidnih polja. Prosudba progresivne pokretljivosti spermija izražena je u postocima (%).

#### **6.4.2. Koncentracija i ukupan broj spermija**

Koncentracija spermija u drugoj frakciji određena je elektronskim brojačem (AccuRead, IMV Technologies, Francuska). Uređaj je prije svake upotrebe kalibriran. Ejakulat se u svrhu određivanja koncentracije razrijedio tako da se u kiveti pomiješa 3960 µL 0,9%-tne otopine NaCl i 40 µL nativnog sjemena. Kiveta se zatim stavlja na očitavanje, a rezultat predstavlja broj spermija u mililitru ejakulata. Ukupan broj spermija u ejakulatu dobiven je umnoškom volumena i koncentracije ejakulata (ENGLAND, 1999.).

#### **6.4.3. Ocjena integriteta stanične membrane spermija**

Integritet stanične membrane spermija određen je testom hipoosmostskog bubrenja (HOS test). U 1 mL hipoosmotske otopine (0,73 g Na- citrata i 1,35 g fruktoze u 100 mL destilirane vode, osmolarnost 100 mOsm/kg) zagrijane na 37 °C dodano je 50 µL sjemena. Sjeme je inkubirano 30 minuta na 37 °C, nakon čega je kapljica dobro promiješanog sjemena stavljena na predmetnicu i pokrivena pokrovnicom. Brojano je 100 spermija po uzorku, a broj spermija sa zavnutim repom (spermiji s intaktnom staničnom membranom) izražen je u postocima. Za ocjenu HOS testa korišten je fazno kontrastni mikroskop (Olympus BX 51, Tokyo, Japan) i povećanje 400 x.

#### 6.4.4. Metoda supravitalnog bojenja spermija po Bloom-u

Supravitalno bojanje spermija po Bloom-u je korišteno za određivanje vitalnosti i morfologije spermija. Na zagrijanu i prethodno odmašćenu predmetnicu 70% etanolom stavljena je kap sjemena i kap eozina. Obje kapi su pomiješane, a zatim je nadodana dvostruko veća kap nigrozina i pomiješana s mješavinom sjemena i eozina. Napravljen je tanki razmaz pomoću predmetnice s brušenim rubom. Nakon sušenja na 37 °C brojano je 200 spermija pod imerzijskim povećanjem mikroskopa (1000X, Olympus CX 21, Tokyo, Japan). Spermiji su podijeljeni u dvije skupine: žive (nebojane glave) i mrtve (obojane glave), a rezultati su iskazani u postotcima.



Bijela glava – živi spermij; ljubičasta glava – mrtvi spermij; strelica- zavinuće repa

Slika 1. Vitalnost spermija po Bloom-u

#### 6.4.5. Morfologija spermija

Metoda supravitalnog bojenja omogućuje vizualizaciju glave, akrosome, središnjeg dijela i repa spermija pa je korištena u ocjeni morfologije spermija. Brojano je ukupno 200 spermija po uzorku, koristeći imerzijsko povećanje mikroskopa (1000X, Olympus CX 21, Tokyo, Japan). Patološki oblici su svrstani u kategorije ovisno o mjestu oštećenja (glava, srednji dio, rep i nezreli spermiji). Broj patološki promijenjenih spermija iskazan je u postotcima (%).

#### **6.4.6. Test preživljavanja spermija**

Nakon inicijalne ocjene, druga frakcija sjemena centrifugirana je kroz 5 minuta na 700 x g, nakon čega je uklonjen nadtalog. U talog sjemena dodan je razrjeđivač za ohlađeno sjeme do konačne koncentracije od  $200 \times 10^6$  spz/mL. Kao razrjeđivač korišten je CaniPlus Chill (Minitube, Tiefenbach, Njemačka) uz dodatak 20% žumanjka. Epruveta s razrijeđenim sjemenom stavljena je u staklenu čašu napunjenu vodom sobne temperature i sve je zajedno pohranjeno u hladnjak na 4° C kroz 5 dana (LOJKIĆ i sur., 2012.). Voda u staklenoj čaši osiguravala je postepeno hlađenje spermija kako bi se izbjegao temperaturni šok i eventualne varijacije u temperaturi tijekom razdoblja pohrane sjemena. Pokretljivost, vitalnost i integritet membrane ocjenjeni su nakon 24 (T24), 72 (T72) i 120 sati (T120), kao što je prethodno opisano.

#### **6.4.7. Klinički i ginekološki pregled kuja**

U sklopu općeg kliničkog i ginekološkog pregleda uzeta je detaljna reproduktivna anamneza te podatci o eventualnim bolestima. Opći klinički pregled obuhvaćao je uzimanje vrijednosti trijasa, sluznice konjunktiva, nosa i usta te palpaciju limfnih čvorova.

Ginekološki pregled uključivao je inspekciju vanjskih spolnih organa, ultrazvučni pregled abdomena odnosno jajnika (veličine i eventualni broj folikula) i maternice, zatim pregled unutarnjih spolnih organa spekulomom kako bi isključili eventualne patološke promjene te odgovara li faza ciklusa kliničkoj slici. Prilikom ginekološkog pregleda uzet je obrisak za vaginalnu citologiju.

#### **6.4.8. Određivanje optimalnog vremena osjemenjivanja**

Optimalno vrijeme osjemenjivanja određivano je kombinacijom dvije metode, određivanjem koncentracije progesterona u serumu i vaginalnom citologijom.

Vađenje krvi se obavljalo uvijek u jutarnjim satima u Klinici za porodništvo u reprodukciju gdje je i analizirana u laboratoriju automatiziranom ELFA metodom (*Enzyme-linked Fluorescence Assay*), koja daje precizan rezultat izražen u ng/mL. Kao početak ovulacije uzeta



je vrijednost od 4 ng/mL, a potvrda ovulacije, odnosno da je ovulacija završila i nastupio je fertilni period smatrala se vrijednost od 10-25ng/mL.

Vaginalna citologija je korištena kao orijentacijska metoda. Priprema mikroskopskog preparata se izvodila tako da se vaginalni obrisak osuši na predmetnici nakon uzimanja, a zatim oboji prema Giemsa metodi i promatra pod mikroskopom. Na početku proestrusa uočena je prisutnost velikih intermedijarnih stanica s jezgrom i eritrocita, a na kraju proestrusa su bile vidljive orožnjale i keratizirane stanice s manjim brojem eritrocita. Tijekom estrusa su bile prisutne superficijalne stanice bez jezgre (>75%). Kako bi ova metoda bila što pouzdanija obrisci su ponavljani svaka 2-3 dana paralelno s određivanjem koncentracije progesterona.

#### **6.4.9. Tehnike osjemenjivanja**

Tehnike umjetnog osjemenjivanja koje su korištene su endoskopska transcervikalna metoda (TCI) i kirurška metoda. Za potrebe endoskopskog TCI koristio se humani produženi cistoureteroskop (Karl Storz Veterinary Endoscopy – America Inc.), hladni izvor svjetla, TCI kateter (Minitube TCI kateter promjera 3, 4 i 5 Fr, dužine do 56 cm), kamera i monitor. Endoskop se uvodio kroz dorzalnu komisuru stidnih usana kako bi se izbjegao klitoris koji se nalazi unutar ventralne komisure. Karakteristični nabori potvrđuju poziciju cistoureteroskopa unutar vagine. Ulaz u područje paracerviksa potvrdio je nalaz dorzalnog medijalnog nabora i polumjesečasti vaginalni lumen. Endoskop se na ovoj poziciji okretao za 40-60 ° prema gore u odnosu na horizontalnu liniju. U visini forniksa endoskop je pomaknut kaudalno 1-2 cm kako bi se lakše vizualizirala cervikalna os. Jednom kad je locirana, vrh katetera uveden je u os zajedničkom manipulacijom cistoureteroskopa i katetera. Prethodno pomiješano sjeme od dva mužjaka se polako apliciralo kroz kateter prateći istjecanje iz cervikalne osi uz masažu stidnice kako bi se potaknule kontrakcije maternice.

Kirurška inseminacija je izvedena na način da se napravio minimalan rez s minimalnom manipulacijom. Kuja se za ovaj postupak uvela u opću anesteziju, smještena je na leđa te se u bijeloj liniji dužinom oko 3 cm učinio rez. Maternica i maternični rogovi su se izolirali te se postavio sterilni hipodermalni kateter na oba maternična roga. Nakon toga se apliciralo sjeme kroz postavljene kateter u rogove maternice, u svaki rog sjeme od jednog mužjaka, a maternica je pritisnuta iznad cerviksa palcem i kažiprstom da se spriječi istjecanje prema rodnici. Trbušna stjenka i koža se rekonstruirala i kuja se nakon što se probudila iz anestezije otpustila kući.

#### **6.4.10. Dijagnostika gravidnosti i štenjenje**

Dijagnostika gravidnosti rađena je ultrazvučnim pregledom 21. dan od osjemenjivanja. U ovom stadiju gravidnosti zametni mjehurići diferencirali su se kao različite okrugle strukture promjera 1-3 cm. Korišten je ultrazvučni uređaj SONOVET R5 (Samsung Medison, J. Koreja) s mikrokonveksnom sondom od 4 do 9 MHz-a za B-oblik (svjetlosni oblik) u realnom vremenu. Ultrazvučni uređaj postavljen je prilikom prvog pregleda te su postavke ostale neizmijenjene za sve preostale preglede koji su provedeni s 28. i 35. dana gravidnosti. Rendgenološka pretraga se radila jednom, 58. dan gravidnosti, nakon što je ultrazvučnom pretragom ustanovljeno da ženka ima samo jedno štene. Kuje su se štenile 58-60 dana nakon osjemenjivanja.

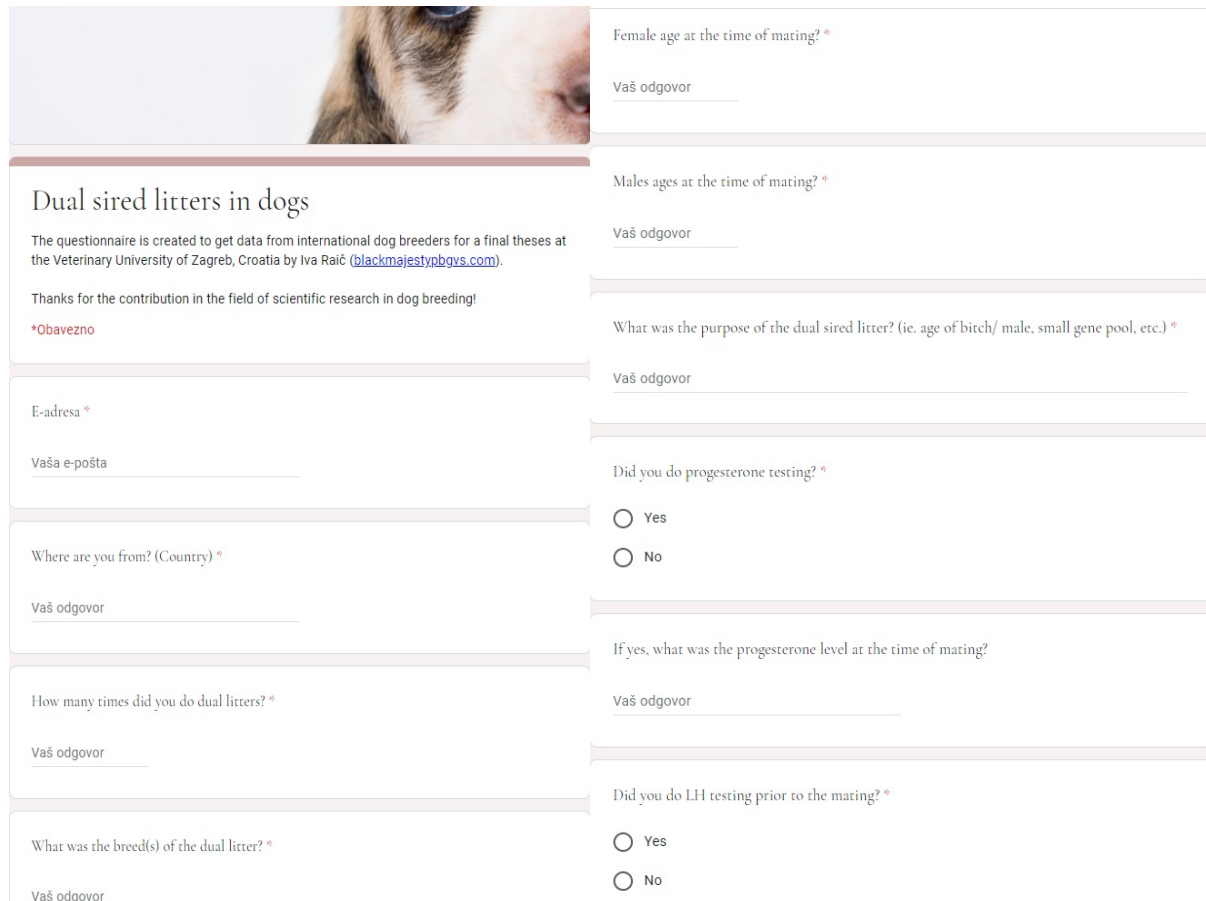
#### **6.4.11. Dokazivanje očinstva**

Za DNK profili roditelja i dokazivanje očinstva koristili smo Thermo Scientific Canine Genotypes Panel 1.1 koji obuhvaća 19 mikrosatelitnih lokusa: AHTk211, CXX279, REN169O18, INU055, REN54P11, INRA21, AHT137, REN169D01, AHTTh260, AHT253, INU005, INU030, Amelogenin, FH2848, AHT121, FH2054, REN162C04, AHTTh171 i REN247M23. Ti su markeri preporučeni su od ISAG sustava. Krv štenaca uzeta je neposredno nakon štenjenja iz umbilikalne vene ili u dobi od 5 tjedana venepunkcijom iz jugularne vene u EDTA epruvete. Uzorci su poslani u komercijalni laboratorij na analizu.

#### **6.4.12. Rezultati ankete**

Anketa je napravljena na engleskom jeziku preko mrežne usluge „Google“ korištenjem „Google obrazaca“ koji omogućavaju izradu i statističku analizu dobivenih podataka. Ciljna skupina ankete su internacionalni uzgajivači pasa koji su koristili heterospermičnu metodu osjemenjivanja/uzgoja. Anketa se sastoji od uvodnog dijela koji opisuje cilj upitnika, pristanka na korištenje dobivenih podataka, zatim 15 pitanja s odgovorima DA/NE, višestrukim odgovorima i opisnim odgovorima. Analiza dobivenih podataka napravljena je u *online* programu *Google tablica*. Pitanja sadrže informacije o državi iz koje dolaze, koliko puta su koristili ovakav način uzgoja, koje pasmine uzgajaju, je li rađen spermogram prije parenja, je li postojala razlika u kvaliteti ejakulata, tehnika inseminacije (TCI, kiruški, vaginalno), vrsta sjemena (nativno, ohlađeno, duboko smrznuto), dob ženke i mužjaka u vrijeme osjemenjivanja/parenja, cilj heterospermičnog osjemenjivanja, vrijednost progesterona za

vrijeme osjemenjivanja, broj osjemenjivana, broj oštenjenih štenaca i omjer ukoliko su od dva oca. Anketu je ispunilo 17 uzgajivača iz 4 zemalja svijeta, a obuhvaćeno je 39 legala, 9 čistokrvnih pasmina i 2 križane.



Female age at the time of mating? \*

Vaš odgovor

Dual sired litters in dogs

The questionnaire is created to get data from international dog breeders for a final theses at the Veterinary University of Zagreb, Croatia by Iva Raić ([blackmajestybgvs.com](http://blackmajestybgvs.com)).

Thanks for the contribution in the field of scientific research in dog breeding!

\*Obavezno

E-adresa \*

Vaša e-pošta

Where are you from? (Country) \*

Vaš odgovor

How many times did you do dual litters? \*

Vaš odgovor

What was the breed(s) of the dual litter? \*

Vaš odgovor

Males ages at the time of mating? \*

Vaš odgovor

What was the purpose of the dual sired litter? (ie. age of bitch/ male, small gene pool, etc.) \*

Vaš odgovor

Did you do progesterone testing? \*

Yes

No

If yes, what was the progesterone level at the time of mating?

Vaš odgovor

Did you do LH testing prior to the mating? \*

Yes

No

Slika 2. Anketni listić o korištenju heterospermičnog osjemenjivanja

## 7. REZULTATI

### 7.1 Prvo heterospermično osjemenjivanje

Prvo heterospermično osjemenjivanje učinjeno je na kuji starosti 4 godine, a kao donori sjemena odabrani su mužjaci starosti 15 i 12 mjeseci na temelju rezultata ocjene ejakulata.

#### 7.1.1. Rezultati ocjene ejakulata pasa

Rezultati ocjene ejakulata pasa potencijalnih donora sjemena u postupku heterospermičnog osjemenjivanja prve kuje prikazani su u tablici 1. Kvaliteta sjemena kod sva tri mužjaka bila je unutar referentnih vrijednosti za sve ispitivane parametre.

Tablica 1. Prikaz ocjene ejakulata pasa potencijalnih donora sjemena u postupku heterospermičnog osjemenjivanja

Mušjak	Volumen (mL)	Progresivna pokretljivost%	Koncentracija spermija ( $\times 10^6$ /mL)	Ukupan broj spermija	% živih spermija (EN)	Integritet membrane (% HOS+)	% morfološki abnormalnih spermija
A	1,5	80	223	334	89	86	12
B	1,3	75	99	129,87	89	82	29
C	2,3	85	79	181,7	88	96	19

U svrhu odabira dva mužjaka koja će se koristiti za heterospermično osjemenjivanje, provedeno je ispitivanje kvalitete pomiješanih uzoraka, a rezultati su prikazani u tablici 2 i 3. Rezultati testa preživljavanja pomiješanih uzoraka sjemena inkubiranih na 37 °C kroz 5 sati pokazali su da su svi uzorci približno jednake kvalitete, bez većih odstupanja u ispitivanim parametrima. Slični rezultati dobiveni su testom preživljavanja na 4 °C. S obzirom na želje vlasnika i zadovoljavajuće rezultate preživljavanja, kao donori sjemena odabrani su mužjaci A i B. Rezultati ocjene ejakulata odabranih mužjaka na tri dana osjemenjivanja prikazani su u tablicama 4, 5 i 6.

Tablica 2. Rezultati testa preživljavanja pomiješanih uzoraka sjemena potencijalnih donora nakon pohrane na 37 °C

Mužjak	Vrijeme inkubacije (sati)											
	1			2			3			5		
	PP %	EN %	HOS %	PP %	EN %	HOS %	PP %	EN %	HOS %	PP %	EN %	HOS %
A+B	70	76	74	50	72	74	40	65	69	20	64	70
A+C	75	75	71	60	66	70	60	67	72	25	65	72
B+C	70	73	76	40	64	72	25	60	70	10	61	68

PP, progresivna pokretljivost; EN, vitalnost sjemena; HOS, integritet membrane

Tablica 3. Rezultati testa preživljavanja pomiješanih uzoraka sjemena potencijalnih donora nakon pohrane na 4 °C

Mužjak	Vrijeme inkubacije (sati)								
	24			72			120		
	PP %	EN %	HOS %	PP %	EN %	HOS %	PP %	EN %	HOS %
A+B	75	90	89	65	84	87	55	70	72
A+C	75	90	88	70	86	87	55	67	68
B+C	75	92	91	75	89	85	50	61	65

PP, progresivna pokretljivost; EN, vitalnost sjemena; HOS, integritet membrane

Tablica 4. Rezultati ocjene sjemena prvog dana osjemenjivanja

Mužjak	Volumen (mL)	Progresivna pokretljivost%	Koncentracija spermija ( $\times 10^6$ /mL)	Ukupan broj spermija	% živih spermija (EN)	Integritet membrane (% HOS+)	% morfološki abnormalnih spermija
A	3,3	80	128	422,4	94	91	17
B	3,5	80	156	564	89	94	27

Tablica 5. Rezultati ocjene sjemena drugog dana osjemenjivanja

Mužjak	Volumen (mL)	Progresivna pokretljivost%	Koncentracija spermija ( $\times 10^6$ /mL)	Ukupan broj spermija	% živih spermija (EN)	Integritet membrane (% HOS+)	% morfološki abnormalnih spermija
A	4,5	90	59	265	89	90	17
B	3,3	80	106	349	86	88	23

Tablica 6. Rezultati ocjene sjemena trećeg dana osjemenjivanja

Mužjak	Volumen (mL)	Progresivna pokretljivost%	Koncentracija spermija ( $\times 10^6/\text{mL}$ )	Ukupan broj spermija	% živih spermija (EN)	Integritet membrane (% HOS+)	% morfološki abnormalnih spermija
A	5	85	72,2	361	97	96	14
B	2,6	80	82,2	213,7	92	95	23

### 7.1.2. Rezultati koncentracije progesterona na dane osjemenjivanja kuje

Praćenjem vrijednosti progesterona utvrđeno je da je ovulacija nastupila pri vrijednosti 4,2 ng/mL, a završila pri vrijednosti 10,76 ng/mL. TCI osjemenjivanja učinjena su iduća tri dana, kada su koncentracije progesterona iznosile 18,57 ng/mL (dan1), 21,99 ng/mL (dan 2.) i 25,44 ng/mL (dan 3.)

### 7.1.3. Rezultati dijagnostike gravidnosti

Dijagnostika gravidnosti rađena je ultrazvučnim pregledom 21. dan od osjemenjivanja. U ovom stadiju gravidnosti viđeno je 6 zametnih mjehurića koji su se diferencirali kao različite okrugle strukture promjera 1-3 cm.

### 7.1.4. Rezultati dokazivanja očinstva

Rezultati dokazivanja očinstva prvog heterospermičnog osjemenjivanja pokazali su da je rođeno 6 štenaca od muškara A i 1 štene od muškara B.



Slika 3. Štenad prvog heterospermičnog osjemenjivanja

## 7.2. Drugo heterospermično osjemenjivanje

Drugo heterospermično osjemenjivanje učinjeno je na kuji starosti 3 godine, a kao donori sjemena odabrani su mužjaci starosti 4 i 5 godina prema želji vlasnika.

### 7.2.1. Rezultati ocjene ejakulata

Rezultati ocjene nativnog sjemena i sjemena nakon dubokog smrzavanja pasa donora sjemena u postupku heterospermičnog osjemenjivanja druge kuje prikazani su u tablicama 7. i 8. Kvaliteta sjemena kod oba mužjaka bila je unutar referentnih vrijednosti za sve ispitivane parametre.

Tablica 7. Rezultati ocjene nativnog sjemena prije smrzavanja

Mužjak	Volumen (mL)	Progresivna pokretljivost%	Koncentracija spermija ( $\times 10^6$ /mL)	Ukupan broj spermija	% živih spermija (EN)	Integritet membrane (% HOS+)	% morfološki abnormalnih spermija
A	4	80	93,4	373	82	94	32
B	2,5	70	73,7	184,3	86	98	20

Tablica 8. Rezultati ocjene sjemena nakon smrzavanja

Mužjak	Progresivna pokretljivost%	Ukupan broj spermija	Integritet membrane (% HOS+)
A	50	200	57
B	45	184,3	66

### 7.2.2. Rezultati koncentracije progesterona na dane osjemenjivanja kuje

Praćenjem vrijednosti progesterona utvrđeno je da je ovulacija nastupila pri vrijednosti 4,99 ng/mL, a završila pri vrijednosti 9,29 ng/mL. Kiruško osjemenjivanje učinjeno je jednom, kada je koncentracija progesterona iznosila 29,92 ng/mL.

### 7.2.3. Rezultati dijagnostike gravidnosti

Dijagnostika gravidnosti rađena je ultrazvučnim pregledom 21. dan od osjemenjivanja. U ovom stadiju gravidnosti viđen je 1 zametni mjehurić koji se diferencirao kao okrugla struktura promjera 1-3 cm. Za potvrdu dijagnostike jednog šteneta rađen je RTG 58. dan od osjemenjivanja.

### 7.2.4. Rezultati dokazivanja očinstva

Rezultat dokazivanja očinstva drugog heterospermičnog osjemenjivanja pokazao je da je jedno rođeno štene od muškaka B.





Univerza v Ljubljani  
Biotehniška fakulteta  
University of Ljubljana  
Biotechnical Faculty

Oddelek za zootehniko  
Department of Animal Science



Član ISAG  
ISAG member

	Black Majesty Serendipity	Black Majesty Gives U Goose Bumps	Black Majesty Inspiration
AHTk211	087/093	087/089	089/093
CXX279	118/126	126/126	126/126
REN169018	164/170	164/170	164/164
INU055	210/214	210/214	214/214
REN54P11	232/232	232/236	232/236
INRA21	099/101	095/101	099/101
AHT137	145/147	145/147	145/147
REN169D01	202/216	216/220	216/216
AHTh260	238/246	242/246	238/242
AHTk253	288/294	294/296	294/294
AHT121	106/106	104/104	104/106
FH2054	148/148	156/156	148/156
REN162C04	202/206	202/210	206/210
AHTh171	235/235	217/235	217/235
REN247M23	266/272	270/272	266/272
INU005	124/128	124/128	124/128
INU030	146/152	146/152	146/152
FH2848	238/242	242/242	242/242
REN105L03	241/241	231/241	231/241
AHTH130			
REN64E19			139/147
AMELOGENIN	XY	XX	XX

### Certificate of DNA parentage

**PES/DOG:**

Black Majesty Inspiration

CHIP: 191100000998650

SIRE: Black Majesty Serendipity

DAM: Black Majesty Gives U Goose Bumps

Odgovorna oseba:

Mateja Janež, M. sc. agr

Vodja laboratorija:

Prof. dr. Peter DOVČ



Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Jamnikarjeva 101, 1000 Ljubljana, Slovenija, T: 01 320 3804

Slika 4. Primjer nalaza dokazivanja očinstva

## 7.3. Treće heterospermično osjemenjivanje

Treće heterospermično osjemenjivanje učinjeno je na kuji starosti 5 godina, a kao donori sjemena odabrani su mužjaci starosti 2 i 5 godina na temelju zahtjeva vlasnika.

### 7.3.1. Rezultati ocjene ejakulata

Rezultati ocjene ejakulata pasa potencijalnih donora sjemena u postupku trećeg heterospermičnog osjemenjivanja kuje prikazani su u tablici 9. i 10. Kvaliteta sjemena kod oba mužjaka bila je unutar referentnih vrijednosti za sve ispitivane parametre.

Tablica 9. Rezultati ocjene sjemena prvog dana osjemenjivanja

Mužjak	Volumen (mL)	Progresivna pokretljivost%	Koncentracija spermija ( $\times 10^6/\text{mL}$ )	Ukupan broj spermija	% živih spermija (EN)	Integritet membrane (% HOS+)	% morfološki abnormalnih spermija
A	4,5	75	64,7	291	87	96	28
B	3,4	75	98,9	336	88	98	14

Tablica 10. Rezultati ocjene sjemena drugog dana osjemenjivanja

Mužjak	Volumen (mL)	Progresivna pokretljivost%	Koncentracija spermija ( $\times 10^6/\text{mL}$ )	Ukupan broj spermija	% živih spermija (EN)	Integritet membrane (% HOS+)	% morfološki abnormalnih spermija
A	5,3	75	75,1	397	92	96	23
B	3,0	80	80	240	93	97	16

### 7.3.2. Rezultati koncentracije progesterona na dane osjemenjivanja kuje

Praćenjem vrijednosti progesterona utvrđeno je da je ovulacija nastupila pri vrijednosti 4,1 ng/mL, a završila pri vrijednosti 8,13 ng/mL. TCI osjemenjivanja učinjena su iduća dva dana, kada su koncentracije progesterona iznosile 21,44 ng/mL (dan1), 34,83 ng/mL (dan 2.).

### 7.3.3. Rezultati dijagnostike gravidnosti

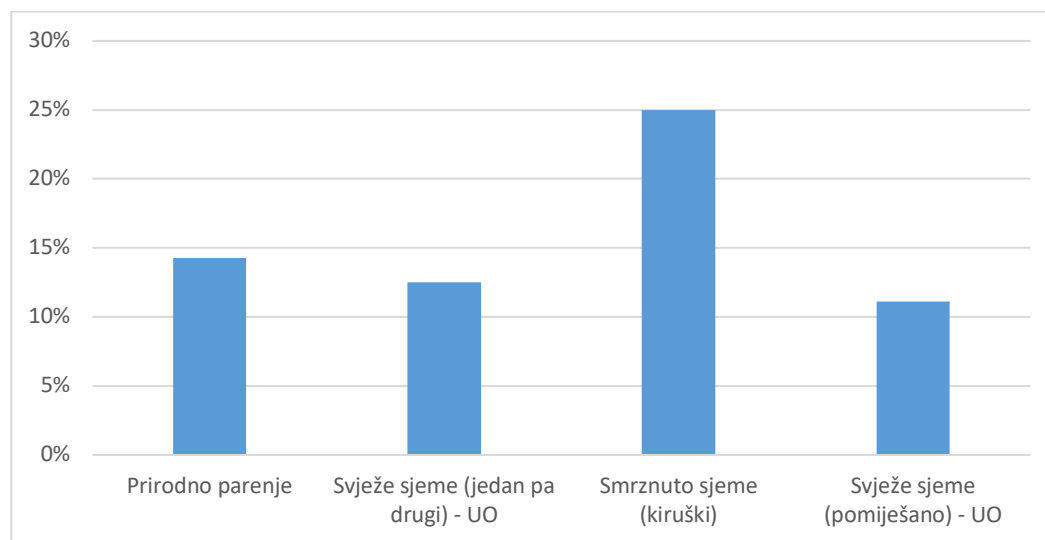
Dijagnostika gravidnosti rađena je ultrazvučnim pregledom 21. dan od osjemenjivanja. U ovom stadiju gravidnosti viđeno je 5 zametnih mjehurića koji su se diferencirali kao različite okrugle strukture promjera 1-3 cm.

### 7.3.4. Rezultati dokazivanja očinstva

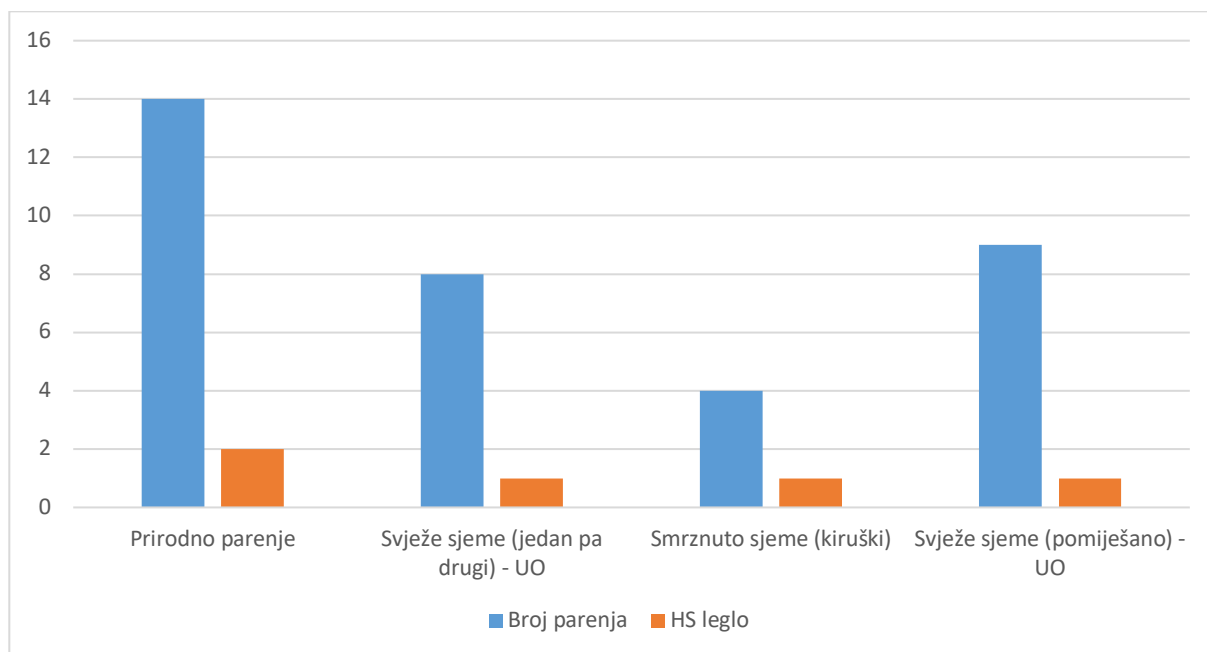
Rezultati dokazivanja očinstva trećeg heterospermičnog osjemenjivanja pokazali su da je rođeno 6 štenaca od mušjaka B.

#### 7.4. Rezultati ankete

Internacionalnu anketu su ispunili uzgajivači iz Amerike, Australije, Finske i Danske. Rezultati ankete obuhvaćaju 9 čistokrvnih pasmina: mali lavlji psić, škotski ovčar, kavalirski španijel kralja Charlesa, sibirski haski, rotvajler, njemački kratkodlaki ptičar, veliki vendenski baset grifon, velški korgi Pembroke i američki stafordski terijer, zatim 2 križane: goldendoodle (zlatni retriever i pudla) i bordoodle (graničarski koli i pudla) te 35 legala unutar navedenih pasmina. Dob kuja koje su heterospermično osjemenjivane je od 2 do 8 godina, a mužjaka od 1 do 10 godina. Prema anketi, heterospermično osjemenjivanje je najčešće korišteno kod čistokrvnih pasmina s malim genetskim bazenom kako bi se potencijalno dobila veća genetska raznolikost, a nasuprot tome uzgajivači križanih dizajnerskih pasmina kao što su goldendoodle i bordoodle su se najčešće odlučivali na ovakva legla zbog mogućih različitih varijeteta u bojama kao što su blue merle, red merle, harlekin, bikolor, trikolor i slično. Kao ostali razlozi navode se dob kuje ili mužjaka, lošija kvaliteta ejakulata jednog od mužjaka ili korištenje duboko smrznutog sjemena. Koncentracija progesterona je mjerena kod nekih kuja i iznosila je od 10 – 21 ng/mL, a koncentracija LH je vrlo rijetko određivana. Rezultati postotka uspješnih heterospermičnih osjemenjivanja u odnosu na tip sjemena, način osjemenjivanja/parenja i kvalitetu sjemena su prikazani na slikama 4, 5, 6, 7.

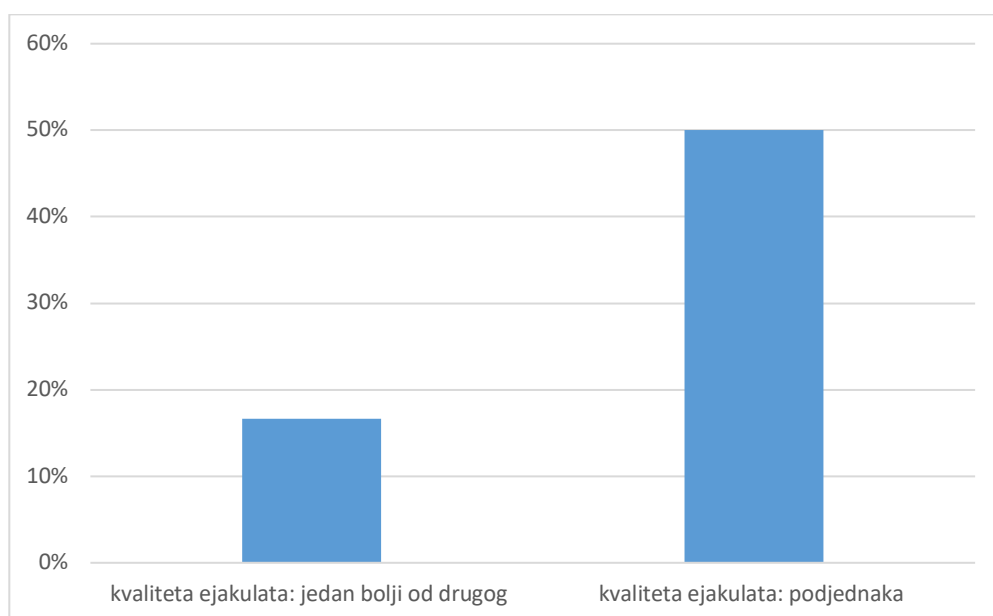


Slika 5. Uspjeh heterospermičnog osjemenjivanja

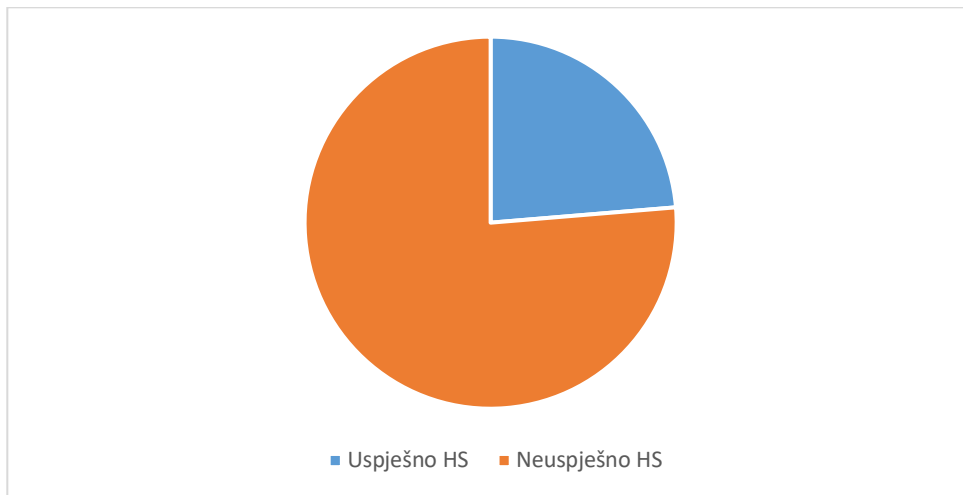


HS leglo – heterospermično leglo

Slika 6. Odnos metode osjemenjivanja/parenja i tipa sjemena na uspjeh heterospermičnog osjemenjivanja



Slika 7. Utjecaj kvalitete sjemena na uspjeh heterospermičnog osjemenjivanja



HS – heterospemično

Slika 8. Uspjeh heterospermičnog osjemenjivanja

## 8. RASPRAVA

Princip heterospermičnog osjemenjivanja zasniva se na kompeticijskim osobinama spermija od dva ili više mužjaka. Nakon prirodnog ili umjetnog osjemenjivanja spermiji započinju svoj put od mjesta ulaska, što ovisi o načinu osjemenjivanja, do mjesta oplodnje. Samo mali broj spermija uspije oploditi jajne stanice zbog brojnih čimbenika koji utječu na njihovu brojnost i plodnost, poput ženskog reproduktivnog trakta, stanica-stanica interakcije, ekspresije gena te morfologije spermija (GARCIA-VASQUEZ i sur., 2016.). Štoviše, poznato je da se ejakulat sastoji od različitih subpopulacija spermija (HOLT i sur., 2016.). Subpopulacije karakteriziraju razlike u pokretljivosti, statusu fragmentacije DNK, morfologiji i veličini spermija, osjetljivosti na signalne molekule i mnoga druga svojstva. Pokretljivost je izuzetno važna osobina spermija. Prema istraživanju HERNANDEZ-CARAVACA i sur. (2015.), spermiji s lošom pokretljivošću su odbačeni već nakon samo 15 minuta od trenutka osjemenjivanja spermijima koji pokazuju različitu razinu pokretljivosti. To nam dokazuje da se početni odabir spermija unutar spolnog trakta odvija na temelju pokretljivosti te ide u korist visoko pokretljivih spermija. Povećana pokretljivost spermija je obično povezana sa kompeticijom spermija koji pokušavaju oploditi jajnu stanicu pogotovo kada su u reproduktivnom traktu ženke spermiji od više različitih mužjaka kao što se to događa u ptica (LUPOLD i sur., 2009.), nekih vrsta riba (FITZPATRICK i sur., 2009.) i sisavaca (TOURMENTE i sur., 2011.). Naši rezultati nisu pokazali značajnu razliku između progresivne pokretljivosti između testiranih mužjaka koji su korišteni za heterospermično osjemenjivanje. Inicijalno individualno testiranje je pokazalo razlike u progresivnoj pokretljivosti koja je bila između 75-85%, dok rezultati testiranja pomiješanih uzoraka na nulti, treći i peti dan nisu pokazali značajne razlike u pokretljivosti. Razlike progresivne pokretljivosti na dane osjemenjivanja su bile minimalne za 3 heterospermična osjemenjivanja čak i kod osjemenjivanja s duboko smrznutim sjemenom.

Što se tiče kromatina u glavi spermija, isto tako, primjećena je superiorna sposobnost spermija sa stabilnim kromatinom da dođu do mjesta oplodnje (ARDON i sur., 2008.) i vežu se za zonu pellucidu (TSAKMAKIDIS i sur., 2011.). Heterogenost spermija u ejakulatu može imati funkcionalnu važnost, osiguravajući veći potencijal za oplodnju nakon ulaska u ženski reproduktivni trakt. Razlike u svojstvima spermija mogu biti uslijed snažne selekcije ženskog

reproduktivnog trakta s obzirom da spermiji moraju prijeći nekoliko barijera da bi mogli oploditi jajnu stanicu. (LIANA i WITALINSKI, 2005.).

Kada se ženke umjetno osjemene sa spermijima od dva ili više mužjaka (heterospermično osjemenjivanje), spermiji određenih mužjaka najčešće imaju prednost odnosno sposobniji su oploditi jajne stanice i dati potomstvo (DZIUK, 1996., STAHLBERG i sur., 2000., KASIMANICKAM i sur., 2006., FERREIRA i sur., 2015.). To ukazuje ili na značajan ženski izbor spermija ili na osobine spermija same po sebi, a u oba slučaja mogu biti uključene morfološke karakteristike spermija. Kod pasa postoji potencijalno velika vremenska razlika između parenja ili osjemenjivanja i oplodnje jajnih stanica, što znači da spermiji moraju biti sposobni preživjeti nekoliko dana u ženskom reproduktivnom traktu zadržavajući sposobnost pokretljivosti i mogućnosti oplodnje. Razlike u svojstvima spermija mogu nastati kao rezultat prelaženja prirodnih barijera u ženskom reproduktivnom traktu s potencijalnom nekompatibilnošću spolnih stanica. U svakom slučaju, svojstva spermija, pogotovo morfologija pokazuje znatne razlike među vrstama i obično je moguće razlikovati vrste zbog fenotipskih razlika (LIANA i WITALINSKI, 2005.) Spermiji unutar ejakulata jedne životinje obično su prepoznatljivi kao pripadnici različitih subpopulacija, pri čemu jedna vrsta stanica može imati veći potencijal oplodnje (SANTOLARIA i sur., 2015.). Primjerice, glave spermija vepra mogu se morfometrijski podijeliti u tri subpopulacije: velike, male-izdužene i male-okrugle glave (VICENTE-FIEL i sur., 2013.) ili glave pravokutnog oblika, oštro sužavajuće ili blago sužene (THURSTON i sur., 2001.). Poznato je da je kompeticija spermija odnosno postkopulatorna selekcija spermija utjecala na morfologiju spermija i njihova svojstva (GOMENDIO i ROLDAN, 2008., TOURMENTE i sur., 2011., SOLER i sur., 2016.), ali nije u potpunosti razjašnjeno je li postkopulatorna selekcija sjemena imala glavni utjecaj u evoluciji psećih reproduktivnih svojstava s obzirom da ni relativna masa testisa niti dimenzije spermija nisu pod utjecajem kompeticije spermija (IOSSA i sur., 2008.). Prema našem istraživanju nismo primijetili značajne razlike u obliku glava između ispitivanih mužjaka, ali su primjećene razlike u ukupnim morfološkim abnormalnostima (distalne i proksimalne protoplazmatske kapljice, zavijeni repovi) koje su mogle utjecati na kompeticiju spermija pri heterospermičnom osjemenjivanju. Dapače, sva su očinstva potvrđena kod mužjaka s manjim brojem morfoloških abnormalnosti.

U humanoj kliničkoj medicini široko se koristi koncept "normalnog" spermija, a najnovije smjernice Svjetske zdravstvene organizacije (WHO, World Health Organization) o analizi ejakulata (WHO, 2010.) pokazuju da samo oko 4% spermija unutar plodnog ljudskog ejakulata

odgovara morfološkoj definiciji normalnog spermija. Definicija je izvedena ispitivanjem morfologije spermija koji su uspjeli dosegnuti jajne stanice nakon osjemenjivanja. Antropološki dokazi potvrđuju da su ljudi kao vrsta evoluirali u kontekstu u kojem kompeticija spermija nema važan utjecaj (MARTIN, 2007.).

Posljednja tri desetljeća svjedočimo o razvoju teorije o kompeticiji sperme, što znači da se javlja kada spermiji iz više od jednog mužjaka imaju priliku oploditi jajne stanice jedne ženke tijekom istog spolnog ciklusa (PARKER, 1970., 1998.), odnosno kada se nekoliko mužjaka pari ili osjemenjuje s jednom ženkom. U ovakvim situacijama, mužjak koji može proizvesti najviše i najkvalitetnije spermije ima prednost u odnosu na svoje suparnike. Nekoliko studija pokazalo je da veći testisi imaju veći kapacitet proizvodnje spermija što je osobina vrsta koje pokazuju sustave parenja s više mužjaka (HARCOURT i sur, 1981.). Volumen ejakulata često se navodi kao marker kvalitete, no kod pasa on se ne smatra osobitim pokazateljem kvalitete sjemena (AROKIA ROBERT i sur., 2016.). Ipak, ovaj je podatak bitan kod određivanja ukupne koncentracije spermija u ejakulatu pa predstavlja rutinski marker u standardnoj analizi sjemena. Naši rezultati testiranja kvalitete ejakulata nisu pokazali poveznicu između većeg volumena i veće koncentracije spermija.

Socijalna dominacija odnosno hijerarhija u čoporu također je važna u takvim sustavima parenja. Dob, tjelesna masa i razlike u ponašanju utječu na relativni broj spermija koje proizvode mužjaci. Isto tako, socijalni utjecaj je primijećen i u populaciji konja kod kojih prisustvo drugih konja i kobila utječe na koncentraciju spermija i parametre pokretljivosti (GARCIA-VASQUEZ i sur., 2016.). Prema istraživanju provedenom u Australiji na dingosima (*Canis familiaris dingo*) koji su usko srodni sa psom (*Canis familiaris familiaris*), CORBETT (1995.) navodi da hijerarhija u čoporu ima veliki utjecaj na proizvodnju sjemena kod mužjaka koji su plodni samo u sezoni parenja, koja traje od travnja do lipnja, dok se nakon sezone proizvodnja sjemena drastično smanjuje, što kod domesticiranih pasa nije slučaj. Mužjaci uključeni u naše istraživanje nisu bili pod vidljivim utjecajem hijerarhije u čoporu jer su živjeli u različitim kućanstvima za vrijeme provođenja istraživanja.

Alfa ženke dinga biraju mužjaka i najčešće se pare samo s alfa mužjakom. Kao jedna od velikih razlika između srodne vrste, odnosno vuka (*Canis lupus*), a zatim i psa, navodi se to što i druge ženke dinga u čoporu budu parene čak i sa subdominantnim mužjacima, dok se u čoporima vukova ovakav oblik ponašanja ne događa. Alfa ženka dinga ubije svu štenad iz drugih legala, ali za razliku od vuka, ženke dinga pomažu u odgoju i laktaciji štenadi od alfa ženke (CORBETT, 1995.)



Prema eksperimentalnom istraživanju provedenom na govedima u Argentini, ALBRECHT i sur. (2005.) navode da heterospermično osjemenjivanje goveda povećava postotak koncepcije te da važan utjecaj ima koncentracija spermija i vrijeme osjemenjivanja. U našem istraživanju sve su ženke ostale gravidne, s obzirom na dostupnu generacijsku reprodukciju povijest kuja i mužjaka, zatim dob kuja koje su bile u rasplodnom vrhuncu, no nismo primijetili da je heterospermično osjemenjivanje imalo utjecaj na veći broj štenaca po leglu iako su koncentracije spermija bile podjednake. Nasuprot tome, prema rezultatima internacionalne ankete, u uzgajivačnici iz Danske primijećeno je da je kod svake kuje s prethodno dokazanom reprodukcijom poviješću ustanovljeno da je sa svakim heterospermičnim osjemenjivanjem dobiveno 1-2 šteneta više.

Za uspješno heterospermično osjemenjivanje, osim procjene kvalitete sjemena rasplodnjaka i precizno određenog vremena osjemenjivanja, važnu ulogu ima i metoda osjemenjivanja. JI HYE i sur. (2009.) u svom istraživanju navode da su kiruškom inseminacijom kuje sa konc spermija od  $1,3 \times 10^8$  dobili 5 štenadi od čega je 1 bio od jednog mužjaka, a 4 od drugog. Prema internacionalnoj anketi, kiruškom metodom osjemenjivanja je dobiven najbolji omjer između potencijalnih očeva koji je bio 5:5. U našem istraživanju koristili smo metode transcervikalnog osjemenjivanja s pomiješanim svježim sjemenom gdje smo dobili jedno štene od jednog oca i 6 od drugog, zatim u drugom leglu 6 štenadi od jednog oca, a u trećem leglu gdje je provedena kiruška metoda osjemenjivanja s duboko smrznutim sjemenom, oštenjeno je jedno štene.

Heterospermično osjemenjivanje može povećati postotak gravidnosti i broj štenadi po leglu, što je važna činjenica kada se koriste genetski vrijedni psi ili stariji psi sa smanjenom plodnošću.

## 9. ZAKLJUČCI

Iz rezultata dobivenih ovim istraživanjem možemo zaključiti:

Heterospermično osjemenjivanje daje mogućnost veće genetske raznolikosti unutar jednog legla i pozitivno utječe na broj štenadi u leglu.

Određivanje optimalnog vremena osjemenjivanja je ključno za dobivanje legla.

Standardna procjena ejakulata daje precizan uvid u kvalitetu sjemena potencijalnih rasplodnjaka za heterospermično osjemenjivanje te na osnovu rezultata se volumeni i koncentracije mogu prilagoditi kako bi oba rasplodnjaka dobili potencijalno jednake šanse za oplodnju jajnih stanica.

S obzirom na specifični ciklus kuje i višestruke ovulacije u dužem vremenskom periodu, teško je pretpostaviti da će jajne stanice biti oplodene sa spermijima od oba mužjaka s obzirom na evolucijsku postkopulacijsku selekciju odnosno kompeticijsko svojstvo spermija.

## 10. LITERATURA

ALBRECHT, A., R. CAVIA, G. LARRABURU, F. GARCIA MIGLIARO, G. BROGLIATTI (2005): Heterospermic insemination at two sperm concentrations in timed AI: CASA semen parameters and pregnancy rates. *Reprod. Fertil. Dev.* 17, 154-154.

AMANN, R. P., D. WABERSKI (2014): Computer-assisted sperm analysis (CASA): capabilities and potential developments. *Theriogenology* 81, 5–17.

ARDON, F., D. HELMS, W. SAHIN, H. BOLLWEIN, E. TOPFER-PETERSEN (2008): Chromatin-unstable boar spermatozoa have little chance of reaching oocytes in vivo. *Reproduction* 135, 461-70.

AROKIA ROBERT, M., G. JAYAPRAKASH, M. PAWSHE, T. TAMILMANI, M. SATHIYABARATHI (2016): Collection and evaluation od canine semen. *Int. J. Sci. Environ. Tech.* 5, 1586-1595.

BARTH, A. D., R. J. OKO (1989): Abnormal morphology of bovine spermatozoa. Ames (IA): Iowa State University Press, 20-35.

BEATTY, R. A., G. H. BENNETT, J. G. HALL, J. L. HANCOCK, D. L. STEWART (1969): An experiment with heterospermic insemination in cattle. *J. Reprod. Fert.* 19, 491–502.

BERGER, T., D. L. ANDERSON, M. C. T. PENEDO (1996): Porcine sperm fertilizing potential in relationship to sperm functional capacities. *Anim. Reprod. Sci.* 44, 231–239.

BIRKHEAD, T. R., T. PIZZARI (2002): Post-copulatory sexual selection. *Nat. Rev. Genet.* 3, 262–273.

BLENDINGER, K. (2007): Collection and evaluation of the semen in the dog. *Proceedings of the SCIVAC Congress, Rimini, Italy*, pp. 83-84.

BRITTAIN, D., P. W. CONCANNON, J. A. FLANDERS (1995): Use of surgical intrauterine insemination to manage infertility in a colony of research German shepherd dogs. *Lab. Anim. Sci.* 45, 404 –7.

CERGOLJ M., M. SAMARDŽIJA (2006): Veterinarska andrologija. Odabrana poglavlja. Medicinska naklada, Zagreb. 15-66; 139-142;169-194.

- CORBETT, L. (1995): The Dingo in Australia and Asia. University of New South Wales Press Ltd: Sydney.
- DAYTON, M. (2009): Developmental Validation of Short Tandem Repeat Reagent Kit for Forensic DNA Profiling of Canine Biological Material, *Cro. Med. J.* 50, 268-285.
- DOBRANIĆ, T., M. SAMARDŽIJA, M. CERGOLJ, N. PRVANOVIĆ (2005): Determination of membrane integrity of canine spermatozoa. *Vet. arhiv* 75, 23-30.
- DZIUK, P. J. (1996): Factors that influence the proportion of offspring sired by a male following heterospermic insemination. *Anim. Reprod. Sci.* 43, 65-88.
- ENGLAND G., (2010): Canine and feline reproduction and neonatology, *Physiology and endocrinology of the female*, 1-20.
- ENGLAND, G. C. W. (1999): Semen quality in dogs and influence of a short interval second ejaculation. *Theriogenology* 52, 981-986.
- FARSTAD, W. F. (2010): Artificial insemination in dogs, U: *Bsava Canine and Feline Reproduction and Neonatology* (England G. , A. von Heimendahl, eds), 80 – 89.
- FERREIRA, C. E., D. B. SAVIO, A. C. GUARISE, M. J. FLACH, G. D. GASTAL (2015): Contribution of boars to reproductive performance and paternity after homospermic and heterospermic artificial insemination. *Reprod Fertil Dev* 27, 1012-1019.
- FITZPATRICK, J. L., R. MONTGOMERIE, J. K. DESJARDINS, K. A. STIVER, N. KOLM, S. BALSHINE (2009): Accepted. Female promiscuity promotes the evolution of faster sperm in cichlid fishes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*.
- FOLNOŽIĆ, I., T. KARADJOLE, G. BAČIĆ, N. MAĆEŠIĆ, M. KARADJOLE, M. SAMARDŽIJA, I. GETZ (2009): Vaginoskopija kuja. *Vet. Stn.* 40, 27 - 36.
- FORREST, J. D., S. SINGH (1990): The sexual and reproductive behavior of American women, 1982- 1988. *Fam. Plann. Perspect.* 22, 206-214.
- FRESHMAN, J. L. (2002): Semen collection and evaluation. *Clin. Tech. Small Anim. Pract.* 17, 104-107.
- GARCIA-VAZQUEZ, F. A., J. GADEA, C. MATAS, W. V. HOLT (2016): Importance of sperm morphology during sperm transport and fertilization in mammals. *Asian J. Androl.* 18, 844–850.

GOERICKE-PESCH, S., K. FAILING (2013): Retrospective analysis of canine semen evaluations with special emphasis on the use of the hypoosmotic swelling (HOS) test and acrosomal evaluation using Spermac. *Reprod. Domest. Anim.* 48, 213–217.

GOMENDIO, M., E. R. S. ROLDAN (2008). Implications of diversity in sperm size and function for sperm competition and fertility. *Int. J. Dev. Biol.* 52, 439–447.

GOMEZ MONTOTO, L., C. MAGANA, M. TOURMENTE, J. MARTIN-COELLO, C. CRESPO (2011): Sperm competition, sperm numbers and sperm quality in murid rodents. *PloS One.* 6, e18173.

GUNZEL-APEL, A. R., C. GUNTHER, P. TERHAER, H. BADER (1993). Computer-assisted analysis of motility, velocity and linearity of dog spermatozoa. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 47, 271–278.

HARCOURT, A. H., P. H. HARVEY, S. G. LARSON, R. V. SHORT (1981): Testis weight, body weight and breeding system in primates. *Nature.* 293 55–57.

HERNANDEZ-CARAVACA, I., C. SORIANO-UBEDA, C. MATAS, M. J. IZQUIERDO-RICO, F. A. GARCIA-VAZQUEZ (2015): Boar sperm with defective motility are discriminated in the backflow moments after insemination. *Theriogenology* 83, 655-661.

HESSER, A., C. DARR, K. GONZALES, H. POWER, T. SCANLAN, J. THOMPSON, C. LOVE, B. CHRISTENSEN, S. MEYERS (2017): Semen evaluation and fertility assessment in a purebred dog breeding facility. *Theriogenology* 87, 115-123.

HOLT, W. V., A. FAZELI (2016): Sperm selection in the female mammalian reproductive tract. Focus on the oviduct: hypotheses, mechanisms, and new opportunities. *Theriogenology* 85, 105-112.

HOLT, W., K. J. W. VAN LOOK (2004): Concepts in sperm heterogeneity, sperm selection and sperm competition as biological foundations for laboratory tests of semen quality. *Reproduction* 127, 527-535.

IOSSA, G., C. D. SOULSBURY, P. J. BAKER, S. HARRIS (2008): Sperm competition and the evolution of testes size in terrestrial mammalian carnivores. *Functional Ecology* 22, 655–662.

JAMES, W. H. (1984): Coitus-induced ovulation and its implications for estimates of some reproductive parameters. *Acta Genet. Med. Gemellol.* 33, 547-555.

- JI HYE, L., J. K. KEUN, A. C. SEON, L. XIAOXIA, Y. K. EUN, J. O. HYUN, C. L. BYEONG, J. K. HYE, K. P. BYUNG, K. K. MIN (2009): Superfecundation induction by intrauterine insemination with different frozen-thawed canine semen and parentage test using microsatellite analysis. *Korean J. Vet. Res.* 49, 285-290.
- JOHANNES, J. E. (2002): The Basenji annual estrus: African origins. *The Basenji*, 38, 10.
- JOHNSTON S. D., M. V. ROOT KUSTRITZ, P. N. S. OLSON (2001): *Canine and Feline Theriogenology*, Saunders, Philadelphia, pp.592
- JOHNSTON, S. D. (1991): Performing a complete canine semen evaluation in small animal hospital. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 21, 545-551.
- KANTHASWAMY, S. (2009): Canine Population dana Generated from a Multiplex STR Kit for Use in Forensic Casework. *J. Foren. Sci.* 54, 829-840.
- KARADJOLE, T., G. BAČIĆ, N. MAČEŠIĆ, M. LOJKIĆ, N. PRVANOVIĆ BABIĆ, M. EFENDIĆ, I. BAČIĆ (2015): Laparoscopska kastracija kuja, Zbornik radova XVII regionalno savetovanje iz kliničke patologije I terapije malih životinja Clinica Veterinaria 2015, Fruška Gora 18.-20. Lipanj, 2015. 12-14.
- KASIMANICKAM, R., R. L. NEBEL, I. D. PEELER, W. L. SILVIA, K. T. WOLF (2006): Breed differences in competitive indices of Holstein and Jersey bulls and their association with sperm DNA fragmentation index and plasma membrane integrity. *Theriogenology* 66, 1307-1315.
- KELLER, L., H. K. REEVE (1995): Why do females mate with multiple males? The sexually selected sperm hypothesis. *Advan. Anim. Behav.* 24, 291-315.
- KOLSTER, K. A. (2018): Evaluation of canine sperm and management of semen disorders. *Vet. Clin Small Anim.* 48, 553-545.
- KONIG, H. W., H. G. LIEBICH (2005): *Anatomija domaćih sisavaca*, Naklada Slap, Zagreb, Hrvatska. 516, 581-582.
- KRUGER, T. F., S. B. ACKERMAN, K. F. SIMMONS, R. J. SWANSON, S. S. BRUGO, A. A. ACOSTA (1987): A quick, reliable staining technique for human sperm morphology. *Arch. Androl.* 18, 275-277.
- LEIVERS, S., G. RHODES, L. W. SIMMONS (2014): Sperm competition in humans: mate guarding behavior negatively correlates with ejaculate quality. *PLoS One.* 9, e108099.

- LIANA, M., W. WITALINSKI (2005): Sperm structure and phylogeny of Astigmata. *Journal of Morphology* 265, 318–324.
- LINDE FORSBERG, C. (1995): Artificial insemination with fresh, chilled extended, and frozen-thawd semen in dog. *Semin. Vet. med. Surg.* 10, 48-58
- LINDE-FORSBERG, C., B. STROM HOLST, G. GOVETTE (1999): Comparison of fertildanadata from vaginal vs intrauterine insemination of frozen-thawed dog semen: a retrospective study. *Theriogenology*, 52, 11–23.
- LOJKIĆ, M. (2016): Oogeneza, folikulogeneza, oplodnja i rani embrionalni razvoj. [http://www.vef.unizg.hr/doc-sec/porodnistvo/lojkic\\_m-folikulogeneza\\_i\\_oogeneza.pdf](http://www.vef.unizg.hr/doc-sec/porodnistvo/lojkic_m-folikulogeneza_i_oogeneza.pdf)
- LOJKIĆ, M., G. BAČIĆ, N. MAĆEŠIĆ, T. KARADJOLE, N. PRVANOVIĆ BABIĆ, M. SAMARDŽIJA (2015): Upotreba ohlađenog i duboko smrznutog sjemena za umjetno osjemenjivanje kuja. *Clinica Veterinaria 2015. XVII regionalno savjetovanje iz kliničke patologije i terapije malih životinja*, 18.-20. lipnja 2015, Fruška gora, Srbija., pp. 30-34.
- LOJKIĆ, M., N. MAĆEŠIĆ, G. BAČIĆ, T. KARADJOLE, M. SAMARDŽIJA, I. GETZ, I. FOLNOŽIĆ, M. CERGOLJ, T. DOBRANIĆ, B. ŠKRLIN, Z. VRBANAC (2012): Uporaba duboko smrznute i ohlađene pseće sperme na Klinici za porodništvo i reprodukciju Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. *Zbornik radova 5. hrvatskog veterinarskog kongresa s međunarodnim sudjelovanjem*, Zagreb, Hrvatska veterinarska komora, Veterinarski fakultet, pp. 423-429.
- LUPOLD, S., S. CALHIM., S. IMMLER, T. R. BIRKHEAD (2009): Sperm morphology and sperm velocity in passerine birds *Proc. R. Soc. B* 276, 1175–1181.
- MAKLOSKI, C. L. (2012): Clinical techniques of artificial insemination in dog. *Vet. Clin. Small Anim.* 42, 439-444.
- MANSON, S. J. (2018): Current Review od Artifitial Insemination in Dogs. *Vet. Clin. Small Anim.* 48, 567-80.
- MARTIN, R. D. (2007): The evolution of human reproduction: a primatological perspective. *Am. J. Phys. Anthropol.* 45, 59-84.
- MOCÉ, E., J. K. GRAHAM (2008): *In vitro* evaluation of sperm quality. *Anim. Reprod. Sci.* 105, 104-118.

- MURPHY, E. M., B. EIVERS, C. M. O'MEARA, P. LONERGAN, S. FAIR (2018): Effect of increasing equilibration time of diluted bull semen up to 72 h prior to freezing on sperm quality parameters and calving rate following artificial insemination. *Theriogenology* 108, 217-222.
- OGDEN, R. (2012): Danatic data from 15 STR loci for forensic individual identification and parentage analyses in UK domestic dogs (*Canis lupus familiaris*). *Foren. Sci. Int.* 6, e63-e65.
- OLSEN, S. J. (1985): *Origins of the Domestic Dog*. Tucson: University of Arizona Press, 111-150.
- ORTEGA-PACHECO, A., J. C. SEGURA-CORREA, M. JIMENEZ-COELLO, C. LINDEFORSBERG (2007): Reproductive patterns and reproductive pathologies of stray bitches in the tropics. *Theriogenology*. 67, 382–390
- PARKER, G. A. (1998): Sperm competition and the evolution of ejaculates: towards a theory base. In *Sperm Competition and Sexual Selection* (Birkhead, T. R., A. P. Moller, eds.) Academic Press, London. 3–54.
- PARKER, G.A. (1970): Sperm competition and its evolutionary consequences in the insects. *Biol. Rev.* 45, 525–567.
- PARRISH, J. J., R. H. FOOTE (1985): Fertility differences among male rabbits determined by heterospermic insemination of fluorochromelabeled spermatozoa. *Biol. Reprod.* 33, 940–949.
- PURSWELL, B. J., G. C. ALTHOUSE, M. V. ROOT-KUSTRITZ (2010): Guidelines for using the canine breeding soundness evaluation form. *Clin. Theriogenol.* 2, 51-59.
- ROMAGNOLI, S., C. LOPATE (2014): Transcervical Artificial Insemination in Dog and Cats: Review of the Technique and Practical Aspects, *Reprod. Dom. Anim.* 49, 56-63.
- SANTOLARIA, P., S. VICENTE-FIEL, I. PALACIN, E. FANTOVA, M. E. BLASCO (2015): Predictive capacity of sperm quality parameters and sperm subpopulations on field fertility after artificial insemination in sheep. *Anim Reprod Sci* 163, 82-88.
- SEAGER, S. W. J. (1986): *Artificial insemination in dogs*. U: *Small Animal Reproduction and Infertility* (Burke, T. J. ed.). Lea & Febiger, Philadelphia, pp. 207-217.
- SILVA, P. F., B. M. GADELLA (2006): Detection of damage in mammalian sperm cells. *Theriogenology* 65, 958-78.



SINDING, M. H. S. *i sur.* (2020): Arctic-adapted dogs emerged at the Pleistocene-Holocene transition. *Science*. 368, 1495-1499.

SOLER, C., T. COOPER, A. VALVERDE, J. YANIZ (2016): Afterword to Sperm morphometrics today and tomorrow special issue in *Asian Journal of Andrology*. *Asian J. Androl.* 18, 895–897.

SREWART, D. L., R. L. SPOONER, G. H. BENNETT, R. A. BEATTY, J. L. HANCOCK (1974): A second experiment with heterospermic insemination in cattle. *J. Reprod. Fert.* 36, 107–116.

STAHLBERG, R., B. HARLIZIUS, K. F. WEITZE, D. WABERSKI (2000): Identification of embryo paternity using polymorphic DNA markers to assess fertilizing capacity of spermatozoa after heterospermic insemination in boars. *Theriogenology* 53,1365-1373.

THURSTON, L. M., P. F. WATSON, A. J. MILEHAM, W. V. HOLT (2001): Morphologically distinct sperm subpopulations defined by Fourier shape descriptors in fresh ejaculates correlate with variation in boar semen quality following cryopreservation. *J. Androl.* 22, 382-394.

TOURMENTE, M., M. GOMENDIO, R. S. E. ROLDAN (2011): Sperm competition and the evolution of sperm design in mammals. *BMC Evolutionary Biology* 11, Article number: 12.

TSAKMAKIDIS, I. A., A. G. LYMBEROPOULOS, T. A. KHALIFA (2011): Selectivity of porcine zona pellucida to bind spermatozoa with normal chromatin structure. *Andrologia* 43, 358-360.

TSUITSUI, T., H. EJIMA (1987): Experimental induction of superfecundation in the dog. *Japanese J. Vet. Sci.* 50, 581-583.

TSUTSUI, T., C. HIGUCHI, M. SOETA (2009): Plasma LH, ovulation and conception rates in cats mated once or three times on different days on oestrus. *Reprod. Dom. Anim.* 44, 76-78.

VERSTEGEN J, G. DHALIWAL, K. VERSTEGEN-ONCLIN (2008): Mucometra, cystic endometrial hyperplasia, and pyometra in the bitch: advances in treatment and assessment of future reproductive success. *Theriogenology* 70, 364–374.

VICENTE-FIEL, S., I. PALACIN, P. SANTOLARIA, J. L. YANIZ (2013): A comparative study of sperm morphometric subpopulations in cattle, goat, sheep and pigs using a computer-assisted fluorescence method (CASMA-F). *Anim Reprod Sci* 139, 182-189.

- VON HOLDT, B. M., J. P. POLLINGER, K. E. LOHMUELLER, H. G. PARKER (2010): Genome-wide SNP and haplotype analyses reveal a rich history underlying dog domestication. *Nature*. 464, 898–903.
- WAYNE, R. K., W. G. NASH, S. J. O'BRIEN (1987): Chromosomal evolution of the *Canidae*. II. Divergence from the primitive carnivore karyotype. *Cytogenet. Cell Genet.* 44, 134–141.
- WENK, R. E., T. HOUTZ, M. BROOKS, F. A. CHIAFARI (1992): How Frequent Is Heteropaternal Superfecundation? *Acta Genet. Med. Gemelloi (Roma)*. 41, 43-47.
- WHO (2010): WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen. 5<sup>th</sup> ed. Geneva: World Health Organization, p. 286.
- WILSON, M. S. (2003): Endoscopic Transcervical Insemination in the Bitch. U: Recent Advances in Small Animal Reproduction, (Concannon P. W. England G., Verstegen III J., Linde-Forsberg C., Eds.). International Veterinary Information Service, Ithaca NY. 1-6.
- YASUI, Y. (1997): A 'good sperm' model can explain the evolution of costly multiple mating by females. *Am. Natur.* 149, 573–584.
- ZEH, J. A., D. W. ZEH (2001): Reproductive mode and the genetic benefits of polyandry. *Anim. Behav.* 61, 1051–1063.
- ZELLI, R., A. TROISI, A. ELAD NGONPUT, L. CARDINALI, A. POLISCA (2013): Evaluation of testicular artery blood flow by Doppler ultrasonography as a predictor of spermatogenesis in the dog. *Res. Vet. Sci.* 95, 632-637.

## 11. SAŽETAK

### Raič, I.: Heterospermično osjemenjivanje kuja

Cilj heterospermičnog osjemenjivanja pasa je dobivanje legala od dva različita oca, što daje mogućnost veće genetske raznolikosti uslijed specifičnog spolnog ciklusa kuje te daje podjednake šanse mužjacima za dobivanje legla.

Istraživanje je provedeno u razdoblju od 2 godine na 2 spolno zrele ženke i 5 mužjaka pasmine mali vendenski baset grifon koje su u 3 legla oštenile 14 štenadi. Ukupno su provedena 3 heterospermična osjemenjivanja. U istraživanje je uključena i internacionalna anketa koju su ispunili uzgajivači iz Amerike, Danske, Finske, i Australije koji su koristili ovaj način rasplodivanja. Prije svakog osjemenjivanja mužjacima je uzeto sjeme radi određivanja kvalitete ejakulata. Ocijenjen je volumen, progresivna pokretljivost, morfologija, koncentracija i vitalnost spermija (HOS test i bojenje po Bloom-u).

Optimalno vrijeme osjemenjivanja određivano je mjerenjem koncentracije progesterona u serumu. Kao početak ovulacije uzeta je vrijednost od 4.2 ng/mL. U dva heterospermična osjemenjivanja kuje su osjemenjene tehnikom transcervikalne inseminacije svježim, prethodno pomiješanim sjemenom 2 odabrana mužjaka, dok je jedno osjemenjivanje učinjeno s duboko smrznutim sjemenom 2 odabrana mužjaka tehnikom kirurške inseminacije.

Inicijalno individualno testiranje mužjaka pokazalo je minimalne razlike u kvaliteti sjemena koja je kod svih mužjaka bila je unutar referentnih vrijednosti za sve ispitivane parametre. Ocjenom sjemena na dan osjemenjivanja utvrđena su minimalna odstupanja u kvaliteti te je sjeme odabranih mužjaka pri svakom osjemenjivanju bilo približno jednake kvalitete. Volumen ejakulata je prilagođen za svako osjemenjivanje, s obzirom na kvalitetu sjemena, kako bi svaki mužjak imao jednake šanse za oplodnju. Svi psi su prethodno imali napravljen DNK profil.

Kuje su se štenile 58-60 dana nakon osjemenjivanja. Za dokazivanje očinstva krv štenadi uzeta je neposredno nakon štenjenja iz umbilikalne vene ili u dobi od 5 tjedana venepunkcijom iz jugularne vene u EDTA epruvete. Rezultati su pokazali da je u prvom leglu oštenjeno 6 štenadi od mužjaka A (4 ♂, 2 ♀) i 1 štene od mužjaka B (♂), u drugom leglu je oštenjeno 6 štenadi (3 ♂, 3 ♀) od mužjaka A, a u trećem 1 štene (1 ♀) od mužjaka B. Jednoajčani blizanci nisu utvrđeni. Internacionalna anketa je pokazala da je najbolji omjer očeva bio kod kirurškog osjemenjivanja sa smrznutim sjemenom (5:5), dok su preostala legla koja su

uključivala prirodno parenje ili osjemenjivanje prethodno pomiješanim sjemenom imala omjer očeva u korist jednog, dominantnijeg mužjaka. Veći broj štenadi u leglu nakon heterospermičnog osjemenjivanja primjećen je u danskoj uzgajivačnici patuljastih pasmina kod kuja prethodno dokazane plodnosti.

Ključne riječi: pas, umjetno osjemenjivanje, dokazivanje očinstva, ocjena ejakulata, heterospermično osjemenjivanje

## 12. SUMMARY

### **Raič, I.: Heterospermic insemination in bitches**

The idea of heterospermic insemination in dog breeding is to give equal chances to both possible males to fertilize the eggs due to specific oestrus cycle of the bitch.

The data was collected in the period of 2 years from 2 breeding bitches with genetically proven reproductive history. Bitches belong to the breed Petit Basset Griffon Vendéen that produced altogether 3 litters and 14 puppies. In order to get more objective results we have included data from international questionnaire that was presented to the breeders worldwide. Prior every breeding with fresh semen stud dogs semen was collected and evaluated for the following parameters: colour, volume, progressive motility, morphology, concentration, viability and functional integrity of sperm membrane (HOS test and Bloom staining). Breeding time of each bitch was determined by measuring progesterone (P<sub>4</sub>) levels. P<sub>4</sub> concentration at the onset of ovulation was 4,2 ng/mL. Two inseminations with fresh mixed semen were done using transcervical insemination, while 3<sup>rd</sup> insemination with frozen semen was done surgically.

Initial individual semen testing showed minimum deviations in all tested parameters as well as on the days of inseminations. Semen volume was adjusted for each breeding based on quality parameters, to give equal chances to both males to fertilize eggs. All dogs had DNA profiles done before inseminations.

Puppies were born 58- 60 days after 1<sup>st</sup> insemination. Blood samples were collected on week 5 via jugular venipuncture or after birth via umbilical venipuncture into EDTA vacutainer tubes for genetic analysis. Final results in 1<sup>st</sup> dual sired litter showed 6 puppies from stud A (4 ♂, 2♀) and 1 puppy from stud B (♂), second litter showed 6 puppies(3 ♂, 3♀) from stud A, third litter showed 1 puppy (1♀) from stud B. No monozygotic twins were born. Based on international questionnaire, the best parentage ratio was after surgical insemination with frozen semen (5:5), while other litters that included either natural matings or mixed fresh semen showed litters with one sire dominating over other in the parentage ratios. Improved reproductive performance was detected in Danish toy breed kennel within bitches with previously proven reproductive history.

Key words: canine, artificial insemination, paternity testing, semen quality, heterospermic insemination

### 13. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 30.05.1988. u Zadru. Osnovnu, a zatim i srednju školu Ivana Meštrovića završila sam u Drnišu. Aktivno uzgajam pse od 2003. godine od kada sam uključena u brojne uzgojne programe različitih pasmina u svrhu unaprijeđenja kako zdravlja pasa tako i očuvanja i proširivanja genetskog bazena. Sudjelovala sam na brojnim edukacijama vezanih za genetiku pasa i načine selekcije u Europi i SAD-u.

Zbog istaknutog interesa za porodništvo i reprodukciju pasa sam htjela da moj diplomski rad bude ujedno i istraživački, s obzirom na dugogodišnji uzgoj pasmine petit basset griffon vendeen i njihov mali genetski bazen, tema istraživanja je „Heterospermično osjemenjivanje kuja“.

Prisustvovala sam na Simpoziju veterinaru male prakse Srbije (SIVEMAP) 17.-19.11.2017. u Beogradu, Europskom seminaru studenata veterinarske medicine (EVSS) 14.-17.06.2018. u Zagrebu, Istočnoeuropskoj veterinarskoj konferenciji (EERVC) 4.-6.10.2018. u Beogradu, aktivno sudjelovala u organizaciji radionice na stručno-edukativnom skupu Inter Medical Vet Forum „Naša praksa“ 17.-18.05.2019. u Termama Tuhelj u organizaciji tvrtke Medical Intertrade d.o.o., sudjelovala sam u organizaciji događaja „Meet the breeds“ 25.05.2019. godine koji se održao na Veterinarskom fakultetu te okupio 16 različitih pasminskih klubova, pohađala radioncu „Ultrazvučni pregled abdomena: osnovna razina“ 12.10.2019., prisustvovala Simpoziju veterinaru male prakse Srbije (SIVEMAP) 15.-17.11.2019 u Beogradu, Noći muzeja 31.01.2020. na „Stotoj obljetnici suživota“ te na brojnim drugim događajima u svrhu promocije Veterinarskog fakulteta kao što su Festival znanosti, 08. – 13. travnja 2019. u Tehničkom muzeju Nikola Tesla i trodnevne Smotre sveučilišta u studenom 2019. Aktivno sam sudjelovala na kongresu „Veterinarska znanost i struka“, Zagreb, 10.-12.10.2019., gdje sam usmeno prezentirala slučaj „Prvo heterospermično leglo u Hrvatskoj“. Osim toga, volonterka sam na Klinici za porodništvo i reprodukciju od 2018. godine. Također sam bila predavač na radionicama o biomehanici pasa i njezi čistokrvnih pasa u Finskoj, Švedskoj, Islandu i SAD-u.

Aktivno se služim engleskim jezikom, a pasivno češkim, slovačkim i njemačkim.