

# UMJETNO OSJEMENJIVANJE I DUBOKO SMRZAVANJE SPERME PTICA

---

**Golob, Anže**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2021**

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:178:927935>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-11-01**



*Repository / Repozitorij:*

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



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
VETERINARSKI FAKULTET**

**Anže Golob**

**UMJETNO OSJEMENJIVANJE I DUBOKO SMRZAVANJE SPERME  
PTICA**

**Zagreb, 2021.**

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU**

**VETERINARSKI FAKULTET**

**Klinika za porodništvo i reprodukciju**

**Predstojnik prof. dr. sc. Marko Samardžija**

**Zavod za fiziologiju i radiobiologiju**

**Predstojnik prof. dr. sc. Marinko Vilić**

Mentori: prof. dr. sc. Marko Samardžija

doc. dr. sc. Ivana Žura Žaja

**ČLANOVI POVJERENSTVA ZA OBRANU DIPLOMSKOG RADA:**

1. izv. prof. dr. sc. Martina Lojkić
2. doc. dr. sc. Ivana Žura Žaja
3. prof. dr. sc. Marko Samardžija
4. izv. prof. dr. sc. Nino Maćešić (zamjena)

# SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. FUNKCIONALNA ANATOMIJA REPRODUKTIVNOG SUSTAVA PTICA .....	2
2.1 Ženski spolni organi .....	2
2.2 Lijevi jajnik (ovarium sinistrum) .....	2
2.2.1 Embrionalni razvoj jajnika.....	2
2.3 Folikul jajnika ( <i>Folliculus ovaricus</i> ).....	4
2.3.1 Struktura.....	4
2.3.2 Sazrijevanje jajnih stanica.....	5
2.3.3 Post-ovulacijski i atretički folikul.....	6
2.3.4 Endokrina aktivnost lijevog jajnika .....	6
2.4 Lijevi jajovod ( <i>Oviductus sinister</i> ).....	7
2.4.1 Lijevak ( <i>Infundibulum</i> ).....	8
2.4.2 Magnum ( <i>Magnum</i> ) .....	8
2.4.3 Suženi dio jajovoda ( <i>Isthmus</i> ).....	9
2.4.4 Maternica ( <i>Uterus</i> ).....	9
2.4.5 Rodnica ( <i>Vagina</i> ) .....	10
2.4.6 Razvoj jajašca .....	11
2.5 Spolni organi mužjaka.....	13
2.5.1 Testisi.....	13
2.5.2 Nuzjaje ( <i>Epididimis</i> ) .....	15
2.5.3 Sjemenovod ( <i>Ductus deferens</i> ) .....	16
2.5.4 Organi za kopulaciju .....	17
2.6 Spermiji i njihov razvoj.....	18
2.7 Spermatogeneza .....	20
2.8. Ocjenjivanje sjemena .....	25
2.8.1. Koncentracija sjemenske tekućine.....	25
2.8.2. Optička gustoća (fotometrija) .....	26
2.8.3. Održivost sperme .....	26
2.8.4. Dilucija sjemena.....	26
2.9. Postupak umjetnog osjemenjivanja ženki .....	28
2.10. Čuvanje sjemena.....	29
2.10.1. Uporaba .....	29

2.10.2.	Krioprezervacija sjemena ptica .....	30
2.10.3.	Krioprotektori.....	31
3.	RASPRAVA.....	37
4.	ZAKLJUČAK.....	38
5.	SAŽETAK.....	39
6.	SUMMARY.....	40
7.	POPIS LITERATURE.....	41
8.	ŽIVOTOPIS.....	42

## POPIS SLIKA

Slika 1: Ženski spolni organi (Prema King i Mclelland, 1984.).	2
Slika 2: Histološki preparat jajnika spolno nezrele fazanke ( <i>Phasianus colchicus</i> ). Kora (sk) i dobro vaskularizirana jezgra (sr) vidljivi su izvana prema unutra. Folikuli jajašaca (strelice) leže unutar kore. Bojanje HE, uvećanje vol. 10 x ok 1,5 (Golob, 2011.).	5
Slika 3: Prikaz građe lijevog jajnika u nesilice. Jasno su vidljivi primarni, sekundarni i tercijarni folikuli te postovulacijski folikul (Golob, 2011.).	7
Slika 4: Hormonsko aktivni jajnik spolno zrele jarebice ( <i>Perdix perdix</i> ) pred početkom nesenja (Foto: Anže Golob, 2021.).	7
Slika 5: Anatomski prikaz celomične šupljine ženke goluba kamenjara ( <i>Columba livia</i> ).	11
Slika 6: Anatomska raspodjela jajovoda s histološkim slikama i prikaz razvoja jajeta po vremenskim razdobljima (Golob, 2011.).	12
Slika 7: Spolni organi mužjaka (Prema King i Mclelland, 1984.).	13
Slika 8: Par testisa u leđnom dijelu koelomske šupljine kod kamenjara ( <i>Columba livia</i> ) (Foto: Anže Golob, 2021.).	14
Slika 9: Histološka struktura testisa u spolno zrelog kanarincu ( <i>Serinus canaria</i> ).	14
Slika 10: Histološki preparat prstena spolno nezrelog fazana ( <i>Phasianus colchicus</i> ).	16
Slika 11: Slika prikazuje dvije vrste spermija: a. jednostavnu vrstu kod pijetla i b. složenu vrstu zebe (King, Mclelland 1984, uz ljubazno dopuštenje autora).	19
Slika 12: Elektronska mikroskopska slika jednostavne vrste sperme: glava (žuta strelica) i bič (crvena strelica) prepelice ( <i>Coturnix coturnix</i> ). (Originalna snimka dr. Zlatka Goloba: MF Ljubljana, 2011.)	19
Slika 13: Stijenka sjemenske cjevi (crvena strelica) s pripadajućim sjemenskim epitelom kod spolno aktivnog mužjaka prepelice ( <i>Coturnix coturnix</i> ). (Originalni snimak dr. Zlatko Golob: MF Ljubljana, 2011.).	21
Slika 14: Vrste elektroda za izvođenje elektroejakulacije.	24
Slika 15: Uređaj ima dva različita izlazna napona: od 0 do 12 V i od 0 do 50 V.	24
Slika 16: Električni ejakulator za ptice i male sisavce i majmune.	24
Slika 17: Spermiji indijskog ždrala ( <i>Grus antigone antigone</i> ) (Foto: Anže Golob: Belgija, 2020.).	27
Slika 18: Sperma ždralova s crnim vratom ( <i>Grus nigricolis</i> ) (Foto: dr. Zlatko Golob. Belgija, 2018.).	28
Slika 19: Umjetno osjemenjivanje velike droplje ( <i>Otis tarda</i> ) uz pomoć spekuluma i aplikacije (ECPWP Emirates center, 2017.).	33
Slika 20: Gospodin Bram Ciertes, director Tropic ZOO Belgija, jedan je od najboljih osjemenitelja rijetkih i ugroženih vrsta ptica u Europi.	33
Slika 21: Primjena sperme u kloaku kod indijskog ždrala ( <i>Grus Antigone antigone</i> ).	34
Slika 22: Dr. Zlatko Golob DVM, specijalist za liječenje malih, divljih i egzotičnih životinja, bavi se umjetnim osjemenjivanjem rijetkih i ugroženih vrsta i liječenjem poremećaja plodnosti u uzgojnom centru, te brine o očuvanju mozaika biološke raznolikosti.	34
Slika 23: Otvor jajovoda kod ženke indijskog ždrala ( <i>Grus antigone antigone</i> ).	35
Slika 24: Primjena sjemena u jajovod ženke indijskog ždrala ( <i>Grus antigone antigone</i> ).	35
Slika 25: Priprema primjene sjemena u kloaku ženke crnovratog ždrala ( <i>Grus nigricolis</i> ). Domovina: Butan, S Indija, Kina (Zoološki vrt Bram Ciertes Tropic, Belgija 2019.).	35
Slika 26: Primjena sjemena u jajovod ženke crnovratog ždrala. (Zoološki vrt Bram Ciertes Tropic, Belgija 2019.).	36

Slika 27: Demonstracija primjene sperme u jajovod ženke indijskog ždrala ( <i>Grus antigone antigone</i> ). (Uz dopuštenje zoološkog vrta Tropic, Belgija). .....	36
Slika 28: Rezultat umjetne oplodnje. Mladunci crnovratih ždralova ( <i>Grus nigricolis</i> ). Očuvanje rijetkih i ugroženih vrsta ptica; konzervatorska veterina. Ljubaznošću zoološkog vrta Tropic, Belgija. ....	36

## POPIS TABLICA

Tablica 1: Trajanje skladištenja sperme u sjemenskim cijevima.....	20
Tablica 2: Koncentracija sperme i volumen ejakulata kod nekih ptica. (Birkhead i Moller, 1992.).....	22
Tablica 3: Koncentracija (mM) i glavne komponente krvi i sjemene plazme kod pijetlova i purana (Khrayat i sur., 2016).....	25

## **ZAHVALA**

*Zahvaljujem svojim mentorima profesoru dr. sc. Marku Samardžiji i doc. dr. sc. Ivoni Žuri Žaja za svu stručnu podršku i pomoć u pisanju diplomskog rada. Želim zahvaliti svojoj obitelji, posebno majci Branki koja me podržala i pomogla mi u učenju i pokazala mi da kad dođemo na vrh planine, tek se počinjemo penjati. Veliku zahvalnost dugujem svom dragom ocu, veterinaru specijaliziranom za male, divlje i egzotične životinje, koji već 20 godina vodi sklonište za zaštićene divlje životinje u Sloveniji. Svoje znanje sije po cijelom svijetu: Rusija, Maroko, Tajland, Belgija, Nizozemska, Austrija itd., sve za njihovo zdravlje, dobrobit i očuvanje biološke raznolikosti. Moj dragi otac stavio mi je ljubav prema životinjama u kolijevku. Odrastao sam s njima, postali su važan dio mog života. Brzo sam shvatio prolaznost koja je skovala stepenice do njihovih vrata kako bih bolje razumjela njihovu nevolju i bol, koje bih ublažila i izliječila i omogućila im dostojanstven život. Moj moto u budućnosti bit će razviti medicinu rijetkih i ugroženih vrsta (konzervacijski lijek) kako bi svojom posebnosti mogli usrećiti naše potomke.*

*Također bih se zahvalio profesorici slovenskog i engleskog jezika Ivanki Stopar, prof., koja je uvijek osjećala kamo puše vjetar i pomagala ga usmjeriti na jedro kako bi brod mogao pronaći luku. Zahvaljujem i svima ostalima koji su me podržavali i pomagali tijekom dugogodišnjeg studija i omogućili mi da uspješno dovršim ovo poglavlje u svom životu.*



# 1. UVOD

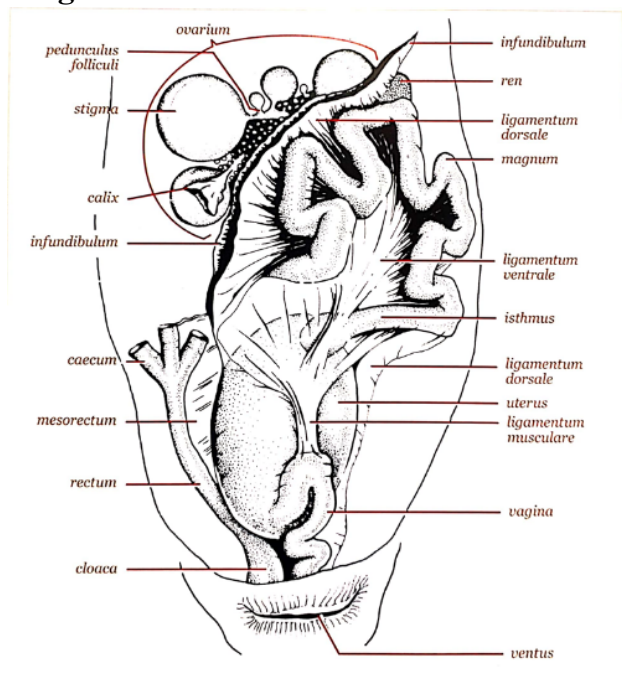
Umjetno osjemenjivanje ptica je neinvazivan postupak u tehnologiji umjetnog osjemenjivanja. Veliki je interes za njezinu provedbu na velikim farmama peradi, kao i za uzgojne programe uzgajališta i zooloških vrtova za očuvanje genetske varijabilnosti i biološke raznolikosti te zaštitu rijetkih i ugroženih vrsta ptica, što je dio konzervacijske medicine, grane veterine s velikom perspektivom.

U radu sam predstavio funkcionalnu anatomiju reproduktivnog sustava ptica, prikupljanje i procjenu sperme te njeno zamrzavanje. Dubinsko smrzavanje sperme u ptica složen je postupak koji još nije postigao željene rezultate. Najveći problem ovog postupka je slaba plodnost nakon odmrzavanja koja pada i do 50 % ili više, ovisno o krioprotektoru i vrsti ptica. Danas se intenzivno istražuje kako poboljšati plodnost sperme tijekom smrzavanja i nakon otapanja. U drugome dijelu diplomskog rada ukratko predstavljam zanimljive postupke pripreme za uzimanje sjemena mužjaka te uzimanje sjemena s izravnom umjetnom oplodnjom neposredno nakon uzimanja sperme. Naša veterinarska klinika, zajedno s belgijskim zoološkim vrtom Zoo Tropic, bavi se uglavnom umjetnim osjemenjivanjem ždralova, a surađujemo i s uzgojnim centrom za velike droplje (*Otis tarda*) u južnoj Španjolskoj i s uzgajalištem afričke droplje (*Chlamydotis undulata*) u Maroku. Snimke su vlastite i originalne.

Najvažniji cilj diplomskog rada je otvaranje nove grane veterinarske medicine "Konzervacijska medicina - conservation medicine", koja se brine o očuvanju rijetkih i ugroženih vrsta te zaštitom biološke raznolikosti.

## 2. FUNKCIONALNA ANATOMIJA REPRODUKTIVNOG SUSTAVA PTICA

### 2.1 Ženski spolni organi



Slika 1: Ženski spolni organi (Prema King i Mclelland, 1984.).

Ptice su zadržale oviparni reproduktivni sustav gmazova i jedina su skupina kralježnjaka koji nisu razvili živorodnost, no količina žumanjka u jajetu uvelike se povećala zbog potreba toplokrvnog embrija. Već se u ptičjem embriju razvijaju dvostrano simetrične spolne žlijezde. Kasnije u razvoju, njihov lijevi jajnik s jajovodom brzo premašuje desni par. U odraslih ženki aktivan je lijevi jajnik s jajovodom, a desni se smanjuje. Među vrstama s potpuno razvijenim jajnicima s jajovodima nalaze se grabežljivci i smeđi kivi, a oba jajnika prisutna su u još najmanje vrsta 16 ptica. U smeđem kiviju s dva aktivna jajnika postavljena je pojedinačna lijeva jajovodna cijev koja prima oocite iz oba jajnika (Golob, 2011.).

### 2.2 Lijevo jajnik (ovarium sinistrum)

#### 2.2.1 Embrionalni razvoj jajnika

U ženki domaće kokoši kao i u mnogih drugih vrsta u ranom se embrionalnom razvoju područje spolnih žlijezda zametne stanice naseljavaju više lijevo nego desno. Početna asimetrija dodatno se povećava migracijom mnogih zametnih stanica iz desne u lijevu spolnu žlijezdu. Stoga je lijeva spolna žlijezda veća od desne već prije valjenja.

Između 6. i 7. dana inkubacije, kod domaće kokoši, iz zametnog epitela razvijaju se primarne spolne tračke, koje oblikuju jezgre jajnika kod ženki i sjemenske cjevčice u mužjaka. U ženki se zametni epitel množi u zadebljanu perifernu zonu stanica odvojenih od primarnih spolnih vrpca bjelkastim slojem vezivnog tkiva (*Tunica albuginea*).

Između osmog i jedanaestog dana inkubacije iz ove zadebljale periferne zone stanica počinje izbijati drugi val stanica koje rastu prema dolje i predstavljaju sekundarne spolne tračke, dok se iz njih razvijaju oogoniji. Oni se aktivno dijele i razvijaju u primarni oocit. Oni nastanjuju jajnik kod izlijeganja. U ovom stadiju dosežu fazu prve redukcijske podjele. Žumanjak se u njemu nakuplja i raste do konačne veličine. Postoje tri faze oogeneze: razdoblje razmnožavanja, rasta i faza sazrijevanja. Broj jajnih stanica u kokošnjem embriju povećava se s oko 28 000 devetog dana razvoja na 680 000 sedamnaestog dana razvoja, nakon čega se broj smanjuje na 480 000 u trenutku izlijeganja, kada oogeneza završava.

Jajnik nezrele ženke sastoji se od mase malih oocita, od kojih je najmanje 2.000 vidljivo golim okom. Samo nekoliko od njih, oko 200 do 500, dostigne zrelost i ovulira tijekom života udomaćenih vrsta. Funkcionalno zreli jajnik kokoši ima folikule poredane u hijerarhiji. Obično postoje četiri velika folikula ispunjena žumanjkom, promjera od 2 do 4 cm, popraćena velikim brojem žutih folikula od 2 do 10 mm, te mnoštvo malih, bijelih.

U domaćih kokoši masa primarnog oocita je oko 20g. Na kraju rasta oociti dovršavaju dva redukcijska dijeljenja, nakon prvog stvara se sekundarni oocit, a nakon drugog jaje.

Dodatna zanimljivost: jedna od najvećih stanica na našem planetu bio je oocit izumrle madagaskarske slonovske ptice, promjera oko 37 cm i volumena veličine kante.

Od izlijeganja do dobi od 4 mjeseca lijevi jajnik polako raste kod domaće kokoši, dosežući duljinu od 1,5 cm i težinu oko 0,5 g. U ovoj se fazi sastoji od kore i jezgre. Korteks okružuje jezgru, osim na mjestu gdje jajnik dodiruje leđnu tjelesnu stijenku. Vanjska površina korteksa okružena je niskim ili ravnim peritonealnim epitelom koji još uvijek postoji u vrijeme nezrelosti. Ispod epitela nalazi se sloj čvrstog veziva.

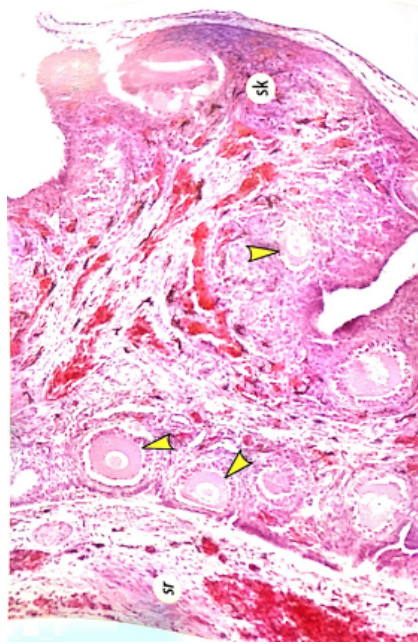
Između 18 i 24 tjedna rast se uvelike ubrzava tako da oociti dosegnu konačnu veličinu i izgubi se granica između kore i jezgre. Korteks u ovoj fazi čine parenhimska zona s mnogim nezrelim folikulima, a jezgra nepravilnim vaskularnim zonama s krvnim žilama, živcima, glatkim mišićima i intersticijem. U završnoj fazi brzog rasta, promjer primarnih oocita povećava se sa 6 mm na 40 mm za 6 dana. Jajnik u ovom trenutku teži oko 60 g i visi na nosaču jajnika (mesovarium). To je nabor peritoneuma koji leđnu površinu nezrelog jajnika pričvršćuje na leđnu stijenku u cjelini. Dok zrelog ojačavaju vezivno tkivo, glatki mišići i krvne žile te živci u pukotini jajnika (hilus ovarii), gdje ulaze žile i živci.

Tijekom spolne aktivnosti lijevi jajnik nalikuje grozdu zbog niza velikih folikula. U kokoši koje aktivno polažu jaja, na jajniku je 4 ili 5 vrlo velikih folikula promjera 40 mm i nekoliko tisuća ili više manjih. U fazi mirovanja lijevi se jajnik smanjuje i u domaće kokoši teži samo 2 do 6 g. Ženke nekih ptica imaju pigmentirani jajnik. Primjerice, kod nojeva i nandua jajnik je žutosmeđe, dok je kod emua tamnozelen. Tkivo jajnika može biti više ili manje crnkasto, posebno u kakadua, ara i nekih drugih papiga. U ptica koje se uzgajaju sezonski, općenito razlikujemo 3 faze u jajniku: faza ubrzanja prije razmnožavanja, u kojoj se jajnik povećava; vrhunac faze kada dolazi do ovulacije i izlijeganja jajašaca i faze mirovanja kada je jajnik mali. Te su faze više-manje istodobne s usporedivim fazama u testisima i regulirane su neuroendokrinim sustavom. Arterijska krv lijeve kranijalne bubrežne arterije jajovodom se isporučuje u jajnik. Dreniraju je dvije jajne žilice izravno u kaudalnu venu kavu (King i Mclelland, 1984., Mclelland, 1990., Nomina anatomica avium, 1993., Golob, 2011).

## **2.3 Folikul jajnika (*Folliculus ovaricus*)**

### **2.3.1 Struktura**

Jajna stanica je okrugla i relativna velika, ali veličina varira i ovisi o količini žumanjka. Primarni oocit ptice najveća je stanica u životinjskom svijetu. U citoplazmi jajne stanice razlikujemo: vlastitu plazmu (idioplazma) i hranjivu plazmu (deutoplazma). Deutoplazma se sastoji uglavnom od žumanjka (*vitellus*), a koji se sastoji od koncentriranih hranjivih sastojaka. Žumanjak služi za ishranu embrija, a njegov je sadržaj raspoređen polarno. Razlikujemo animalni pol ili pol zametka i vegetativni pol ili pol žumanjka jajeta. Na peteljci vise obješeni folikuli (*pedunculus folliculi*), koji sadrže glatke mišiće (*musculi pedunculares*) te krvne žile i živce. Ti mišići izvana ulaze u gornji sloj i tvore intramuralne mišićne snopove (*musculi intramurales*). U svakom folikulu nalazi se primarni oocit okružen stijenkom koja se sastoji od 6 slojeva (Harrison i Lightfoot, 2006., Golob 2011).



*Slika 2: Histološki preparat jajnika spolno nezrele fazanke (Phasianus colchicus). Kora (sk) i dobro vaskularizirana jezgra (sr) vidljivi su izvana prema unutra. Folikuli jajašaca (strelice) leže unutar kore. Bojanje HE, uvećanje vol. 10 x ok 1,5 (Golob, 2011.).*

### **2.3.2 Sazrijevanje jajnih stanica**

Na kraju razdoblja rasta proces sazrijevanja nastavlja se u oocitima. Nakon prve redukcije ili mejotičke diobe, iz diploidnog primarnog oocita izbijaju sekundarni oocit i prvo polarno tijelo s haploidnim brojem kromosoma. Otprilike 2 sata prije ovulacije primarni oocit je još uvijek u folikulu. Nakon toga slijedi ovulacija. U ovaj proces je uključen luteinizirajući hormon adenohipofize. Broj ovulacija je specifičan za vrstu.

Do ovulacije dolazi kod kokoši 15 do 75 minuta nakon što se izlegne prethodno jaje, dok je kod grabežljivaca to vrijeme dulje. Novootpušteni sekundarni oocit ulazi u lijevak jajovoda. Jajovod ne pohvata sve ovulirane oocite. Izlijeganje u trbušnoj šupljini ili unutarnje izlijeganje prilično je često, pogotovo kada ženka ulazi ili izlazi iz razdoblja nesenja, jer u tom vremenu jajovod i jajnik nisu usklađeni. Neki od tih oocita se potpuno izgube i apsorbiraju se bez štete u roku od 24 sata, dok neki mogu prouzročiti peritonitis jaja. To su vrlo česta stanja viđena na kraju nesenja jaja kod kokoši, purana i pataka.

Kao posebna značajka, kod smeđeg kivijsa, lijevak lijevog jajovoda prima ovulirane folikule iz oba jajnika. Druga mejotička dioba, koja tvori jaje i sekundarno polarno tijelo, događa se u jajovodu. Do oplodnje dolazi oko 15 minuta nakon ovulacije, čak i prije nego što je jaje prekriveno bjelanjkom. To se događa u lijevku jajovoda. Oplodnja je spoj muških i ženskih pronukleusa. Polispermija je prilično česta u ptica. U svih ptica sperma sadrži Z kromosom, a

ženski oociti sadrže W ili Z kromosom pa je ženka ta koja određuje spol kod ptica (King, McLelland, 1984., Golob, 2011).

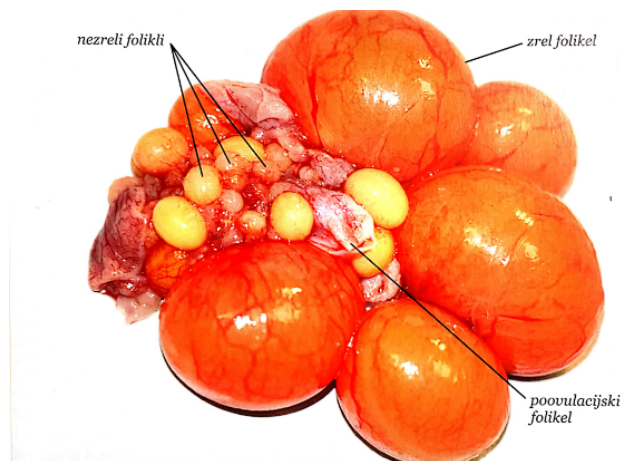
### **2.3.3 Post-ovulacijski i atretički folikul**

Neposredno nakon ovulacije folikul se smanjuje i poprima oblik vrećice s tankom stijenkom bez krvnih ugrušaka, koja se zatim brzo smanjuje. Deseti dan nakon ovulacije završena je regresija kod domaćih kokoši i većine drugih vrsta. U ptica nema postojanog post-ovulacijskog žutog tijela. Potpuno se resorbira u 8 do 10 dana kod kokoši, a kod pataka tek nakon nekoliko mjeseci. Folikuli koji nisu dostigli stupanj ovulacije atreziraju. Pritom se sadržaj oocita resorbira u krvožilni sustav ili filtrira kroz poderane slojeve teke u peritonealnu šupljinu. Nakon razdoblja nesenja slijedi faza polijeganje jaja i izlijeganje mladunaca. Za to vrijeme nanovo razvijeni oociti propadaju zbog resorpcije. Nakon atrezije slijedi razdoblje mirovanja u kojem je mirujući jajnik skvrčen, izgledom sličan juvenilnom jajniku.

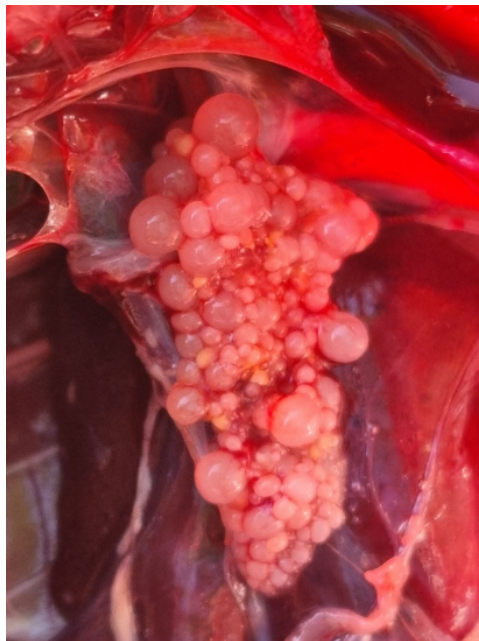
### **2.3.4 Endokrina aktivnost lijevog jajnika**

Progesteragen izlučuju stanice granuloze preovulatornog, a možda i postovulatornog folikula. Intersticijske stanice teke izlučuju estrogene i androgene, uz njih, androgene stanice izlučuju i intersticijske stanice koje leže u vezivnom tkivu jajnika izvan folikula. Intersticijske stanice su velike vakuolirane stanice jajnika. Glavni izvor progesterona su stanice granuloze, a stanice teke progesteron pretvaraju u androgene i estrogene.

Osam sati prije ovulacije vršne koncentracije progesterona i estrogena prisutne su u najvećem i najmanjem preovulacijskom folikulu, dok koncentracije testosterona u najvećem preovulacijskom folikulu opadaju neposredno prije ovulacije. Postovulatorni folikul je hormonski aktivan. Sadržaj progesterona u ovom folikulu smanjuje se prvih 15 sati nakon ovulacije. Dvadeset do dvadeset i sedam sati nakon ovulacije, razina estrogena privremeno raste. U folikulima prije i poslije ovulacije nalaze se i prostaglandini E i F. U najzrelijem folikulu nalaze se i visoke koncentracije adrenalina i noradrenalina, ali ne i dopamina. Koncentracija histamina raste u predovulacijskom folikulu njegovim sazrijevanjem, nakon toga pada u vrijeme ovulacije i ponovno raste najmanje dva dana u tkivu postovulatornog folikula (Golob, 2011.).



*Slika 3: Prikaz građe lijevog jajnika u nesilice. Jasno su vidljivi primarni, sekundarni i tercijarni folikuli te postovulacijski folikul (Golob, 2011.).*



*Slika 4: Hormonsko aktivni jajnik spolno zrele jarebice (Perdix perdix) pred početkom nesenja (Foto: Anže Golob, 2021.).*

#### **2.4 Lijevi jajovod (*Oviductus sinister*)**

Kod ženke koja nese jaja lijevi jajovod u cijelosti ispunjava veći dio dorzalnog i kaudalnog dijela lijeve strane. Kod domaće kokoši teži oko 75 g i dugačak je 65 cm. Tijekom razdoblja mirovanja smanjuje se i teži oko 5 g i dugačak je 15 cm. Lijevi jajovod sastoji se od 5 dijelova: lijevka, magna, suženog ili istmičnog dijela, maternice i rodnice. Njegova je struktura ujednačena u svih ptica sa samo manjim razlikama, od kojih većina nema funkcionalno značenje. Stijenka jajovoda sastoji se od 7 glavnih slojeva s malim regionalnim razlikama. Pokožica (epidermis) se sastoji od vrčastih i trepljastih stanica. Vrčaste stanice su velike i brojne

u magnumu, gdje doprinose svojim izlučivanjem bjelanjku svakog jajeta. Trepeljlikave stanice na svim područjima trepere u smjeru kloake, a u dijelu magnuma i prema lijevku. Treperenjem najvjerojatnije igraju zaštitnu ulogu sličnu onoj u gornjim dišnim putovima. U spolno neaktivnih kokoši smanjuje se broj trepetljikavih stanica. Odmah ispod epitela leži rahlo vezivno tkivo i višestanične cjevaste žlijezde. Propria sluznice tvori uzdužne spiralne primarne nabore (*plicae primariae*) koji nose sekundarne nabore (*plicae secundariae*). Veličina nabora varira ovisno o području. Cjevaste žlijezde otvaraju se na sluznim naborima cjevastog dijela lijevka, magnuma, istmusa (osim prozirnog područja) i maternice. Žljezdane brazde nalaze se samo u lijevku. Sluznica je odvojena od mišićnog sloja slojem dobro vaskulariziranog i inerviranog vezivnog tkiva (tijelo submukoze). Nakon toga slijedi kružni i uzdužni sloj glatke muskulature između kojeg se nalazi vezivno tkivo s većim krvnim žilama. U rodnici i maternici mišićni slojevi su najdeblji, a najtanji u lijevku.

Funkcija mišića je prijenos sperme u jajovod retroperistaltikom i potiskivanje jajne stanice prema dolje peristaltičkim valovima. Stražnji sloj je serozni peritonealni sloj (*tunica serosa*).

U spolno nezrelih trkačica otvor jajovoda na spoju rodnice i mokraćovoda prekriven je tankom opnom koja pukne kad ženka položi prvo jaje, često krvareći, što se odražava u okrvavljenoj ljusci jajeta.

#### **2.4.1 Lijevak (Infundibulum)**

Lijevak je početni dio jajovoda koji se prema jajniku otvara izduženim lijevkastim otvorom, ustima, (*ostium infundibularae*) s tankim usnama (*fimbriae infundibulares*) prekrivenim trepetljikavim epitelom. Slijedi usko cjevasto područje (*tubus infundibulares*), u kojem se nalaze žlijezde (*glandulae tubi infundibularis*), koje sintetiziraju tvar iz koje nastaju halaze (*chalase*) i halazni sloj (*stratum chalaziferum*) bjelanjka.

Cjevasto područje karakteriziraju žljezdane brazde (*fossae glandulares infundibuli*) u kojima se može čuvati sperma. U slučaju domaće kokoši, lijevak je dugačak 7 cm, a samo usta lijevka imaju 9 cm. Kod nekih vrsta ptica poznato je da spermiji u lijevku mogu preživjeti oko 3 tjedna.

#### **2.4.2 Magnum (Magnum)**

Magnum je najduži dio jajovoda u kojem se nalaze 2 vrste žlijezda, cjevaste i intraepitelne. Tubularne žlijezde magnuma nalaze se u propriji primarnih nabora (*plicae primariae*) sluznice. Tubularne žlijezde proizvode ovotransferin i ovomukoid. Stanice žlijezda intraepitela



proizvode avidin. Te žlijezde izlučuju unutarnji sloj rijetkog bjelanjka (*albumen rarum*). Područje neposredno pred suženjem izlučuje gusti bjelanjak (*albumen densum*). Prelazak iz lijevka u magnum je iznenađan, a obilježen je velikim sluzničnim naborima. Kod domaće kokoši dužina magnuma je oko 34 cm. Ovi nabori su veći i deblji nego u drugim dijelovima jajovoda, što povećava sekretorno područje sluznice za 3 puta. Neposredno prije ovulacije tubularne žlijezde i njihove stanice napunjene su izlučevinama koje čine većinu bjelanjaka jajeta, tako da su žlijezde i žljezdano vezivo gotovo nevidljivi. Magnum ima mliječno bijelu boju zbog prisutnosti ovog sekreta. Kokoši koje nesu jaja s vodenkastim bijelim bjelanjkom imaju nepravilne sekretorne stanice. U zadnjem dijelu magnuma je smanjen broj nabora i tubularnih žlijezda, a žljezdane stanice sadrže mnogo sluzi. Jaje se kreće kroz magnum zbog peristaltičkog djelovanja glatkih mišića.

#### **2.4.3 Suženi dio jajovoda (*Isthmus*)**

Ovaj kratki dio jajovoda kod domaćih je kokoši dugačak oko 8 cm. Nabori sluznice u ovome dijelu su manje izraženi nego u magnumu, a histološki nose sekundarne nabore. Prozirno područje (*pars translucens isthmi*) nema tubularnih žlijezda, dok ih preostali dio suženja ima i histološki su slične onima u magnumu.

Samo stanice iz žlijezda suženog dijela (*glandulae isthmi*) sadrže proteine sa sumporom, što je u skladu s proizvodnjom membrane jaja od keratina na ovom mjestu. Bjelanjku dodaju nešto bjelančevina i vodu. Tu se pojavljuje prvo nakupljanje kalcija. Vanjska i unutarnja membrana jajeta oblikuju se prvi i drugi sat prolaska kroz suženi dio jajovoda.

#### **2.4.4 Maternica (*Uterus*)**

To je izraz za dio jajovoda koji se koristi u ptičjoj anatomiji više od 150 godina. Ne postoji jasna anatomska granica između suženja i maternice. Kod domaće kokoši duga je oko 8 cm. Kranijalni dio maternice je kratak i uzak kroz koji jajašce brzo prolazi. Glavni dio maternice (*pars major uteri*) sličan je džepu i u njemu se zadržava jaje tijekom stvaranja ljuske. Ovdje jaje provodi većinu svog vremena putovanja.

Jaje dobiva vanjsku ljusku u maternici. U većine vrsta ptica ljuska je pigmentirana. U duplarima je bez pigmenta. Početak kalcifikacije povezan je sa stimulatorima koji utječu na početak ovulacije ili s neuroendokrinim čimbenicima koji kontroliraju i koordiniraju ovulaciju i lučenje kalcija. Prilikom kretanja kroz ovaj dio jajovoda jaje se uvija i okreće. Mjesta u maternici gdje izlučuje pigment označena su ljuskom jajeta tijekom prolaska i formira se vidljivi obrazac njegovog kretanja. Pigmenti ljuske derivati su porfirina i biliverdina koji

nastaju tijekom razgradnje mrtvih eritrocita u jetri i prenose se krvotokom u maternicu. Za stvaranje ljuske jajeta potrebno je oko 20 do 26 sati. Jaje se kalcificira za oko 15 sati, a u posljednjih 5 sati stvara se pigment ljuske.

#### 2.4.5 Rodnica (*Vagina*)

Rodnica je kratka mišićna cijev u obliku slova S koja spaja maternicu i kloaku. Kod domaće kokoši dugačka je oko 8 cm. Snažni mišićni sloj stijenke deblji je nego bilo gdje drugdje u jajovodu. Mišić sfinktera rodnice (*musculus sphincter vaginae*) zadebljanje je mišićnog sloja prvog segmenta rodnice. U području nabora mišića sfinktera odn. na mjestu uterovaginalnog kontakta nalaze se epitelne udubine u sluznici (spermalna gnijezda) u kojima se čuvaju spermiji (*tubuli spermatici*). U manjoj su mjeri prisutni i u lijevku jajovoda. Ovo je uobičajena osobina ptica.

U vrijeme oplodnje spermiji dođu do vrha jajovoda, ali nestaju u roku od 24 sata, a mali broj spermija pojavljuje se u lumenu jajovoda, u vrijeme svake sljedeće ovulacije. Sjeme se čuva i zadržava sposobnost oplodnje kod kokoši 7 do 14 dana, kod ždralova oko 20 dana, a kod purana 40 do 50 dana. Za vrijeme dok ženka liježe jaja, uskladišteni se spermiji oslobađaju iz tih udubina, osiguravajući da su spermiji prisutni na mjestu oplodnje.

Epitelne udubine za čuvanje sperme mogu se razviti ali i ne moraju, npr. kod divljih kokoši (*Gallus*) i patki (*Anas*) one su sekretorno aktivne. Nastaju od visoko prizmatičnih stanica s vršnim mikrovilima. Ima ih kod kokoši, gusaka i golubova, kao i kod ptica pjevice, sokola i glista. Još uvijek je nepoznato kako spermiji ulaze u cijevi i opstaju u njima te kada i kako ih napuštaju. Kod maloljetnih ženki ulaz u kloaku iz rodnice zatvara se opnom, barem kod domaćih kokoši i divljih gusaka. U spolnoj zrelosti ova membrana pukne, što je pod hormonskom kontrolom. Rodnica zajedno s maternicom sudjeluje u istiskivanju jajašaca. Rodnica se otvara otvorom (*ostium cloacale oviductus sinistri*) u mokraćni put kloake (King i Mclelland, 1984., Nomina anatomica avium, 1993., Golob, 2011.).



*Slika 5: Anatomski prikaz celomične šupljine ženke goluba kamenjara (Columba livia).*

Lijepo vidljiva uparena pluća sa zračnim vrećicama, lijevi jajnik s primarnim, sekundarnim i tercijarnim folikulima i jajovod; lijepo vidljivi magnum i maternica i kloaka (Foto: Anže Golob, 2021).

#### **2.4.6 Razvoj jajašca**

Razvoj jajašca započinje oslobađanjem zrele jajne stanice (*ovium*) iz jajnika. Dok putuje jajovodom okružen je tercijarnim ovojnicama čime nastaje jaje. Razvoj jajašca kod većine ženki traje oko 25 sati, kod nandua i noja do 48 sati, a kod emua 72 sata. Bjelančevine i masti jajeta sintetiziraju se u jetri i kroz krv putuju do jajnika. Jajna stanica organizira ovaj materijal u žumanjak i tekućinu. U samom jajašcu nema biokemijske sinteze žumanjka.

Nakon ovulacije jajašce uđe u lijevak jajovoda kojim putuje do 30 minuta, i u tom dijelu jajovoda dolazi do oplodnje. Tubularne žlijezde oko jajašca talože halazni sloj bjelanjaka, koji se sastoji od tankog sloja gustog bjelanjka koji okružuje žumanjak. Vrpca žumanjka formirana je u cjevastom dijelu lijevka, što omogućuje žumanjku da se slobodno okreće.

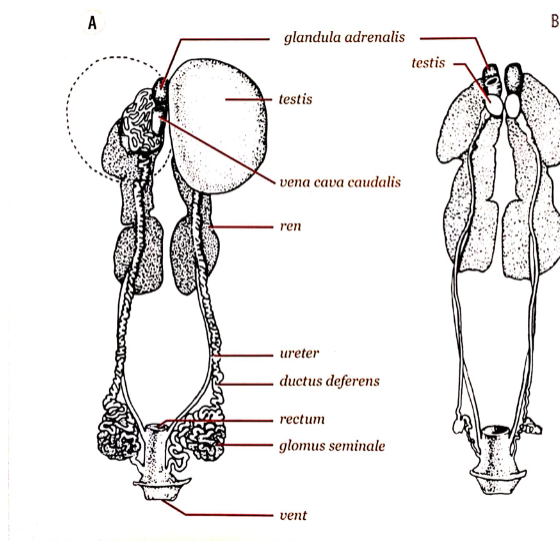
Kroz magnum jaje putuje do 3 sata. Za to vrijeme dobiva bjelanjak kojeg izlučuju tubularne žlijezde uz sudjelovanje jednostaničnih žlijezda te neke elemente u tragovima poput kalcija, magnezija i natrija.

Kretanje jajeta kroz istmus sporo je i traje do 2 sata. Tu nastaju unutarnja i vanjska membrana ljuske, koje oblažu ljusku. Prije toga se bjelanjku dodaje još manja količina bjelančevina (do 10%) i ovdje se ljuska počinje kalcificirati.

Jaje ostaje u maternici oko 20 do 26 sati. Nastaje ljuska jajeta. U prvih 8 sati dodaje se vodena otopina iz žlijezda koje leže u kranijalnom dijelu maternice, što prouzroči dvostruko



## 2.5 Spolni organi mužjaka



Slika 7: Spolni organi mužjaka (Prema King i Mclelland, 1984.).

### 2.5.1 Testisi

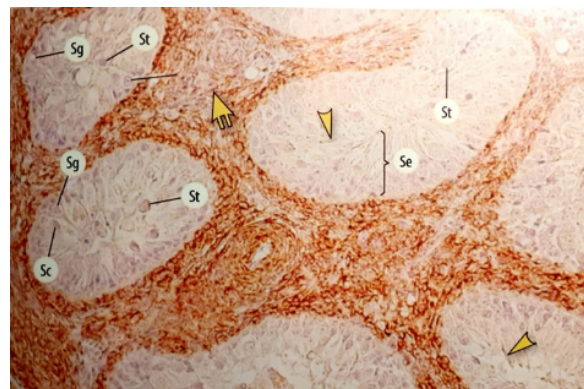
Testisi se mogu razlikovati već nakon 4 dana inkubacije, a potječu iz zametnog epitela mezonefrosa. Rast i razvoj testisa u velikoj je mjeri ovisan o gonadoliberinu hipotalamusa. Testisi, koji nalikuju grahu, smješteni su simetrično sa svake strane srednje linije u dorzalnoj cjelini blizu kaudalnog kraja pluća i kranijalnog dijela bubrega. U domaće kokoši, u mnogih ptica pjevica, a vjerojatno i u većine ostalih ptica, iznimka je sokol, lijevi testis mužjaka, kao i lijevi jajnik ženke, rano u embrionalnom razvoju stekne mnoštvo iskonskih zametnih stanica iz desne spolne žlijezde. Stoga su u spolno nezrelih ptica lijevi testisi veći od desnog. Kod domaćeg pijetla ta razlika u veličini traje do 6 mjeseci starosti, a tada desni testis postaje teži od lijevog. Svaki testis visi na kratkoj opni (mezorhiju) okruženom trbušnom zračnom vrećicom. Veličina testisa povećava se seksualnom aktivnošću. Tijekom spolnih aktivnosti veličina testisa povećava se i do tri puta, a testisi postaju bijeli zbog raspršivanja intersticijskih stanica i uglavnom zbog povećane duljine i povećanog promjera sjemenskih cijevi. Najizraženije povećanje testisa tijekom sezone parenja je kod divljih ptica kod kojih povećanje može biti i do 300 puta.

Površina testisa prekrivena je tankim vlaknastim bjelkastom ovojnicom (*tunica albuginea*). Većina arterijske krvi dolazi u testis putem *a. testicularis*, grane kranijalne bubrežne arterije. Ptice nemaju sjemenski pletter (*plexus pampiniformis*), a koji ima ulogu regulacije smanjene temperature kod sisavaca u testisima. Iz testisa se venska krv ispušta kratkom venom testisa (*vv.testiculares*) u kaudalnu venu.

Testis se sastoji od tisuća uvijenih sjemenih kanalića (*tubuli seminiferi convoluti*). Sjemenski kanalić slični su onima kod sisavaca, ali anastomoze su mnogo brojnije kod ptica. Sjemenski kanalić sastoji se od spolnog epitela koji se sastoji od zametnih stanica i potpornih stanica ili Sertolijevih stanica. Svaka potporna stanica proteže se cijelom površinom epitela i na taj način pruža mehaničku potporu zametnim stanicama, a njihova je funkcija i proizvodnja steroidnih hormona. Vjerojatno igraju i ulogu fagocita. Kad su spermatozoidi zreli oslobađaju se iz genitalnog epitela kao mladi spermiji i putuju prema kratkim ravnim kanalićima (*tubuli seminiferi recti*) koje se otvaraju na oko 6 mjesta u mrežnici testisa (*rete testis*). Intersticijske ili Leydigove stanice nalaze se između cijevi. Poligonalne su, sadrže glatki endoplazmatski retikulum, mitohondrije, kapljice lipida bogate kolesterolom. Lipidni materijal preteča je proizvodnje androgenih steroida. Kao i kod sisavaca, testosteron je glavni androgeni hormon kod ptica. Androgeni hormoni utječu na rast sjemenovoda i na razvoj sekundarnih spolnih karakteristika: razvoj dodatka, pjevanje, spolni nagon (King i Mclelland, 1984., Nomina anatomica avium, 1993., Golob, 2011.).



Slika 8: Par testisa u leđnom dijelu koelomske šupljine kod kamenjara (*Columba livia*) (Foto: Anže Golob, 2021).



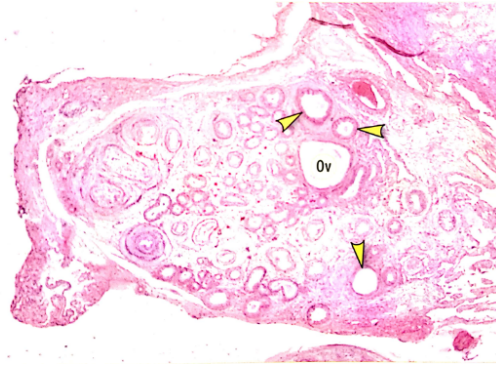
Slika 9: Histološka struktura testisa u spolno zrelom kanarincu (*Serinus canaria*).

Sjemeni kanalići imaju visok epitel (Se). Uz Sertolijeve stanice (Sc) u sjemenim su mjehurićima prisutne i spermatogonije (Sg), spermatoцитi prvog reda (St) i pojedinačne spermatide. Između sjemenskih kanalića postoji opsežni intersticij s Leydigovim stanicama (dvostruka strelica) (Golob, 2011.).

### 2.5.2 Nuzsjemenik (*Epididimis*)

Epididimis se razvije iz prednjeg dijela mezonefrosa i prepoznatljiv je već 18. dana inkubacije. Kod ptica testis leži na dorzomedijalnoj površini. U usporedbi s epididimisom sisavaca, relativno je mali, kod spolno zrelog domaćeg pijetla debeo je oko 3 mm. Kod ptica koje se razmnožavaju sezonski, u to se vrijeme povećava. Glava, tijelo i rep ne mogu se razlikovati jer se kanalići obično protežu cijelom dužinom i nisu vezani ni za jedan dio epididimisa. Epididimis ima velik broj uvijenih kanalića (*ductuli efferentes proximalis / distalis testis*) koji imaju visoko prizmatični trepetljikavi epitel. U početku imaju širok unutarnji promjer, nakon čega se sužavaju i konačno otvaraju kroz kratke spojne kanale (*ductulus conjungens*) u kanal epididimisa. *Ductus epididymidis* kraći je kod domaćih pijetlova i divljih vrsta nego kod sisavaca. *Ductus paradidymidis* se može naći u svim dijelovima epididimisa koji su na oba kraja slijepo zatvoreni. Slijepo crijevo epididimisa (*appendix epididymidis*) kranijalni je nastavak epididimisa i veže se za nadbubrežnu žlijezdu. Sastoji se od aberantnih kanala (*ductus aberrans*) i aberantnih kanala (*ductuli aberrantes*), koji se u njega otvaraju i većina ih je u dodatku epididimisa, ali prelazi i u nadbubrežnu žlijezdu pa u kastratima kvržice koje izlučuju androgene nastaju iz njih. Kod spolno aktivnog domaćeg pijetla jajovodi su natrpani spermom, dok se kod ptica sa sezonskim razmnožavanjem sperma skladišti u sjemenom mjehuriću (*glomus seminale*) smještenom na kaudalnom kraju sjemenovoda.

Kod svih ptica, osim domaćeg pijetla, postoje 3 faze u reproduktivnom ciklusu u testisu i epididimisu: prva je faza regeneracije kada su sjemeni mjehurići, intersticijske stanice, bijela ovojnica i odvod i povezujući kanali epididimisa uvelike regresirani a zatim se regeneriraju; druga faza je ubrzana faza u kojoj gonadotropini potiču regeneraciju sperme; i treća faza je vrhunska faza kada proizvodnja sperme doseže svoj vrhunac (King i Mclelland, 1984., *Nomina anatomica avium*, 1993., Golob, 2011.).



Slika 10: Histološki preparat prstena spolno nezrelog fazana (*Phasianus colchicus*).

Brojni kanalići različitih promjera (strelice) koje su na početku većeg promjera, a zatim sužene. Dobro je vidljiv kanal epididimisa (Ov) (Golob, 2011.).

### 2.5.3 Sjemenovod (*Ductus deferens*)

Sjemenovod je prepoznatljiv 18. dana inkubacije i proizlazi iz mezonefričnog kanala. Ide cik-cak (*ansae ductus deferentis*) i paralelno s ureterom. Nastavlja se kratkim ravnim dijelom (*pars recta ductus deferentis*) koji prodire u leđnu stijenk u mokraćnog sustava kloake i završava kao nastavak cisterne sjemenovoda (*receptaculum ductus deferentis*). Okružen je kloakalnim mišićem, osim u posljednjih 2 do 3 mm gdje strši poput kratke papile sjemenovoda (*papilla ductus deferentis*) i završava otvorom sjemenovoda (*ostium ductus deferentis*). Kod jednogodišnjeg pijetla, sjemenovod je dugačak 65 cm. Njegov se promjer povećava i u početku pri ulasku u kloaku mjeri 400  $\mu\text{m}$  do 900  $\mu\text{m}$ . Kod domaćeg pijetla sjemenovod je pun sperme baš kao i kanal epididimisa. Putovanje sperme od mrežnice testisa do kraja sjemenovoda traje 1 do 4 dana.

U mirovanju je glavni dio sjemenovoda relativno ravna cijev, ali u fazi širenja testisa i epididimisa sjemenovod se jako produljuje, odmiče od bubrega i postaje jako uvijen. Kod ptica pjevice (*Passerines*) i *Melopsittacus undulatus*, kaudalni kraj sjemenovoda čini sjemeni mjehurić (*glomus seminale*), koji se sastoji od sjemenovodnih vijuga koje služe kao mjesto za čuvanje i sazrijevanje sperme. Lijevi i desni sjemeni mjehurići potiskuju zid kloake prema van kako bi stvorili kloakalnu izbočinu (*promontorium cloacale*). Na temelju toga moguće je odrediti spol ptice pjevice.

Kao i kod sisavaca, spolne stanice se kod ptica ne mogu u potpunosti razviti pri visokim temperaturama u celomičnoj šupljini, gdje se nalaze testisi. U nekih ptica razvoj sperme omogućuje noćni pad temperature, dok u drugih natečeni kraj sjemenovoda štiti sperm u razvoju od visokih temperatura općenito. Važno je napomenuti da kod ptica ne postoje organi



slični prostati, bulbouretralnim žlijezdama, mokraćnom mjehuru i ampuli sjemenovoda sisavaca.

#### 2.5.4 Organi za kopulaciju

Falus mužjaka (*phallus masculinus*).

Ptičji falus nije homolog penisa sisavaca i namijenjen je samo razmnožavanju. U ptica sjeme putuje vanjskom površinom organa, dok sisavcima putuje unutarnjom stranom uretre. Kod sisavaca također služi i za mokrenje. Kod ptica je tijekom erekcije ispunjen limfom, a kod sisavaca krvlju. U mužjaka razlikujemo 2 vrste falusa: pravi istureni i neistureni tip. Izbočeni oblik javlja se kod trkačica, dugonogih kokoši, čudnovatih kljunaša, flaminga i roda. Ima dva glavna oblika: čvrsti falus i falus s ušćem koji sadrži uvijeni dio. Neistureni tip karakterističan je za domaće kokoši i pure, a može biti prisutan i kod nekih pjevica, najčešće u pravih strnjača (*Emberizidae*).

Istureni falus (*phallus protrudens*) ima 4 osnovna dijela: bazu, tijelo, vrećice i džep falusa. Baza se nalazi u ventralnoj stijenci kloake. Tijelo falusa je u mirovanju uvijeno, a tijekom erekcije postaje njegov rukav. Vaskularno tijelo neisturenog falusa (*corpus vasculare phalli*), kojem krv stiže stidnom arterijom (*a. pudenda*), kod kokoši i purana dugačko je 10 mm, a sastoji se od kuglica arterijskih kapilara okruženih mrežom limfnih kapilara koje se prazne u subkapsularne limfne sinuse koji okružuju površinu krvožilnog tijela. Vaskularno tijelo proizvodi limfu za njegovu erekciju.

U erektilnom tkivu falusa postoje limfne šupljine koje se tijekom erekcije ispunjavaju limfom iz susjednih parakloakalnih vaskularnih tijela što rezultira erekcijom. Lijevo vaskularno tijelo veće je od desnog pa je uspravni falus zakrivljen ulijevo.

Vrećice falusa, s druge strane, čine šuplju unutrašnjost mirujućeg falusa poput obrnutog prsta rukavice. U bazi mu je limfna cisterna, koja leži na leđnoj strani vlaknasto-hrskavičnog tijela. Tijekom razdoblja mirovanja kod pataka i gusaka i trkačica, vaskularna tijela kranijalno odvođaju limfne žile kloake (*vasa lymphatica cloacalia*) u unutarnju limfnu žilu crijeva (*vas lymphaticum iliaceum internum*). Kod ovih vrsta parno limfno srce (*cor lymphaticum*) tjera limfu iz mirujućeg falusa u venski sustav.

Žlijeb (*Sulcus phalli*) leži na vanjskoj površini natečenog tijela. U nandua, nojeva i pravih pataka spiralno zavija cijelom dužinom. Desna i lijeva usna utora (*labium sulci phalli dextrum / sinistrum*) čine svoje granice cijelom dužinom. Na vanjskoj površini natečenog falusa vidljivi su grebeni (*rugae phalli*). Kod uvijenog falusa pa strše u lumen njegove kožne vrećice. Na spoju njegove žlijezde (*saccus glandularis phalli*) i kožne vrećice (*saccus cutaneus phalli*) pojavljuje

se zavoj neerektalnog falusa (*flexura phalli nonerecti*), koji je na uvijenom organu jako zakrivljen i postaje njegov vrh (*vrh phalli erecti*) tijekom erekcije. Obje vrećice otprilike su iste dužine, leže jedna iza druge i povezane su ušća žljezdane vrećice. To je važno tijekom erekcije jer izlučuje sluz i vlaži falus. Jaki elastični ligament (lig. *Elasticum phalli*) kod svih ptica s isturenim falusom, osim kod kivija i dugonogih kokoši, tijekom erekcije prolazi cijelom dužinom i pomaže uvijanju uspavanog falusa. U uspavanom falusu rukav od elastičnih i kolagenih vlakana okružuje žljezdanu vreću. U njemu se nalazi elastični ligament. Kad se falus smanji, elastični ligament i tkivo suspensorija povlače tijelo falusa u uvrnuti položaj. Ejakulatorna šupljina (*fossa ejaculatoria*) široko je udubljenje na dnu stražnjeg zaljeva u koje se otvaraju papile lijevog i desnog sjemenovoda. Vodi u uski žlijeb za ejakulaciju, središnji žlijeb u dnu stražnjeg zaljeva, koji se nastavlja u žlijeb falusa. Kranijalni i kaudalni retraktorni mišići falusa (*m. retractor phalli caudalis/cranialis*) javljaju se kod mužjaka nojeva, pravih patki (*Anas*) i kokoši (*Gallus*).

Oba mišića ugrađuju se na trbušni otvor kloake, u blizini ili na falus. Kaudalni retraktor je parni mišića jači od kranijalnog mišića i kod pravih pataka (*Anas*) potječe od usne trbušnog dijela repa. Nalazi se na središnjem tijelu kokoši, na trbušnoj strani bočnog tijela kod purana i blizu trbušne površine vlaknasto-hrskavičnog tijela kod pravih pataka, gdje je to poprečno prugasti mišić. Kranijalni mišić podizač vrlo je tanak upareni glatki mišić i nalazi se u bazi falusa kod pravih pataka (King i Mclelland, 1984., Nomina anatomica avium, 1993., Golob, 2011.).

## 2.6 Spermiji i njihov razvoj

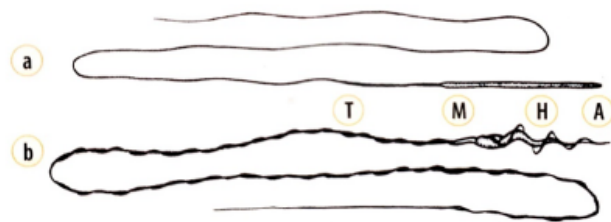
Sperma je kod ptica mliječna do žučkastobijela. Sastoji se od spermija, izlučevina sjemenih kanalića i njihovih oljuštenih epitelnih stanica. Tekući dio je sjemena plazma koju izlučuju nuzsjemenik i sjemenovod, posebno njezino vaskularno tijelo i limfni nabori kloake. Sadrži visok udio glukoze i malo fruktoze. Količina ejakulata varira kod ptica, kod domaćeg pijetla je 0,5 do 1 mL. Za optimalnu plodnost u umjetnoj oplodnji potrebno je 100 milijuna spermija. U nedostatku sjemenog mjehurića, glavno mjesto čuvanja sperme u domaćem pijetlu je sjemenovod koji ima kapacitet od nešto manje od 1 ml. Sperma mora doći do sjemenovoda prije nego što postane potpuno plodna. U seksualno aktivnih ptica to traje do 4 dana.

Spermij se sastoji od tri dijela: akrosoma, glave s jezgrom i biča. Akrosom leži kao pokrivač na proksimalnom kraju glave. Sadrži akrosomsku tvar (*substantia acrosomatica*) okruženu vanjskom i unutarnjom akrosomskom membranom. Akrosomska tvar je homogena tvar koja sadrži enzime koji otapaju perivitelinsku membranu jajašca. Za razliku od sisavaca, ne postoje

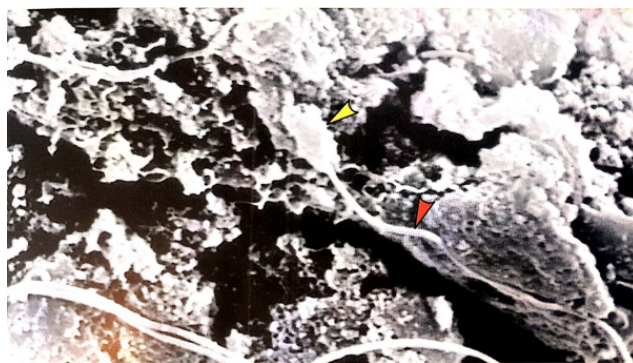
regionalne razlike koje dijele akrosom na kapu i ovratnik. Perforatorij (*perforatorium*) je homogen, okružen subakrosomskom tvari koja je sitnozrni homogeni materijal. Zglobna jama (*fossula articularis*) je nepravilan zavoј glave na koji se naslanja zglobna površina repa.

Bičevi su dugi, nitasti i mogu se podijeliti u 4 područja: relativno kratak vrat koji okružuje proksimalni centriol (*pars conjungens*), relativno kratak srednji dio (*intermedia*) koji okružuje distalni centriol i spiralno uređene mitohondrije, dugačak glavni dio (*pars principalis*), koji okružuje kratki završni dio (*pars terminalis*).

Rep spermija okružen je laganom plazmalemom i sadrži 9 duplikata ili dubleta i središnji par mikrotubula. Prema građi ptica razlikujemo dvije vrste spermija, jednostavne i složene. Jednostavan tip postoji u domaćem pijetlu. Spermiji su dugi oko 100  $\mu\text{m}$ . Homogeni konusni akrosom nalazi se samo na krajnjem kraju glave spermija. Nakon ejakulacije, rep postaje gibljiv. Složena vrsta spermija karakteristična je za ptice pjevice. Mitohondriji akrosoma, glave i repa imaju karakterističan spiralni oblik. Umjesto mreškanja, ovi se spermiji brzo okreću oko svoje uzdužne osi.



Slika 11: Slika prikazuje dvije vrste spermija: a. jednostavnu vrstu kod pijetla i b. složenu vrstu zebe (King, Mclelland 1984, uz ljubazno dopuštenje autora).



Slika 12: Elektronska mikroskopska slika jednostavne vrste sperme: glava (žuta strelica) i bič (crvena strelica) prepelice (*Coturnix coturnix*). (Originalna snimka dr. Zlatka Goloba: MF Ljubljana, 2011.)

## 2.7 Spermatogeneza

Spermatogeneza se, poput oogeneze, odvija u 3 faze:

- Razdoblje razmnožavanja ili umnožavanja spermatogonije
- Razdoblje rasta kada se povećavaju primarni spermatociti
- Razdoblje sazrijevanja kada se sekundarni spermatociti stvaraju nakon prve mejotske diobe, a spermatide nakon druge mejotske diobe

Spermiji se razvijaju u skupinama i dodiruju potporne stanice tijekom razvoja, a njihovi bičevi strše u lumen. Trajanje spermatogeneze kraće je u ptica nego u sisavaca. Kod ptica sa sezonskim razmnožavanjem, svi spolni udovi smanjuju se u različitom stupnju tijekom spolne neaktivnosti. Putovanje sperme od testisa do distalnog područja sjemenovoda traje 1 do 4 dana. Prije nego što napuste mrežu testisa, njihova strukturna diferencijacija je dovršena. Pokretljivost je najmanja u testisu, povećava se u nuzsjemeniku, a najveća je u sjemenovodu. Plodnost sperme u pijetlu povećava se tijekom prolaska kroz nuzsjemenik i sjemenovod.

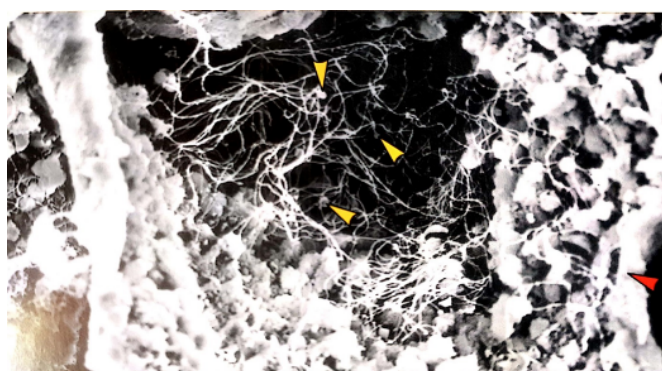
U mladih pijetlova primarni se spermatociti pojavljuju u dobi od 6 tjedana i rastu tijekom sljedeća 2 do 3 tjedna. Sekundarni spermatociti počinju se pojavljivati u dobi od 10 tjedana kao rezultat redukcijske diobe primarnih spermatocita. Spermatide se javljaju oko 12 tjedana starosti u sjemenim kanalićima, a u dobi od 20 tjedana prisutne su u svim kanalićima. Pubertet se javlja u dobi od 16 do 24 tjedna, što se očituje brzim rastom testisa i završetkom spermatogeneze.

Sjemenski kanalići pijetlova odnosno mužjaka su prije puberteta male i okružene jednim slojem stanica. Zreli testis pak ima višeslojni epitel koji predstavlja različite faze spermatogeneze. U japanskim prepelicama kompletna spermatogeneza i putovanje sperme traje oko 25 dana.

Tablica 1: Trajanje skladištenja sperme u sjemenskim cijevima

Vrsta	Trajanje skladištenja sperme u danima
Postovka	8,1
Bengalska zeba	8,0
Japanske prepelice	6,3
Klamerica	11,0
divlje kokoši	24,0
kokoš	12,0

lijenčina	9,9
zamorčići	7,0
guska	9,7
fazan	21,0
golub	8,0
grlica	8,0
pura	42,0
zebrica	10,0
jarebica	7,8



*Slika 13: Stijenka sjemenske cjevi (crvena strelica) s pripadajućim sjemenskim epitelom kod spolno aktivnog mužjaka prepelice (*Coturnix coturnix*). (Originalni snimak dr. Zlatko Golob: MF Ljubljana, 2011.).*

#### Količina i koncentracija sperme

Količina sperme varira ovisno o vrsti. Prosječno iznosi od 0,11 do 1 mL. Prosječna koncentracija sperme je 3,5 milijuna odnosno u 0,5 do 1 mL ejakulata nalazi se 1,7 do 3,5 milijardi spermija. Kod sporo rastuće vrste peradi dolazi 4,9 milijuna sperme na 1 mL sperme, a kod brzo rastućih 2,3 milijuna/mL sperme.

Purani proizvode manje sperme od pijetlova, a koncentracija im je mnogo veća. Prosječni volumen ejakulata je 0,2 mL, a koncentracija je 6,2 do 7 milijuna na 1 mL ejakulata. Prosječni volumen ejakulata kod patki je 0,18 do 0,41 ml, a koncentracija 2,1 do 9,33 milijuna/mL.

Za fazane količina sjemena je 0,1 mL ili manje. Što je veća učestalost parenja, manji je volumen, a također i koncentracija. Pijetao se može pariti 25 do 41 puta dnevno. Na parenje utječe i redosljed ključanja. Najčešće se pijetlovi pare s kokošima u sredini hijerarhijske ljestvice.

Optimalna plodnost pijetla bijelog leghorna je kada se pari i nalazi se u skupini od 15 ženki. U teških hibrida taj je broj znatno manji (Golob, 2011.). Trajanje skladištenja sperme u sjemenim kanalicima specifično je za vrstu.

Tablica 2: Koncentracija sperme i volumen ejakulata kod nekih ptica. (Birkhead i Moller, 1992.).

Vrsta ptice	Koncentracija sperme (milijun/mm <sup>3</sup> )	Zapremina ejakulata u mL
Pijetlovi lakih pasmina	1,5-3	0,30-1
Pijetlovi teških pasmina	2,5-4,5	0,5-1,5
Purani	2,4-4,5	0,5-1,5
Patke	0,9-1,5	0,20-0,60
Gosaki	0,8-1,5	0,20-0,60
Skobčevke	9,5-11,3 milijardi/mL	3,5-13
Fazana	10 x 10 <sup>9</sup> /ql	50-2
Velike papige	9-10 milijuna/mL	50-100
Emui	4,4 milijardi/mL	1200

## 2.8. Umjetno osjemenjivanje i postupak umjetnog osjemenjivanja

Umjetno osjemenjivanje postupak je ručnog prenošenja sjemena u kloaku ili vaginu ženke. U osnovi je to postupak u dva koraka: prvo, sakupljanje sjemena od mužjaka i drugo, unosenje ejakulata u vaginu ženke. Umjetna oplodnja prvi je put izvedena u Americi dvadesetih godina 20. stoljeća, a zatim je široko korištena u Australiji uvođenjem koka nesilica krajem pedesetih godina. Umjetna oplodnja koristi se za održavanje matičnih jata. Kod širokoprskog purana, koji je dobiven genetskom selekcijom i nije fizički sposoban za prirodno parenje i oplodnju, umjetna je oplodnja jedini način razmnožavanja. Umjetno osjemenjivanje također je vrlo važno za spašavanje populacija ugroženih vrsta ptica u zatočeništvu (očuvanje biološke raznolikosti) i od velike je pomoći u ponovnom uzgoju i ponovnom naseljavanju nekih vrlo rijetkih vrsta ptica. Nekim je ugroženim pticama zbog rijetkosti teško pronaći odgovarajućeg partnera za prirodno razmnožavanje. Uzrok mogu biti i zdravstveni poremećaji, stres, rijetkost uzoraka odnosno njihova udaljenost i njihovo abnormalno ponašanje (biološki dojam na ljude). Prikupljena sperma može se nekoliko dana nesmrznuto transportirati i koristiti za širenje genetskog potencijala, radi očuvanja vrste.

Neke od prednosti umjetnog osjemenjivanja su:

1. Povećavanje omjera oplodnje; obično se jedan pijetao može pariti sa 6 do 10 kokoši. Umjetnom oplodnjom taj se omjer može povećati za 4 puta.
2. Stariji mužjaci velikog kapaciteta i dobrog libida mogu se koristiti nekoliko generacija, dok je u prirodnom parenju to razdoblje ograničeno, u nekih vrsta ptica s dugim životnim vijekom

mužjaci se mogu koristiti za kvalitetno podrijetlo sperme i do pola stoljeća. Sibirski ždral „Volf“ je prirodno oplodio ženku u dobi od 74 godine.

3. Dragocjeni mužjaci koji imaju različite motoričke poremećaje zdjelčnih udova i dalje se mogu koristiti kao darivatelji sperme.

4. Uspješno križanje: iako je križanje vrlo uspješno u divljini, ponekad, na primjer, postoji diskriminacija boje, jer se neke kokoši neće pariti s mužjakom druge boje, osim ako nisu uzgajane zajedno. U ovom je slučaju umjetna oplodnja prijeko potrebna.

5. Kod ždralova s crnim vratom (*Grus nigricolis*) često se događa da mužjaci ubijaju ženke tijekom seksualnih aktivnosti; umjetna oplodnja to sprječava (vlastiti nalaz) (Gee i Murray, 1985., Gee i sur., 2004; Hughes, 2008., Primack, 2010., Golob, 2011., Khayat i sur., 2016.).

- Postupak za dobivanje sjemena (ejakulata)

Tri su osnovne tehnike za sakupljanje sjemena:

1. Prva tehnika je suradnička tehnika koja se može izvoditi na pticama koje imaju biološki dojam na ljude (imprint). Ptice, npr. sokolovi, u dodiru sa kacigom ili rukavicom koju nosi voljena osoba, prskaju na njih spermu.

2. Druga tehnika je tehnika masaže koja se izvodi na onima sa ili bez biološkog dojma na osobu.

3. Treće je vađenje sjemena elektroejakulacijom.

Prikupljanje sperme tehnikom masaže koja uključuje držanje mužjaka pritiskom prsa na stol ili koljeno i onaj koji uzima spermu obično sjedi. To je naravno slučaj s malim pticama. Zatim jednom rukom čvrsto masiramo trbuh, dok drugom rukom gladimo leđa i perje repa. Falus će se povećati nakon 3-6 takvih masaža, a za to vrijeme izvođač će brzo staviti prste oko kloake. Kloaka se palcem i kažiprstom pritiska odozgo i odozdo, što omogućuje izbacivanje kloake odnosno falusa prema van. Nakon masaže na vrhu falusa sakuplja se ejakulirana sperma koja se usisava kapilarnom cijevi. Taj se postupak uzimanja sjemena može ponoviti dvaput. Sjeme se može dobiti 4-6 puta tjedno.

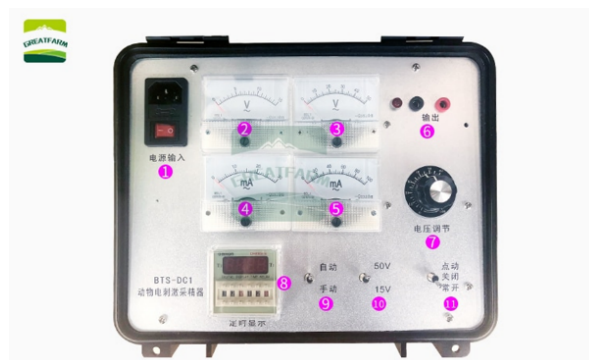
Prilikom sakupljanja sjemena od ždralova i roda potrebna je posebna pažnja i rukovanje zbog dugih nogu, oštih prstiju i dugog kljuna. Pomoćnik uhvati mužjaka i fiksira ga postavljanjem među noge u stojećem položaju, tako da vrat i glava ždrala budu iza pomagača, a kloaka i stražnji dio tijela ždrala okrenuti su prema glavi (vidi prilog na slici).

Elektroejakulacija se uglavnom koristi kod velikih i vrlo divljih ptica, jer to smanjuje stres povezan s rukovanjem, a postupak je brz. Ovaj postupak ne zahtijeva sudjelovanje ptice, ali se ipak češće koristi kod sisavaca. Postoji unutarnja i vanjska stimulacijska sonda. Postupak korištenja unutarnje sonde umetnute u kloaku zahtijeva upotrebu anestetika i kloakalni otvor može se držati otvorenim. Kada se koristi vanjska sonda, sjeme se izlučuje kroz kloaku i

pojavljuje se ispod nje. Neki znanstvenici tvrde da patke i guske, golubovi i papige imaju prednosti u elektroejakulaciji jer je uz pomoć ovog postupka postignuta veća koncentracija sjemena u ejakulatu i ejakulat je bio većeg volumena (Gee i Murray, 1985., Gee i sur., 2004., Samour, 2004.).



Slika 14: Vrste elektroda za izvođenje elektroejakulacije.



Slika 15: Uređaj ima dva različita izlazna napona: od 0 do 12 V i od 0 do 50 V.



Slika 16: Električni ejakulator za ptice i male sisavce i majmune.



Sastav sperme prikazan je u donjoj tablici. Koncentracija glutamata u sjemennoj plazmi peradi vrlo je visoka, a koristi se kao izvor energije. Tablica 3 prikazuje koncentracije sjemena i komponenata krvne plazme.

*Tablica 3: Koncentracija (mM) i glavne komponente krvi i sjemene plazme kod pijetlova i purana (Khrayat i sur., 2016).*

Komponente plazma	Sjemena plazma	Sjemena plazma	Krvna
	(pijetlovi)	(purani)	
glukoza	0,18	-	12
Klor	46	23	121
natrij	145	140	160
kalij	13	20	6
kalcij	1,4	0,3	6
glutamat	75	88	0,2
laktat	3,7	2,4	5,5
piruvat	0,3	0,4	0,4
@-ketoglutarat	0,4	0,2	0,1
karnitin	3,2	1,7	0,2
Acetil-karnitin	0,5	0,5-2	0,1
Protein (g/L)	8	22	40

## 2.8. Ocjenjivanje sjemena

U procesu umjetnog osjemenjivanja, sjeme se procjenjuje i analizira na koncentraciju, pokretljivost i održivost sperme. Pokretljivost sperme može biti progresivna (naprijed i brzo) ili ne-progresivna (slučajne oscilacije ili kretnje). Općenito se progresivna pokretljivost određuje na sobnoj temperaturi mikroskopom pri malom povećanju ili pomoću računalno potpomognutog sustava za analizu sjemena. Analiza pokretljivosti sperme postala je popularna kao mjera sposobnosti pojedine ptice da proizvodi visoko pokretnu spermiju. Analiza pokretljivosti definira se kao sposobnost sperme da se postupno kreće prema viskoznom mediju kod 41 °C, za koji je vjerojatnije da će oploditi jajnu stanicu, nego kod mužjaka koji proizvode manje pokretnu spermiju.

### 2.8.1. Koncentracija sjemenske tekućine

Ako je sjeme potrebno razrijediti, najbolje je prije sakupljanja pripremiti propisanu količinu tekućine za razrjeđivanje (medij koji omogućuje preživljavanje i pokretljivost sperme)

na sobnoj temperaturi. U rutinskom sakupljanju sjemena uzima se sjeme od nekoliko mužjaka istovremeno, a zatim se sve sjeme zajedno s razrjeđivačem nježno promiješa.

Ako je određen volumen sjemena i ako se sve doze temelje na koncentraciji sjemena po dozi (obično 250 do 350 milijuna spermija po dozi), određuje se koncentracija sjemena. Metode za određivanje koncentracije sjemena su:

- izravna metoda: Hemocitometar je izravna metoda za procjenu koncentracije sperme,
- neizravne metode: PCV (zapremina napunjenih stanica) također se naziva spermatokritom. Određivanje koncentracije sperme pomoću PCV gotovo je isto kao i kod određivanja hematokrita. Sjeme usisano u epruvete s mikrohematokritom centrifugira se u centrifugi dok se sjeme dobro ne sabije. Potom se utvrđuje postotak pakirane sperme prema izvornoj količini sjemena u mikrocijevi. Zatim se izračunava koncentracija sperme pomoću konverzijskog faktora ili standardne krivulje koja je prethodno određena usporedbom i crtanjem koncentracije spermatokrita iz niza razrijeđenih uzoraka hemocitometra.

### **2.8.2. Optička gustoća (fotometrija)**

Optička gustoća jako razrijeđenog sjemena izravno je proporcionalna koncentraciji sperme, što daje neizravnu procjenu koncentracije sperme. Kao i kod metode PCV, i ovdje se s koncentracijom sperme izračunava faktor konverzije ili prethodno izvedena standardna krivulja s usporedbom i grafičkim crtanjem.

### **2.8.3. Održivost sperme**

Broj mrtvih i abnormalnih spermija u uzorku mora biti manji od 10 %. Stabilnost sperme određuje se bojanjem uzorka eozin-nigrozinom, nakon čega slijedi mikroskopski pregled. Živi i sposobni spermiji ostaju bijeli ili bezbojni na crnoj podlozi jer je njihova membrana nepropusna za eozin. Mrtve spermiji, s druge strane, poprimaju eozinsku boju i postaju ružičasti kad se gledaju pod mikroskopom pri uvećanju od 80-100 x. Normalni spermiji ptica izgledaju poput crva, s tankim simetrično oblikovanim tijelom koje završava kratkim tankim repom. Većina abnormalnih spermija karakterizira snažno savijanje i lomljenje u području glave, tijela ili repa.

### **2.8.4. Dilucija sjemena**

Sjeme se može razrijediti tako da se njime može osjemeniti 5 do 20 kokoši. Stupanj razrijeđenja ovisi o početnoj koncentraciji sperme koja se vremenom mijenja kod različitih mužjaka iste vrste. Većina razrjeđivača sadrži natrijev glutamat, glukozu, fruktozu i

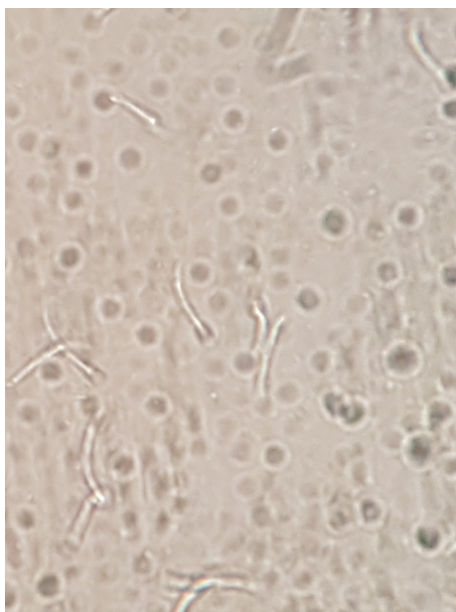
specijalizirane pufere, tako da se Ph održava na oko 7,0, a osmolarnost na oko 400 mmoL. Glutamat je posebno važan ako se sjeme čuva duže od 4 do 6 sati. Sjeme ptica vrlo slabo reagira na smrznuto u smislu plodnosti, jer je njihova plodnost uvelike smanjena (Khrayat i sur., 2016., Gee i sur., 2004.).

Na tržištu su dostupne različite vrste sredstava za razrjeđivanje sjemena. Sjeme se može razrijediti otopinom poznatom kao modificirana Ringerova otopina, koja je vrlo jeftina i lako dostupna. Sastav modificirane Ringerove otopine prema Khrayat i sur., 2016. je sljedeći:

Natrijev klorid	0,68 g
Kalijev klorid	0,173 g
Kalcijev klorid	0,0642 g
Magnezijev sulfat	0,025 g
Natrijev bikarbonat	0,025 g
Destilirana voda	100 mL



*Slika 17: Spermiji indijskog ždrala (Grus antigone antigone) (Foto: Anže Golob: Belgija, 2020.).*



*Slika 18: Sperma ždralova s crnim vratom (Grus nigricolis) (Foto: dr. Zlatko Golob. Belgija, 2018.).*

## **2.9. Postupak umjetnog osjemenjivanja ženki**

Prvo se ptica dobro fiksira, a zatim nježno pritisne na lijevu stranu abdomena oko kloake, uzrokujući iščašenje kloake i izbočenje otvora jajovoda (vidi prilog na slici) tako da doza sjemena može biti ubrizgana u nju. Kada osjemenjivač primijeni sjeme, treba smanjiti pritisak oko kloake kako bi se ptici pomoglo zadržati spermiju u rodnici ili jajovodu. Zbog visoke koncentracije sperme u nerazrijeđenom sjemenu purana, za optimalnu je plodnost ovaj postupak potrebno primjenjivati u redovitim razmacima svakih 14 dana. To znači da spermiji tijekom tog razdoblja ostaju u gnijezdima sperme i kontinuirano oploduju ovulacijske folikule.

Zbog niže koncentracije sperme i kraćeg trajanja plodnosti, postupak umjetnog osjemenjivanja treba provoditi svakih 7 dana kod kokoši, a kod droplji i ždralova svaki drugi ili treći dan. Plodnost se obično smanjuje kasnije, pa je češća oplodnja opravdana kasnije. Naravno, važne su i specifične informacije o tome koliko se dugo jaje razvija. Oplodnja treba biti u vremenu nakon ovulacije. Za maksimalnu plodnost bio bi potreban interval između umjetne oplodnje kokoši i ovipozicije od 8-15 sati. Kao i kod ostalih ptica, ždralovi mogu iščašiti jajovod kako bi ih oplodili. Poticanje ženke masažom uzrokuje otvaranje kloake i jajovoda. Neki osjemenjivači oplodnju obavljaju sami, ali za zahtjevnije vrste trebaju biti dvije osobe. Plodnost obično prelazi 90 % ako se odgovarajuća količina dobrog sjemena primijeni izravno u jajovod. Za optimalnu plodnost, jedna doza oplodnje trebala bi sadržavati 16 milijuna živih spermija ili više. Međutim, pticu treba oploditi 1 do 2 tjedna prije početka razdoblja

polaganja jaja i 2 do 3 puta tjedno tijekom sezone razmnožavanja i ponovno nakon svake ovulacije (Gee i sur., 2004., Cergolj i Samardžija, 2006., Golob, 2011.).

## **2.10. Čuvanje sjemena**

### **2.10.1. Uporaba**

Pravilno smrznuto sjeme i druga tkiva osiguravaju znanstveniku materijal za sustavne studije, za praćenje promijena među zoološkim parkovima, okolišni monitoring, retrospektivne studije (istraživanja), forenzičke slučajeve, očuvanje genetskog poola. Prostor potreban za skladištenje sjemena, u globalu, je mali i ekonomski povoljniji u odnosu na držanje živih ptica.

Molekularne komponente, posebice bjelančevine i nukleinske kiseline zamrznutog tkiva omogućuju genetska istraživanja na razini populacije i istraživanja bolesti.

Mrlje od sjemena na odjeći i drugim površinama predstavljaju vrsno-specifične markere koji mogu ostati stabilni kroz dulje vremenske periode. Upotrebljavajući smrznuto sjeme poznatog podrijetla, znanstvenici identificiraju (određuju); mrlje koristeći komparativne biokemijske testove i spermu na temelju mikroskopskog pregleda.

Istraživanje sjemena prije i nakon okolišnih promjena predstavlja važnu ulogu u okolišnim monitornim programima. Krioprezervacija olakšava očuvanje, skladištenje tkiva, krvi, spolnih stanica i njihovu uporabu kada je to potrebno uz mali gubitak vitalnosti istih.

Aviakulturist može koristiti smrznuto sjeme za smanjivanje inbridinga (parenje genetski usko povezanih jedinki, u srodstvu), maksimizirati broj genetski jakih jedinki, održavati populaciju dovoljno velikom u svrhu smanjivanja gubitka genetske raznolikosti tijekom vremena. Zamrzavanje sjemena omogućava genetsku izmjenu zatečenih populacija bez potrebe za premještanjem jedinki, što predstavlja vrijedan resurs tijekom upravljanja malim populacijama. U slučaju kada je dostupna nedovoljna količina svježeg sjemena, smrznuto se sjeme može koristiti u kombinaciji sa svježim u svrhu poboljšanja uspješnosti fertilizacije (oplodnje).

Smrznuto sjeme može se koristiti i u svrhu uklanjanja štetnih alela putem pažljive selekcije, za osvježavanje genetskog poola i za smanjenje problema povezanih s prijenosom bolesti. Smrznuto sjeme može se koristiti kada su mužjak i ženka spolno aktivni uz različito doba godine ili se nalaze na velikim udaljenostima. Uskladištene gamete omogućavaju održavanje integriteta vrste tijekom perioda velikom rizika.

Kakogod, potrebna su još mnoga istraživanja o zamrzavanju i skladištenju gameta i embrija jer krioprezervacija germinativne plazme postaje vrijedan način upravljanja stranim (alohthonim) vrstama ptica. Programi krioprezervacije ptičjeg sjemena nisu uspjeli dostići

predviđene ciljeve peradarske industrije postavljene prije 30 g. Faktor neuspjeha bila je tehnika prezervacije sjemena. Dostupne tehnike prezervacije ptičjeg sjemena su komplicirane. Uz to, uzgajivači peradi postigli su brz genetski napredak te držanje genetskih linija posebne vrijednosti nije prioritet. Iako, industrija purica bi se mogla okoristiti tehnologijom zamrzavanja sjemena, no ona je komplicirana. Sa završetkom mnogih standardnih uzgojnih linija i pasmina kokoši, smrznuti genetski pool ima smisla ako nam je cilj zadržati raznolikost tog poola (biodiverziteta). Siromašnost tehnika ograničavaju to na nekoliko velikih instituta.

### **2.10.2. Krioprezervacija sjemena ptica**

Znanstvenici su prepoznali potencijal dugoročnog zamrzavanja ptičjeg sjemena. Sheffner je bio prvi koji je uspješno zamrznuo sjeme. Prvo sjeme koje je bilo zamrznuto i odmrznuto te korišteno za produkciju živih potomaka, a popraćeno otkrićem glicerola kao uspješnog krioprotektanta za spermu peradi i nedomesticiranih vrsta. Kakogod, protokoli ostaju problematični zbog potrebe za mnogim proceduralnim koracima tijekom zamrzavanja i odmrzavanja.

Glicerol mora biti uklonjen prije inseminacije zbog njegovog kontraceptivnog učinka u ptica. Plodnost nakon odmrzavanja je ispod optimalne. Manje od 2 % sperme ptica sposobno je za oplodnju nakon odmrzavanja u usporedbi sa svježom spermom.

Ostala istraživanja otkrila su sličan problem u krioprezervaciji sjemena divljih vrsta. Umjetna inseminacija Kanadskog ždrala spermom krioprezervirano 6%-nim dimetilsulfoksidom rezultirala je 50 % fertiliziranim jajima, u usporedbi s 90%-nom fertilizacijom pri korištenju istog broja svježe sperme. U Američke vjetruše, 56% jaja bilo je oplodeno nakon inseminacije svježom spermom, a 30,4 % oplodnja prilikom uporabe smrznuto-odmrznutog sjemena koji sadrži 12,3%-ni dimetilacetamid (DMA).

Ta niska razina oplodnje postignuta uporabom krioprezervirane sperme ptica možda je rezultat osjetljivosti na proces zamrzavanja- odmrzavanja ili neoptimalnih metoda prezervacije. U globalu, funkcija sperme, transport i skladištenje u kokošjem reproduktivnom sustavu pokazuje se oslabljenom nakon krioprezervacije. Fiziološki, ptice zadržavaju spermu, danima do tjednima, u spermatskim skladišnim tubulima koji se nalaze unutar kokošjeg reproduktivnog sustava. Krioprezervacija sperme značajno smanjuje duljinu trajanja plodnosti. Bez obzira na ograničenu fertilitet pri korištenju odmrznute sperme, istraživanja su adaptirala procedure za mnoge nedomesticirane vrste.

Postotci uspjeha jako su varijabilni između istraživanja. Faktori koji utječu na rezultat uključuju krioprotektante, vrijeme ekvibracije, kvalitetu sjemena, koncentraciju sjemena i volumen

inseminacije, vrijeme i učestalost. Naročito je važna vrsna specifičnost koja može značajno varirati čak i unutar usko povezanih svojti. Primjerice, u istraživanju evaluacije osjetljivosti sperme na stupanj zamrzavanja unutar kokoši, pura i četiri grabljivice, evidentirane su značajne vrsne različitosti. Protokoli za domaće vrste ptica korišteni su rutinski (ili su neznatno modificirani) i za nedomesticirane vrste. Ovo istraživanje jasno, pokazuje da vrste ptica variraju u osjetljivosti sperme na krioprezervaciju, stoga svaka vrsta zahtjeva istraživanje prije uspješne krioprezervacije sperme.

Iako postoji potreba za određivanje problema na kriorazini, praktični problemi ostaju zabrinjavajući i prioritetni. Primjerice, kontaminacija uratima česta je u ejakulatima sakupljenim od Aleutske guske, Magellanovog pingvina, surog orla, orla krstaša, Bonellijevog orla i sivog sokola. Kontaminacija uratima smanjila je preživljavanje sperme u zmrznuto-odmrzutom sjemenu Aleuatske guske. Kakogod, sjeme Aleuatske guske smrznuto je i upotrebljeno za poboljšanje genetske raznolikosti osnovne populacije u Japanu. Iako se fizički može razdvojiti sjeme od fekalne i uratne kontaminacije, dio sjemena može biti izgubljeno ili ga je nemoguće separirati.

Inseminacija u kloaku, a ne u vaginu omogućuje izbjegavanje moguće infekcije kontaminiranim sjemenom. Temeljna kriobiološka istraživanja kombinirana s kontinuiranom potragom nove zbirke sperme, skladištenja i inseminacijskih tehnika omogućit će asistiranu reprodukciju važniju ulogu u upravljanju i konzervaciji rijetkih vrsta ptica (Gee i sur., 2004., Khayat i sur., 2016.).

### **2.10.3. Krioprotektori**

Postoje mnogi nepenetrirajući i penetrirajući krioprotektanti za prezervaciju sjemena ptica. Tvari poput glukoze, saharoze i polivinilpirolidona su nepenetrativni krioprotektanti. Nepenetrirajući krioprotektanti (levuloza) bio je prvi krioprotektant korišten u domaće kokoši. Penetrirajući krioprotektanti uključuju i tvari poput glicerola, etilen glikola, DMSO, DMA. Dostupni su i mnogi drugi različiti krioprotektanti poput polietilen oksida, formamida, ropanola, metil pirolidona.

Komparacija krioprotektanata je teška zbog razlika u metodama zamrzavanja-odmrzavanja. Nekoliko autora pokušalo je usporediti krioprotektante u ptica. Preživljavanje sperme nakon zamrzavanja-odmrzavanja, osim o krioprotektantima, ovisi i o drugim faktorima. Pojedine vrste i katkada jedinke iste vrste mogu reagirati drugačije ovisno o njihovoj fiziološkoj sposobnosti prevencije ili preživljavanja oštećenja tijekom procesa smrzavanja-odmrzavanja. Glavni faktori koji utječu na preživljavanje sperme su: osmotski stres, krioprotektor i njegova

koncentracija, vrijeme ekvilibracije prije zamrzavanja, temperatura tijekom ekvilibracije, razrjeđenje i stupanj smrzavanja. Centrifugiranje, pranje, razrjeđivanje i filtriranje povezani s nekim krioprezervativnim procesima mogu ograničiti sposobnost oplodnje smrznuto-odmrznute sperme.

Mnogi ekstenderi krioprotektanata korišteni su u svrhu poboljšanja preživljavanja sperme tijekom zamrzavanja i odmrzavanja. To uključuje kemijski definirane otopine poput BPSE te prirode proizvode poput mlijeka i jaja. Mnogi drugi razrjeđivači su efikasni, uključujući Lake's, MTGA, Biggers, Whitten i Whittingamov medij. Navedeni ekstenderi mogu učiniti znatnu razliku.

Mnogi istraživači smrzavaju sjeme u male francuske slamke (0,5 mL francuska slamka) no nedavno se pokazalo uspješnim u kokoši brzo smrzavanje sjemena u paletama. Uspješno je prezervirano sjeme kokoši koristeći tehniku paleta. Uspjeh je bio ograničen kod pokušaja krioprezervacije sjemena pure koristeći istu tehniku. Iz nedavnih istraživanja proizlazi da se sjeme peradi razlikuje u sposobnosti preživljavanja brzog zamrzavanja čak i u blisko srodnih vrsta. Glicerol, DMSO i DMA štite sjeme ptica tijekom krioprezervacije. Glicerol ima kontraceptivni učinak kada se inseminira sa spermom i mora se ukloniti nakon krioprezervacije i prije inseminacije. Nedavno razvijena oprema za dijalizu uzoraka sjemena osigurava učinkovit način uklanjanja glicerola iz velikih uzoraka sjemena. Glicerol se koristio za dobivanje oplodjenih jaja u nedomesticiranih ptica: 33 % oplodjenih u sivog sokola i 11 % u američkoj postovki (*Falco sparverius*). Iako se glicerol koristio u stranih vrsta, DMSO i DMA su više obećavajući u mnogih stranih vrsta zbog malih uzoraka sjemena skupljenih od mnogih vrsta. Također, aviakulturisti mogu direktno koristiti sjeme, bez potrebe za uklanjanjem krioprotektanta. Neovisno o upotrebljenim krioprotektantima i ekstenderima postotak preživljavanja rijetko prelazi 50 % (Gee i sur., 2004., Winkler i sur., 2015.).



## PRILOG SLIKE



*Slika 19: Umjetno osjemenjivanje velike droplje (*Otis tarda*) uz pomoć spekuluma i aplikacije (ECPWP Emirates center, 2017.).*



*Slika 20: Gospodin Bram Ciertes, director Tropic ZOO Belgija, jedan je od najboljih osjemenitelja rijetkih i ugroženih vrsta ptica u Europi.*



*Slika 21: Primjena sperme u kloaku kod indijskog ždrala (*Grus Antigone antigone*).*



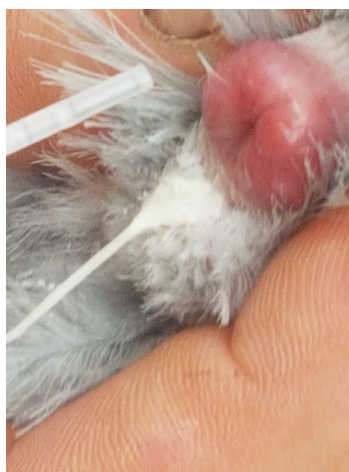
*Slika 22: Dr. Zlatko Golob DVM, specijalist za liječenje malih, divljih i egzotičnih životinja, bavi se umjetnim osjemenjivanjem rijetkih i ugroženih vrsta i liječenjem poremećaja plodnosti u uzgojnom centru, te brine o očuvanju mozaika biološke raznolikosti.*



*Slika 23: Otvor jajovoda kod ženke indijskog ždrala (Grus antigone antigone).*



*Slika 24: Primjena sjemena u jajovod ženke indijskog ždrala (Grus antigone antigone).*



*Slika 25: Priprema primjene sjemena u kloaku ženke crnovratog ždrala (Grus nigricolis).  
Domovina: Butan, S Indija, Kina (Zoološki vrt Bram Ciertes Tropic, Belgija 2019.).*



*Slika 26: Primjena sjemena u jajovod ženke crnovratog ždrala. (Zoološki vrt Bram Ciertes Tropic, Belgija 2019.).*



*Slika 27: Demonstracija primjene sperme u jajovod ženke indijskog ždrala (*Grus antigone antigone*). (Uz dopuštenje zoološkog vrta Tropic, Belgija).*



*Slika 28: Rezultat umjetne oplodnje. Mladunci crnovratih ždralova (*Grus nigricolis*). Očuvanje rijetkih i ugroženih vrsta ptica; konzervatorska veterina. Ljubaznošću zoološkog vrta Tropic, Belgija.*

### 3. RASPRAVA

Poznavanje funkcionalne anatomije reproduktivnog sustava ptica je uvjet za uspješno izvođenje postupka umjetnog osjemenjivanja ptica (Golob, 2011.). Umjetno osjemenjivanje prvi je put izvedeno u SAD-u dvadesetih godina 20. stoljeća. A zatim je široko korištena u Australiji uvođenjem koka nesilica krajem pedesetih godina. Umjetna je osjemenjivanje jedini način razmnožavanja tovnih hibridnih purana, koji su zbog svoje težine nesposobni za parenje (Kharayat i sur., 2016.). Umjetno osjemenjivanje rijetkih i ugroženih vrsta ptica u uzgojnim centrima i u zooloških vrtovima, ima važnu ulogu u očuvanju i razmnožavanju genetskog fonda i njihovom naseljavanju nazad u prirodu.

Znanstvenici su prepoznali potencijal dugoročnog zamrzavanja ptičjeg sjemena. Sheffner je bio prvi istraživač koji je uspješno zamrznuo ptičje sjeme. Prvo sjeme, koje je bilo smrznuto i odmrznuto te korišteno za proizvodnju živih potomaka, a popraćeno je otkrićem glicerola, kao uspješnog krioprotektora peradi i nedomesticiranih vrsta. Kod dubokog smrzavanja sperme velikog kanadskog ždrala (*Grus canadensis tabida*), je vrlo dobre rezultate postigao uporabom krioprotektora DMSO u 6 % postotnom udjelu, jer je nakon odmrzavanja preživljavanje i gibljivost spermija iznosila 55 % (Gee i sur., 2004.).

Prema primjeru konzervacijske biologije (Primak, 2010.), predlaže se otvaranje nove grane veterinarske medicine **»KONZERVACIJSKA VETERINARSKA MEDICINA- CONSERVATION VETERINARY MEDICINE« ZA OČUVANJE RIJETKIH I UGROŽENIH VRSTA ŽIVOTINJA.**

## 4. ZAKLJUČAK

Umjetno osjemenjivanje i krioprezervacija sjemena igraju vrlo važnu ulogu u očuvanju kritično ugroženih vrsta ptica i vrsta, koje se u zatočeništvu ne mogu reproducirati. Zbog iscrpljivanja staništa, izlova i onečišćenja, mnoge su vrste na rubu izumiranja. Planet se pretvorio u jednu veliku monokulturu, u kojoj se pjev ptica rijetko čuje, a s njom smo i dužni i predani, mi koji smo dovoljno informirani, da pokušamo sačuvati ono, što je ostalo. Danas se postupak umjetne oplodnje široko koristi u velikim proizvodima od peradi zbog ekonomskog gledišta, a također i zbog brzog i vrlo uspješnog kontroliranog postupka, koji također smanjuje neke bolesti i probleme u uzgoju određenih vrsta peradi. U slučaju divljih ptica, koje se uzgajaju u zatočeništvu u svrhu oslobađanja i očuvanja vrsta, umjetno osjemenjivanje je tim važnije, jer su divlje ptice u zatočeništvu vrlo zahtjevne, trebaju vrlo dobre uvjete i okoliš bez stresa, jer čak i najmanji stres uvelike utječe na reproduktivno razdoblje i na koncentraciju za ovulaciju važnih hormona. Mnogo je problema i s mužjacima, jer oni često nisu u stanju oploditi ženke, a istovremeno umjetno osjemenjivanje je vrlo uspješno. Krioprezervacija je također postala vrlo važna tema istraživanja i jako se razvila posljednjih desetljeća. Iako postoji mnogo dvosmislenosti u krioprezervaciji sjemena ptica i ostalo je mnogo znanstvenih istraživanja, već se uspješno koristi za očuvanje nekih kritično ugroženih vrsta ptica. Krioprezervacija omogućuje smanjenje gubitka genetske raznolikosti, razmjenu gena između različitih populacija bez potrebe za premještanjem ptica kada su populacije vrlo male, kao i smanjenje inbridinga. U budućnosti će krioprezervacija biti sve važnija zbog masovnog izumiranja vrsta, a u slučaju da se stvori genetska banka smrznutog sjemena ptica, neke od posljednjih predstavnika vrste bit će lakše sačuvati i razmnožiti.

## 5. SAŽETAK

Diplomski rad opisuje umjetno osjemenjivanje ptica, s naglaskom na ždralovima i dropljama. Prikazani su postupci za rukovanje životinjom, sakupljanje sjemena, osjemenjivanje ženke izravno u jajovod i kratki opis dubokog smrzavanja sjemena ptica. Maksimalno 6% DMSO djeluje kao krioprotektant, osiguravajući 55 % preživljavanja i pokretljivosti sperme nakon odmrzavanja kod velikog kanadskog ždrala. Također je predstavljena funkcionalna anatomija reproduktivnog sustava ptica, zbog boljeg razumijevanja funkcioniranja spolnih organa mužjaka i ženki tijekom reprodukcije. Od osobite je važnosti vlastiti slikovni materijal o postupku osjemenjivanja ždralova i droplji. Najvažniji cilj diplomskog rada je otvaranje nove grane veterinarske medicine "KONZERVACIJSKA MEDICINA - CONSERVATION MEDICINE", koja se brine o očuvanju rijetkih i ugroženih vrsta te zaštitom biološke raznolikosti.

**Ključne riječi:** umjetno osjemenjivanje ptica, zamrzavanje sjemena ptica, funkcionalna anatomija reproduktivnog sustava ptica, konzervacijska medicina

## 6. SUMMARY

### **Artificial insemination and cryopreservation of avian semen**

The diploma thesis describes the artificial insemination of birds, with an emphasis on cranes and bustards. Procedures for handling the animal, semen collection, insemination of the female directly into the fallopian tube and a brief description of the deep freezing of bird semen are presented. A maximum of 6 % DMSO works as a cryoprotectant, ensuring 55 % sperm survival and motility after thawing in a large Canadian crane. The functional anatomy of the reproductive system of birds is also presented, due to a better understanding of the functioning of the sexual organs of males and females during reproduction. Of particular importance is the own pictorial material of the process of insemination of cranes and droplets. The most important goal of the diploma thesis is to open a new branch of veterinary medicine "CONSERVATION MEDICINE", which takes care of the conservation of rare and endangered species and the protection of biodiversity.

**Key words:** artificial insemination of birds, freezing of bird semen, functional anatomy of the reproductive system of birds, conservation medicine



## 7. POPIS LITERATURE

- AL-DARAJI, H. J., S. A. AL-SHEMMARY (2016): Effect of breed of falcon on semen quality traits; *Int. J. Conser. Sci.* 7, 725-734.
- CERGOLJ, M., M. SAMARDŽIJA (2006): Umjetno osjemenjivanje peradi. U: Veterinarska andrologija. Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagebu.
- ECWP Emirates Center for Wildlife Propagation (2017): Le succes d'un programme de restauration et de conservation d'une espece menacee, l'outarde houbara (*Chlamydotis undulata*. International Fund for Houbara conservation, Marocco.
- GEE, G. F., H. BERTSCHINGER, A. M. DONGHUE, J. BLANCO, J. SOLEY (2004): Reproduction in Nondomestic Birds: Physiology, Semen Collection, Artificial Insemination and Cryopreservation; *Avian and Poultry Biology Reviews* 15, 47-101.
- GEE, G. F., M. BAKST, T. J. SEXTON (1985): Cryogenic preservation of semen from greater sandhil crane. *J. Wildl. Manage* 49, 480-484.
- GOLOB, Z. (2011): Funkcionalna anatomija ptičev z osnovami ornitologije. Fakulteta za naravoslovje in matematiko; Univerza v Mariboru.
- Handbook of Avian anatomy: Nomina anatomica avium (1993): Nutal ornitological club; Harvard University.
- HARRISON, G. J., L. T. LIGHTFOOT (2006): *Clinical Avian Medicine Volume 2*, Spix Publishing, Inc., Palm Beach, Florida.
- HUGHES, J. M. (2008): *Cranes. A natural History of a Bird in Crisis*. Firefly Books, New York.
- KHARAYAT, N. S, G. R. CHAUDHARY, R. KATIYAR, B. BALMURUGAN, M. PATEL, S. UNIYAL, M. RAZA, G. K. MISHRA (2016): Significance of Artificial Insemination in Poultry. *Res. Rew. J. Vet. Sci. Tech.* 5 (1).
- KING, A. S., J. MCLELLAND (1984): *Birds. Their structure and function*. Bailliere Tindall.
- MCLELLAND, J. (1990): *Colour Atlas of Avian Anatomy*. University of Edinburgh, Scotland. Wolfe Publishing Ltd.
- PRIMACK, R. B. (2010): *Essentials of Consevation Biology*, fifth edition. Sinauer Associates, Inc Publishers, Sunderland, Massachusetts, USA
- SAMOUR, J. H. (2004): Semen Collection, Spermatozoa Cryopreservation, and Artificial Insemination in nondomestic Birds. *J. Avian Med. Surg.* 18, 219-223.
- WINKLER, W. D., S. M. BILLERMAN, I. J. LOVETTE (2015): *Bird Families of the World: An invitation to the Spectacular Diversity of Birds*. Lynx Edicions, Barcelona.

## 8. ŽIVOTOPIS

Rođen 19. srpnja 1993. u Slovenj Gradcu, Slovenija. Od malena sam bio nadahnut da postanem veterinar i jedina želja mi je bila da to postanem i pomognem životinjama u nevolji. Na ovako lijepom djetinjstvu i nebrojenim iskustvima na polju divljih i egzotičnih životinja moram zahvaliti ocu koji mi je otvorio put veterinaru i fascinirao me prirodom, a posebno očuvanjem rijetkih vrsta i okoliša. Osnovnu školu pohađao sam na Muti. U osnovnoj školi osvojio sam srebrnu nagradu za istraživački projekt pod nazivom: Slovenski medvjedi u zatočeništvu i poboljšanje životnih uvjeta. 2008. godine upisao sam opću gimnaziju na Ravnama na Koruškem. Nakon uspješno završene srednje škole, 2013. godine upisao sam Veterinarski fakultet u Zagrebu. Tijekom studija vježbao sam u slobodno vrijeme u našoj ambulanti za male, divlje i egzotične životinje i u Azilu za divlje životinje, koji već duži niz godina uspješno vodimo i u prirodu smo vratili tisuće divljih, zaštićenih životinja.