Primjena ovsynch protokola za sinkronizaciju krava davateljica jajnih stanica za proizvodnju zametaka in vitro

Ciganović, Robert

Master's thesis / Diplomski rad

2019

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:178:438095

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Veterinary Medicine - Repository of PHD, master's thesis

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

VETERINARSKI FAKULTET

ROBERT CIGANOVIĆ

PRIMJENA OVSYNCH PROTOKOLA ZA SINKRONIZACIJU KRAVA DAVATELJICA JAJNIH STANICA ZA PROIZVODNJU ZAMETAKA *IN VITRO*

DIPLOMSKI RAD

ZAGREB, srpanj, 2019.

KLINIKA ZA PORODNIŠTVO I REPRODUKCIJU

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

PREDSTOJNIK: prof. dr. sc. Marko Samardžija

MENTORI: izv. prof. dr. sc. Iva Getz

izv. prof. dr. sc. Martina Lojkić

Članovi povjerenstva za obranu diplomskog rada:

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

ZAHVALA

Posebno i najiskrenije se zahvaljujem mentoricama izv. prof. dr. sc. Ivi Getz i izv. prof. dr. sc. Martini Lojkić na nesebičnoj i stručnoj pomoći tijekom izrade ovog rada.

Veliko hvala dragim roditeljima, obitelji, rodbini i prijateljima na podršci i strpljivosti tijekom cijelog studija.

KRATICE

AP- alkalna fosfataza

CIDR- *controlled internal drug releasing device*

CL- *corpus luteum*, žuto tijelo

eCG- *equine chorionic gonadotropin* - korionski gonadotropni hormon kobila

ESC- serum krava u estrusu

ET- embrio transfer

FCS- fetalni goveđi serum

FSH- folikulostimulirajući hormon

GnRH- *gonadotropin- releasing hormone*, gonadotropin- oslobađajućin hormon

hCG- *human chorionic gonadotropin* – humani korionski gonadotropni hormon

hMG- *human menopausal gonadotropin* – humani menopauzalni gonadotropni hormon

IVC- uzgoj zametaka *in vitro*

IVF- oplodnja jajnih stanica *in vitro*

IVM- dozrijevanje jajnih stanica *in vitro*

IVP- proizvodnja zametaka *in vitro*

LH- luteinizirajući hormon

MOET- multipla ovulacija i embriotransfer

OPU- Ovum Pick Up

PCR- lančanom reakcijom polimerazom

$PGF_2\alpha$- prostaglandin F_2 alfa

PMSG- *pregnant mare serum gonadotropin* - serum ždrijebnih kobila

PRID- *progesterone releasing intravaginal device*

RR- *recovery rate*, uspjeh aspiracije

SOFaaBSA- *Synthetic Oviductal Fluid with aminoacids and Bovine Serum Albumine*

TCM199- *Tissue Culture Medium*

UO- umjetno osjemenjivanje

SADRŽAJ

1. UVOD....1
2. CILJ ISTRAŽIVANJA....2
3. PREGLED LITERATURE....3
3.1. Spolni ciklus goveda....3
3.2. Dinamika rasta folikula tijekom spolnog ciklusa krave....4
3.3. Metode sinkronizacije estrusa....4
3.3.1. Sinkronizacija estrusa upotrebom prostaglandina i njihovih sintetskih analoga.5
3.3.2. Sinkronizacija estrusa primjenom gestagena....5
3.3.3. Sinkronizacija estrusa kombiniranom primjenom hormona....6
3.3.3.1. GnRH ili analozi GnRH....6
3.3.3.2. Pripravci koji nadopunjuju ili nadomještaju gonadotropne hormone....6
3.3.4. OvSynch....7
3.4. Proizvodnja zametaka *in vitro*....8
3.5. Aspiracija goveđih jajnih stanica za oplodnju *in vitro* iz živih davateljica....9
3.6. Hormonska stimulacija rasta folikula za OPU....10
3.7. Ocjena i kategorizacija nezrelih goveđih jajnih stanica....11
3.8. Dozrijevanje nezrelih goveđih jajnih stanica....12
3.9. Oplodnja *in vitro* (IVF)....13
3.10.Uzgoj oplođenih jajnih stanica in vitro (IVC)....13
4. MATERIJALI I METODE....15
4.1. Sinkronizacija krava davateljica jajnih stanica za IVP....15
4.2. Kontrola prisustva dominantnog folikula i kvalitete žutog tijela....15
4.3. Superovulacija krava davateljica jajnih stanica za IVP....16
4.4. Praćenje dinamika rasta folikula na jajnicima stimuliranih davateljica....17
4.5. Transvaginalna aspiracija jajnih stanica pomoću ultrazvuka....17
4.6. Pretraživanje aspirata i kategorizacija jajnih stanica....18
4.7. Statistička obrada podataka....19
5. REZULTATI....20
6. RASPRAVA....24
7. ZAKLJUČCI....28
8. SAŽETAK....29
9. SUMMARY....31

10. LITERATURA.....33
11. ŽIVOTOPIS.....42

1.UVOD

Žensko tele rađa se sa zalihom od približno 150 000 jajnih stanica u folikulima koji nisu obnovljivi i postepeno se troše tijekom života krave. Mali broj folikula ovulira, dok većina njih propada atrezijom. Ovaj masovni gubitak genetskog materijala potaknuo je znanstvenike na nalaženje metoda koje će omogućiti učinkovito iskorištavanje genetskog materijala aspiracijom nezrelih jajnih stanica te njihovom oplodnjom i uzgojem *in vitro*.

Postupci proizvodnje goveđih zametaka *in vitro* (IVP) uglavnom su razrađeni na jajnicima sakupljenim neposredno nakon klanja, budući da je klaonički materijal lako dostupan i jeftin izvor nezrelih jajnih stanica za IVP. Glavni nedostatak klaoničkih jajnika je nemogućnost ponovljene aspiracije. S tim je ciljem razvijena tehnika transvaginalne aspiracije jajnih stanica (OPU = Ovum Pick Up) u krava.

Transvaginalna aspiracija jajnih stanica uvedena je krajem osamdesetih godina kao alternativa dosadašnjoj proizvodnji zametaka kod krava, jer je uspješna neovisno o reproduktivnom statusu davateljice. Primjenom OPU tehnike u zdravih davateljica tijekom 6 mjeseci može se dobiti 3 do 4 puta više nego klasičnim embriotransferom. OPU se može izvoditi u hormonalno stimuliranih i nestimuliranih davateljica, a svrha stimulacijskih protokola je povećati broj folikula pogodnih za punkciju, bez štetnog utjecaja na kvalitetu jajne stanice. Velika varijabilnost superovulacijskog odgovora može se pripisati statusu i dinamici folikularnog razvoja u vrijeme započinjanja tretmana, kao i prisustvu dominantnog folikula na jajnicima u vrijeme započinjanja superovulacije. U današnje vrijeme postoje različiti protokoli za sinkronizaciju krava, a jedan od najučinkovitijih je OvSynch protokol. Metoda sinkronizacije krava davateljica prije započinjanja stimulacijskog tretmana stoga može utjecati na dinamiku rasta folikula tijekom superovulacije te time i na kvalitetu i razvojnu sposobnost jajnih stanica za OPU/IVP.

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Uspjeh transvaginalne aspiracije jajnih stanica krava i junica može se mjeriti brojem aspiriranih kvalitetnih jajnih stanica po punkciji. Povećanje broja aspiriranih goveđih jajnih stanica za oplodnju *in vitro* (IVF) od živih davateljica može se postići usklađivanjem najvažnijih bioloških čimbenika kao što su određivanje vremena punkcije s obzirom na dinamiku rasta folikula tijekom spolnog ciklusa krave, učestalost punkcije te hormonsku priprema i stimulacija davateljica za OPU/IVF.

Cilj ovog istraživanja je analizirati uspjeh sinkronizacije krava holštajn frizijske pasmine, davateljica jajnih stanica za OPU/IVF nakon sinkronizacije estrusa OvSynch protokolom s obzirom na:

- kvalitetu žutog tijela prije započinjanja superovulacijskog tretmana;
- prisustvo dominantnog folikula prije započinjanja superovulacijskog tretmana;
- dinamiku rasta folikula nakon superovulacije;
- broj aspiriranih folikula te
- broj i kvalitetu aspiriranih jajnih stanica.

3. PREGLED LITERATURE

3.1. Spolni ciklus goveda

Spolni (estrusni) ciklus je vremensko razdoblje od početka jednog do početka drugog estrusa. Krave i junice su tipične poliestrične i uniparne životinje, a spolni ciklus nije ovisan o godišnjem dobu. Ponavlja se u prosječnim razmacima od 21 dana u krava i 20 dana u junica, u rasponu 17 do 24 dana (SARTORI i sur., 2004.).

Spolni ciklus krava dijeli se u četiri osnovne faze: proestrus, estrus, metestrus i diestrus (KOJIMA, 2003.). Proestrus (*proestrum*) predstavlja kratku fazu pojačane aktivnosti organa spolnog sustava u kojoj dolazi do razvoja i dozrijevanja folikula. Traje od 1 do 3 dana. Tijekom proestrusa dominantni folikul luči 17 ß-estradiol koji prouzroči vidljive znakove estrusa i predovulatorni val luteinizirajućeg hormona (LH). Estrus (*oestrus*) je faza u kojoj je plotkinja spremna za prirodni pripust ili umjetno osjemenjivanje (UO). Traje 2 do 36 sati, prosječno oko 18 sati. U ovoj fazi dolazi do promjene u ponašanju krava koje dopuštaju zaskakivanje mužjaka ili drugih plotkinja. Maternične, cervikalne i rodničke žlijezde izlučuju povećane količine sluzi, na epitelu rodnice i endometriju javlja se hiperemija i kongestija, a maternični grljak je otvoren uz prisustvo bistre, viskozne sluzi. Ovulacija se javlja u prosjeku 12 sati nakon prestanka vidljivih vanjskih znakova estrusa. Zapaženo je da su znakovi estrusa najuočljiviji tijekom večernjih sati i noću, kada se životinje najmanje uznemiruju te se lakše otkriva kada se krave i junice drže slobodno. U metestrusu (*metoestrus*) dolazi do ovulacije i tvorbe žutog tijela (*corpus luteum* – CL) prilikom čega se granuloza stanice folikula postupno pretvaraju u luteinske stanice. Na sluznici maternice, grljka i rodnice smanjuje se lučenje žlijezda. Ova faza traje u prosjeku 3 do 4 dana. Diestrus (*dioestrus*) je faza cvata žutog tijela (*corpus luteum floridum*), obuhvaća razdoblje aktivnosti žutog tijela koje izlučuje velike količine progesterona i traje 12 do 14 dana. Maternične žlijezde podliježu hiperplaziji i hipertrofiji, a maternica se priprema za prihvat zametka. Ukoliko nije došlo do koncepcije, doći će do razgradnje žutog tijela pod utjecajem prostaglandina koji krvlju stiže do jajnika (TOMAŠKOVIĆ i sur., 2007.).

S obzirom na kliničke znakove tijekom pojedinih faza spolnog ciklusa, u goveda se razlikuje folikularna faza, odnosno estrus i proestrus kada su dominantni hormoni estrogeni koje luči Graafov folikul, te lutealna faza, gdje spadaju metestrus i diestrus, a dominantni hormon je progesteron kojeg luči žuto tijelo. Regresija žutog tijela označava završetak lutealne

faze, pod utjecajem je prostaglandina kojeg luči endometrij negravidne maternice u kasnoj lutealnoj fazi 15 do 18 dana nakon ovulacije (TOMAŠKOVIĆ i sur., 2007.)

3.2. Dinamika rasta folikula tijekom spolnog ciklusa krave

Tijekom svakog spolnog ciklusa rast folikula na jajnicima odvija se u 2 do 3 vala. U svakom valu, grupa malih antralnih folikula s receptorima za gonadotropne hormone počinje rasti (faza odabira). Unutar svake grupe jedan folikul postaje dominantan (faza selekcije) i nastavlja rast (faza dominacije) te izlučuje više estradiola, inhibina i drugih čimbenika. Pojačana sekrecija dominantnog folikula dovodi do atrezije i regresije ostalih subordinantnih folikula. U prisustvu žutog tijela dominantni folikul ostaje u funkciji nekoliko dana, a nakon što postigne svoju maksimalnu veličinu (10-15 mm u promjeru), odlazi u atreziju (faza prestanka dominacije). Dominantni folikul počinje kontinuirano rasti u 3. valu, kada dolazi do istovremene regresije žutog tijela s fazom dominacije dominantnog folikula. Folikul je tada oslobođen negativne povratne sprege progesterona i svoj rast nastavlja do predovulacijske veličine (20 mm) te pokreće hormonske događaje koji dovode do ovulacije (TOMAŠKOVIĆ i sur., 2007.).

3.3 Metode sinkronizacije estrusa

Spolni ciklus može se regulirati pomoću farmakoloških pripravaka u svrhu pokretanja ili usklađivanja vremena u kojem će plotkinja ući u estrus i ovulirati. TOMAŠKOVIĆ i sur. (2007.) navode 6 najvažnijih razloga za kontrolu regulacije spolnog ciklusa krava i junica:

1. indukcija estrusa u mliječnih pasmina goveda u kojih estrus nije uočen do 45. dana puerperija
2. sinkronizacija skupine krava i junica za pripremu umjetnog osjemenjivanja
3. smanjenje vremena potrebnog za otkrivanje estrusa
4. olakšanje umjetnog osjemenjivanja u ekstenzivnim uvjetima držanja
5. sinkronizacija davateljica i primateljica u postupku embriotransfera
6. indukcija cikličke aktivnosti jajnika mesnih pasmina goveda s izraženom laktacijskom anestrijom.

Dva su osnovna principa metoda regulacije i sinkronizacije spolnog ciklusa u krava i junica:

1. produženje lutealne faze primjenom progestagena koji djeluju kao umjetno žuto tijelo
2. skraćenje ciklusa regresijom žutog tijela aplikacijom prostaglandina (GORDON, 1996.).

Gore navedene metode se provode primjenom prostaglandina, progestagena i kombiniranom upotrebom hormona.

Estrus je javlja kao rezultat rasta dominantnog folikula zajedno s regresijom žutog tijela. Djelotvornost protokola za sinkronizaciju koji se temelje na primjeni progestagena i/ili prostaglandina ovise o stadiju rasta folikula u trenutku započinjanja tretmana. Zbog toga, prije primjene protokola za sinkronizaciju, svaka bi plotkinja trebala biti pregledana ultrazvučno, kako bi se povećala preciznost sinkronizacije estrusa, kvaliteta oslobođenih jajnih stanica i na kraju pospješila koncepcija (THATCHER i sur., 2001.).

3.3.1. Sinkronizacija estrusa upotrebom prostaglandina i njihovih sintetskih analoga

Prvi sinkronizacijski protokoli koji su se upotrebljavali u mliječnih krava temeljili su se na primjeni prostaglandina $PGF_2\alpha$. Komercijalno dostupnim pripravcima kontrolirano se skraćivalo vrijeme između dva estrusa. Prostaglandini se uglavnom koriste za sinkronizaciju skupine krava i junica za pripremu umjetnog osjemenjivanja, za regulaciju spolnog ciklusa i prilikom problema s otkrivanjem estrusa (tiho gonjenje). $PGF_2\alpha$ je neučinkovit prema mladom žutom tijelu do 6. dana lutealne faze, kao i kod anovulatornih krava (ŠTIBRIĆ, 2017.). Isto tako, regresija žutog tijela se ne može ubrzati nakon 16. i 17. dana ciklusa nakon što je započela njegova spontana regresija (NOAKES, 1997.). Rezultati sinkronizacije estrusa s $PGF_2\alpha$ su zadovoljavajući jer povisuju stopu otkrivanja estrusa, a time i uspješnost osjemenjevanja (LARSON i BALL, 1992.).

3.3.2. Sinkronizacija estrusa primjenom gestagena

Primjena gestagena temelji se na spoznaji da egzogeni progesteron djeluje na isti način kao žuto tijelo. Nakon njegove aplikacije u organizam plotkinje, gestagen će blokirati oslobađanje gonadotropina putem negativne povratne sprege i time odgađati cikličku aktivnost, odnosno folikularni rast sve dok se njegov izvor ne ukloni ili se njegov učinak smanji (NOAKES, 2001.). Primjena gestagena učinkovita je kod krava u ciklusu, no također i kod anestričnih krava nakon teljenja jer senzibiliziraju vezu hipotalamus-hipofiza-jajnik. Primjena korionskog

gonadotropnog hormona kobila (eCG) nakon primjene progestagena potiče folikularni rast, dozrijevanje folikula i estrus (NOAKES, 2001.). Duža primjena progestagena dovodi do smanjene plodnosti, a kraća do slabije sinkronizacije estrusa. Radi uspješnije sinkronizacije estrusa u postupak se mora uklopiti primjena određene luteolitičke tvari poput estrogena na početku tretmana ili prostaglandina na kraju (YÁNIZ i sur., 2004.). Gestageni koji se koriste su: intravaginalne PRID spirale (*progesterone releasing intravaginal device*), intravaginalni CIDR umetci (*controlled internal drug releasing device*) i supkutani implantati (norgestomet + estradiol).

3.3.3. Sinkronizacija estrusa kombiniranom primjenom hormona

3.3.3.1. GnRH ili analozi GnRH

Primjena gonadotropnog releasing hormona (GnRH) izaziva porast koncentracije gonadotropina. Luteinizirajući hormon (LH) izaziva ovulaciju ili luteinizaciju većih folikula prisutnih u vrijeme tretmana, a folikulostimulirajući (FSH) stimulira rast i sazrijevanje nezrelih folikula.

3.3.3.2. Pripravci koji nadopunjuju ili nadomještaju gonadotropne hormone

Prirodni FSH i LH su skupi i postoji opasnost od prijenosa zaraznih bolesti. Zbog toga ekstrahipofizarni gonadotropini imaju širu primjenu.

Koriste se sljedeći:

- eCG (*equine chorionic gonadotropin* - korionski gonadotropni hormon kobila), naziva se još i PMSG (*pregnant mare serum gonadotropin* - serum ždrijebnih kobila). Budući da je biološki poluživot eCG-a dugačak, on se primjenjuje jednokratno, dok je FSH potrebno aplicirati višekratno, najčešće dva puta dnevno tijekom 4 do 5 dana (GETZ, 2004.).
- hCG (*human chorionic gonadotropin* – humani korionski gonadotropni hormon) ima aktivnost poput LH
- hMG (*human menopausal gonadotropin* – humani menopauzalni gonadotropni hormon) ima uglavnom aktivnost poput FSH, ali kraći biološki poluživot od eCG (TOMAŠKOVIĆ i sur., 2007.).

3.3.4. OvSynch

PURSLEY i sur. (1995.) na Sveučilištu Wisconsin, Madison, razvili su program OvSynch, kojim se sinkronizira ovulacija, a ne estrus. Ovulacija se precizno tempira čime mliječne krave mogu biti osjemenjene u fiksno vrijeme, uz postotak koncepcije blizak onome u krava s utvrđenim estrusom (BRITT i GASKA, 1998.). Osjemenjivanje u fiksno vrijeme, koje uspješno postižemo kod OvSynch protokola, od iznimne je važnosti za uspješan menadžment na farmi (REMNANT i sur., 2015.). Tako prema PURSLEY-u i sur. (1995.), prva injekcija GnRH, u 65% krava inducira ovulaciju, a u 100% novi folikularni val. PGF2α inducira regresiju žutog tijela, a druga injekcija GnRH sinkronizira termin ovulacije dominantnog folikula iz vala potaknutog prvom injekcijom GnRH. FRICKE i sur. (1998.) navode da u 85% krava dominantni folikul ovulira unutar 23-32 sata nakon druge injekcije GnRH. OvSynch (PURSLEY i sur., 1995.) je indukcijski/sinkronizacijski program za mliječne krave, temelj brojnih protokola izvedenih iz njega. Taj temeljni protokol temelji se na kombinaciji injekcija sintetskih analoga ili bioloških pripravaka gonadotropin-releasing hormona i sintetskih analoga ili prirodnih prostaglandina $F_2\alpha$ (ŠTIBRIĆ, 2017.). Novi trend u mliječnom govedarstvu je upotreba različitih protokola s tendencijom osjemenjivanja što većeg broja krava do stotog dana poslije poroda (NOWICKI i sur., 2017.). Rano uvođenje krava u protokole, oko 30-40 dana, dovodi do ranijeg osjemenjivanja (KASIMANICKAM i sur., 2005.). Jedan od takvih protokola je OvSynch u kojemu veliki broj krava bude osjemenjen u prvih 100 dana poslije poroda, kada je muznost na vrhuncu i ekonomski su najisplativije (NOWICKI i sur., 2017.). Nesumnjiva prednost OvSynch-a je nepotrebnost detekcije estrusa, mogućnost primjene bez obzira na fazu ciklusa i fiksno vrijeme osjemenjivanja te uspostava pouzdanog ritma kontrole, što podrazumijeva skraćenje servis razdoblja (WOLFENSON i sur., 2004.). OvSynch započinje tako što prva injekcija GnRH inducira ovulaciju ili luteinizaciju funkcionalnog dominantnog folikula. Nakon ovulacije, nova folikulogeneza nastupa 1,5-2 dana kasnije (PURSLEY i sur., 1995.). U folikula mlađih od tri dana ovulacija izostaje, a novi, spontani ili inducirani dominantni folikul razvit će se kroz sljedećih sedam dana. Tada se aplicira luteolitički PGF2α, što omogućuje dozrijevanje dominantnog folikula. Četrdesetosam sati potom, aplicira se druga injekcija GnRH koja je okidač pulsirajućeg lučenja LH hormona, 28 sati kasnije (ŠTIBRIĆ, 2017.). Stopa osjemenjivanja poslije OvSynch protokola iznosi 45% ako se osjemenjuje 16 sati nakon druge injekcije GnRH ili 41% ako se osjemenjuje između 8 i 24 sata nakon GnRH (PURSLEY i sur., 1998.). Uspješnost protokola ovisi od stada do stada. Neke krave ne odgovore na sinkronizacijski protokol zbog prave anestrije, cisti na jajnicima ili

endometritisa (MEJIA i sur., 2005.). Krave iz različitih stada imaju različite odgovore na isti sinkronizacijski protokol (REMNANT i sur., 2015.). Krave koje su se više puta telile i imaju veću dnevnu proizvodnju mlijeka, imaju smanjenu koncepciju i povećanu embrionalnu smrtnost. Prvotelke imaju bolji odgovor na sinkronizaciju OvSynch-om, a ujedno i veći postotak koncepcije u usporedbi s kravama koje su se telile dva puta i više (EL-TARABANY i sur., 2016.). Osim sinkronizacije plotkinja, OvSynch protokol se može koristiti kod tihih gonjenja, toplinskog stresa i kod tretmana u liječenju cisti. Poslije provedenog protokola na kravama s cistama, 71,3% krava uđe u ciklus, a 36,8% koncipira (NOWICKI i sur., 2017.). Najveću stopu koncepcije (36%) imaju grupe krava koje su protokol započele u diestrusu, a najnižu (20%) grupe krava koje su imale ciste na jajnicima (NOWICKI i sur., 2017.). Postoje modifikacije OvSynch protokola, a jedna od njih je Presynch. Presynch protokol započinje s PGF2α 12 dana prije OvSynch protokola (AYRES i sur., 2013.). Koristeći tako modificirani protokol postotak koncepcije nakon prvog osjemenjivanja povećao se na 48,8% što je za 10% više od klasičnog OvSynch protokola. Double OvSynch koristi dvije doze GnRH koje stimuliraju jajnike na povratak aktivnosti. Takav tretman nema negativnih posljedica kod krava koje imaju aktivne jajnike (SOUZA i sur., 2008.).

3.4. Proizvodnja zametaka *in vitro*

Proizvodnja zametaka *in vitro* (IVP) predstavlja treću generaciju biotehnologije rasplođivanja. Nakon rođenja prvog teleta dobivenog oplodnjom *in vitro* jajnih stanica dozrelih *in vivo* (BRACKETT i sur., 1982.), brzo je napredovala era *in vitro* proizvodnje goveđih zametaka. Ipak je tek s uspješnom primjenom čitavog *in vitro* postupka, koji uključuje dozrijevanje (IVM), oplodnju (IVF) te uzgoj *in vitro* (IVC) do stadija morule/blastociste (LU i sur., 1987.), omogućen konačni proboj *in vitro* tehnologije u stočarstvu. Razvoj *in vitro* tehnologije, osim ubrzanog genetskog napretka dobivanjem više potomstva od visokovrijednih krava davateljica, omogućuje i razvoj drugih biotehnologija koje obuhvaćaju određivanje spola zametaka lančanom reakcijom polimerazom (PCR), te kloniranje i proizvodnju transgenih životinja (HOSHI, 2003.). Postupci proizvodnje goveđih zametaka *in vitro* uglavnom su razrađeni na jajnicima sakupljenim neposredno nakon klanja, budući da je klaonički materijal lako dostupan, jeftin i izdašan izvor nezrelih jajnih stanica za IVP (GETZ, 2004.). Tehnika transvaginalne aspiracije, nazvana Ovum Pick-Up ili OPU, pouzdana je za sakupljanje jajnih stanica višekratno iz jajnika iste plotkinje, bez rizika za zdravlje i reproduktivnu aktivnost iste (BONI, 2012.). IVP u govedarstvu ima brojne primjene kao što su jeftina masovna proizvodnja

zametaka iz klaoničkog materijala za transfer u mliječne krave čija telad ide u tov, zaobilaženje nepredvidivog superovulacijskog odgovora i nekih poremećaja u spolnim organima davateljica, proizvodnja zametaka iz jajnih stanica dobivenih punkcijom jajnika ili laparaskopski, kontrola i sprečavanje širenja zaraznih bolesti, skraćenje generacijskog intervala proizvodnjom zametaka u tovnih životinja, utvrđivanje plodnosti bikova koji se koriste za umjetno osjemenjivanje i ubrzanje postupka progenog testiranja bikova te konačno, proizvodnja transgenih životinja i kloniranje (GALLI i sur., 2001.).

3.5. Aspiracija goveđih jajnih stanica za oplodnju *in vitro* iz živih davateljica

U današnje vrijeme za dobivanje jajnih stanica od krava najviše se koristi metoda transvaginalne aspiracije pomoću ultrazvuka, nazvana još OPU (Ovum Pick-Up), uvedena krajem osamdesetih godina adaptacijom metode korištene u humanoj asistiranoj reprodukciji (PIETERSE i sur., 1988.). OPU je alternativa dosadašnjoj proizvodnji zametaka kod krava jer je uspješna neovisno o reproduktivnom statusu davateljice, činjenici jesu li plotkinje gravidne ili aciklične te imaju li upalne procese reproduktivnog sustava (BONI, 2012.). Ovom metodom, zametci se mogu dobivati od davateljica na mjesečnoj bazi. Primjenom OPU tehnike jajne stanice mogu se aspirirati kod krava u ciklusu dva puta tjedno kroz više tjedana (HIDALGO i sur., 2000.). Sakupljanje jajnih stanica izvodi se bez ikakve opasnosti za zdravlje i reproduktivnu aktivnost davateljice (BONI, 2012.). Ovom metodom se mogu dobiti jajne stanice od gravidnih junica i krava u prvom tromjesečju gravidnosti, od krava u puerperiju, pa čak i od ženske teladi prije puberteta (MAJERUS i sur., 1999.) OPU se može izvoditi i ubrzo poslije poroda, bez negativnog učinka na broj i kvalitetu jajnih stanica (LOPES, 2006.). Tehnika je vrlo prilagodljiva te se može primjenjivati sporadično ili u pravilnim vremenskim intervalima tijekom dužeg razdoblja. Glavni razlog da se aspiracija izvodi dva puta tjedno je veći broj jajnih stanica sposobnih za daljnju obradu i samim time veći broj zametaka, nego kada se aspiracija izvodi jednom tjedno (LI i sur., 2007.). Velika prednost ove tehnike je da se može primjenjivati i kod nestimuliranih davateljica, odnosno ne uključuje nužno prethodnu stimulaciju davateljica s gonadotropnim hormonima, za razliku od klasičnog embriotransfera gdje je superovulacija neizostavni dio postupka (GALLI i sur., 2001.)

3.6. Hormonska stimulacija rasta folikula za OPU

Superovulacijski postupci detaljno su razrađeni u klasičnim programima embriotransfera (MOET) (BOLAND i sur., 1991.; MAKEK i sur., 1996.), no velika nepredvidljivost superovulacijskog odgovora još je uvijek ograničavajući čimbenik i glavni problem za uspješnu komercijalnu primjenu embriotransfera. Razlog zbog čega su neki folikuli anovulatorni nakon superovulacijskog tretmana još nisu dovoljno razjašnjeni, no mogući uzrok je nedovoljno dozrijevanje ili odsutnost dovoljnog broja LH receptora u nekim folikulima, u vrijeme predovulacijkog LH vala. GALLI i sur. (2001.) navode da postoje i varijacije u bioaktivnosti i imunoaktivnosti između, te unutar pojedinih komercijalnih pripravaka gonadotropina. Od različitih hormona koji se koriste, kao što su GnRH (KOHRAM i sur., 1998.), FSH (REIS i sur., 2001.), serum ždrebnih kobila (PIETERSE i sur., 1992.; SENDAG i sur., 2008.), FSH uobičajeno daje najbolje rezultate u broju punktiranih folikula i aspiriranih jajnih stanica. Gonadotropini dobiveni iz seruma ždrebnih kobila (eCG) su složeni glikoproteini koji pokazuju FSH i LH djelovanje (BOLAND i sur., 1991.) Biološki poluživot eCG-a iznosi čak 40 sati kod krava, a budući da teško prolazi renalni filter, prisutan je u cirkulaciji i poslije superovulacije, što može imati nepovoljan učinak na oplodnju i razvoj zametka, te prouzročiti stvaranje cista na jajnicima i prejaku hiperemiju jajovoda (AGARWAL i sur., 1993.). Pročišćeni ekstrakti hipofize proizvode se iz hipofize zaklanih životinja, uglavnom svinja ili ovaca. Većina ovako proizvedenih preparata ima različiti omjer FSH i LH, a ta je varijabilnost odgovoran čimbenik za nestalan i nepredvidiv odgovor jajnika na protokole stimulacije (BRAILEANU i sur., 1998.). Budući da ovi preparati imaju kratak biološki poluživot te se brzo eliminiraju iz organizma, apliciraju se kravama i junicama davateljicama kod MOET-a u lutealnoj fazi ciklusa dva puta dnevno tijekom 4 ili 5 dana. Rezultat superovulacijskog postupka je varijabilan, što je jedan od glavnih nedostataka MOET-a, a osim toga može se primjenjivati samo kod ginekološki zdravih davateljica koje su već prošle vrhunac laktacije, budući da superovulacijski postupak uzrokuje pad proizvodnje mlijeka (GALLI i sur., 2003.). Zbog straha od goveđe spongiformne encefalopatije, u nekim je zemljama ograničena primjena pripravaka dobivenih iz ekstrakta hipofize, budući da potiču iz tkiva koja se ubrajaju u osobito rizične sirovine (GALLI i sur., 2003.). U tim je slučajevima jedina ekonomska isplativa mogućnost za superovulaciju primjena SŽK ili ženskih menopauzalnih gonadotropina. Stimulacija davateljica u postupku transvaginalne punkcije jajnika ima drugačiji cilj u usporedbi sa superovulacijskim postupkom davateljica u klasičnim ET programima. Svrha superovulacijskih protokola u MOET programima je povećati broj ovulacija bez štetnog utjecaja na kvalitetu zametaka

(LOJKIĆ i sur., 2018.). Dok se superovulacijom u okviru MOET-a želi povećati broj ovulacija, stimulacijskim tretmanima prije OPU želi se povećati broj folikula pogodnih za aspiraciju nezrelih jajnih stanica, tj. folikula promjera između 3 i 10 mm. Stimulacijom jajnika davateljica prije OPU potiče se rast folikula promjera većeg od 5 mm, a produljivanjem vremena od zadnje FSH injekcije do aspiracije jajnih stanica potiču se promjene unutar folikula koje odgovaraju promjenama koje se događaju tijekom rane atrezije. U takvim atretičnim folikulima odvija se razvoj jajnih stanica nalik na dozrijevanje u dominantnim folikulima, a te promjene imaju snažan učinak na razvojnu sposobnost jajne stanice *in vitro* (GETZ i sur., 2000., GETZ, 2004.). Jajne stanice iz ovih folikula pokazuju veću razvojnu sposobnost u odnosu na one iz manjih folikula (KARADJOLE i sur., 2011., LOJKIĆ i sur., 2016.). Utvrđen je pasminski utjecaj na superovulacijski odgovor i i učinkovitost OPU/IVP programa (GETZ i sur., 2008., KARADJOLE i sur., 2008., LOJKIĆ i sur., 2013.).

3.7. Ocjena i kategorizacija nezrelih goveđih jajnih stanica

Morfološka procjena stanica granuloze koji okružuju nezrelu goveđu jajnu stanicu stanicu i njezine ooplazme jedan je od mogućih kriterija pri odabiru jajnih stanica najpogodnijih za postupak *in vito* dozrijevanja i oplodnje (MAKEK i sur., 1998.). S obzirom na izgled kumulusnih stanica i ooplazme, jajne stanice svrstane su u pet kategorija:

1. Jajne stanice potpuno okružene s više od tri kompaktna sloja kumulusnih stanica i fino granuliranom ooplazmom koja potpuno ispunjava zonu pelucidu (G1)
2. Jajne stanice djelomično okružene kompaktnim slojem stanica kumulusa ili s manje od 3 sloja stanica kumulusa (G2)
3. Jajne stanice nepotpuno okružene stanicama kumulusa s oslabljenim međustaničnim vezama te neravnomjerno granuliranom ooplazmom (G3)
4. „Gole“ jajne stanice, bez staničnog omotača s degeneriranom ooplazmom s vakuolama, fragmentiranom ili samo s ostacima ooplazme koja ne ispunjava u potpunosti zonu pelucidu (G4)
5. Ekspandirane jajne stanice s neravnomjerno granuliranom ili degeneriranom ooplazmom.

Najveći razvojni kapacitet za IVM/IVF/IVC postupak imaju jajne stanice iz folikula većih od 3 mm s homogenom ooplazmom i potpuno okružene s više slojeva kompaktnih kumulusnih stanica (MAKEK i sur., 1998.).

3.8. Dozrijevanje nezrelih goveđih jajnih stanica

Dozrijevanje goveđih nezrelih stanica *in vitro* predstavlja uzgoj nezrelih jajnih stanica u staničnoj kulturi kroz 24 sata dok ne dostignu stadij druge metafaze. Najčešće se za dozrijevanje jajnih stanica *in vitro* koristi TCM199 (*Tissue Culture Medium*). Veoma je važno da svi sastojci medija budu najbolje kakvoće, da bi se povećao postotak oplođenih i dozrelih jajnih stanica te broj uzgojenih blastocista (GREVE i sur., 1993.). Dodavanje fetalnog goveđeg seruma (FCS) ili seruma krava u estrusu (ESC) te gonadotropnih (FSH/LH) i/ili steroidnih hormona u medij, stimulira dozrijevanje i sposobnost oplodnje *in vitro* goveđih jajnih stanica (STUBBINGS i sur., 1990.). Svaki laboratorij ima svoj način uzgoja tako da se jajne stanice mogu uzgajati u „kapljicama“ u kojima ima 10 do 20 jajnih stanica prekrivenih parafinskim uljem ili u posudicama ili kušalicama s 0,6 do 1 mL medija u skupinama po 50 jajnih stanica u jednoj kušalici. Inkubacija traje 24 sata na 39°C i 5% CO_2 (MAKEK i sur., 2000.). Uspjeh dozrijevanja goveđih jajnih stanica *in vitro* mjeri se morfološkom procjenom ekspanzije stanica *cumulusa oophorusa* i *corone radiate* (LOJKIĆ i sur., 2014.). Stupanj dozrelosti jezgre mjeri se postotkom jajnih stanica koje su dostigle metafazu II s izbačenim prvim polarnim tjelešcem, te prosječno iznosi 83% i više (GREVE i sur., 1993.). Pravi pokazatelj uspješnosti postupka dozrijevanja goveđih jajnih stanica *in vitro* je postotak dobivenih blastocista, koji je unatoč svim naporima prilično nizak i promjenjiv te iznosi 20 do 40% od ukupno oplođenih jajnih stanica (LONERGAN i sur., 2003.).

3.9. Oplodnja *in vitro* (IVF)

Oplodnja *in vitro* predstavlja zajednički uzgoj *in vitro* dozrelih jajnih stanica sa spermijima u strogo kontroliranim laboratorijskim uvjetima. Jajne stanice podrijetlom iz živih krava i junica oplode se *in vitro* sa zamrznutom/odmrznutom spremom bikova, prethodno ispitanoj na jajnim stanicama aspiriranim iz klaoničkih jajnika (MATKOVIĆ i sur., 2002.). Zrelu goveđu jajnu stanicu u postupku oplodnje *in vitro* oplođujemo samo s pokretljivim spermijima (GETZ, 2004.). Danas se za izdvajanje pokretljivih spermija iz sjemena bika koristi nekoliko metoda (SAMARDŽIJA, 2003.):

1. Selekcija pokretljivih spermija aktivnom migracijom u mediju- klasični swim-up

2. Swim-up spermija kroz hijaluronsku kiselinu
3. Priprema spermija na gradijentima gustoće kao što su Percoll i Bovipure
4. Metoda uporabe selektivnih filtera
5. Metoda razrjeđenja i ispiranja

Nakon provjere zrelosti, ekspandirani kumulus- oocita kompleksi se ispiru u TALP-HEPES mediju. Pri tome se odvaja veći dio kumulusne mase, kako bi ostala samo 3 do 4 sloja oko jajne stanice. Zatim se prebacuju u pripremljene mikrokapljice sa spermijim – u svaku kapljicu stavlja se po 5 do 15 jajnih stanica. Za pripremu kapljica najčešće se koristi IVF-TALP medij uz dodatak heparina, penicilamina, hipotaurina i epinerfina (GALLI i sur., 2001.). Ko-kultura jajnih stanica i spermija inkubira se 18 do 24 sati na 39°C uz 5% CO2 u zraku i 80% vlage (MAKEK i sur., 2000.). Uspjeh oplodnje goveđih jajnih stanica *in vitro* procjenjuje se na osnovi sljedećih pokazatelja: nalaz zametaka koji su dostigli razvoj od 4 i više stanica nakon 48 sati inkubacije jajnih stanica i spermija (GREVE i sur., 1993., KARADJOLE, 2009.), nalazom muškog i ženskog pronukleusa koji je vidljiv nakon 18 do 22 sata inkubacije spermija s jajnim stanicama, bojanjem 1% orceinom (SHAMSUDDIN i sur., 1993.) te ocjeni broja penetriranih spermija koja ovisno o metodi pripreme sjemena iznosi 52% (gradijent Percolla) do 74% (swim-up) (PARRISH i sur., 1995.).

3.10. Uzgoj oplođenih jajnih stanica *in vitro* (IVC)

Oplođene jajne stanice uzgajaju se *in vitro* do stadija blastociste, kada takvi zametci mogu biti presađeni u primateljice ili zamrznuti i pohranjeni u tekućem dušiku. Uzgoj se odvija kroz 7 dana, poželjno u definiranim sekvencijalnim medijima koji zadovoljavaju energetske potrebe predimplantacijskog zametka. Metode uzgoja goveđih zametaka *in vitro* u ko-kulturi s različitim somatskim stanicama (epitelnimn stanicama goveđeg jajovoda, stanicama kumulusa) osiguravaju zametcima potrebne metabolite te izlučuju čimbenike rasta koji zametku omogućavaju da prijeđe stadij blokade (BAVISTER, 1995.). Više istraživača je utvrdilo da ko-kultura jajnih stanica s raznim somatskim stanicama uz dodatak seruma, već u tom kratkom razdoblju uzgoja prije implantacije uzrokuje probleme u daljnjem razvoju ploda, te da je barem djelomično odgovorna za otežano teljenje i za sindrom „velikog potomka“ (BAVISTER, 2000.). Korištenje definiranih medija kao što je SOFaaBSA (*Synthetic Oviductal Fluid with aminoacids and Bovine Serum Albumine*) ima povoljni utjecaj na dobivanje normalnog potomstva, tako da je njihova primjena nužna u standardnim protokolima proizvodnje goveđih

zametaka *in vitro*. Ustaljeno je da se kvaliteta goveđih zametaka uzgojenih *in vitro* određuje na osnovu morfološke ocjene i kategorizacije zametaka prema razvojnom stadiju (WRIGHT, 1998., LOJKIĆ i sur., 2014.). Međutim, u procjeni kvalitete zametaka možemo se služiti i drugim pokazateljima poput broja stanica u zametku (SHAMSUDDIN i sur., 1993.), odnosa stanica zametnog čvorića i stanica trofoblasta (VAN SOOM i sur., 2001., LOJKIĆ i sur., 2012.), pojavnosti apoptoze (GJORRET i sur., 2003.), genske ekspersije (EL-SAYED i sur., 2006.) i kinetike brazdanja (HOLM i sur., 1998., KARADJOLE, 2009., SUGIMURA i sur., 2012.).

Kakvoća *in vitro* proizvedenih zametaka još je uvijek slabija u odnosu na one dobivene *in vivo*. To se odražava morfološki, te u njihovoj povećanoj osjetljivosti prema dubokom smrzavanju. Nakon transfera IVP zametaka učestalija je pojava embrionalne smrtnosti.

Premda uvjeti uzgoja imaju značajnu ulogu za postizanje zadovoljavajuće kvalitete *in vitro* uzgojenih goveđih blastocista, na razvojni potencijal goveđih zametaka uvelike utječe i porijeklo jajnih stanica za IVP. Poznavanje uvjeta u kojima rastu i dozrijevaju jajne stanice neophodno je za učinkovitiju primjeni oplodnje i uzgoja *in vitro* goveđih jajnih stanica (GETZ,2004., KARADJOLE, 2009.).

4. MATERIJALI I METODE

U radu su obrađeni arhivski podatci Laboratorija za asistiranu reprodukciju Klinike za porodništvo i reprodukciju Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Za davateljice jajnih stanica korištene su krave holštajn frizijske pasmine (n=7) u dobi od 3 do 6 godina (tjelesne težine od 400 – 500 kg). Krave su za istraživanje odabrane nasumično, bez prethodnog vaginalnog i rektalnog pregleda. Životinje su bile smještene na vezu u kliničkom stacionaru mjesec dana prije započinjanja tretmana. Hranjene su sijenom po volji i koncentratom te vitaminsko-mineralnim dodatkom.

4.1. Sinkronizacija krava davateljica jajnih stanica za IVP

Krave su sinkronizirane OvSynch metodom bez prethodnog rektalnog pregleda. Nulti dan sve su krave dobile sintetski analog hormona hipotalamusa GnRH (Depherelin Gonavet Veyx®, 2 mL i.m., Veyx-Pharma GmbH). Sedam dana poslije dobile su sintetski analog prostaglandina (Estrumate, 2 mL i.m. Shering Plough Ltd.) te dva dana nakon njega ponovno GnRH. Deseti dan nakon prve injekcije GnRH sve su krave pregledane vaginalno i rektalno uz pomoć ultrazvuka radi kontrole estrusa.

4.2. Kontrola prisustva dominantnog folikula i kvalitete žutog tijela

Osmog dana nakon utvrđenog estrusa krave su rektalno i ultrazvučno pregledane kako bi se utvrdilo zrelo žuto tijelo na jajnicima te utvrdio folikularni status davateljica (prisustvo/odsutvo dominantnog folikula) prije započinjanja superovulacijskog postupka. Također je uzeta krv za određivanje razine progesterona u serumu kako bi se potvrdila kvaliteta žutog nakon sinkonizacije OvSynch metodom krava davateljica jajnih stanica za OPU/IVP. Razina progesterona određena je imunoenzimskim testom s fluorescentnom detekcijom (Enzyme Lynked Fluorescent Assay, ELFA) iz ostatnih uzoraka seruma, koristeći komercijalni komplet VIDAS®Progesterone (Biomérieux SA, Marcy-l'Etoile, Francuska), na Mini Vidas automatskom analizatoru.

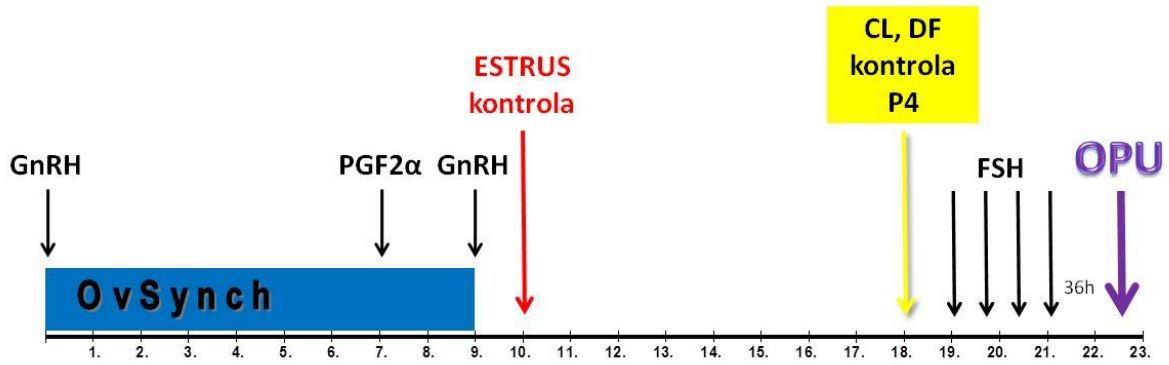
Progesteronski kit i uzorak seruma moraju biti zagrijani na sobnu temperaturu kroz 30 minuta prije izvođenja testa. Princip testa temelji se na kombinaciji kompetitivnog imunoenzimskog testa s detekcijom fluorescencije. U prvu jažicu testnog stripa (PRG strip)

dodaje se uzorak seruma (200µl). U ostalim jažicama nalazi se konjugat, otopina za ispiranje, razrjeđivač i supstrat. Progesteron u uzorku veže se za specifična monoklonska protutijela kojom je obložena unutrašnjost SPR pipete. Nakon inkubacije i ispiranja, vezani progesteron otkriva se pomoću konjugata, progesteronskog derivata označenog alkalnom fosfatazom (AP). U konačnom koraku AP hidrolizira supstrat (4-metil umbeliferil) u fluorescentni produkt, koji se mjeri na valnoj duljini od 450 nm. Intenzitet fluorescencije obrnuto je proporcionalan koncentraciji progesterona u uzorku. Rezultat je iskazan u ng/mL.

4.3. Superovulacija krava davateljica jajnih stanica za IVP

Kod svih je davateljica aktivnost jajnika stimulirana s pomoću pFSH preparata (Pluset®, Laboratorios Calier S.A., Španjolska), intramuskularno, u padajućim dozama počevši od 9. ili 10. dana ciklusa. Neposredno prije započinjanja superovulacijskog tretmana zabilježeno je prisustvo dominantnog folikula kod krava davateljica bez njegove aspiracije. Ukupna superovulacijska doza Pluseta® iznosila je 7 mL, raspoređena u 4 doze kroz 2 dana. Prva doza je bila 2,5 mL, a svaka sljedeća za 0,5 mL manja, da bi završna doza bila 1 mL. Krave su kontrolirane 24 i 36 sati nakon zadnje injekcije pFSH. Transvaginalna aspiracija jajnih stanica učinjena je 36 sati nakon zadnje injekcije pFSH.

Na slici 1 shematski je prikazan čitav postupak sinkronizacije OvSynch protokolom, kontrola estrusa i kontola kvalitete žutog tijela određivanjem razine progesterona te prisustva dominantnog folikula kao i postupak superovulacije krava davateljica jajnih stanica za OPU/IVP



Slika 1: Shematski prikaz dizajna istraživanja sinkronizacije davateljica jajnih stanica za OPU/IVP OvSynch-om

4.4. Praćenje dinamike rasta folikula na jajnicima stimuliranih davateljica

Krave i junice davateljice jajnih stanica za OPU/IVP (n = 6) pregledane su rektalno i ultrazvučno 24 i 36 sati nakon zadnje FSH injekcije. Svaki pregled izveden je s istim ultrazvučnim aparatom (Pia Medical, Nizozemska) kojim je rađena i aspiraciju jajnih stanica, sa sektorskom sondom od 5,0/7,5 MHz uz odgovarajući software za mjerenje tvorbi na jajnicima. Zabilježen je ukupan broj folikula >2 mm te prisustvo drugih tvorbi na jajnicima davateljica, kao što su žuto tijelo (CL) te hemoragični ili luteinizirani folikuli (HF).

Folikuli su podijeljeni u sljedeće razrede: folikuli <9 mm, folikuli promjera 10-14 mm te folikuli >15 mm. Prilikom svakog pregleda nacrtani su dijagrami jajnika s naznačenim položajem žutog tijela i položajem folikula, koji su korišteni za praćenje dinamike rasta pojedinih folikula prilikom sljedećeg pregleda.

4.5. Transvaginalna aspiracija jajnih stanica pomoću ultrazvuka

Punkcija i aspiracija folikula učinjeni su uz pomoć OPU sistema (Pie Medical, Nizozemska) koji se sastoji od 3 komponente: ultrazvučnog aparata sa sektorskom sondom od 5 i 7,5 MHz, aspiracijske pumpe i sustava za uvođenje igle za aspiraciju. Životinje su prije punkcije sedirane (0,1 mL/100kg Xylapan, Vetoquinol, Francuska), a radi bolje relaksacije i lakše transrektalne manipulacije jajnicima aplicirana im je i epiduralna anestezija (5 mL 2% lidokaina). Nakon čišćenja i dezinfekcije stidnice i međice, sustav za uvođenje igle (Terumo 18G) u kojem je također smještena i sonda ultrazvuka, uveden je u rodnicu, a vrh fiksiran kraniodorzalno s lijeve ili desne strane vanjske osi maternicnog grljka, ovisno o tome koji se jajnik punktira (slika 2).

Slika 2: OPU sistem (Pie Medical) sa sektorskom sondom (5/7,5 MHz) i sustavom za uvođenje aspiracijske igle, povezanim s vakuum pumpom.



S pomoću druge ruke, operater *per rectum* fiksira i smješta jajnik na vrh sonde, čime su folikuli jasno vidljivi na ekranu i pod kontrolom ultrazvuka izvršena je punkcija. Na ekranu ultrazvučnog aparata naznačena je linija punkcije koja označava mjesto gdje treba postaviti folikul kojeg želimo punktirati. Prilikom punkcije nastojano je s jednim ubodom igle u stijenku rodnice aspirirati što više folikula, kako bismo što manje oštetili tkivo i parenhim jajnika. Aspirat folikula sakupljan je u sterilnu 15 mL epruvetu (Falcon) s medijem za aspiraciju zagrijanim na tjelesnu temperaturu. Da bismo spriječili oštećenje jajnih stanica prilikom aspiracije folikula, tlak je podešen na 25 mL / min, što odgovara tlaku od 60 mm Hg. Tijekom aspiracije, epruvete s medijem i aspiriranim jajnim stanicama držane su u vodenoj kupelji zagrijanoj na 39°C.

4.6. Pretraživanje aspirata i kategorizacija jajnih stanica

Aspirat folikula sakupljen je u sterilnu epruvetu, 15 mL (Falcon), s medijem za aspiraciju zagrijanim na tjelesnu temperaturu. Aspirat folikula pretražen je pod binokularnom lupom (Olympus SZX-ILLB2-200, Tokio, Japan), a jajne stanice svrstane u pet kategorija, s obzirom na izgled kumulusa i ooplazme:

1. Jajne stanice potpunio okružene s više od tri kompaktna sloja kumulusnih stanica i fino granuliranom ooplazmom koja potpuno ispunjava zonu pelucidu (G1)
2. Jajne stanice djelomično okružene kompaktnim slojem stanica kumulusa ili s manje od 3 sloja stanica kumulusa (G2)
3. Jajne stanice nepotpuno okružene stanicama kumulusa s oslabljenim međustaničnim vezama te neravnomjerno granuliranom ooplazmom (G3)
4. „Gole“ jajne stanice, bez staničnog omotača s degeneriranom ooplazmom s vakuolama, fragmentiranom ili samo s ostatcima ooplazme, koja ne ispunjava u potpunosti zonu pelucidu (G4)
5. Ekspandirane jajne stanice s neravnomjernom granuliranoim ili degeneriranom ooplazmom.

Zabilježen je broj aspiriranih folikula po kategorijama veličine, broj aspiriranih jajnih stanica i uspjeh aspiracije. Uspjeh aspiracije (*Recovery Rate*, RR%) izračunavan je prema formuli:

RR% = broj aspiriranih jajnih stanica/ broj aspiriranih folikula.

4.7. Statistička obrada podataka

Statistička analiza podataka učinjena je pomoću programskog paketa SAS 9.4 (Statistical Analysis Software 2002-2012 by SAS Institute Inc., Cary, SAD). Deskriptivna statistika napravljena je pomoću modula PROC MEANS i PROC FREQ.

Krave su svrstane u dvije skupine: skupina 1 (K1) – krave kod kojih je koncentracija progesterona bila < 10 ng/mL, skupina 2 (K2) – krave kod kojih je koncentracija progesterona bila >10 ng/mL. Razlike u koncentraciji progesterona između grupa analizirane su generalnim linearnim modelom (PROC GLM). Za usporedbu srednjih vrijednosti korištena je Tukey-Kramer-ova metoda usporedbi na razini statističke značajnosti $p<0,05$.

5. REZULTATI

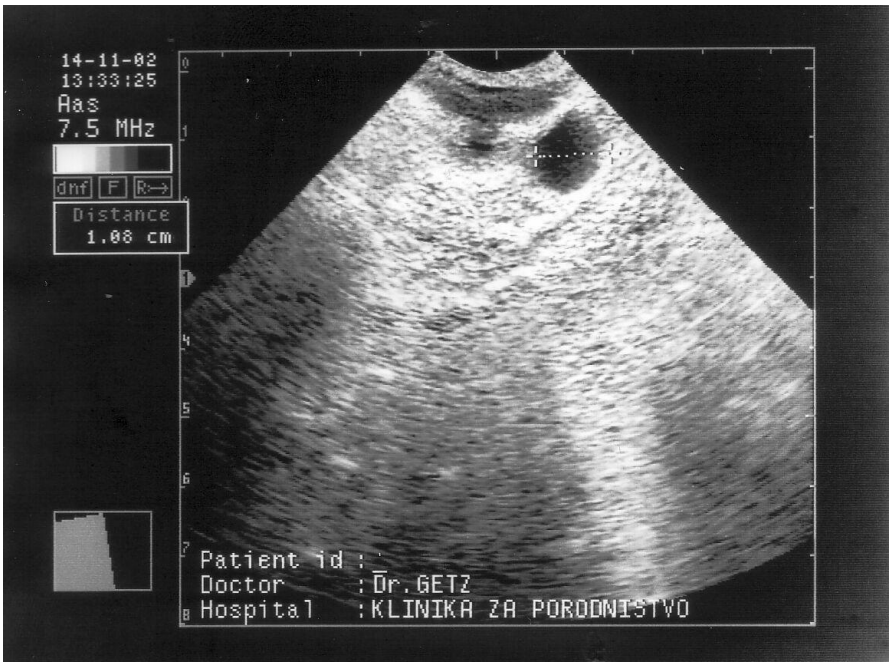
5. 1. Rezultati sinkronizacije krava davateljica jajnih stanica OvSynch-om

Rezultati sinkronizacije krava davateljica jajnih stanica OvSynch protokolom kontrolirani su prvi put 10-og dana nakon započetog tretmana te je kod svih krava vaginalnom i rektalnom pretragom ustanovljen estrus (n=7). Prije započinjanja superovulacijskog postupka (8-og dana nakon utvrđenog estrusa) sve su davateljice pregledane rektalno i ultrazvučno radi kontrole žutog tijela te je svima uzeta krv radi određivanja razine progesterona. Zrelo žuto tijelo ustanovljeno je kod šest sinkroniziranih davateljica (n=6), a kod jedne su krave ustanovljene 2 cistične tvorbe promjera većeg od 2 cm, te je krava izlučena iz daljnjeg postupka.

Prosječna razina progesterona iznosila je 6,48 ±0,79 ng/mL (n=7). Kod četiri krave (n=4) koncentracija progesterona bila je niža, a kod dvije (n=2) viša od 10 ng/mL.

5. 2. Prisustvo dominantnog folikula u vrijeme započinjanja superovulacijskog tretmana

Prije započinjanja superovulacijskog tretmana sve su krave davateljice (n=6) pregledane rektalno i ultrazvučno. Dominantni folikul na jednom od jajnika (slika 3) zabilježen je kod 4/6 davateljica jajnih stanica jajnih stanica za OPU/IVP.



Slika 3. Dominantni folikul na jajniku krave davateljice jajnih stanica za OPU/IVP prije započinjanja prvog stimulacijskog tretmana

5.3. Dinamika rasta folikula nakon superovulacije davateljica jajnih stanica

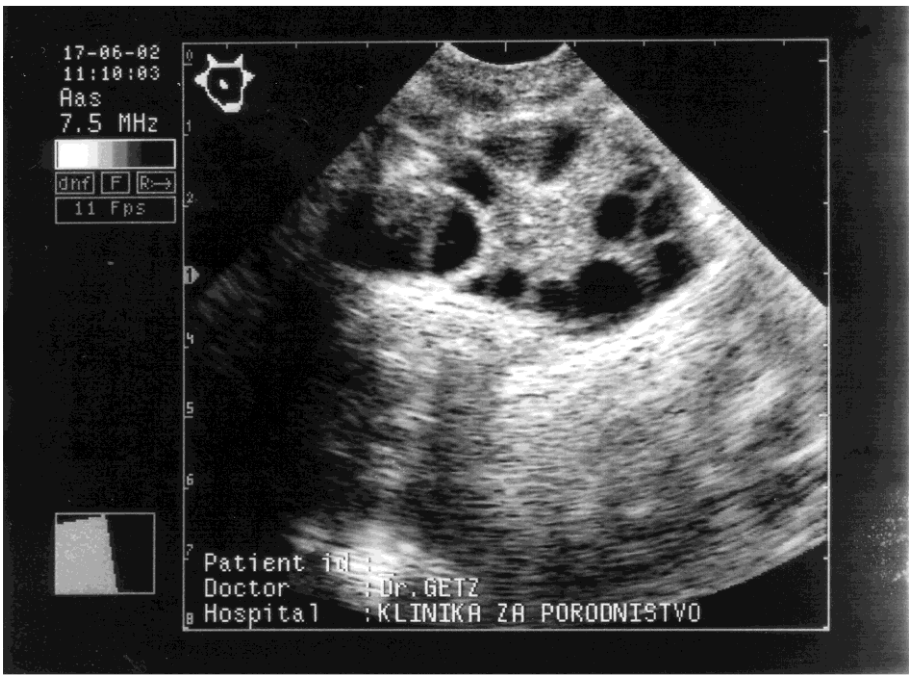
Dinamika rasta folikula 24 i 36 sati nakon hormonske stimulacije jajnika davateljica te utjecaj prisustva dominantnog folikula prije započinjanja stimulacijskog postupka na dinamiku rasta folikula, prikazani su u tablici 1.

Tablica 1. Dinamika rasta folikula po kategorijama (prosječan broj ± SEM) 24 i 36 sati nakon hormonske stimulacije jajnika davateljica

Krave (n=6)	<9 mm	10-14 mm	>15 mm
24h	8,00 ± 0,73	3,50 ± 0,42	0,33 ± 0,21
36h	8,83 ± 1,70	4,16 ± 0,60	0,83 ± 0,30

Kod krava davateljica jajnih stanica za OPU/IVP sinkroniziranih OvSynch protokolom prosječan broj folikula po kategorijama nije se značajno razlikovao 24 i 36 sati nakon zadnje FSH injekcije.

Na slici 4 prikazan je jajnik krave davateljice jajnih stanica 36 sati nakon stimulacije s FSH, neposredno prije transvaginalne aspiracije jajnih stanica.



Slika 4. Jajnik krave davateljice, 36 sati nakon stimulacije s FSH

Utjecaj prisustva dominantnog folikula na dinamiku rasta i veličinu folikula po kategorijama prikazan je u tablici 2.

Tablica 2. Prosječan broj folikula (± SEM) po kategorijama 36 h nakon zadnje aplikacije FSH s obzirom na prisustvo dominantnog folikula (DF)

DF	< 9 mm	10-14 mm	>15 mm
DF + (n=4)	$4,55 \pm 0,35^{a}$	$1,95 \pm 0,22$	$0,20 \pm 0,09^{a}$
DF - (n=2)	$2,50 \pm 0,79^{b}$	$1,75 \pm 0,49$	$0,75 \pm 0,21^{b}$

$^{ab}P< 0,05$

Tablica 2 pokazuju da je prosječan broj folikula do 9 mm bio značajno viši ($p<0,05$) u grupi davateljica koje su imale prisutan dominantni folikul. Prosječan broj folikula promjera >15 mm bio je značajno viši ($p<0,05$) u skupini davateljica koje nisu imale dominantni folikul.

U tablici 3 prikazan je prosječan broj folikula po kategorijama 36 sati nakon zadnje aplikacije FSH s obzirom na razinu koncentracije progesterona nakon sinkronizacije davateljica OvSynch protokolom.

Tablica 3. Prosječan broj folikula (±SEM) po kategorijama 36h nakon zadnje aplikacije FSH s obzirom na koncentraciju progesterona

Skupina	< 9 mm	10-14 mm	>15 mm
K1	$7,12 \pm 0,87^{a}$	$4,25 \pm 0,36$	$0,87 \pm 0,22^{a}$
K2	$11,00 \pm 1,35^{b}$	$3,00 \pm 0,70$	0^{b}

$^{ab}p<0,05$

K1 (n=4)- krave s koncentracijom progesterona < 10 ng/mL
K2 (n=2)- krave s koncentracijom progesterona > 10 ng/mL

Tablica 3 pokazuje da je prosječan broj folikula do 9 mm bio značajno viši ($p<0,05$) u grupi davateljica koje su imale koncentraciju progesterona višu od 10 ng/mL. Prosječan broj folikula promjera >15 mm bio je značajno viši ($p<0,05$) u skupini davateljica koje su imale koncentraciju progesterona manju od 10 ng/mL.

5. 4. Rezultati transvaginalne aspiracije folikula krava davateljica za OPU/IVP

Jajne stanice aspirirane su 36 sati nakon zadnje FSH injekcije kod krava davateljica (n = 6) sinkoniziranih OvSynch protokolom. Uspjeh aspiracije jajnih stanica prikazan je u tablici 4.

Tablica 4. Rezultati aspiracije goveđih jajnih stanica nakon FSH stimulacije davateljica (srednja vrijednost ±SEM)

Krave davateljice	Broj aspiriranih folikula	Broj aspiriranih jajnih stanica	Uspjeh aspiracije (%)
n=6	12,33 ± 0,45	7,16 ± 0,22	60,00 ± 2,97

Aspirirane su ukupno 43 jajne stanice iz 74 folikula. Prosječan broj aspiriranih jajnih stanica kod pojedine davateljice iznosio je 7,16 ± 0,22. Uspjeh aspiracije jajnih stanica kretao se u granicama od 42,85% do 88,88%. Srednja vrijednost uspjeha aspiracije (RR%) iznosila je 60,00 ± 2,97%.

5. 5. Rezultati kategorizacije goveđih jajnih stanica

Rezultati kategorizacije jajnih stanica kod FSH stimuliranih krava davateljica za OPU/IVP, prethodno sinkroniziranih OvSynch protokolom te prosječan broj jajnih stanica za postupak proizvodnje goveđih zametaka *in vitro* nakon transvaginalne aspiracije prikazani su u tablici 5.

Tablica 5. Rezultati kategorizacije aspiriranih goveđih jajnih stanica za IVM (srednja vrijednost ±SEM) nakon sinkronizacije OvSynchom

Krave davateljice	Broj aspiriranih jajnih stanica	Kategorija jajnih stanica				Jajne stanice za IVM
		G1+ G2	G3	G4	Ekspandirane jajne stanice	
n=6	7,16 ± 1,09	3,83 ± 0,22	0,66 ± 0,15	0,50 ± 0,10	2,16 ± 0,18	4,50 ± 0,31

G1+ G2 - jajne stanice prve i druge kategorije; G3 - jajne stanice treće kategorije
G4 - jajne stanice četvrte kategorije

Iz tablice 5 je vidljivo da je aspirirano najviše jajnih stanica prve i druge kategorije te ekpandiranih jajnih stanica. Prosječan broj kvalitetnih jajnih stanica prikladnih za postupak dozrijevanja i oplodnje *in vitro* iznosio 4,50 ± 0,31.

6. RASPRAVA

Sinkronizacija i indukcija estrusa, umjetno osjemenjivanje (UO), multipla ovulacija i embriotransfer te *in vitro* proizvodnja zametaka predstavljaju postupke asistirane reprodukcije koje uzimaju sve većeg maha u govedarskoj proizvodnji, a s ciljem bržeg genetskog napretka dobivanjem velikog broja potomaka od najkvalitetnijih životinja (LOJKIĆ i sur. 2018.). Transvaginalna punkcija jajnika i proizvodnja zametaka *in vitro* pružaju mogućnost dobivanja velikog broja potomaka od živih visokovrijednih krava i junica uz učinkovitije iskorištavanje zalihe jajnih stanica određene rođenjem. Njena je glavna prednost mogućnost višekratnog ponavljanja postupka kod stimuliranih ili nestimuliranih genetski vrijednih plotkinja koje više ne zadovoljavaju u standardnim ET programima (GETZ i sur., 2011.). Transvaginalnom aspiracijom antralnih folikula dobivaju se jajne stanice različite kvalitete i različite razvojne sposobnosti do stadija blastociste *in vitro*, što ovisi o mnogobrojnim čimbenicima kao što su: veličina folikula, sinkronizacija folikularnih valova, hormonska stimulacija jajnika, pasmina, hranidbeni i metabolički status davateljice, mliječnost, toplinski stres i drugo (BARUSELLI i sur., 2012.). U postupak dozrijevanja *in vitro* uzimaju se jajne stanice iz folikula vidljivih na površini jajnika promjera većeg od 3 mm, potpuno okružene s više slojeva kumulusnih stanica i homogenom ooplazmom (MAKEK i sur., 1998.).

Kontrola folikularnog rasta hormonalnim ili mehaničkih postupcima (ablacija dominantnog folikula pod kontrolom ultrazvuka) ima znatan utjecaj na folikularnu dinamiku, uspjeh aspiracije i razvojnu sposobnost aspiriranih jajnih stanica. Uspješna primjena OPU/IVP postupka u velikom mjeri ovisi kako o kvantiteti, tako i o kvaliteti aspiriranih jajnih stanica. Stoga je veliki broj istraživanja u novije vrijeme posvećen poboljšavanju kvalitete jajnih stanica dobivenih s OPU i stvaranjem što homogenije populacije jajnih stanica na jajnicima davateljica s obzirom na njihovu daljnju sposobnost za oplodnju i uzgoj *in vitro* (LONERGAN i FAIR, 2008.).

U našem istraživanju korišten je OvSynch protokol za sinkronizaciju krava davateljica jajnih stanica, koji je ujedno i najkorišteniji protokol za sinkronizaciju kod mliječnih krava. OvSynch protokol uspješno započinje novi folikularni val primjenom GnRH, pa se smatra da bi se primjenom ovog protokola mogao povećati broj folikula vidljivih ultrazvukom, a time i uspješnost transvaginalne punkcije jajnika krava davateljica. U sadašnjem istraživanju sve su krave (n=7) bile u ciklusu 24 sata nakon sinkronizacije OvSynch metodom. To je u skladu s rezultatima PARIHKA i sur., (2019.) koji su također imali 100%-tni odgovor (n=11/11) na

sinkronizacijski postupak. LAKHER i sur. (2019.) su imali lošiji rezultat sinkronizacije, 3/4 (75%) krava su bile u ciklusu dok je jedna bila aciklična.

Postupak superovulacije davateljica za OPU/IVP započeli smo 9. dana ciklusa te je kod 4/6 plotkinja zabilježen dominantni folikul. Svrha stimulacijskih protokola prije OPU je povećati broj folikula pogodnih za punkciju (van WAGTENDONK-de LEEUW, 2006.), posebice folikula promjera 5 do 10 mm (PIETERSE i sur., 1988.). Jajne stanice iz ovih folikula pokazuju veću razvojnu sposobnost u odnosu na one iz manjih folikula (KARADJOLE i sur., 2011., LOJKIĆ i sur., 2016.). Jedna od mogućnosti za sinkronizaciju folikularnog vala je aspiracija dominantnog folikula prije započinjanja FSH tretmana, što dovodi do ranijeg rasta najmanjih folikula promjera 2 do 5 mm (BO´ i MAPLETOFT, 2014.). KIM i sur. (2001) aspirirali su dominantni folikul promjera ≥10 mm 8. dana ciklusa, odnosno 48 sati prije započinjanja superovulacijskog tretmana. Prosječan broj srednjih folikula (promjera od 6 do 9 mm) bio je značajno veći ($p<0,01$) prvog i drugog dana FSH superovulacijskog postupka. Broj velikih folikula (≥10 mm) bio je značajno veći ($p<0,01$) trećeg i četvrtog dana superovulacije nego u kontrolnoj skupini junica. Ukupni broj folikula između skupine junica kod kojih je aspiriran DF i kontrolne skupine nije se razlikovao prvog, trećeg i četvrtog dana superovulacije. Drugog dana FSH stimulacije jajnika kod junica prethodno podvrgnutih aspiraciji DF ustanovljen je značajno veći ukupni broj folikula ($P<0,05$), zbog porasta folikula srednje kategorije (promjera od 6 do 9 mm). Tako su dokazali da je aspiracija dominantnog folikula prouzročila raniji rast srednjih folikula te kasnije povećanje broja velikih folikula.

U našem je istraživanju kod grupe krava davateljica jajnih stanica, koje su imale prisutan dominantni folikul prije započinjanja superovulacijskog tretmana, utvrđen značajno veći broj folikula do 9 mm, za razliku od grupe koja nije imala prisutan dominantni folikul prije tretmana. Folikuli ove kategorije predstavljaju populaciju folikula s jajnim stanicama najbolje razvojne sposobnosti za IVP. Grupa krava davateljica koje nisu imale prisutan dominantni folikul, imale su značajno veći broj folikula većih od 15 mm. GETZ i sur.,(2004.) nisu imali značajnih razlika u broju folikula po kategorijama između stimuliranih davateljica kod kojih nije ili jest aspiriran dominantni folikul. Također, nije bilo značajne razlike u ukupnom broju folikula po kategorijama nakon završetka stimulacijskog tretmana što je u skladu s našim rezultatima.

Davateljice koje su imale koncentraciju progesterona višu od 10 ng/mL imale su značajno veći broj folikula manjih od 9 mm te ukupno veći broj folikula. I PFEIFER i sur. (2009.) su dobili veći broj folikula i bolji uspjeh aspiracije u krava s višom koncentracijom progesterona, dok je kvaliteta aspiriranih jajnih stanica bila bolja u krava s nižom

koncentracijom progesterona. Iako je dokazano da progesteron pozitivno utječe na kvalitetu jajnih stanica (BLONDIN i SIRARD, 1995.) jer jajne stanice sakupljene u kasnom diestrusu imaju bolju razvojnu sposobnost od onih sakupljenih u ranom diestrusu ili folikularnoj fazi ciklusa (MACHATKOVA i sur., 1996., MACHATKOVA i sur., 2004.), mehanizam kojim progesteron stimulira rast malih folikula ostaje nejasan (CUSHMAN i sur., 2001., ROTH i sur., 2001., PFEIFER i sur., 2009.).

Najveći udio aspiriranih jajnih stanica u našem istraživanju pripadao je kvaliteti G1 i G2 te ekspandiranim jajnim stanicama, neovisno o veličini i podrijetlu folikula iz kojih su dobivene. Veliki broj ekspandiranih jajnih stanica može se objasniti većim brojem folikula > 10 mm u kojima je počelo završno dozrijevanje folikula, a time i jajne stanice pod utjecajem LH. Isto tako, velik broj ekspandiranih jajnih stanica može biti posljedica superovulacijskog postupka kod davateljica jajnih stanica, što je zabilježila GETZ (2004.). RHODES i sur. (1997.) te SENEDA i sur. (2001.) nisu utvrdili povezanost veličine folikula s kvalitetom aspiriranih jajnih stanica. GETZ (2004.) je dokazala postojanje pozitivne korelacije između prosječnog broja folikula 6 do 9 mm i prosječnog broja aspiriranih jajnih stanica prve i druge kategorije. Nadalje, utvrdila je postojanje pozitivne korelacije između prosječnog broja folikula većeg od 15 mm i prosječnog broja jajnih stanica četvrte kategorije koje nisu išle u daljnji IVP postupak. VIEIRA i sur. (2014.) su nakon dvodnevne stimulacije s pFSH kod holšajnskih krava davateljlica aspirirali prosječno 10,7 ± 1,5 jajnih stanica, a od toga 8,9 ± 1,3 jajnih stanica prve, druge i treće kategorije koje su ušle u IVP postupak. ONGARATTO i sur. (2015.) su nakon dvodnevne superovulacije krava davateljica jajnih stanica s pFSH transvaginalnom aspiracijom dobili prosječno 8,6 ± 0,6 kvalitetnih jajnih stanica, a nakon jednokratne aplikacije eCG-a značajno manje, svega 3,7 ± 0,6 kvalitetnih jajnih stanica po davateljici.

GETZ i sur., (2013.) navode da je kod grupe krava sinkroniziranih pomoću prostaglandina uspjeh aspiracije (RR) iznosio 68,2%, dok je u našem istraživanju iznosio 60,0%. Nasuprot tome, da SILVA i sur. (2017.) su nakon dvodnevne i trodnevne stimulacije jajnika krava hoštajnske pasminae s pFSH zabilježili veći broj srednjih folikula (od 6 do 10 mm), no ne i bolji uspjeh aspiracije i veći broj kvalitetnih jajnih stanica. CAVALIERI i sur. (2018.) su kod davateljica jajnih stanica za OPU/IVP sinkronizirali folikularne valove pomoću ušnih implantata progesterona te aspirirali veći broj kvalitetnih jajnih stanica te značajno veći broj *in vitro* proizvedenih zametaka s većim postotkom koncepcije nakon transfera, nego kod kontrolne grupe nesinkroniziranih davateljica. Rezultati našeg istraživanja također su pokazali da je OvSynch protokol uspješno sinkronizirao estrus u krava davateljica jajnih stanica za

OPU/IVP i pozitivno utjecao na folikularni razvoj, a time i na uspjeh aspiracije jajnih stanica za oplodnju *in vitro*.

7. ZAKLJUČCI

1. OvSynch protokolom uspješno je sinkroniziran estrus u krava davateljica jajnih stanica za OPU/IVP.
2. OvSynch protokol pozitivno je utjecao na folikularni razvoj, a time i na uspjeh aspiracije jajnih stanica za oplodnju *in vitro.*
3. Prosječan broj folikula <9 mm bio značajno viši ($p<0,05$) u grupi davateljica koje su imale prisutan dominantni folikul. Prosječan broj folikula promjera >15 mm bio je značajno viši ($p<0,05$) u skupini davateljica koje nisu imale dominantni folikul.
4. Prisustvo dominantnog folikula prije započinjanja superovulacijskog protokola utjecao je na porast broja folikula <9 mm, koji predstavljaju populaciju folikula s jajnim stanicama najbolje razvojne sposobnosti za IVP.
5. Davateljice koje su imale koncentraciju progesterona >10 ng/mL imale su značajno veći broj folikula <9 mm te ukupno veći broj folikula.
6. Kod svih davateljica jajnih stanica za OPU/IVP nakon superovulacije s FSH aspirirano je najviše jajnih stanica prve i druge kategorije te ekpandiranih jajnih stanica.

8. SAŽETAK

Svrha ovog rada bila je istražiti uspjeh sinkronizacije krava davateljica jajnih stanica OvSynch protokolom. Istraživan je utjecaj OvSynch-a na kvalitetu žutog tijela i prisustvo dominantnog folikula prije započinjanja superovulacijskog tretmana, na dinamiku rasta folikula i uspjeh aspiracije jajnih stanica za oplodnju *in vitro*. Šest krava holštajn frizijske pasmine u dobi od 3-6 godina sinkronizirane su sintetskim analogom GnRH (0. i 9. dan) i sintetskim analogom prostaglandina (7. dan). Superovulacijski postupak započet je u lutealnoj fazi ciklusa s pomoću visokopurificiraniog FSH preparata apliciranog dva puta dnevno tijekom dva dana u padajućim dozama. Neposredno prije započinjanja superovulacijskog tretmana ultrazvučno je zabilježeno prisustvo dominantnog folikula i žutog tijela kod krava davateljica te kvaliteta žutog tijela mjerenjem razine progesterona. Dinamika rasta folikula praćena je rektalnim i ultrazvučnim pregledima 24 i 36 sati nakon zadnje aplikacije FSH. Transvaginalna aspiracija jajnih stanica učinjena je 36 sati nakon zadnje injekcije FSH. Folikuli su podijeljeni prema promjeru u sljedeće razrede: folikuli <9 mm, folikuli 10-14 mm te folikuli >15 mm. Bilježen je broj aspiriranih folikula prema veličini, broj aspiriranih jajnih stanica i uspjeh aspiracije. Aspirirane jajne stanice morfološki su ocjenjene te prema izgledu stanica kumulusa i ooplazme svrstane u pet kategorija kvalitete (G1, G2, G3 i G4 i ekspandirane jajne stanice).

Prisustvo dominantnog folikula na jajnicima, koji je utvrđen u 4 davateljice prije započinjanja superovulacijskog postupka, utjecao je na dinamiku rasta folikula po kategorijama. Kod davateljica koje su imale prisutan DF bilo je značajno više folikula < 9 mm ($p<0,05$), dok je u skupini bez DF bilo značajno više folikula promjera >15 mm ($p<0,05$). S obzirom na koncentraciju progesterona, prosječan broj folikula < 9 mm bio značajno viši ($p<0,05$) u grupi davateljica koje su imale koncentraciju progesterona > 10 ng/mL, dok je kod davateljica koje su imale koncentraciju progesterona > 10 ng/mL prosječan broj folikula >15 mm bio je značajno viši ($p<0,05$). Prosječan broj aspiriranih jajnih stanica iznosio je 7,16 ± 1,09, a kvalitetnih jajnih stanica (G1, G2 i G3) prikladnih za IVF iznosio je 4,50 ± 0,31. Uspjeh aspiracije (RR%) iznosio je 60,00 ± 2,97%.

Rezultati istraživanja pokazuju da je OvSynch protokol uspješno sinkronizirao estrus u krava davateljica jajnih stanica za OPU/IVP i pozitivno utjecao na folikularni razvoj, a time i na uspjeh aspiracije jajnih stanica za oplodnju *in vitro*.

Ključne riječi: krava, superovulacija, ultrazvučna aspiracija (OPU), jajna stanica, oplodnja *in vitro*.

9. SUMMARY

EFFICIENCY OF OVSYNCH FOR SYNCHRONIZATION OF OOCYTE DONOR COWS FOR EMBRYO PRODUCTION *IN VITRO*

The aim of this study was to evaluate the efficacy of OvSynch protocol for synchronization of oocyte donor cows. The effect of OvSynch on quality of corpora lutea and the presence of dominant follicle prior to superovulation, the dynamics of follicular growth and oocyte recovery rate after ovum pick-up was investigated. Six Holstein-Friesian cows, three to six years of age, were synchronized with a synthetic GnRH analogue (day 0 and 9) and with a synthetic prostaglandin analogue (day 7). Superovulation started in a luteal phase with a highly purified FSH applied twice a day for two days in decreasing doses. Just before the beginning of superovulation, the presence of a dominant follicle and corpora lutea in donor cows was recorded using ultrasound imaging. The quality of corpora lutea was recorded by measuring blood progesterone levels. Rectal examinations and ultrasound imaging, 24 and 36 hours after last application of FSH, were used to track the follicular dynamics. Transvaginal ovum pick-up was performed 36 hours after the last FSH injection. Follicles were ranked by diameter into following categories: follicles <9 mm, follicles 10-14 mm and follicles >15 mm. The number of aspirated follicles according to size, the number of retrieved oocytes and the oocyte recovery rate were recorded. Collected oocytes were classified, based on compactness of cumulus cells and morphology of ooplasm, into five quality categories (G1, G2, G3, G4, and expanded cumulus oocytes).

Presence of a dominant follicle in the ovaries, which has been recorded in 4 donor cows prior to superovulatory treatment, affected the follicular dynamics of ovarian follicular growth of all categories. Donor cows with the presence of DF had significantly more follicles <9 mm ($p<0,05$), while the group without DF had more follicles of diameter >15 mm ($p<0,05$). Depending on a progesterone levels, number of follicles <9 mm was significantly higher ($p<0,05$) in a group of donor cows with progesterone levels >10 ng/mL, while a group of donor cows with progesterone levels >10 ng/mL had significantly higher ($p<0,05$) number of follicles >15 mm. The average number of oocytes recovered was $7,16 \pm 1,09$. The number of high quality oocytes (G1, G2 and G3) appropriate for IVF was $4,50 \pm 0,31$. The recovery rate (RR%) after OPU was $60,00 \pm 2,97\%$.

These results demonstrate that the OvSynch protocol effectively synchronized oestrus of oocyte donor cows and had a positive effect on a follicular growth and oocyte recovery rate after transvaginal aspiration of oocytes for *in vitro* fertilization.

Key words: cow, superovulation, Ovum Pick-Up (OPU), oocyte, *in vitro* fertilization

10. LITERATURA

1. AGARWALL, S. K., V. K. KANEJA, U. SHANKAR, M. C. YADAV, P. C. SANWAL (1993): Superovulation, embryo recovery and endocrine response in cross-bred cattle treted with PMSG and FSH-P. Ind. J. Dairy Sci. 46, 450-454.
2. AYRES, H., R. M. FERREIRA, A. P. CUNCHA A, R. R. ARAÚJO, M. C. WILTBANK (2013): Double Ovsynch in high-producing dairy cows: effects on progesterone concentrations and ovulation to GnRH treatments. Theriogenology 79, 159–164.
3. BARUSELLI, P. S , M. F. Sa´ FILHO, R. M. FERREIRA , J. N. S. SALES, L. U. GIMENES, L. M. VIEIRA, M. F. MENDANHA, G. A. BO´ (2012): Manipulation of Follicle Development to Ensure Optimal Oocyte Quality and Conception Rates in Cattle. Reprod. Dom. Anim. 47, 134–141.
4. BAVISTER, B. D. (1995): Culture of preimplantation embryos: facts and artifacts. Hum. Reprod. Upd. 1, 91-148.
5. BAVISTER, B. D. (2000): Interactions between ambryos and the culture milieu. Theriogenology 53, 619-626.
6. BLONDIN, P., M. SIRARD (1995): Oocyte and follicular morphology as determining characteristics for developmental competence in bovine oocytes. Mol. Reprod. Dev., 41, 54-62.
7. BO´, G. A., R. J. MAPLETOFT (2014): Historical perspectives and recent research an superovulatrion in cattle. Theriogenology 81, 38-48.
8. BOLAND, M. P., D. GOULDING, J. F. ROCHE (1991): Alternative gonadotrophins for superovulation in cattle. Theriogenology 35, 5-17.
9. BONI, R. (2012): Ovum pick-up in cattle: 25 retrospective analysis. Anim. Reprod. 9, 362-369.
10. BRACKETT, R. G., D. BOUSQUET, M. L. BOICE, W. J. DONAWICK, J. F. EVANS, M. A. DRESSEL (1982): Normal development following *in vitro* fertilization in the cow. Biol. Reprod. 27, 147-158.
11. BRAILEANU, G. T., C. ALBANESE, C. CARD, P. J. CHEDRESE (1998): FSH Bioactivity in Commercial Preparations of Gonadotropins. Theriogenology 49, 1031-1037.

12. BRITT, J. S., J. GASKA (1998): Comparison of two estrus synchronization programs in a large, confinement-housed dairy herd. J. Am. Vet. Med. A. 212, 210-212.
13. CAVALIERI, F. L. B., F. MOROTTI, M. M: SENEDA, A. H. B. COLOMBO, M. A. ANDREAZZI, I. P.EMANUELLI, L. P. RIGOLON (2018): Improvement of bovine *in vitro* embryo production by ovarian follicular wave synchronization prior to ovum pick-up. Theriogenology 117, 57–60.
14. CUSHMAN, R., J. DESOUTA, V. HEDGPETH, J. BRITT (2001): Alteration of activation, growth, and atresia of bovine preantral follicles by long-term treatment of cows with estradiol and recombinant bovine somatotropin. Biol. Reprod. 65, 581-586.
15. DA SILVA, J. C. B., R. M. FERREIRA, M. M. FILHO, J. DE REZENDE NAVES, T. SANTIN, G. PUGLIESE, E. HOFFMANN MADUREIRA (2017): Use of FSH in two different regimens for ovarian superstimulation prior to ovum pick up and *in vitro* embryo production in Holstein cows. Theriogenology 90, 65-73.
16. EL-SAYED, A, M. HOELKER, F. RINGS, D. SALILEW, D. JENNEN, E. THOLEN, M. A. SIRARD, K. SCHELLANDER, D. TESFAYE (2006): Large-scale transcriptional analysis of bovine embryo biopsies in relation to pregnancy success after transfer to recipients. Physiol. Genom. 28, 84–96.
17. EL-TARABANY, M. S., A. A. EL-TARABANY, E. M. ROUSHDY (2016): Impact of parity on the efficiency of ovulation synchronization protocols in Holstein cows. Theriogenology 86, 2230–2237.
18. FRICKE, P. M., J. N. GUENTHER, M. C. WILTBANK (1998): Efficacy of decreasing the dose of GnRH used in a protocol for synchronization of ovulation and timed AI in lactating dairy cows. Theriogenology 52, 1133-1143.
19. GALLI, C., G. CROTTI, C. NOTARI, P. TURINI, R. DUCHI, G. LAZZARI (2001): Embryo production by ovum pick up from live donors. Theriogenology 55, 1341-1357.
20. GALLI, C., R. DUCHI, G. GROTTI, P. TURINI, N. PONDERATO, S. COLLEONI, I. LAGUTINA, G. LAZZARI (2003): Bovine embryo technologies. Theriogenology 59, 599-616.
21. GETZ I., M. MATKOVIĆ, Z. TUČEK, M. LOJKIĆ, M. SAMARDŽIJA, T. DOBRANIĆ, A. ORAK, J. GRIZELJ, S. VINCE, I. FOLNOŽIĆ (2013): The use of embryo transfer and reproductive technologies in the cattle breeding of Croatia: a retrospective study. Proceedings of the XIIIth Middle European Buiatrics Congress, Belgrade, Srbija, 05.- 08. June. 2013., pp. 129-135.

22. GETZ, I. (2004): Uspješnost stimulacije jajnika krava u postupku transvaginalne ultrazvučne punkcije i uzgoja *in vitro* goveđih zametaka. Disertacija. Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, Hrvatska.
23. GETZ, I., M. KARADJOLE, M. SAMARDŽIJA, M. MATKOVIĆ, Z. MAKEK, T. DOBRANIĆ, T. KARADJOLE, J. GRIZELJ, N. MAČEŠIĆ, I. FOLNIŽIĆ (2011): Bovine embryo production *in vitro* by Ovum Pick-Up – an overwiev of 10 years of investigation in Croatia. Veterinarska stanica Suppl. Book of proceedings of the 12th Middle European Buiatric Congress. Pula, Hrvatska, 18-22. May 2011., pp. 38-45.
24. GETZ, I., M. KARADJOLE, M. SAMARDŽIJA, N. MAĆEŠIĆ, Z. MAKEK, T. KARADJOLE, T. DOBRANIĆ, G. BAČIĆ, S. VINCE (2008): Effect of breed (Simmental and Holstein-Friesian) of donor cows on Ovum Pick-Up/*in vitro* fertilization result after repeated superovulation with FSH-P. Reprod. Dom. Anim. 43, Supplement 5, 79.
25. GETZ, I., M. MATKOVIĆ, M. LOJKIĆ, Z. MAKEK, G. BAČIĆ, M. CERGOLJ (2000): Transvaginal ovum pick-up on the cow: alternative in the production of bovine embryos for transfer. Vet. arhiv 70, 75-80.
26. GJORRET, J. O., H. M. KNIJN, S. J DIELEMAN, B. AVERY, L. I. LARSSON, P. MADDOX-HYTTEL (2003): Chronology of apoptosis in bovine embryos produced *in vivo* and *in vitro*. Biol. Reprod. 69, 1193–1200.
27. GORDON, I. (1996): Controlled Reproduction in Cattle and Buffaloes. CAB International, Wallingford, UK.
28. GREVE, T., V. MADISON, B. AVERY, H. CALLEDEN, P. HYTTEL (1993): *In vitro* production of bovine embryos: A progress report and the consequences on the genetic upgrading of cattle populations. Anim. Reprod. Sci. 33, 51-69.
29. HIDALGO, C.O., J. MENENDEZ, L. PRIETO, J.A.GARCIA-PALOMA, N. FACAL, E. DIAZ, P. DUQUE, E. GOMEZ, C. DIEZ (2000): Pregnancies after bovine ovum pick-up in Spain: preliminary results. Proceedings of the 16th scientific meeting of the European Embryo Transfer Association, Santander, 08-09 September 2000, pp. 164.
30. HOLM, P., N. N. SHUKRI , G. VAJTA, P. BOOTH, C. BENDIXEN, H. CALLESEN (1998): Developmental kinetics of the first cell cycles of bovine *in vitro* produced embryos in relation to their *in vitro* viability and sex. Theriogenology 50, 1285-1299.
31. HOSHI, H. (2003): *In vitro* production of bovine embryos and their application for embryo transfer. Theriogenology 59, 675-685.

32. KARADJOLE, M. (2009): Utjecaj veličine folikula na kvalitetu goveđih jajnih stanica i razvoj zametka u postupku oplodnje *in vitro*. Disertacija. Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, Hrvatska.
33. KARADJOLE, M., I. GETZ, M. SAMARDŽIJA, N. MAĆEŠIĆ, B. ŽEVRNJA, M. MATKOVIĆ, T. KARADJOLE, G. BAČIĆ, I. FOLNOŽIĆ, S. VINCE (2011): The effect of follicle size on developmental competence of bovine oocytes collected by Ovum pick-up. Proceedings of the 12th Middle European Buiatric Congress, 18-22. svibnja 2011., Pula, Croatia, pp. 153-159.
34. KARADJOLE, M., I. GETZ, M. SAMARDŽIJA, N. MAĆEŠIĆ, Z. MAKEK, T. KARADJOLE, G. BAČIĆ, T. DOBRANIĆ, M. KNEŽEVIĆ, G. PERČULIJA (2008): Comparison of bovine oocyte recovery and in vitro embryo development after ovum pick up in simmental, charolais and holstein friesian cows. Proceedings of the 24th Scientific Meeting of A.E.T.E., 12-13 September, 2008, Pau, France. pp. 172.
35. KASIMANICKAM, R., L. M. CORNWELL, R. L. NEBEL (2005): Fertility following fixed-time AI or insemination at observed estrus in Ovsynch and Heatsynch programs in lactating dairy cow. Theriogenology 63, 2250-2559.
36. KIM I. H., D. S. SON, S. H. YEON, S. H. CHOI, S .B. PARK, I. S. RYU, G. H. SUH, D. W. LEE, C. S. LEE, H. J. LEE, J. T. YOON (2001): Effect of dominant follicle removal before superstimulation on follicular growth, ovulation and embryo production in holstein cows. Theriogenology 55, 937-945.
37. KOHRAM, H., H. TWAGIRAMUNGU, D. BOUSQUET, J. DUROCHER, L. A. GUILBAULT (1998): Ovarian superstimulation after follicular wave synchronization with GnRH at two difference stages of the estrus cycle in cattle. Theriogenology 49, 1175–1186.
38. KOJIMA, F. N. (2003): The estrous cycle in cattle: physiology, endocrynology and follicular wawes. Applied animal science 19, 83-95.
39. LAKHER, J. P., M. K. AWASTHI, J. R. KHAN, M. R. POYAM (2019): Efficacy of OvSynch plus protocol for improvment of fertility in postpartum sahiwal cows. Ind. J. Of Vet. Sci. And Biotech. 14, 5-8.
40. LARSON, L. L., P. J. H. BALL (1992):Regulation of estrus cycles in dairy cattle: a review. Theriogenology 38, 255-267.

41. LI, F., X. CHEN, W. PI, C. LIU, Z. SHI (2007): Collection of oocytes through transvaginal ovum pick-up for *in vitro* embryo production in Nanyang Yellow cattle. Reprod. Domest. Anim. 42, 666-670.
42. LOJKIĆ, M., I. GETZ, M. SAMARDŽIJA, M. MATKOVIĆ, G. BAČIĆ, T. KARADJOLE, N. MAĆEŠIĆ, I. FOLNOŽIĆ, B. ŠPOLJARIĆ (2012): Effect of cysteamine supplementation during *in vitro* culture of early stage bovine embryos on blastocyst rate and quality. Acta Vet. Brno 81, 229-234.
43. LOJKIĆ, M., I. GETZ, M. SAMARDŽIJA, N. MAĆEŠIĆ, M. MATKOVIĆ, T. KARADJOLE, G. BAČIĆ, N. PRVANOVIĆ BABIĆ, J. GRIZELJ, S. VINCE, I. FOLNOŽIĆ (2013): Effect of breed on efficiency of oocyte collection and subsequent bovine embryo production. Congress Proceedings XIIIth Middle European Buiatrics Congress, Beograd: Serbian Buiatrics Association, Faculty of Veterinary Medicine, pp. 426-431.
44. LOJKIĆ, M., I. GETZ, N. KARAJIĆ, M. SAMARDŽIJA, N. MAĆEŠIĆ, T. KARADJOLE, N. PRVANOVIĆ BABIĆ, G. BAČIČ, D. ŽELJEŽIĆ, V. MAGAŠ (2018): Primjena asistirane reprodukcije u govedarstvu. Vet. stn. 49, 91-104.
45. LOJKIĆ, M., M. ČAVLEK, G. BAČIĆ, I. GETZ, M. SAMARDŽIJA, N. MAĆEŠIĆ, T. KARADJOLE, M. ČANIĆ (2014): Morfološka ocjena goveđih zametaka *in vitro*. Vet. stn. 45, 187-193.
46. LOJKIĆ, M., S. UVODIĆ, I. GETZ, M. SAMARDŽIJA, J. ALADROVIĆ, N. MAĆEŠIĆ, T. KARADJOLE, G. BAČIĆ, M. MATKOVIĆ, M. BENIĆ (2016): The influence of follicle size on the developmental kinetics of bovine embryos. Vet. arhiv 86, 613-622.
47. LONERGAN, P., D. ROZOS, T. FAIR, M. P. BOLAND (2003): *In vitro* production of bovine embryos: factors affecting blastocyst yield and quality. Zbornik radova IV srednjoeuropskog bujatričkog kongresa, Lovran, 23-27. travnja 2003. pp.33-38.
48. LONERGAN, P., T. FAIR (2008): *In vitro*-produced bovine embryos—Dealing with the warts. Theriogenology 69, 17–22.
49. LOPES, A. S., T. MARTINUSSEN, T. GREVE, H. CALLESEN (2006): Effect of days post-partum, breed and ovum pick-up scheme on bovine oocyte recovery and embryo development. Reprod. Domest. Anim. 41, 196-203.
50. LU, K. H., I. GORDON, M. GALLAGHER, A. MCGOVERN (1987): Pregnancy established in cattle by transfer of embryos derived from *in vitro* fertilization of oocytes matured *in vitro*. Vet. Rec. 121, 259-260.

51. MACHATKOVA, M., E. JOKESOVA, J. PETELIKOVA, V. DVORACEK (1996): Developmental competence of bovine embryos derived from oocytes collected at various stages of the estrous cycle. Theriogenology 61, 329-335.
52. MACHATKOVA, M., K. KRAUSOVA, E. JOKESOVE, M. TOMANEK (2004): Developmental competence of bovine oocytes: effects of follicle size and the phase of follicular wave on *in vitro* embryo production. Theriogenology 61, 329-335.
53. MAJERUS, V., R. DE ROOVER, D. ETIENNE, S. KAIDI, S. MASSIP, F. DESSY, I. DONNAY (1999): Embryo production by ovum pick up in unstimulated calves before and after puberty. Theriogenology 52, 1169-1179.
54. MAKEK, T., M. HERAK, M. CERGOLJ, I. BARAC-GETZ, D. RUDAN (1996): A comparison rectal palpation and ultrasonography for the evaluation of superovulatory response on the ovaries in beef heifers. Acta Vet. Hung. 44, 467-476.
55. MAKEK, Z., I. GETZ, M. CERGOLJ, M. HERAK, A. TOMAŠKOVIĆ, KORANA STIPETIĆ, T. DOBRANIĆ, V. SUŠIĆ (1998): Selection of immature bovine oocytes as the preliminary phase of *in vitro* fertilization. Vet. arhiv 68, 109-119.
56. MAKEK, Z., M. MATKOVIĆ, I. GETZ, M. LOJKIĆ (2000): Proizvodnja goveđih zametaka *in vitro* za embriotransfere: Usporedba rezultata uzgoja u kokulturi sa stanicama granuloze i uzgoja u definiranom mediju. II Hrvatski veterinarski kongres, Cavtat, Hrvatska, 2000., pp. 273-281.
57. MATKOVIĆ, M., J. ŠURINA, J. PETRIĆ, M. LOJKIĆ, I. GETZ, Z MAKEK (2002): Comparison of some simmental sires for IVF: preliminary results. Theriogenology 51, 677.
58. MEJIA, M. E., I. M. LACAU-MENGIDO (2005): Endometritis treatment with a $PGF_2\alpha$ analog does not improve reproductive performance in a large dairy herd in Argentina. Theriogenology 63, 1266-1276.
59. NOAKES, D. E. (1997): Normal non-pregnant animal. U: Fertility and obstetrics in cattle. 2nd ed. Blackwell Science Ltd. pp. 3-16.
60. NOAKES, D. E. (2001): Normal oeswtrus cycles: Endogenus and exogenus control of ovarian cycliti. U: Arthur's Veterinary Reproduction & Obstetrics 8th ed. W.B. Saunders Company Ltd. pp. 3-53.
61. NOWICKI, A., W. BARAŃSKI, A. BARYCZKA, T. JANOWSKI (2017): OvSynch Protocol and its Modifications in the Reproduction Managment of Dairy Cattle Herds. J. Vet. Res. 61, 329-336.

62. ONGARATTO F. L., P. RODRIGUEZ-VILLAMIL, A. TRIBULO, G. A. BÓ (2015): Effect of follicle wave synchronization and gonadotropin treatments on the number and quality of cumulus-oocyte complex obtained by ultrasound-guided ovum pick-up in beef cattle. Anim. Reprod. 12, 876-883.
63. PARIKH, S. S., F. S. KAVANI, R. J. RAVAL, K. B. VALA, R. B. MAKWANA (2019): Identifying early conception using ultrasound in OvSynch treated postpartum anestrus gir cows. Ind. J. Of Vet. Sci. And Biotech. 14, 25-28.
64. PARRISH, J. J., A. KROGENAES, J. L. SUSKO-PARRISH (1995): Effect of bovine sperm separation by either swim-up or Percoll method on succes of *in vitro* fertilization and early embryonic development. Theriogenology 44, 859-869.
65. PFEIFER, L. F. M., R. SARTORI, I. PIVATO, R. RUMPF, G. P. NOGUEIRA, E. G. XAVIER, N. J. L. DIONELLO, M. N. CORREA (2009): Effect of circulating progesterone on *in vitro* developmental competence of bovine oocytes. Anim. Reprod. 6, 473-480.
66. PIETERSE, M. C., K. A. KAPPEN, T. A. M. KRUIP, M. A. M. TAVERNE (1988): Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning of the ovaries. Theriogenology 30, 751-762.
67. PIETERSE, M., P. VOS, T. A. KRUIP, Y. WURTH, T. H. VAN BENEDEN, A. WILLEMSE, M. TAVERNE (1992): Repeated transvaginal ultrasound-guided ovum pick-up in PMSG-treated cows. Theriogenology 37, 273.
68. PURSLEY, J. R., M. O. MEE, M. C. WILTBANK (1995): Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF2alpha and GnRH. Theriogenology 44, 915-923.
69. PURSLEY, J. R., R. W. SILCOX, M. C. WILTBANK (1998): Effect of time of artificial insemination on pregnancy rates, calving rates, pregnancy loss, and gender rations after synchronization of ovulation in lactating dairy cows. J. Dairy Sci. 81, 2139-2144.
70. REIS, P., M. STAINES, R. WATT, D. DOLMAN, T. MCEVORY (2001): Embryo production using defined oocyte maturation and zygote culture media following repeated ovum pick-up (OPU) from FSH-stimulated Simmental heifers. Anim. Reprod. Sci. 72, 137–151.
71. REMNANT, G. J., M. J. GREEN, J. N. HUXLEY, C. D. HUDSON (2015): Variation in the interservice intervals of dairy cows in the Unioted Kingdon. J. Dairy Sci. 98, 889-897.

72. RHODES, F. M., A. J. PETERSON, P. D. JOLLY, W. H. MCMILLAN, M. DONISON, A. LEDGRADE, G. PARTON, D. R. HALL (1997): Bovine ovarian and oocyte characteristics after emergence of the first follicular wave. Theriogenology 47, 149.
73. ROTH, Z., A. ARAV, A. BOR, Y. ZERON, R. BRAW-TAL, D. WOLFENSON (2001): Improvement of quality of oocytes collected in the autumn by enhanced removal of impaired follicles from previously heat-stressed cows. Reproduction 122, 737-744.
74. SAMARDŽIJA, M. (2003): Priprema bičje sperme u postupcima oplodnje *in vitro*. Znanstveni magistarski rad. Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.
75. SARTORI, R., J. M. HAUGJIAN, R. D. SHAVER, G. J. M. ROSA, M. C. WILTBANK (2004): Comparison of ovarium function and circulating steroids in estrus cycles of Holstein heifers and lactating cows. J. Dairy Sci. 87, 905-920.
76. SENDAG, S., Y. CETIN, M. ALAN, K. HADELER, H. NIEMANN (2008): Effects of eCG and FSH on ovarian response, recovery rate and number and quality of oocytes obtained by ovum pick-up in Holstein cows. Anim. Reprod. Sci. 106, 208–214.
77. SENEDA, M. M., C. R. ESPER, J. M. GARCIA, J. A. DE OLIVEIRA, R. VANTINI (2001): Relationship between follicle size and ultrasound guided transvaginal oocyte recovery. Anim. Reprod. Sci. 67, 37-43.
78. SHAMSUDDIN, M., B. LARSSON, H. RODRIGUEZ-MARTINEZ (1993): Maturation-related changes in bovine oocytes under different culture conditions. Anim. Reprod. Sci. 31, 49-60.
79. SOUZA, A. H., H. AYRES, R. M. FERREIRA, M. C. WILTBANK (2008): A new presynchronization system (Double-Ovsynch) increases fertility at first postpartum timed AI in lactating dairy cows. Theriogenology 70, 208–215.
80. STUBBINGS, R. B., R. M. LIPTRAP, K. J. BETTERIDGE, J. S. WALTON, D. T. ARMSTRONG, P. K. BASRUR (1990): Requirements for Bovine Oocyte Maturation *in vitro*. Reprod. Dom. Anim. 25, 158-166.
81. SUGIMURA, S, T. AKAI, Y. HASHIYADA, T. SOMFAI, Y. INABA, M. HIRAYAMA, T.YAMANOUCHI, H., S. MATSUDA, S. KOBAYASHI, Y. AIKAWA, M. OHTAKE, E. KOBAYASHI, K. KONISHI, K. IMAI (2012): Promising system for selecting healthy *in vitro*-fertilized embryos in cattle. PLoS One 7, 36627.
82. ŠTIBRIĆ, G. (2017): Učinkovitost različitih sinkronizacijskih protokola s obzirom na faze spolnog ciklusa u mliječnih krava. Doktorski rad. Veterionarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, Hrvatska.

83. THATCHER, W. W., F. MOREIRA, J. SANTOS, R. C. MATTOS, F. L. LOPES, S. M. PANCARCIL, C. A. RISCO (2001): Effects of hormonal treatments on reproductive performance and embryo production. Theriogenology 55, 75-89.
84. TOMAŠKOVIĆ, A., Z. MAKEK, T. DOBRANIĆ, M. SAMARDŽIJA (2007): Rasplođivanje krava i junica. Veterinarski fakultet, Zagreb.
85. VAN SOOM, A., G. VANROOSE, A. DE KRUIF (2001): Blastocyst evaluation by means of differential staining: a practical approach. Reprod. Dom. Anim. 36, 29-35.
86. VAN WAGTENDONK-DE LEEUW, A. M. (2006): Ovum pick up and *in vitro* production in the bovine after use in several generations: a 2005 status. Theriogenology 65, 914-925.
87. VIEIRA, L. M., C. A. RODRIGUES, A. CASTRO NETTO, B. M. GUERREIRO, C. R. A. SILVEIRA, R. J. C. MOREIRA, M. F. SÁ FILHO, G. A. BÓ, R. J. MAPLETOFT, P. S. BARUSELLI (2014): Superstimulation prior to the ovum pick-up to improve *in vitro* embryo production in lactating and non-lactating Holstein cows. Theriogenology 82, 318-324.
88. WOLFENSON, D., G. INBAR, Z. ROTH, M. KAIM, A. BLOCH, R. BRAW-TAL (2004): Follicular dynamics and concentrations of steroids and gonadotropin in lactating cows and nulliphars heifers. Theriogenology 62, 1042-1055.
89. WRIGHT, J. M. (1998): Photographic illustrations of embryo developmental stage and quality codes. U: Manual of the International Embryo Transfer Society, 3rd ed. (Stringfellow, D. A. and S. M. Siedel , eds.). IETS, Savoy, Illinois. p.p.167-170.
90. YÁNIZ, J. L., K. MURUGAVEL, F. LÓPEZ-GATIUS (2004): Recent developments inoestrus synchronization of postpartum dairy cows with and without ovarian disordes. Reprod. Dom. Anim. 39, 86-93.

11. ŽIVOTOPIS

Rođen sam u Požegi 06.08.1994. godine. Nakon završetka osnovne škole Vilim Korajac u Kaptolu, upisujem Gimnaziju u Požegi, opći smjer koju završavam 2013. godine. Iste godine upisao sam Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Apsolvirao sam 2019. godine. Od početka studija do daanas volontiram u Veterinarskoj ambulanti Simentalac u Kutjevu.