A satellite image of Europe and the Mediterranean region, showing the Iberian Peninsula, France, and parts of Italy and the Balkans. The land is shown in shades of green and brown, while the sea is a deep blue. The text is overlaid on the left side of the image.

ASISTIRANA REPRODUKCIJA MALIH PREŽIVAČA

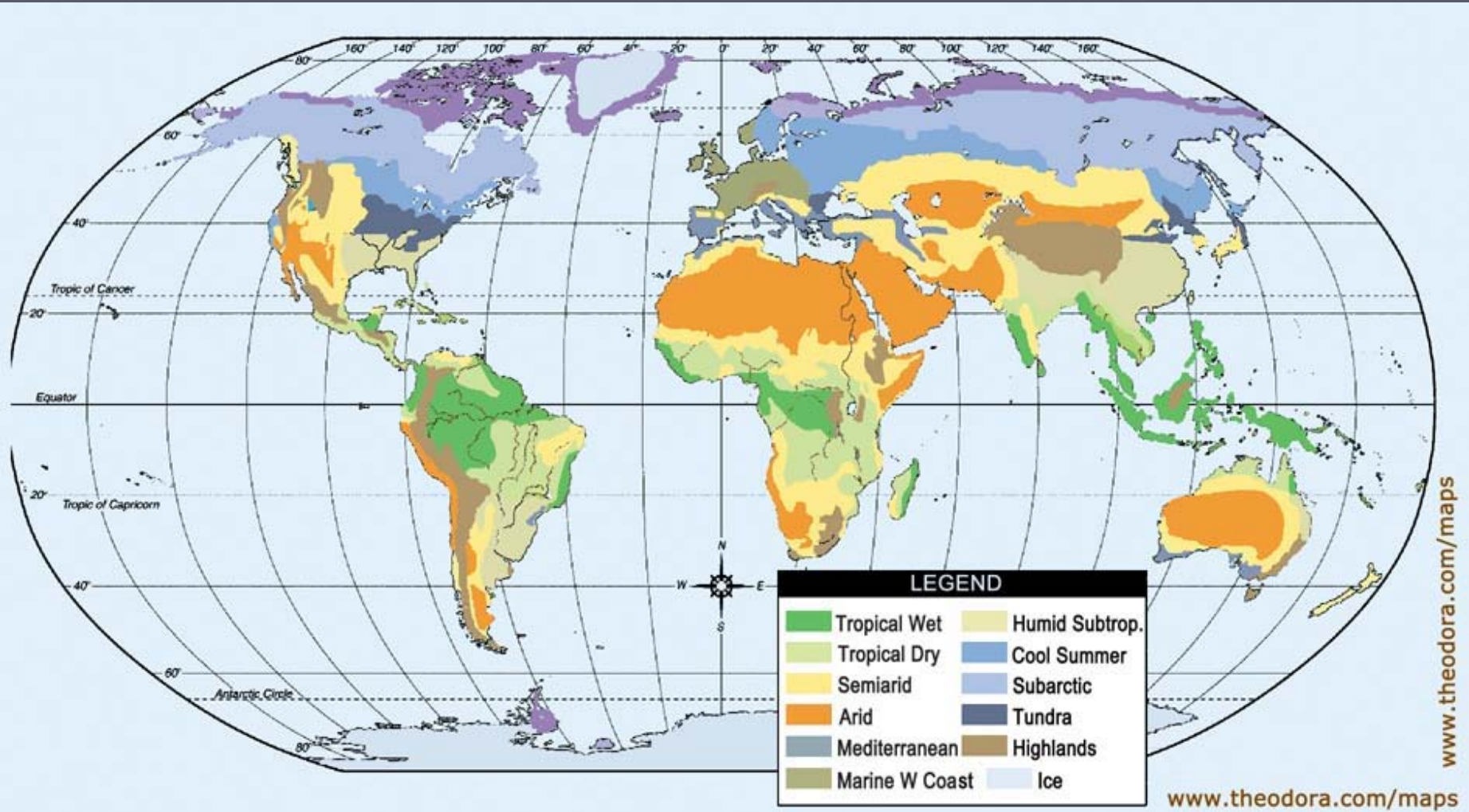
**Doc. dr. Juraj Grizelj
Veterinarski fakultet**

Zagreb, 16. studenog 2009.

Pregled

- ▶ uvjetovanost sezonosti spolnog ciklusa
- ▶ sinkronizacija spolnog ciklusa
- ▶ tehnike U.O.
- ▶ UZV
- ▶ superovulacijski protokoli
- ▶ ispiranje maternice
- ▶ ocjena i smrzavanje zametaka
- ▶ transfer

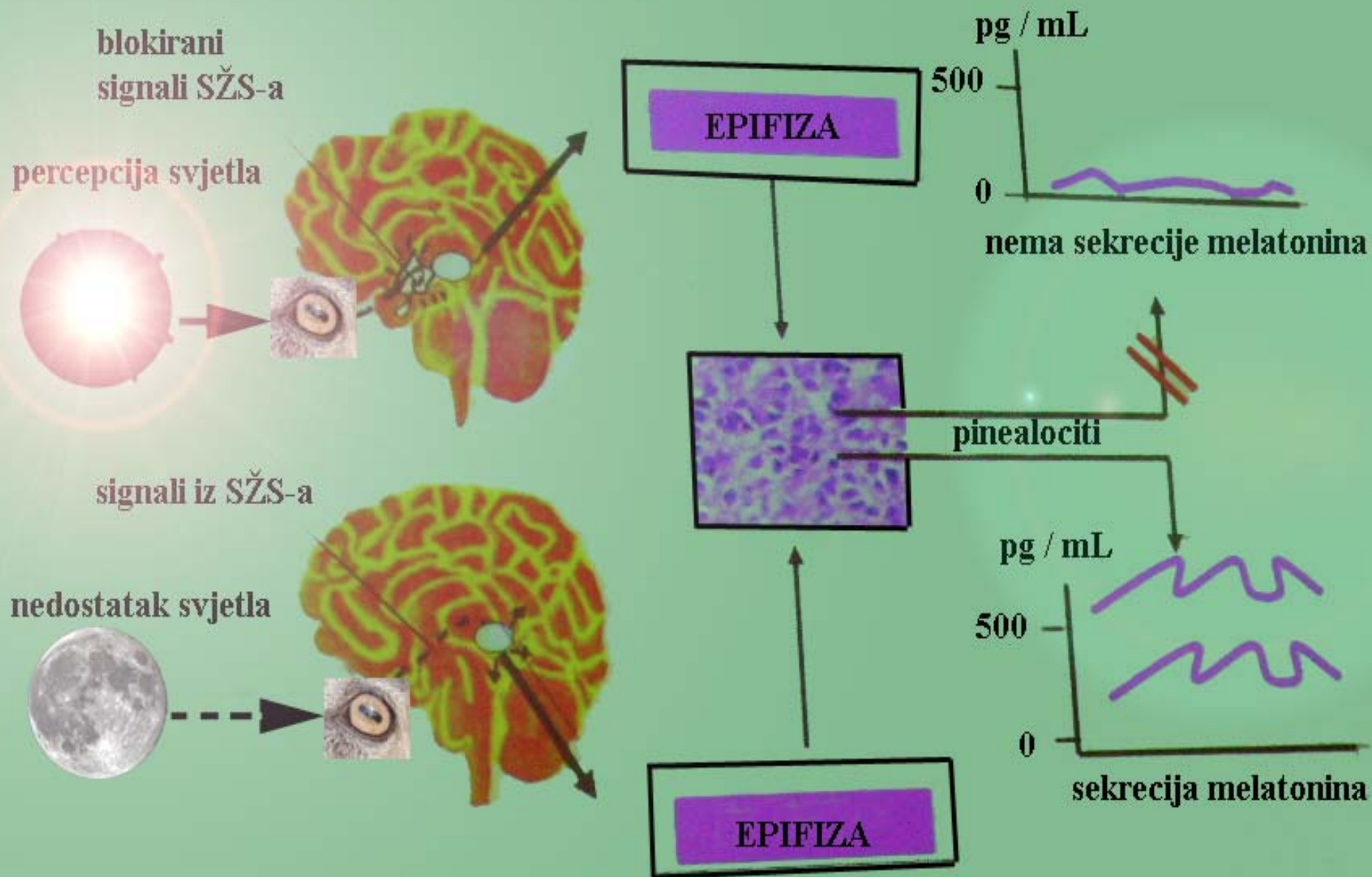
Uvjetovanost sezonalnosti spolnog ciklusa



Uvjetovanost sezonosti spolnog ciklusa

- ▶ sezonski poliestrične
- ▶ fotoperiod – glavni čimbenik okoliša
- ▶ aktivnost gonada i spolna akt. variraju ovisno o dužini dana – **short day breeder**
- ▶ svjetlost – živč. vlakna - epifiza –melatonin (lučenje tijekom noći) – djelovanje na hptl. i hipofizu

Prijenos svjetlosne informacije : epifiza : melatonin

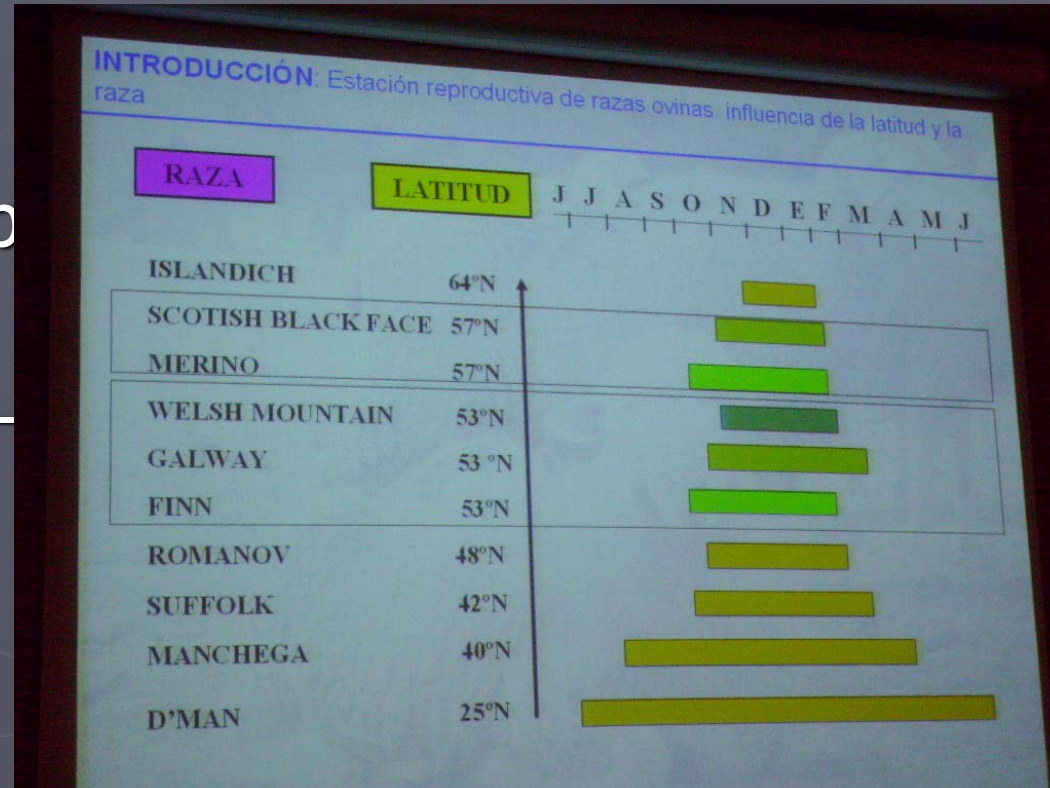


Sezonost spolnog ciklusa

- ▶ Sezonost ovisi o geografskoj širini
- ▶ veća geo širina – duže trajanje sp. inaktivnosti!
- ▶ Sjeverna hemisfera – vrlo kratko razdoblje sp.aktivnosti (11.-2.)
- ▶ umjereno područje – sezonost izražena, max aktivnost tijekom razdoblja opadanja svjetla
- ▶ Sredozemlje – anestrus od 3. – 6.
- ▶ Tropi – slabe varijacije fotoperioda, ciklička aktivnost tijekom cijele godine

Sezonost spolnog ciklusa

- ▶ sezonost uvjetuje povezanost datuma rođenja i dobi ulaska u pubertet
- ▶ rođenje prije ožujka – sazriju već u jesen (dob 8 – 11mj)
- ▶ rođenje nakon ožujka – tek sa 18 mj.
- ▶ pripust ovisno o tjelesnoj građi i masi (45kg)
- ▶ Ne prerano pripuštati!



Važnost fotoperioda

Umjetna inverzija svjetlosti - nastaje pomak sp. aktivnosti od 6 mj.

smanjenje fotoperioda - aktivacija sp. akt.

povećanje fotoperioda - inhibicija sp. akt.

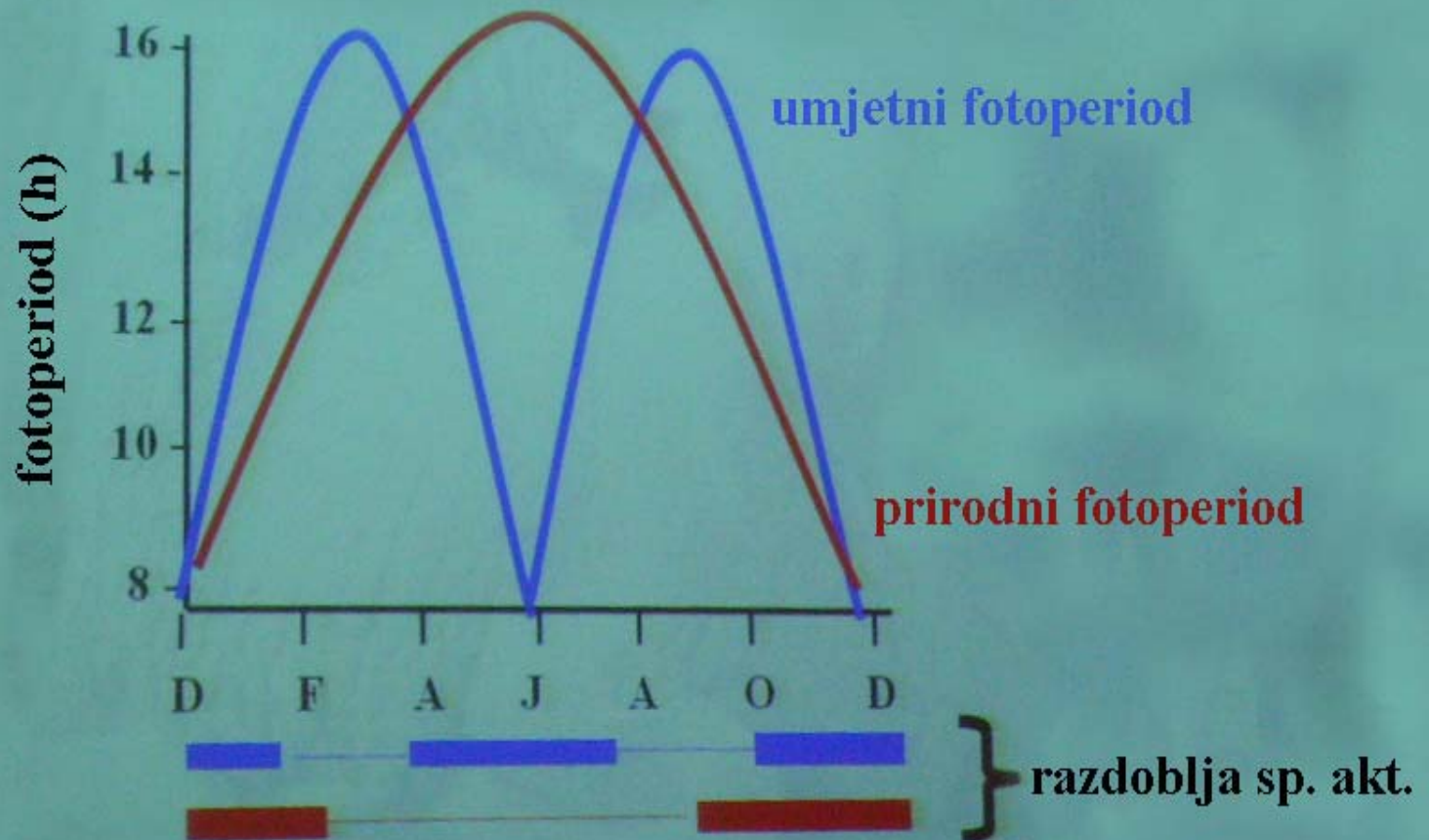


Važnost fotoperioda

Semestralni svjetlosni ritam stvara godišnji efekt svako 6 mj.

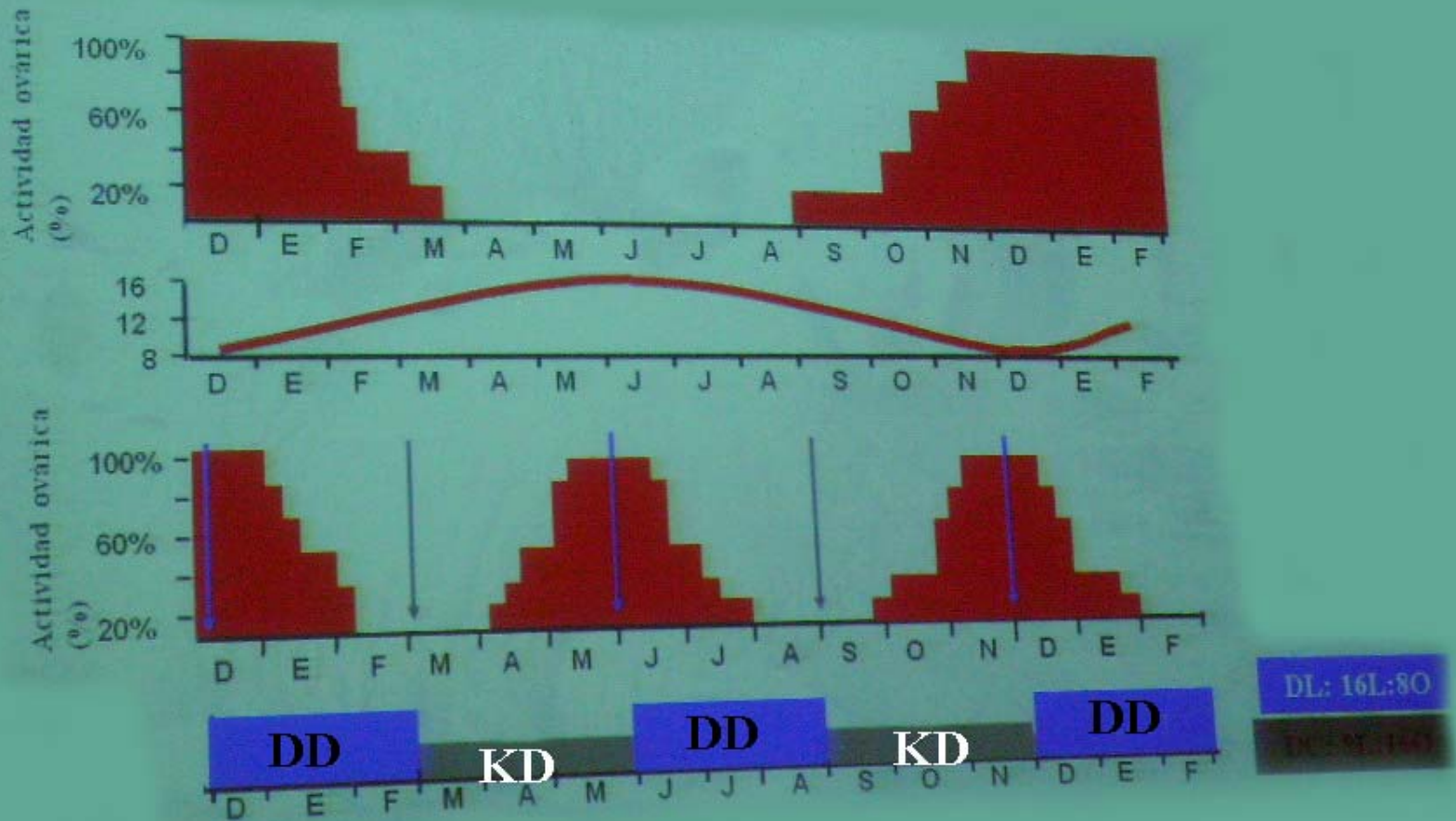
smanjenje fotoperioda - stimulacija sp. akt.

povećanje fotoperioda - inhibicija sp. akt.



Izmjena DD i KD svako 3 mj. inducira pojavu razdoblja jajničke aktivnosti i neaktivnosti

prijelaz s KD na DD – inhibicija ovulatorne akt. nakon 20 – 35d
prijelaz s DD na KD – početak ovulatorne akt. 40 – 50d nakon početka protokola



Sezonost mužjaka?



- ▶ Spermioogeneza se ne zaustavlja, ali se smanjuje isto kao i masa testisa

| | |
|-----------------------------|-------------------------------|
| 1g testisa ovna | |
| jesen 12×10^6 spz. | proljeće 9×10^6 spz. |
| 8.mj. $>300g$ | 5.mj. $200g$ |
| 1g testisa jarca | |
| 9.mj. $>150g$ | 5.mj. $<100g$ |

Sezonost mužjaka? DA

- ▶ Ovan – u proljeće do 70% anormalnih sp.
- ▶ Jarac – smanjen motilitet i plodnost
- ▶ V ejakulata veći u sezoni
- ▶ Conc manja u sezoni – više plazme
- ▶ Slabiji libido u proljeće – dulje vrijeme opasivanja; kod redovitog polučivanja manje izraženo

Spolni ciklus malih preživaa

- ▶ REGRUTACIJA više folikula ($\varnothing 2\text{mm}$) počinje rasti (FSH) tijekom luteolize – SELEKCIJA i atrezija - DOMINACIJA i završno sazrijevanje
- ▶ 2-3 od njih do preovulatornog stadija
- ▶ **Ovulatorni folikuli 6-8mm**

Metode sinkronizacije



- ▶ Prirodne: svjetlosni režim, utjecaj mužjaka
- ▶ Farmakološke: implantati melatonina, vaginalne spužvice, prostaglandini



Svjetlosni režim

- ▶ pojava spolne akt. van sezone
- ▶ izmjena režima dugih i kratkih dana (4 h razlike!)
- ▶ tretman svjetlom ili zamračenje zastorima
- ▶ short day effect – implantati melatonina

Svjetlosni režim

KLASIČNI PROTOKOL za parenje u proljeće
(svibanj)

1) DD (16h/dan) tijekom zime

(70-90d, prosinac–ožujak)

2) povratak na prirodno svjetlo (KD – **4h**

razlike) je stimulatorni signal i razlog

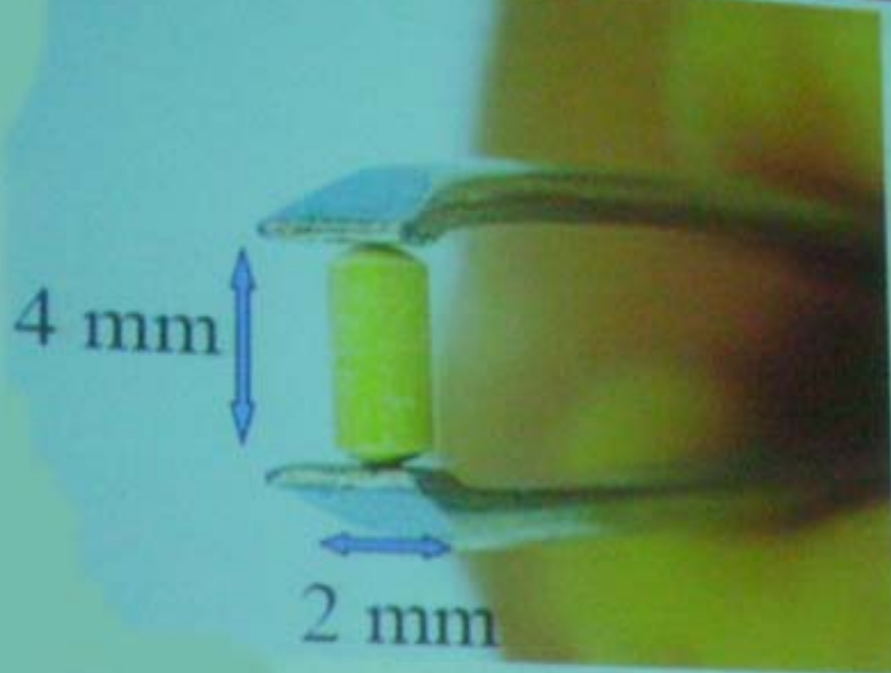
boljeg odgovora na uvođenje mužjaka (60d

nakon kraja DD) u svibnju

Svjetlosni režim

KLASIČNI PROTOKOL za parenje u ljeto

- 1) DD (16h/dan) tijekom proljeća
(70-90d, veljača-svibanj)
- 2) melatonin ili KD (90d) jer je dan
predugačak (samo 2h razlike) + uvesti
mužjaka (60d nakon kraja DD)



Implante Melovine
(CEVA, Salud Animal)



Proporcionan una liberación continua
de melatonina



Protokol korištenja implantata melatonina (Melovine)

odvajanje mužjaka
aplikacija 3 implantata

Nije protokol
sinkronizacije estrusa!

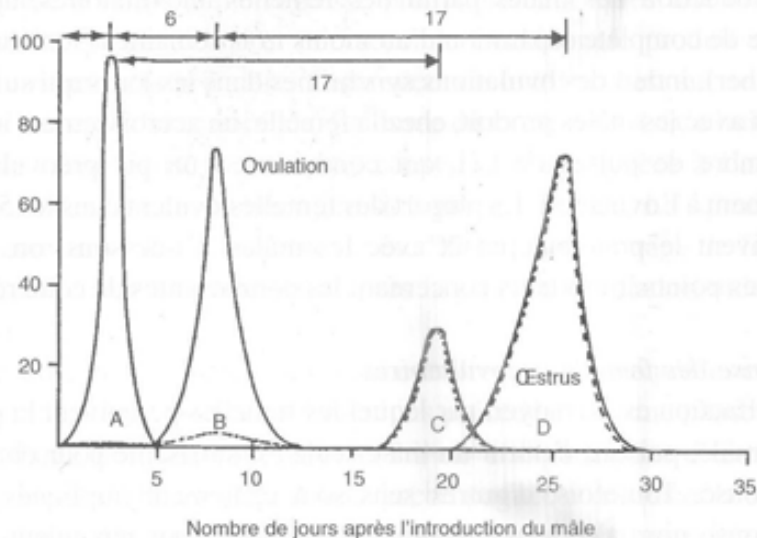


7 mjeseci prije početka
sezona poroda

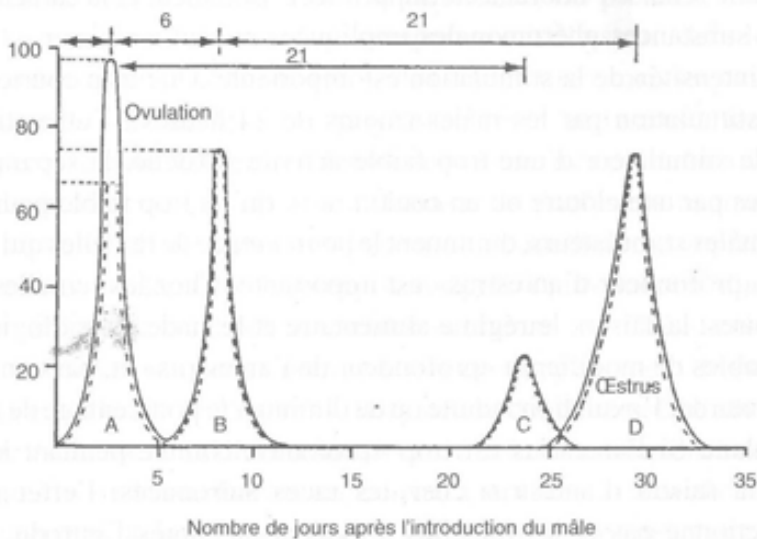
Utjecaj mužjaka

- ▶ ovan i jarac mogu pred početak rasplodne sezone u ženki stimulirati sekreciju gonadotropina i tako pokrenuti spolnu aktivnost
- ▶ bez utjecaja u dubokom anestrusu
- ▶ ovulacije unutar 50h
- ▶ uvjeti: prethodna međusobna odvojenost (4 tjedna – zvuk, vid, **miris**, dodir)

Pourcentage de brebis
ovulant ou en œstrus

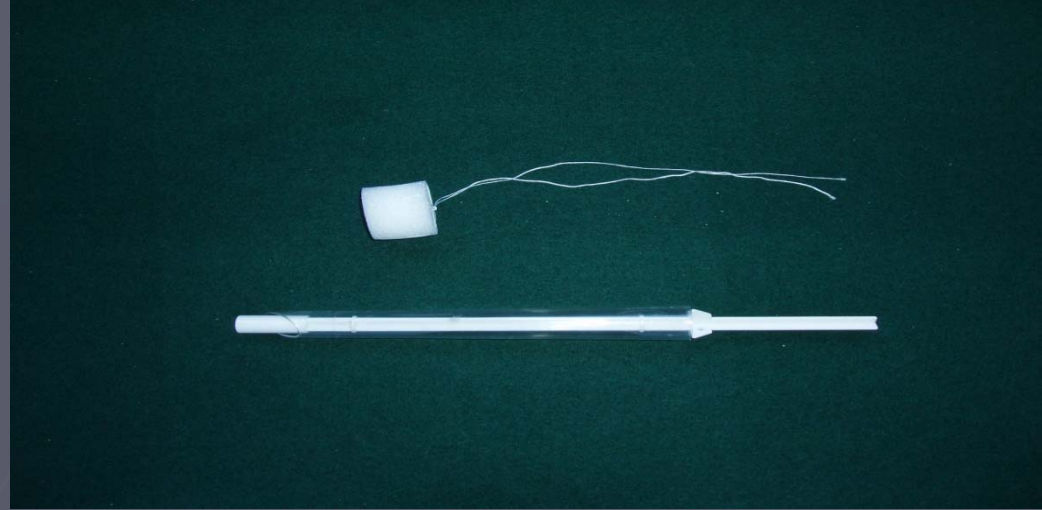


Pourcentage de chèvres
ovulant ou en œstrus



- ▶ OVCE: plodni estrusi 20-25d po uvođenju; za plodnost potreban jedan normalni CL ciklus
- ▶ KOZE: 2 "peak-a": 7-11d i 27-35d po uvođenju

Vaginalne spužvice + eCG



- ▶ progestagenske poliuretanske spužvice
- ▶ **OVCE**: 12d van sezone / 14d u sezoni
+ 500-700 i.j. / 400-500 i.j. eCG
prilikom vađenja
- ▶ estrus za 36-48h (šilježice ranije)
- ▶ uvesti ovna 36-40h (1:10, van sezone 1:5)
- ▶ U.O. 55h (u šilježica 50) – 1x
50 i 60h - 2x
i/ut 60-66h



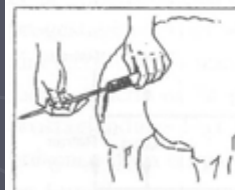
Insertion: 1. Désinfecter l'applicateur avec un désinfectant quaternaire. Traiter l'éponge avec une poudre antibiotique.



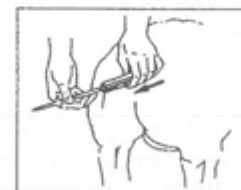
2. Insérer doucement le tube et le poussoir. Une faible résistance peut se manifester. Si une résistance importante se manifeste, examiner l'hymen avec le doigt pour détecter une malformation.



3. Laisser le tube en place, retirer le poussoir et placer l'éponge dans l'extrémité du tube, avec la ficelle vers l'arrière.



4. Utiliser le poussoir pour pousser l'éponge dans le tube jusqu'à ce qu'elle atteigne le cervix.



5. Laisser le poussoir en place et retirer le tube de 2 à 3 cm pour expulser l'éponge. Retirer les deux instruments.



Retrait: 6. Retirer les éponges le matin. Détruire les éponges après usage.

► **KOZE:** dugi tretman 16-21d + eCG (48h prije završetka)

kratki 11d + PG i eCG (48h prije završetka)

≥3,5L : 600-700 i.j. van sezone / 500-600 u sezoni

<3,5L : 500-600 / 400-500 i.j.

► estrus za 24-72h

► U.O. 36-43h nakon vađenja (60% jarenja)

- ▶ ponovljena uporaba eCG – Anti eCG At – smanjena učinkovitost protokola i smanjena plodnost
- ▶ eCG je purificiran iz animalnog tkiva – mogućnost prisutstva patogena u pripravku
- ▶ uporaba progestagena utječe na MRL (maximum residue limits) u mlijeku – u FRA ne smije mlijeko na tržište 15 dana (11d protokol + 4d ili 30 mužnji) – od 2008 nove spužvice s manjom količinom gestagena na tržištu u FRA
- ▶ EU trendovi izbjegavanja hormona i sint. pripravaka

prostaglandini

- ▶ samo tijekom sezone spolne aktivnosti
- ▶ slabija plodnost u odnosu na spužvice (67% : 80%)
- ▶ cl refrakterno 4d
- ▶ protokol: 2 injekcije PG u razmaku 9-11d
- ▶ pojava estrusa 36-48h u ovaca,
72-96h u koza

U.O. protokoli

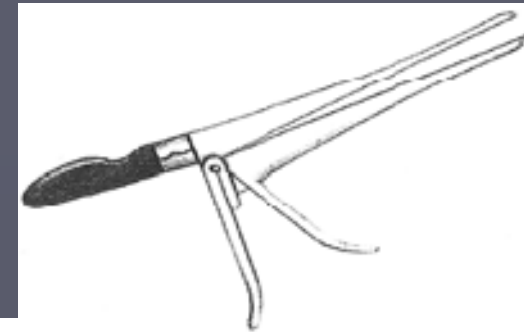
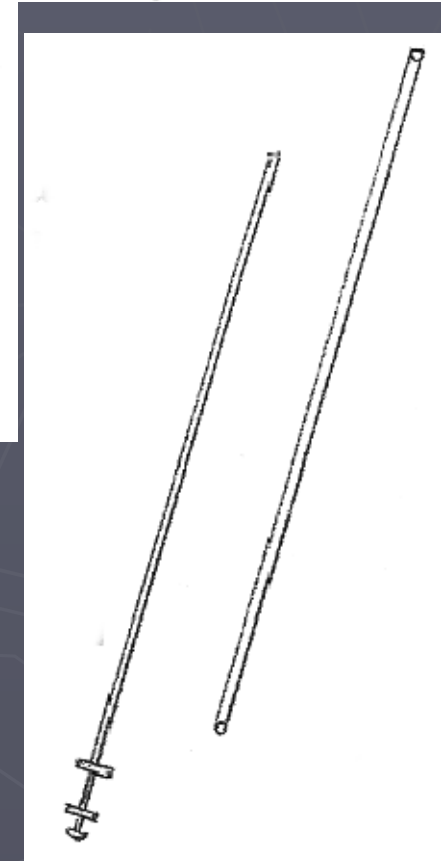
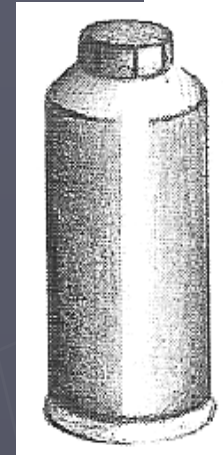


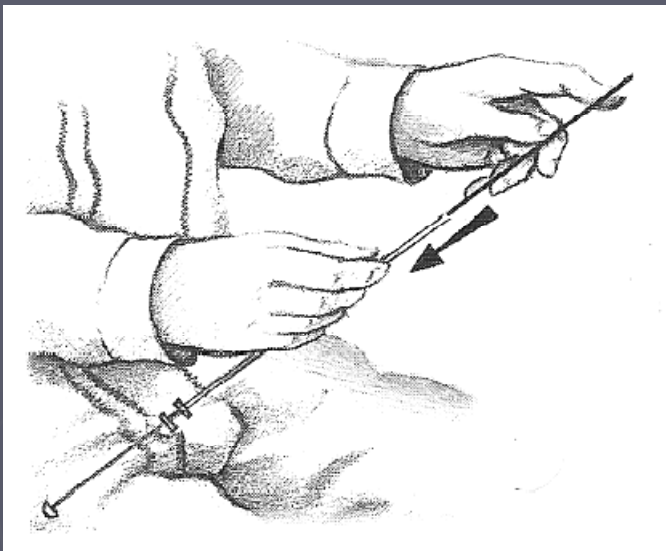
Intracervikalno UO – 1-2cm

Intrauterino UO- ne siliti

Sjeme se polaže na ulaz u cerviks (ovce, većina koza) ili u uterus (10-30-50% koza; blizu ovulacije).

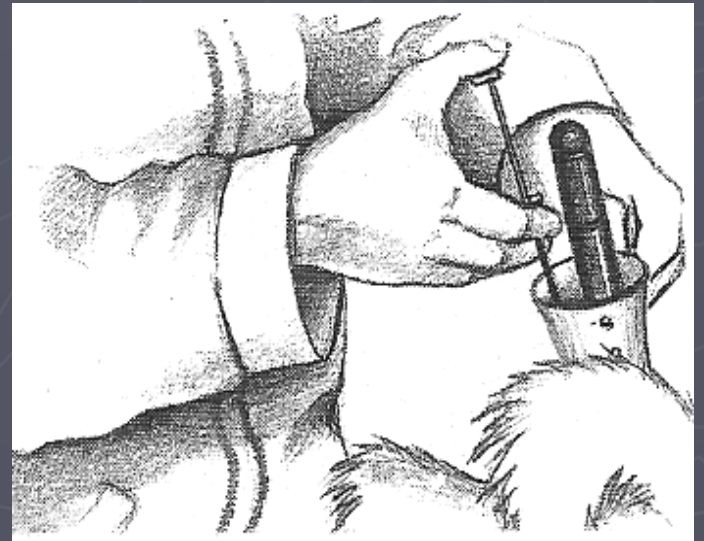
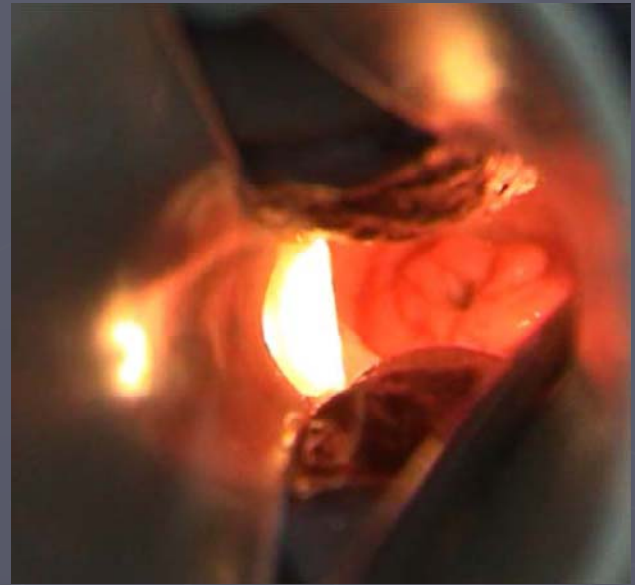
Pajete otopiti 37-38°C, 15-30s.





- cerviks – vulkan,
pupoljak, roze boje

- raditi brzo – izbjeći stres!



U.O. protokoli

| | 1xUO | 2xUO |
|-------------|-------------|--------------------------------------|
| OVCE | 55h | 50 i 60h |
| KOZE | 45 | 30 i 48h (Sanske, prije 15.6.) |

OVCE

- ▶ **svježe sjeme** 400×10^6 0,25mL 1UO 50%
- ▶ **smrznuto** 900×10^6 2x0,25mL 1-2UO

(laparoskopski – 10x manja doza, plodnost 60%)

- ▶ UO bez sinkronizacije: 2x/dan detekcija, UO 15-17h od prve detekcije

KOZE (mliječne, poznatih karakteristika)

▶ **svježe sjeme** 150x10⁶ 0,25mL 1UO
70%

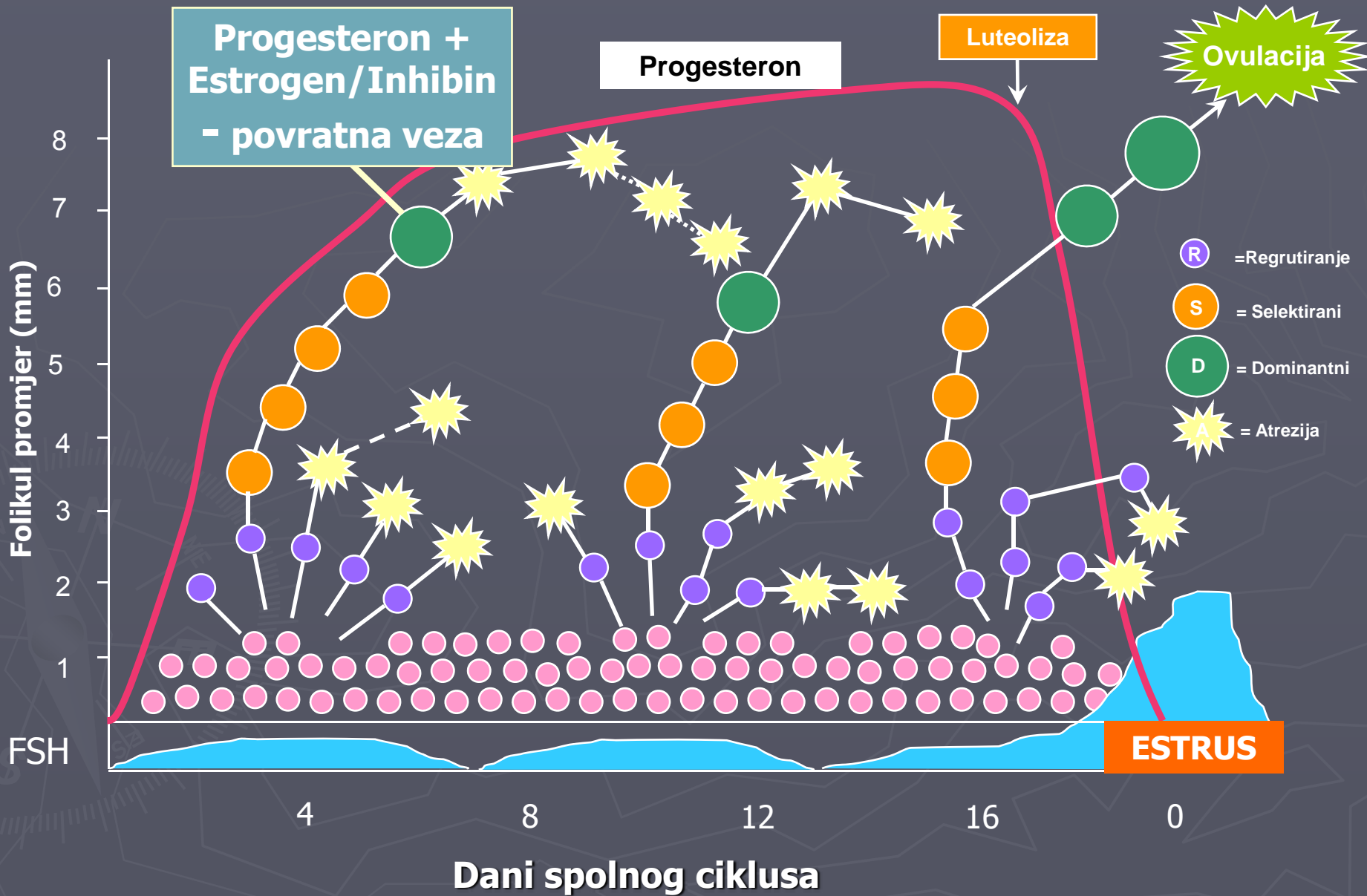
▶ **smrznuto** 100x10⁶ 0,25mL 1UO
40% 2x200x10⁶ 0,5mL 2UO

(Sanske, prije 15.6.)

▶ UO bez sinkronizacije: 2x/dan detekcija,
UO 12 i 24h od prve detekcije

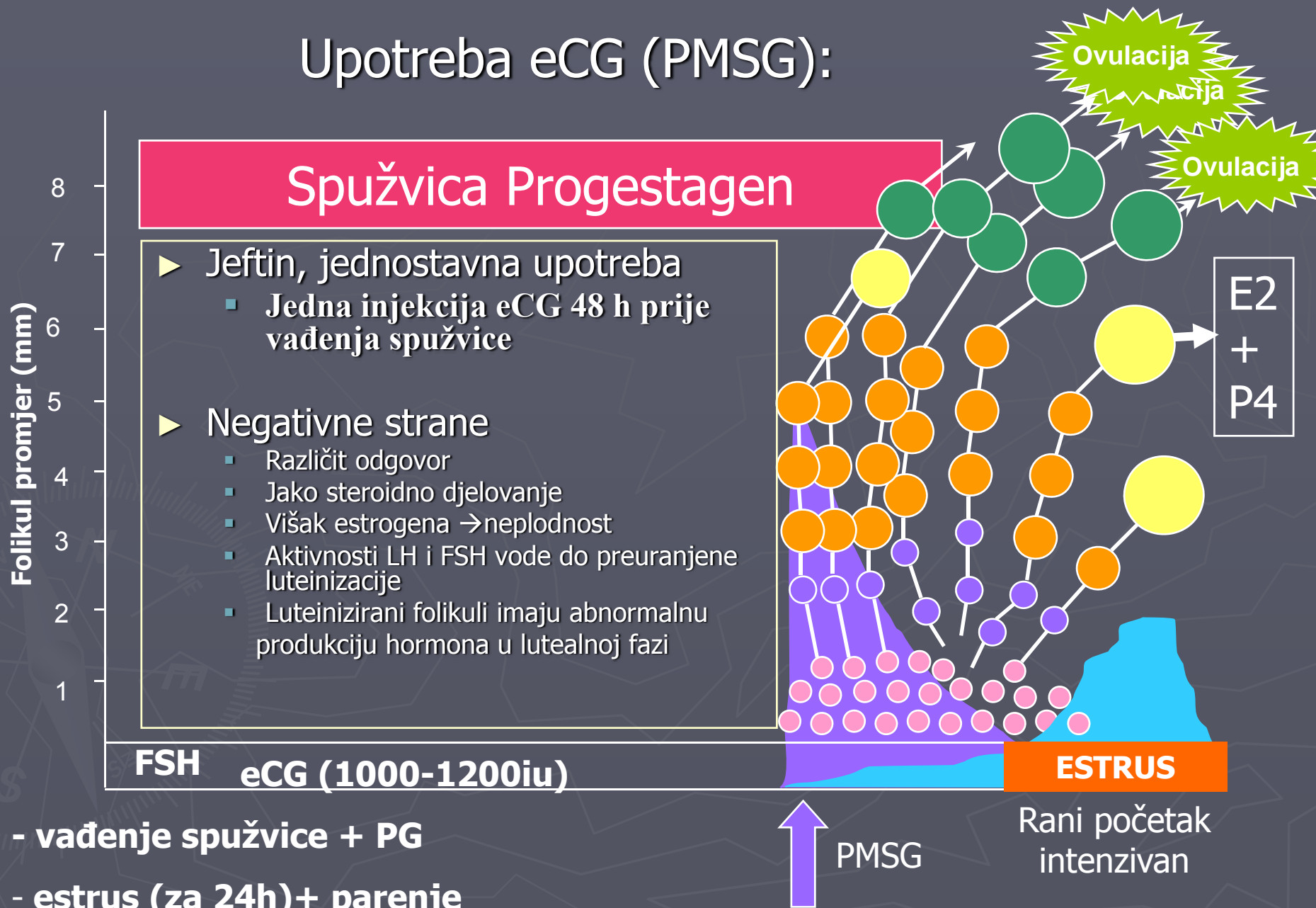
Superovulacija i transfer zametaka

- ▶ porast genetskog utjecaja vrijednih ženki, smanjen trošak transporta živih jedinki, karantene, prijenosa bolesti, aklimatizacije
- ▶ ZP je barijera prijenosu bolesti
- ▶ aplikacija visokih doza FSH – stimulacija rasta puno predovulatornih FOL:
 - 1) oocite za IVP zametaka
 - 2) in vivo produkcija zametaka



Višestruka ovulacija za embrio transfer

Upotreba eCG (PMSG):

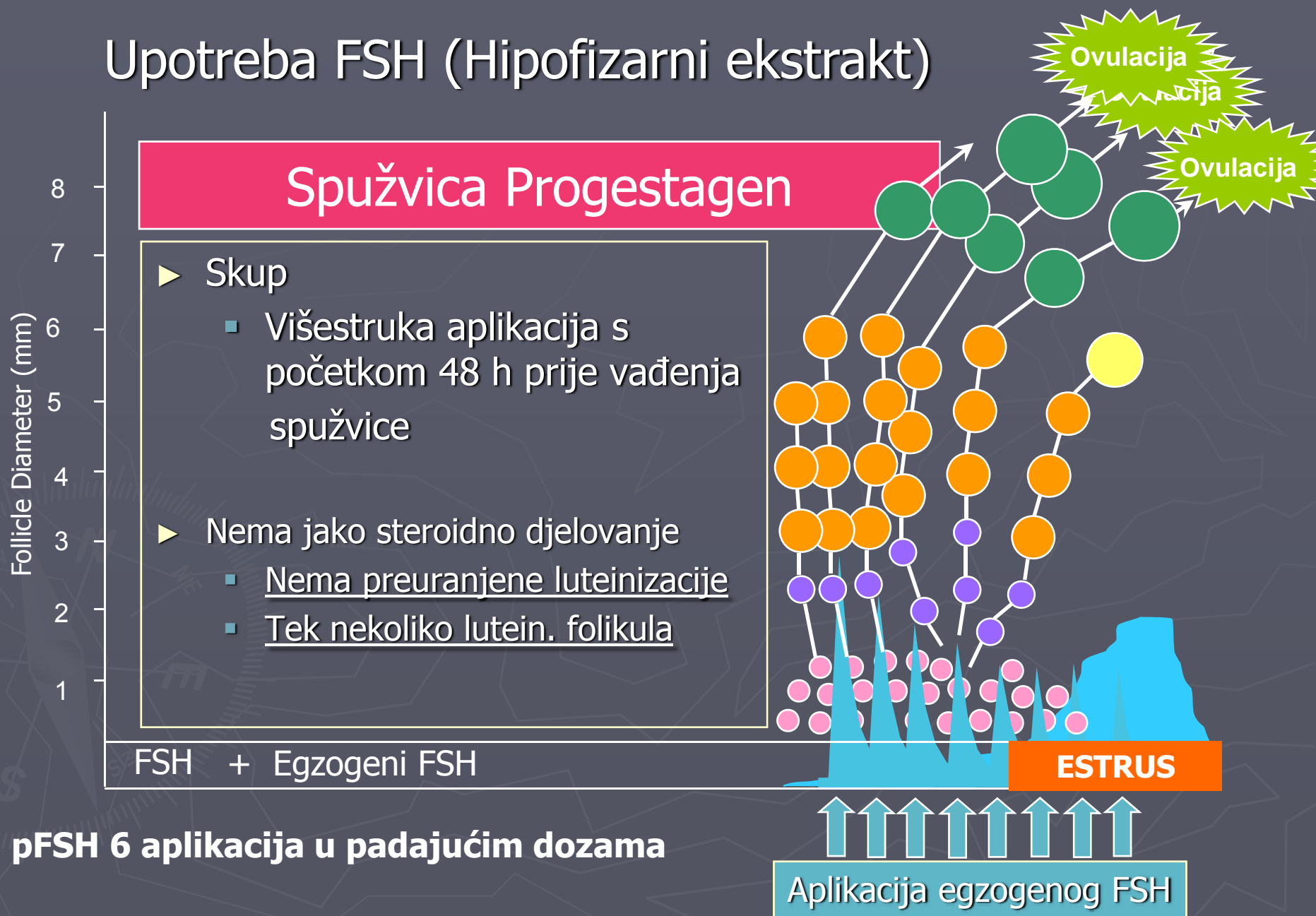


- vađenje spužvice + PG

- estrus (za 24h)+ parenje

Višestruka ovulacija za embrio transfer

Upotreba FSH (Hipofizarni ekstrakt)



pFSH 6 aplikacija u padajućim dozama

Aplikacija egzogenog FSH

Protokol superovulacije koza



ministarstvo znanosti, obrazovanja i športa

(Folltropine –pFSH)



pFSH

50 mg 25 mg 25 mg



cloprostenol

50 μ g

pFSH

50 mg 25 mg 25 mg

DANI



parenje

vađenje spužvice



Ultrazvučna pretraga jajnika

- ▶ **transrektalni pregled (7,5 MHz)**
- ▶ Vizualizacija i mjerenje jajnika i cikličkih struktura na jajniku:
 - od malih antralnih folikula (2-3mm) do ovulatornih (6-8mm)
 - žuta tijela

UZV pregled

- Prije pregleda neophodno je:
 - sputati životinju
 - aplicirati gel s lokalnim anestetikom



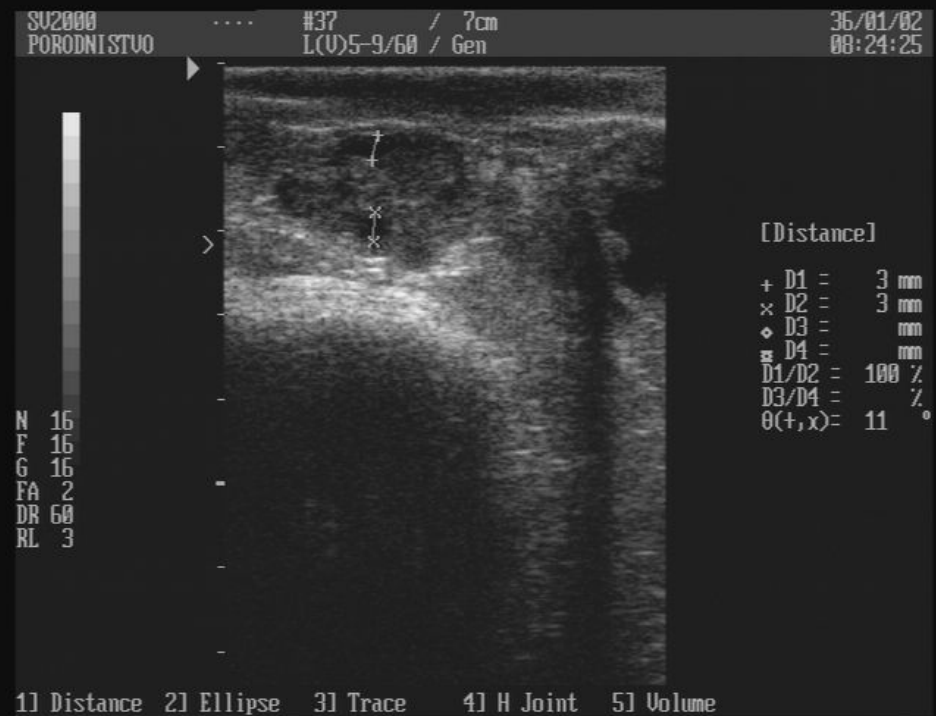
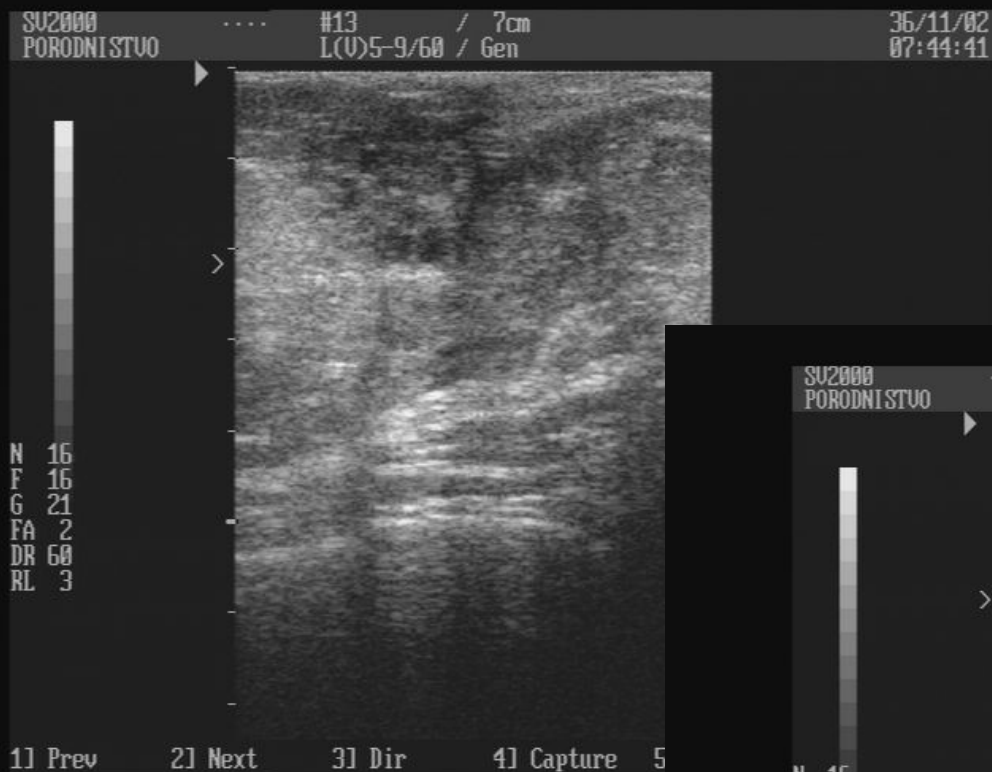
Ultrazvučni prikaz jajnika – dobar odgovor jajnika nakon 4 aplikacije pFSH



Ultrazvučni prikaz jajnika – početak estrusa (D12)



Ultrazvučni prikaz jajnika – uspješna ovulacija - nema folikula ≥ 5 mm



Parenje

- ▶ 12. dan - nakon detekcije estrusa (D0) kožu pripuštamo jarcu ("parenje iz ruke")
- ▶ Ako koza odbije jarca – ponavljati svaka 4 h
- ▶ 13. dan - ponoviti parenje ako je koza još u estrusu



Izvođenje zahvata



Izvođenje zahvata

- ▶ Anestezija: Xylazine 0,1mg/kg IM; za 5 -10 min. Ketamine 11 mg/kg IM
- ▶ kirurški set, kuter, brizgalice 20 ml, epruvete, trokar za maternicu, kateter (igla 18G zatupljena i zarezana na 2 ili 3 mjesta), medij za ispiranje (PBS+2g/L BSA + ATB), vodena kupelj za PBS/BSA na 37 C°, silikonski nastavci za ispirak



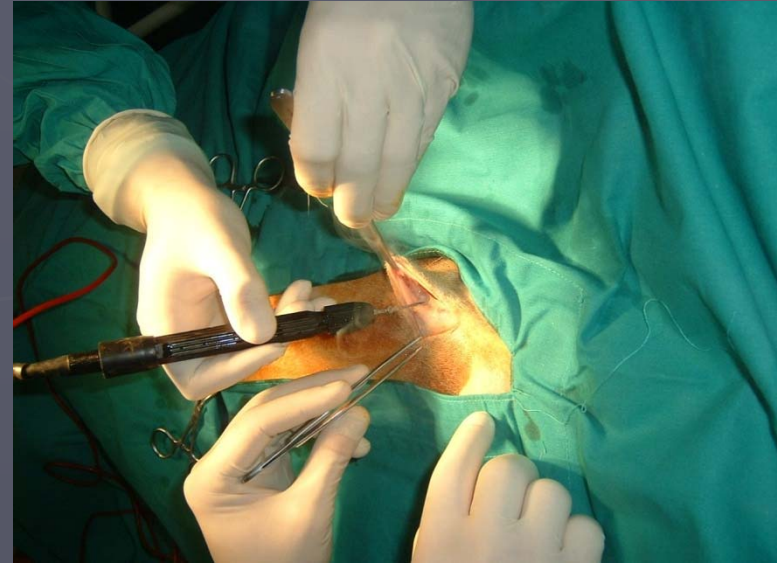
Ispiranje (lavaža, flushing) maternice

- ▶ **Ispiranje sedmi dan nakon prvog parenja (D7)**
- ▶ U pravilu se zametci transferiraju prije izvale (hatching) koja slijedi od 8. dana na dalje



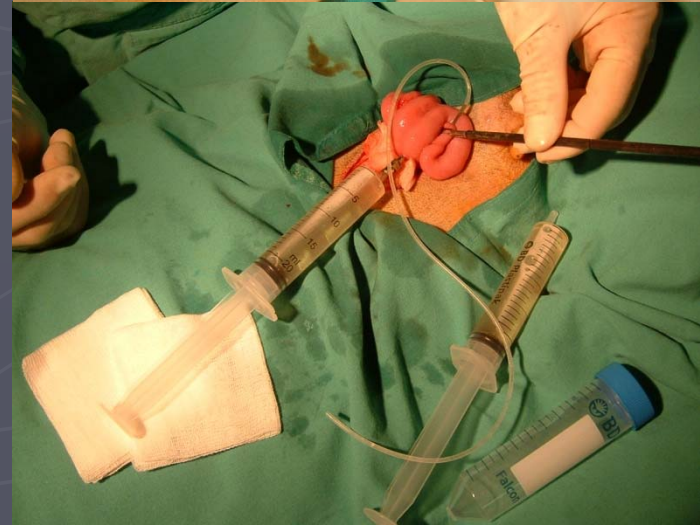
Ispiranje maternice

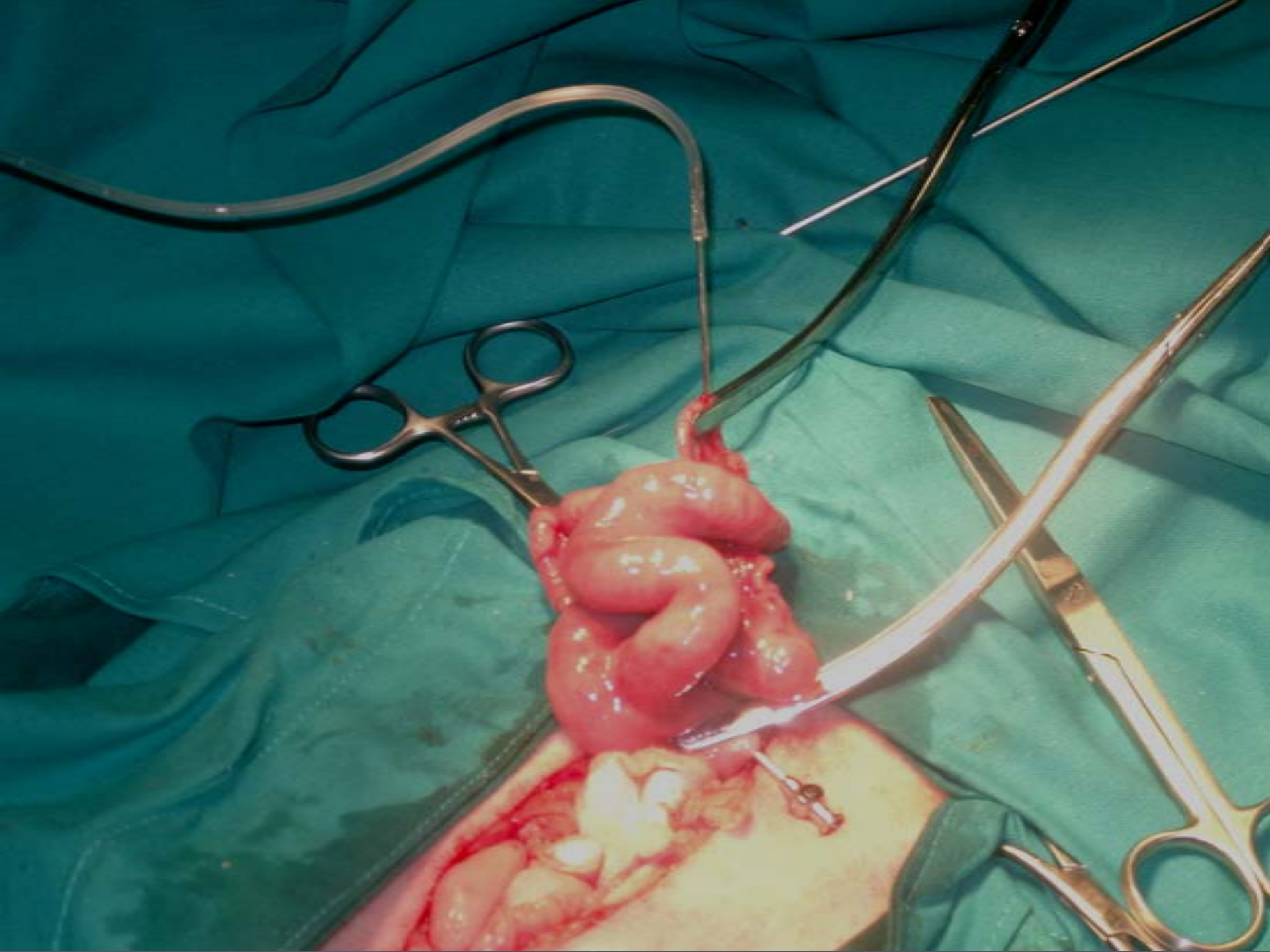
- ▶ Medioventralna laparotomija
- ▶ Vađenje maternice i jajnika
- ▶ Prebrojavanje i ocjena žutih tijela



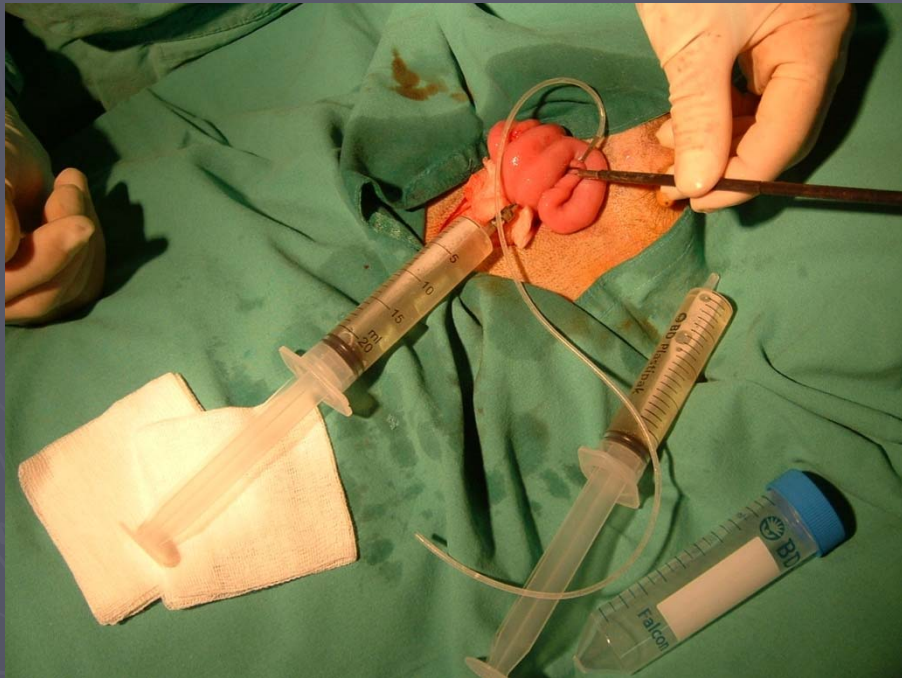
Ispiranje maternice

- ▶ Punkcija baze i vrha roga pomoću troakara te postavljanje katetera
- ▶ Svaki rog se ispire 2 x 20mL medija PBS+BSA+ATB
- ▶ Lagana masaža roga potiče ispražnjavanje



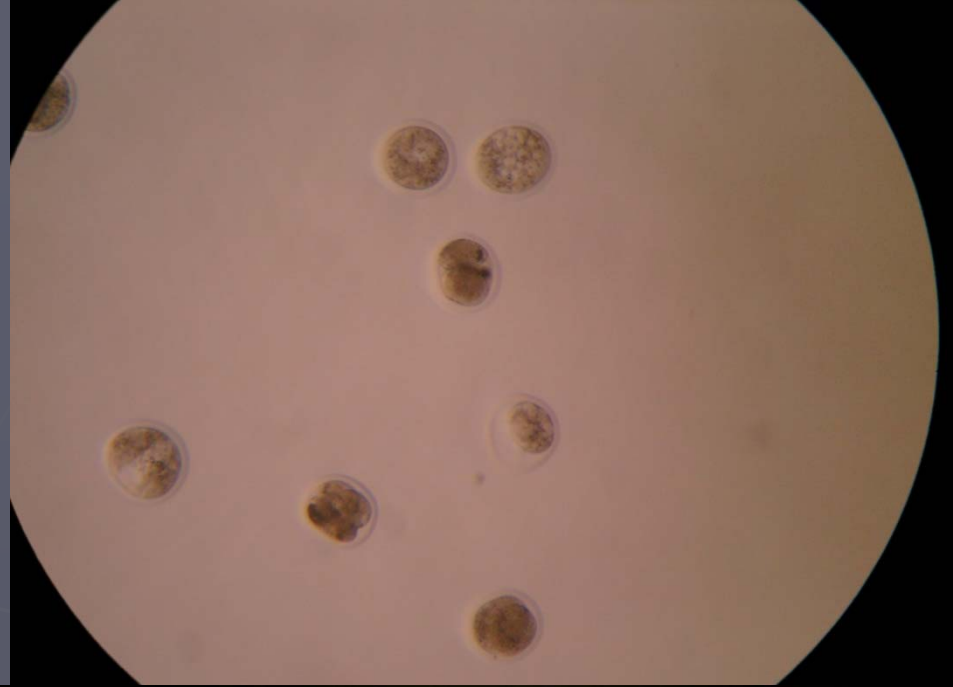


Ispiranje maternice



Pretraživanje ispirka i ocjena zametaka

- ▶ Pretraživanje ispirka
- ▶ Zametci se ocjenjuju te **svježi** transferiraju u sinkronizirane primateljice ili **smrzavaju**



Smrzavanje

- ▶ **Krioprezervacija** 1,5M etilen glikol (EG)
- ▶ Ispiranje zametaka kroz nekoliko kupki EG u rastućim koncentracijama
- ▶ Punjenje zametaka u 0,25 mL pajete (po 2 zametka) u 20-30 μ L u središnji dio pajete, ostatak napunjen sa 1,5 M EG ili galaktozom 0,85 M (direktni transfer)

Smrzavanje

- ▶ Programiranje aparata za smrzavanje
- ▶ Pad temperature od 25 C° do -7 C° (4-5 C°/min)
- ▶ Stabilizacija 10min
- ▶ Indukcija kristalizacije („seeding“)
- ▶ -7 do -30 C° (0,3 C°/min)
- ▶ Stabilizacija 10-15 min na -30 C°
- ▶ uranjanje u tekući dušik



- ▶ Po jednoj kozi u prosjeku:
 - 14 ovulacija (od 0 do 40)
 - 11 oplodjenih jajnih stanica
 - 7 zametaka pogodnih za transfer
 - 4 jareta (svježi transfer)
 - 3 jareta (ako su zameci prethodno smrznuti)

Poteškoće

- ▶ Parcijalna ili totalna rana luteoliza CL (10-35% koza)
- ▶ Loša sinkronizacija ovulacija u FSH tretiranih koza

To rezultira>>% retardiranih i degeneriranih zametaka



Poteškoće

- ▶ Opadanje ovulacijskog odgovora nakon 3. ili 4. tretmana sa pFSH zbog stvaranja anti-pFSH-At u 70-80% koza
- ▶ slabija oplodnja u ženki s visokim ovulacijskim odgovorom
- ▶ Priraslice na jajnicima i maternici nakon višekratnih ispiranja smanjuju plodnost i uspješnost ispiranja

Priprema primateljica

- izbor koza – maksimalno 1-2 prethodnih poroda, od kojega je proteklo barem 5, a ne više od 12 mj.
- šilježice – min. 60% t.m. odrasle jedinke ili minimalno 8 mj. starosti
- na 1 pajetu treba pripremiti 1,2 koze



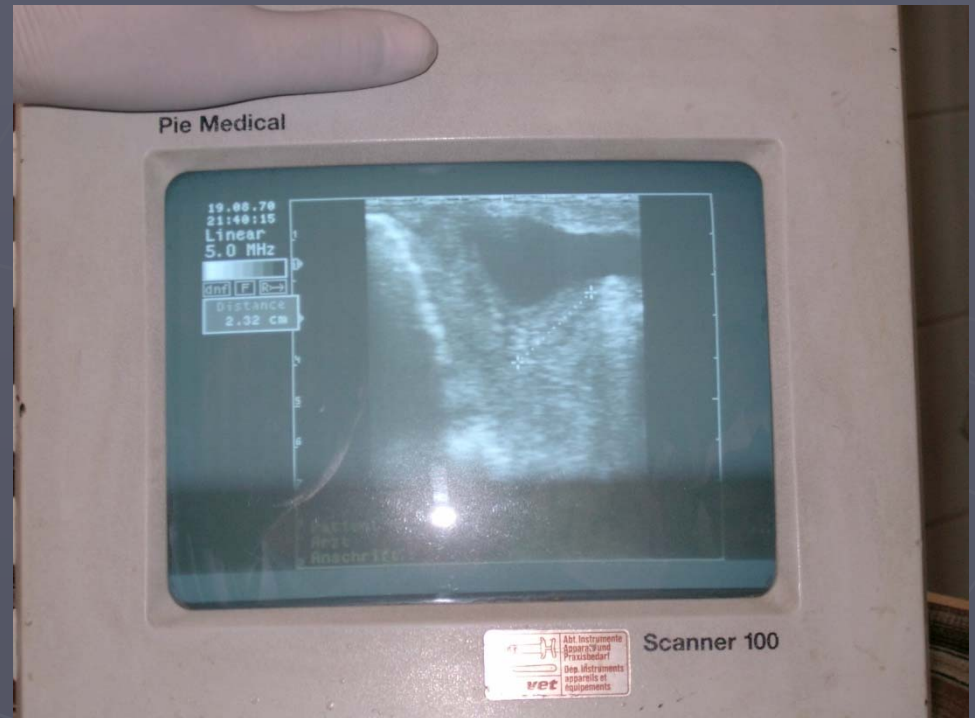
Protokol primateljica

- ▶ **D0** stavljanje spužvice tijekom 11d
- ▶ **D9** 500-600 i.j. eCG + prostaglandin (50 μ g cloprostenola)
- ▶ **D11** vađenje spužvica
- ▶ **D12 (D0)** detekcija estrusa (jarac s pregačom)
- ▶ **D7** transfer zametaka



Pregled primateljica prije transfera

- ▶ UZV pregled jajnika



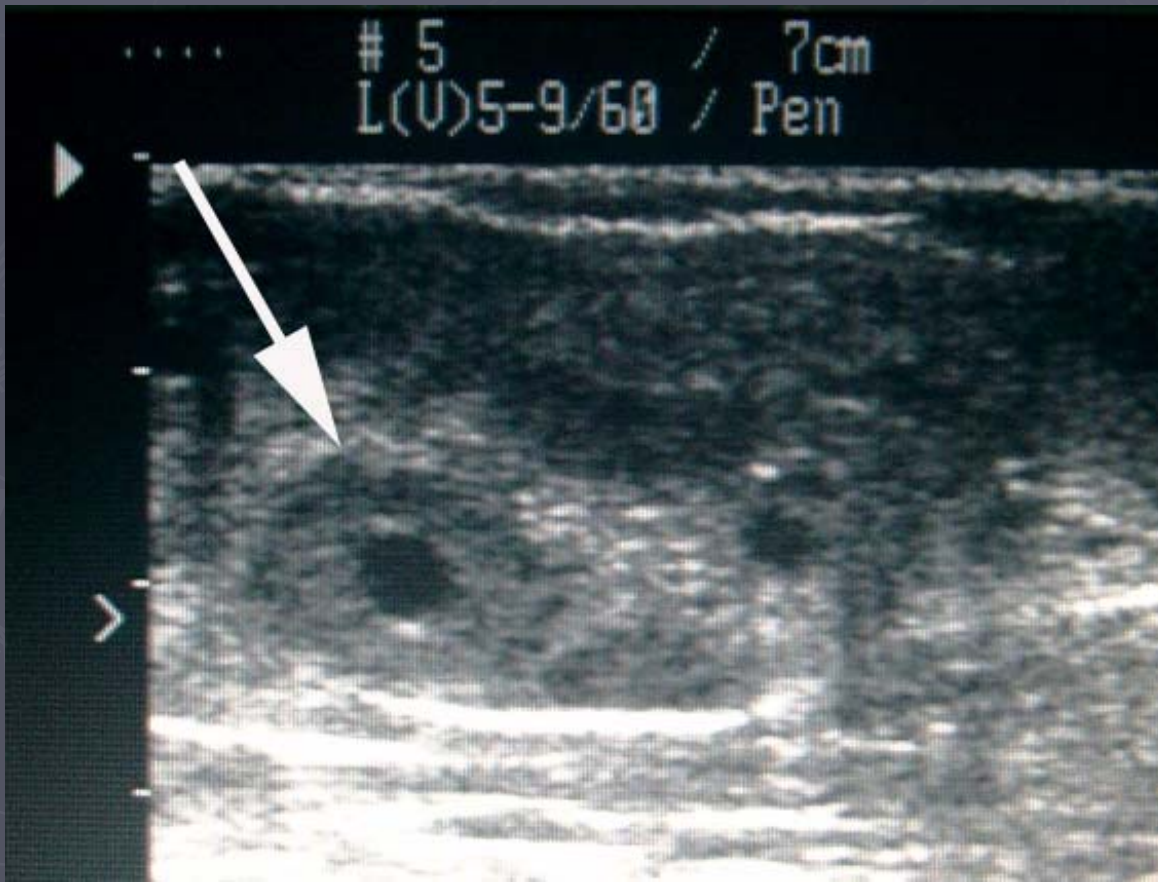
Pregled primateljica prije transfera

- ▶ kvaliteta i broj CL - optimalna doza eCG (sezona, pasmina, geo širina)



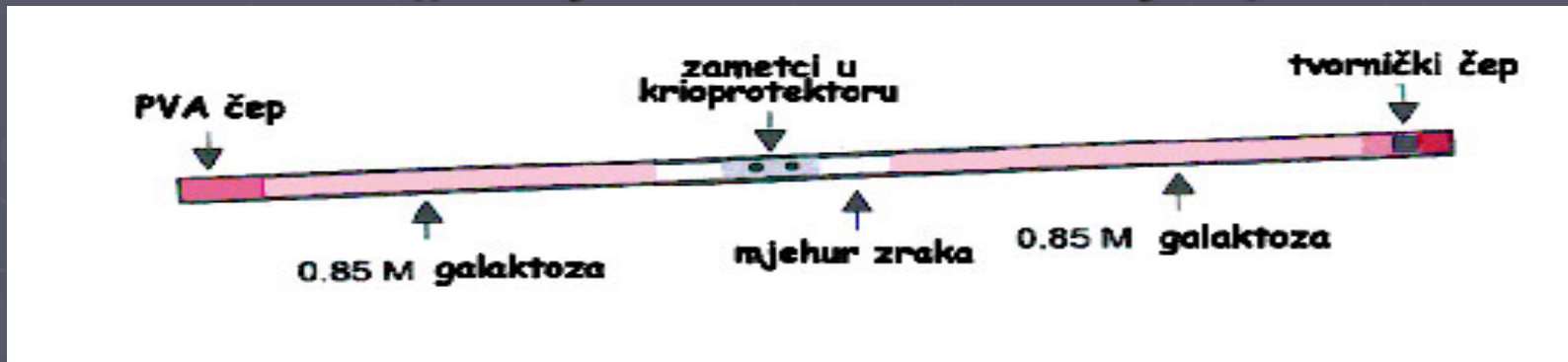
UZV pregled primateljica

- ▶ Žuto tijelo sa šupljinom



Transfer zametaka

- ▶ otapanje (37°C – 20s) i transfer u roku 1min
- ▶ Direktni transfer – sadržaj pajete nakon otapanja izravno se ubacuje u vrh roga maternice (primjena - terenski uvjeti)



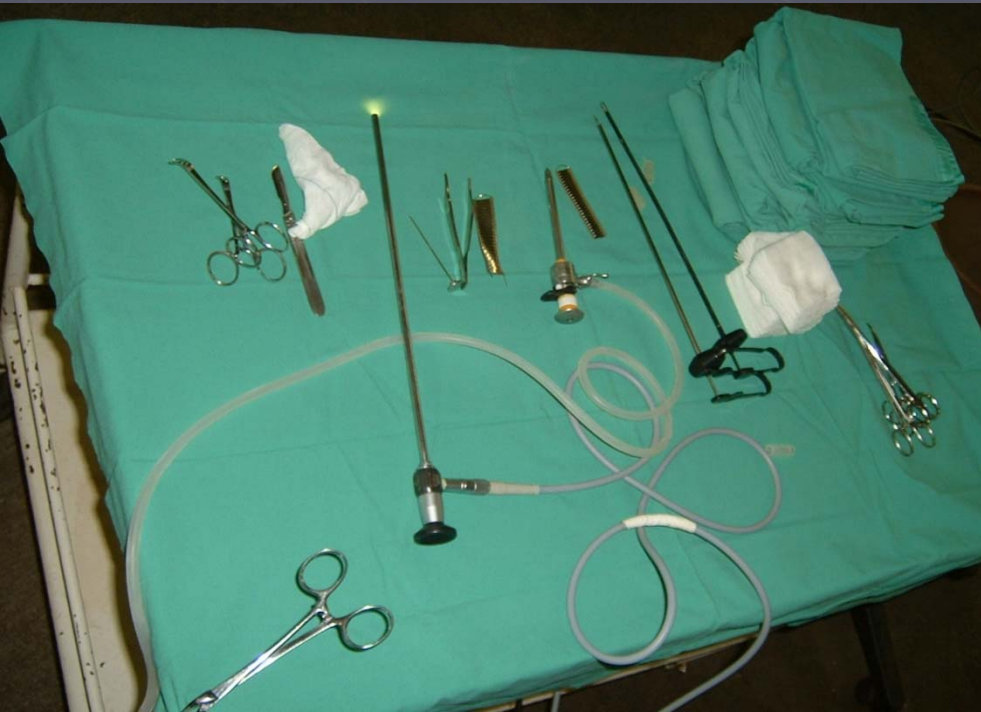
- ▶ Klasični transfer – zametci se nakon otapanja pasiraju kroz padajuće koncentracije otopina krioprotektora i zatim transferiraju

METODE TRANSFERA

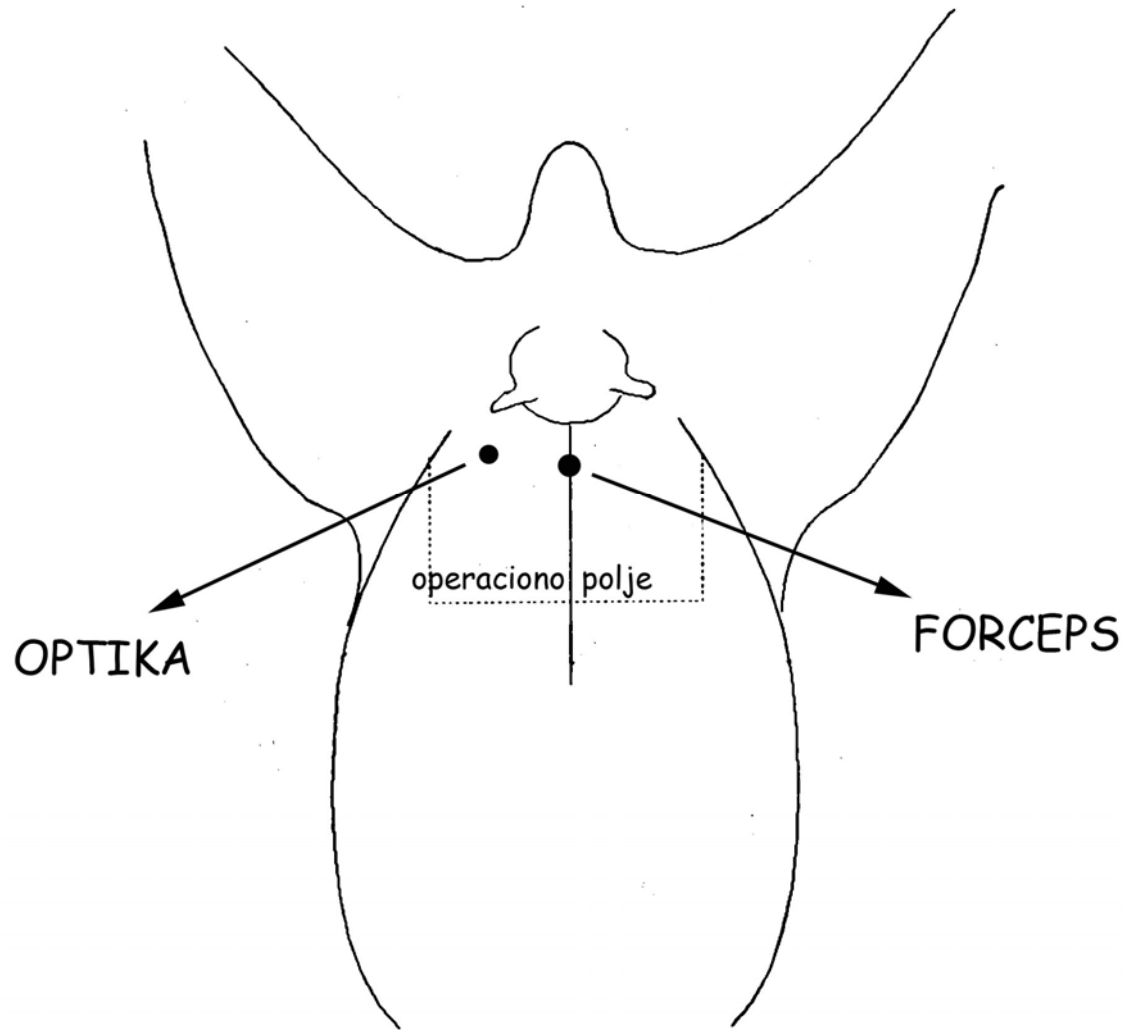
- ▶ laparotomski
- ▶ Laparoskopski
- ▶ Semilaparoskopski
- ▶ transcervikalno

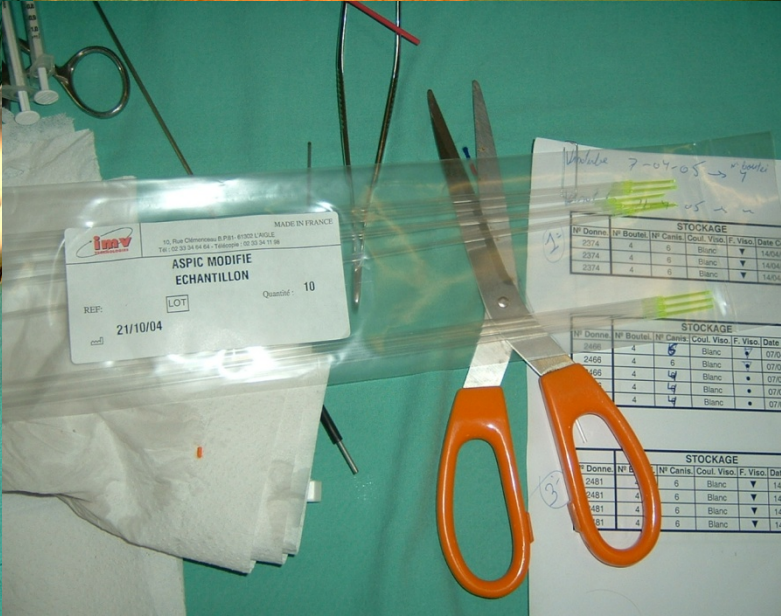
Semilaparoskopija – naša metoda izbora

- ▶ Jednostavna, brzo izvediva, neinvazivna
- ▶ Skupa oprema



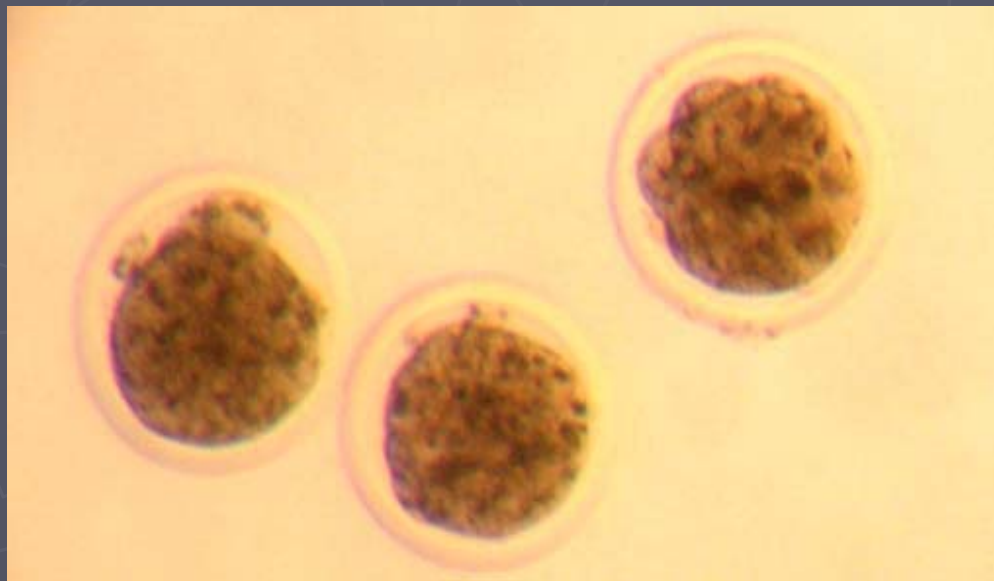
Izvođenje zahvata





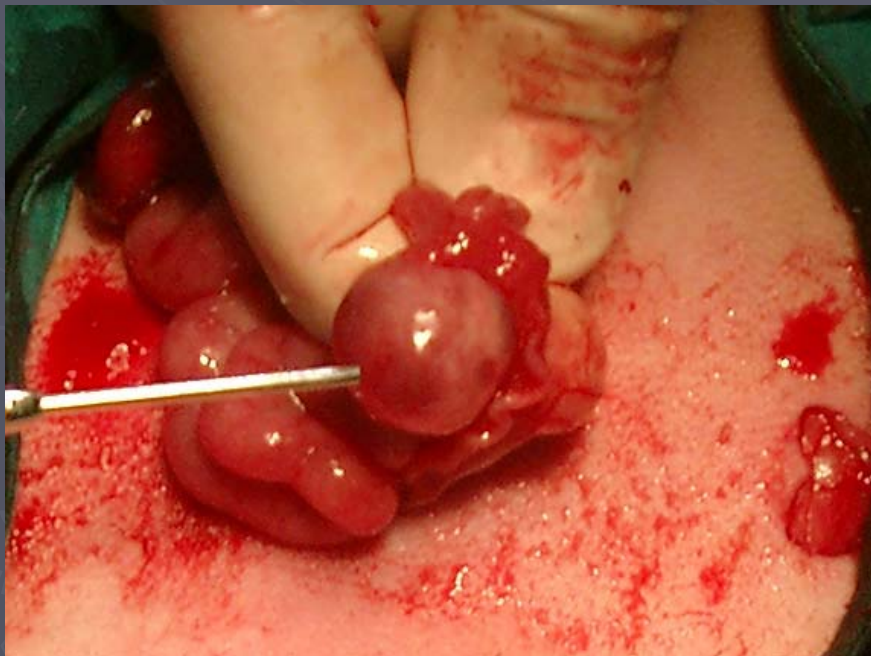
Poteškoće transfera

- ▶ stres značajno umanjuje rezultate;
IZBJEĆI GA!!!
- ▶ sinkronizacija razvojnog stadija zametka koji se transferira i primateljice



Poteškoće transfera

- ▶ individualne razlike u odgovoru na hormonalni protokol (ciste, luteolizirana CL)



Dijagnostika gravidnosti

- ▶ uzv prikaz nakon transfera



Hvala!

