

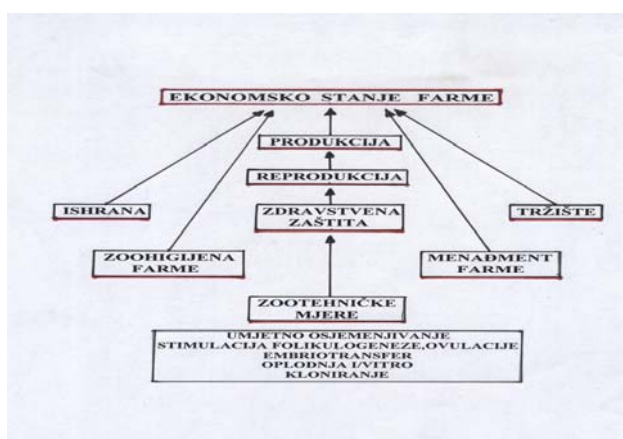
VETERINARSKI FAKULTET SARAJEVO
KLINIKE FAKULTETA
Katedra za Fiziologiju i patologiju razmažanja domaćih životinja

MANIPULACIJA SA DUBOKO ZAMRZNUTOM SPERMOM
(PRAVILNI RAD I UPOTREBA ZAMRZNUTIH DOZA SPERME)

Prof. dr Mustafa Podžo

Stočarstvo kao grana poljoprivrede ima veliku važnost u proizvodnji bjelančevina animalnog porijekla za ishranu ljudi i obezbjeđuje sirovine za industrije mlijeka, mesa, kože i vune. Iz tih razloga nastoje se povećati i što bolje iskoristiti reproduktivne i produktivne osobine domaćih životinja. Ekonomsko poslovanje u stočarstvu je ogledalo i zavisi od reproduktivnog i produktivnog stanja na farmama, a koji su pod direktnim utjecajem niza unutrašnjih i vanjskih faktora.

Među vanjskim faktorima značajno mjesto zauzima ishrana koja trebala da zadovoljava uzdržne, produktivne i reproduktivne potrebe životinja. Pored ishrane, važnu ulogu imaju zoohigijenski uslovi u objektima gdje borave životinje, jer njihova neurohormonalna aktivnost u određenoj mjeri je zavisna od ovih faktora. Mikroklimatski parametri u objektima trebaju biti u zadovoljavajućim granicama, odnosno da u objektima ima dovoljno svjetlosti, da su sunčani, prozračni, bez nakupljanja većih količina štetnih plinova i vlage, itd. Veoma je važno da su životinjama obezbijeđeni suhi i prostrani ispusti, kako bi tokom dana boravile vani i imale dovoljno prostora za kretanje. Životinje na farmama, a naročito visokoproduktivne moraju biti pod stalnom kontrolom stručnjaka kako bi se na vrijeme i prema potrebi na adekvatan način provodile mjere zdravstvene zaštite i neke zootehničke mjere. U okviru preduzimanja ovih mjera rukovodstvo, menadžment, odnosno vlasnici farmi imaju važnu ulogu i utjecaj na ekonomsko stanje i rentabilnost stočarske proizvodnje. Oni moraju da imaju određeni nivo znanja, kako bi sami mogli preduzimati određene mjere, a u komplikovanijim situacijama da na vrijeme traže pomoć i intervencije stručnjaka iz određenih oblasti.



Sl. 1. Ekonomika farme i utjecaj vanjskih faktora

Tržište, odnosno uspješan plasman proizvoda stočarske proizvodnje po zadovoljavajućim cijenama predstavlja važan faktor u ostvarivanju planiranih ciljeva u

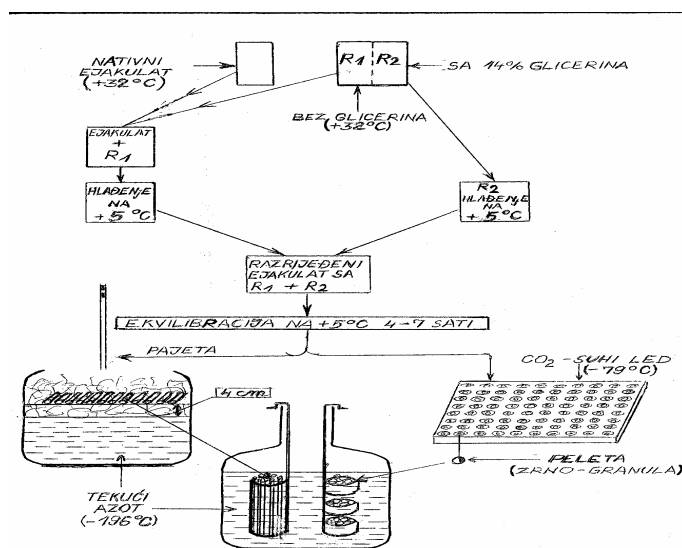
stočarskoj proizvodnji. Plasman proizvoda po zadovoljavajućim cijenama omogućava farmerima da mogu za svoje životinje obezbijediti kvalitetniju ishranu, zoohigijenske uslove, zdravstvenu zaštitu, primjenu zootehničkih mjera, itd. Danas savremene farme obavezno primjenjuju neke od zootehničkih mjera. Među mjerama koje se mogu primjenjivati su: umjetno osjemenjivanje, stimulacija folikulogeneze i ovulacije, embiotransfer, oplodnje jajanih ćelija in vitro itd. U veterinarskoj praksi na terenu ove metode najčešće se koriste u govedarstvu, dok kod ostalih vrsta domaćih životinja koriste se u znatno manjoj mjeri.

Umjetno osjemenjivanje omogućava uspješnije provođenje veterinarsko-sanitarnih mjera, suzbijanje steriliteta, te efikasniju i sigurniju kontrolu širenja koitalnih infekcija i drugih zaraznih bolesti, s obzirom da za umjetno osjemenjivanje koristimo ejakulate provjerenih rasplodnjaka, koji sigurno nisu kliconoše, odnosno nisu inficirani uzročnicima zaraznih i koitalnih bolesti. Umjetno osjemenjivanje može se obavljati tekućom ili duboko zamrznutom spermom. Međutim, danas se znatno više koristi duboko zamrznuta sperma.

Prednosti dubokog zamrzavanja s sperme u odnosu na konzerviranje sperme u tekućem stanju su mnogobrojne, a prije svega:

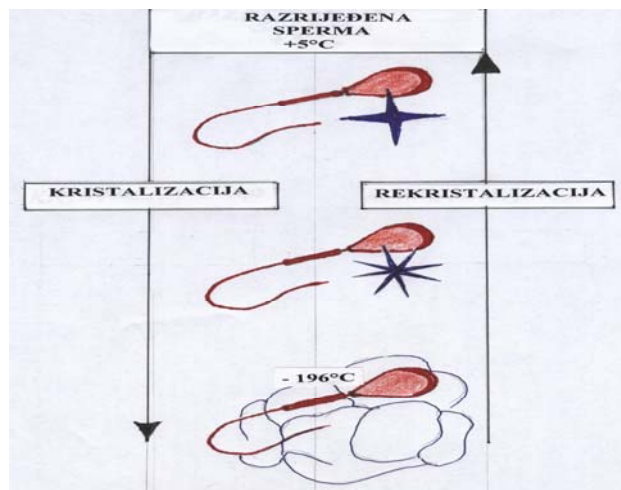
- konzerviranje sperme je vremenski gotovo neograničeno
- od jednog ejakulata dobije se znatno više doza za osjemenjivanje, nego kada se koristi tehnologija konzerviranja sperme u tekućem stanju.
- primjenom tehnologije dubokog zamrzavanja sperme znatno bolje i racionalnije koristimo visoko vrijedne progeno testirane rasplodnjake.
- nema propadanja doza sperme, dok kod tekuće sperme nakon nekoliko dana ako doze nisu upotrijebljene moraju se odbaciti, pa tako propada oko 40-50% doza.
- proce dubokog zamrzavanja koči razmnožavanje ili eliminira neke mikroorganizme.
- primjena duboko zamrznute sperme na terenu omogućava lakše, brže i sigurnije provođenje svih selekcijsko-uzgojnih programa u stočarstvu.

Za duboko zamrzavanje koriste se kvalitetni ejakulati od zdravih i genetski provjerenih bikova. Nakon laboratorijske ocjene ejakulte od pomenutih bikova



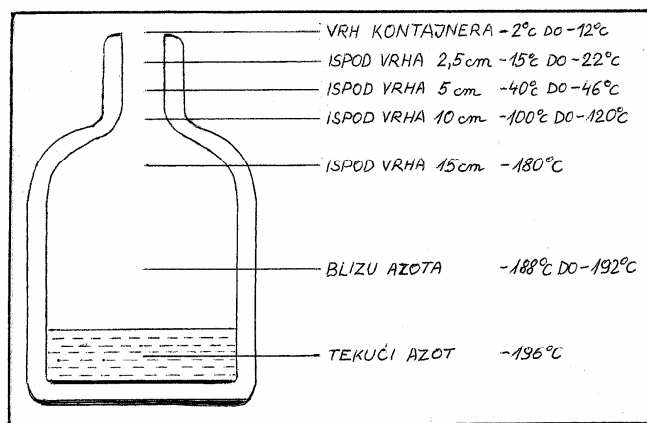
Sl. 2. Tehnološki proces dubokog zamrzavanja sperme

razrijeđujemo sa razrjeđivačima koji pored ostalih ingredijencija moraju imati i glicerol u određenoj koncentraciji. Nakon toga razrijeđena spermu stavljamo u rashladne vitrine na $+5^{\circ}\text{C}$ radi ekvibracije (sl. 2). Ekvibracija je adaptacija spermatozoida na medij sa glicerolom, kako bi glicerol kasnije prilikom zamrzavanja i odmrzavanja vršio zaštitu spermatozoida od procesa kristalizacije i rekristalizacije (sl. 3).



Sl. 3. Kristalizacija i rekristalizacija prilikom zamrzavanja i odmrzavanja sperme

Zavisno od vrsta domaćih životinja dužina ekvibracije je od 2-7 sati, a nakon toga doze sperme definitivno zamrzavamo na -196°C . Nakon zamrzavanja u centrima koji proizvode zamrznutu spermu, doze sperme stavljaju se u depo kontejnere, iz kojih se prema potrebama distribuiraju u kontejnere veterinarskih stanica na terenu.



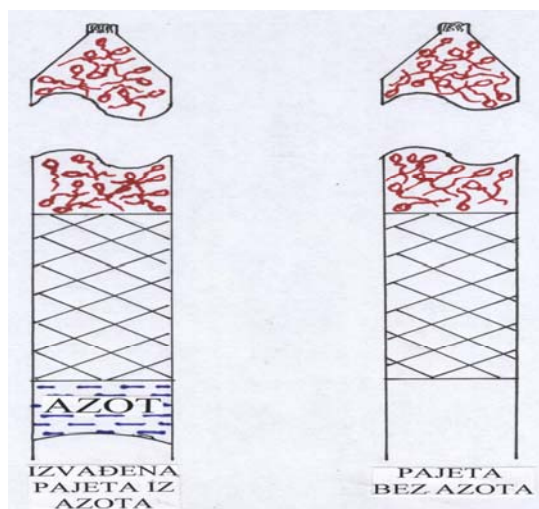
TEMPERATURA U KONTAJNERU NA RAZLIČITIM NIVOTIMA IZNAD TEKUĆEG AZOTA

Sl. 4. Presjek kontejnara

Zamrznutu spermu u pajetama i peletama držimo u tekućem azotu u kojem je temperatura -196°C . Sve manipulacije sa dozama sperme obavljamo u tećnom azotu ili

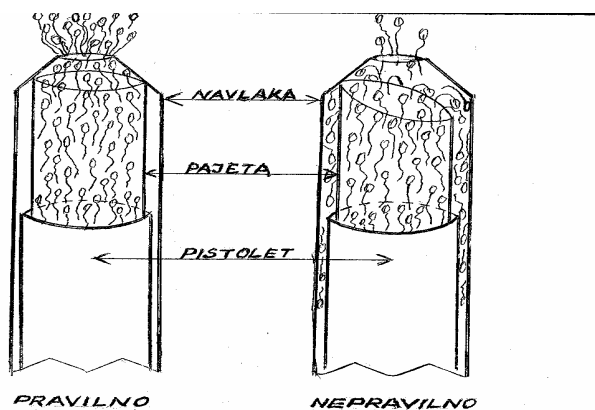
neposredno iznad nivoa azota u njegovim parama, jer u višim slojevima para azota temperatura je veća i uzrokuje stvaranje ledenih kristala koji mogu oštetiti strukturu spermatozoida(sl. 4). Iz tih razloga kada doze zamrznute sperme (pajete) vadimo iz kontejnera to moramo obavljati što dublje iz kontejnera, odnosno iz nivoa azota. Kanistere sa dozama za osjemenjivanje prilikom vađenja doza treba držati u nivou azota ili duboko ispod vrata kontejnera, s obzirom da ispod vrata kontejnera temperature su niže od -75°C .

Pajetu koju smo izvadili iz tečnog azota potrebno je nekoliko puta otresti da bi odstranili ostatke azota i brzo ih prenosimo u vodena kupatila sa zagrijanom vodom (sl. 5).



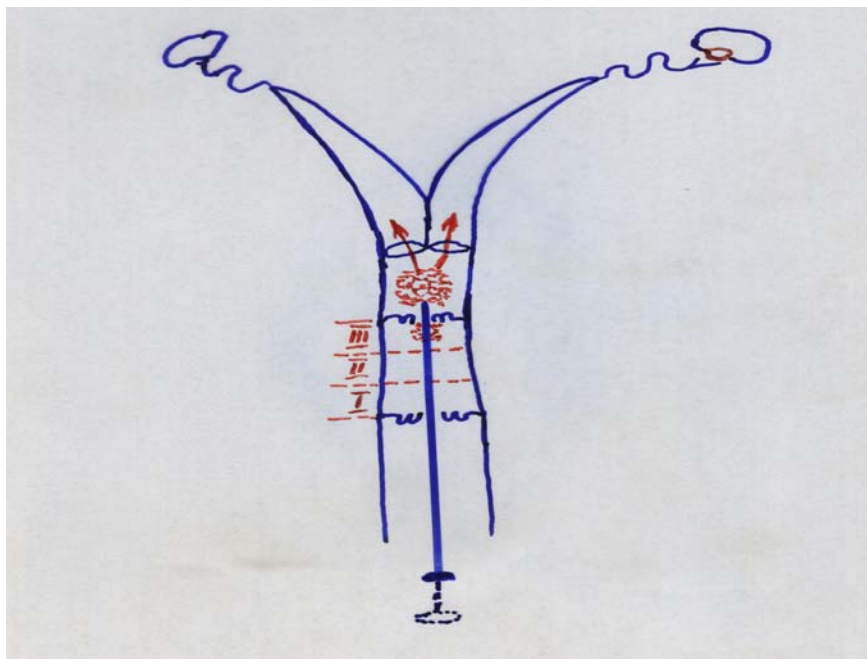
Sl. 5. Pajete sa i bez azota

Temperatura vode treba da je $+35^{\circ}\text{C}$, a pajete odmrzavamo na pomenutim temperaturama u vremenu 15 sekundi. U tom vremenu u pajetama temperatura sa -196°C povećava se na $+5^{\circ}\text{C}$, odnosno sperma je u tečnom agregatnom stanju.



Sl. 6. Pravilno i nepravilno otvorena pajeta

Pajetu koju smo odmrzli vadimo iz termos boce, dobro je posušimo i stavljamo u pistolet, ali tako da prvo ulazi kraj pajete koji u sebi ima čep za istiskivanje sperme. Izvan pistoleta ostaje kraj pajete u kojem je vazdušni mjehurić (slijepljeni kraj) i sada oštrim makazama, pod uglom 90° odsjecamo vrha pajete. Otvaranje pajete moramo vršiti pod uglom od 90°, jer u suprotnom navlaka pravilno ne naliježe uz pajetu, pa prilikom istiskivanja sperma iz pajete može da se izlijeva u navlaku i pistolet (sl. 6). U takvim slučajevima umjetno osjemenjivanje nije potpuno, odnosno nismo kompletnu dozu inseminirali u genitalne organe plotkinje, jer je veći ili manji dio sperme ostao u pistoletu.



**Sl. 7. Šematski prikaz mjesta u genitalnim organima
za osjemenjivanja goveda**

Umjetno osjemenjivanje goveda vršimo intra uterino prije bifurkacije uterusa pa spermatozoidi mogu da ulaze u lijevi i desni rog uterusa (sl.. Intrauterinu inseminaciju dobro je kombinovati sa dubokom cervikalnom, odnosno da 2/3 doze apliciramo intra uterino prije bifurkacije u tijelo uterusa a jedan dio doze (oko 1/3) apliciramo u kranijalnu trećinu cervikalnog kanala (sl. 7). U ovom dijelu cervikalnog kanala uslovi za preživaljavanje spermatozoida su povoljni, tu spermatozoidi duže žive i imaju mogućnost da sukcesivno ulaze u uterus, odnosno dalje u genitalne organe plotkinja.

Ovaj način deponovanja sperme naročito je koristan kod plotkinja kada imaju prolongirane estruse i ovulacije ili ako je osjemenjivanje nešto ranije u odnosu na ovulaciju. U kranijalnoj trećini cerviksa oplodna sposobnost spermatozoida sačuva se od 12-36 sati. Intra uterino osjemenjivanje bez kombinacije sa dubokim cervikalnim osjemenjivanjem daje za 8-10% manje rezultate koncepcije kod osjemenjenih plotkinja. Nakon završene inseminacije i izvlačenja pistoleta potrebno je 10-20 puta izmasirati klitoris plotkinje. Ovom masažom nadražujemo nervne završetke klitorisa, a taj nadražaj će se putem nerava prenijeti na glatku muskulaturu uterusa i jajovoda. Kontrakcijama ovih mišića nastaje usisavanje spermatozoida, pa će oni pasivnom u veoma kratkom

vremenskom periodu doći u ampulu jajovoda, a za taj pređeni put nisu trošili svoje energetske hranjlive materije.

Najpovoljnije vrijeme za osjemenjivanje

Jajna ćelija nakon ovulacije oplodnu sposobnost ima u narednih 6-9 sati, a oplodna sposobnost spermatozoida nakon njihovog unošenja u genitalne organe plotkinja u prosjeku je 12-24 sata.

Estrus kod krava traje 3-36 sati, a kod najvećeg broja plotkinja 18-20 sati. Kod zdravih, dobro hranjenih i njegovanih plotkinja prvi znakovi (6-7 sati od početka estrusa) su nemir, njuši druge životinje, stidnica je vlažna, zacrvenjena i edematozna. Dalje nakon toga u uslovima slobodnog držanja (nevezane) plotkinje koje su u estrusu okreću glavu prema drugim životinjama ili ih pokušavaju zaskočiti. Nakon ovoga perioda u narednih 15-18 sati plotkinje koje su u estrusu dozvoljavaju da ih zaskaču druge krave. U tim slučajevima u estrusu je ona koja skače, a i ona plotkinja koja dozvoljava da na nju skače druga krava.

Vaginalna slika je specifična, odnosno cervikalni nabori su jednolično hiperemični, a cervikalni kanal je otvoren. Iz cervikalnog kanala u vaginu, a iz nje kroz labija vulve u vanjsku sredinu cijedi se bistra i rastegljiva estralna sluz. Pred kraj estrusa sluz postaje žilavija, manje rastegljiva i nešto je gušća. Kod nekih plotkinja, najčešće nakon prestanka psihičkih znakova gonjenja u estralnoj sluzi mogu se pojaviti manje količine krvi. Kod ovih plotkinja ovulacija je već bila i ne treba osjemenjivati. Prisutnost krvi u estralnoj sluzi posljedica je oštećenja većeg krvnog suda prilikom ovulacije, a što znači da je jajna ćelija već u jajovodu. Ovulacija folikula kod krava je 8-12 sati nakon prestanka psihičkih i drugih znakova gonjenja. Prema tome osjemenjivanje plotkinja u ovom stadiju estrusa u najvećem broju slučajeva nije opravdano, jer najčešće izostaje oplodnja jajne ćelije. Iz tih razloga prosječno optimalno vrijeme za osjemenjivanje goveda je 12-13 sati nakon prvih znakova gonjenja, tj. u drugoj polovini gonjenja. Osjemenjivanje plotkinja u ovom periodu gonjenja omogućava da spermatozoidi u genitalnim organima ženskih životinja budu 6-8 sati prije ovulacije, tako da im ostaje dovoljno vremena za proces kapacitacije. U svakodnevnoj praksi na terenu, ako je početak estrusa plotkinja u ranim jutarnjim satima osjemenjivanje treba da bude u kasnim poslijepodnevним satima, a kada je početak estrusa pred veće osjemenjivamo ih u ranim satima slijedećeg dana.