

# Primjena asistirane reprodukcije u govedarstvu



Martina Lojkić\*, Iva Getz, N. Karajić, M. Samardžija, N. Maćešić,  
T. Karadžole, Nikica Prvanović Babić, G. Bačić, D. Želježić i V. Magaš

## Uvod

Asistirana reprodukcija podrazumijeva zahvate kojima u kontroliranim uvjetima rasplodujemo životinje i utječemo na genetsku selekciju širenjem poželjne genetike prema željenim proizvodnim svojstvima.

Pod asistiranom reprodukcijom najčešće podrazumijevamo postupke vezane uz manipulaciju gametama ili zametcima (Mapletoft i Hasler, 2005.). Općenito gledajući, asistirana se reprodukcija može definirati kao bilo koji postupak koji utječe na normalne biološke događaje vezane uz rasplodivanje, poput ovulacije, oplodnje i ranog embrionalnog razvoja, a u svrhu postizanja gravidnosti i proizvodnje zdravog potomstva (Velazquez, 2008.).

Sinkronizacija i indukcija estrusa, umjetno osjemenjivanje (UO), multipla ovulacija i embriotransfer (MOET) te *in vitro* proizvodnja zametaka (IVP) 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. Poznavanje

ovih tehnologija omogućuje razvoj i primjenu naprednijih biotehnologija poput kloniranja s transferom jezgre (NT) i proizvodnje genetski modificiranih životinja.

Životinja u postupcima asistirane reprodukcije pod strogom su sanitarnom kontrolom pa je mogućnost prijenosa zaraznih bolesti svedena na najmanju moguću mjeru. Primjena ovih biotehnologija olakšava međunarodni transport i trgovinu genetskim materijalom čime su smanjeni troškovi i rizik od prenošenja zaraznih bolesti, jer više nije potreban transport živih životinja.

Postupci asistirane reprodukcije poput embriotransfera (ET) i IVP zametka zajedno s krioprezervacijom, od izuzetne su važnosti u očuvanju izvornih i ugroženih pasmina goveda. Njihova primjena nezaobilazna je u programima uspostave banke gena koji pomažu u očuvanju farmskih genetskih resursa. Biotehnološki postupci mogu poslužiti i za rekonstrukciju pasmine/linije u slučajevima nestanka ili ugroženosti od bolesti ili prirodnih katastrofa.

Dr. sc. Martina LOJKIĆ\*, dr. med. vet., izvanredna profesorica, (dopisni autor, e-mail: mlojkic@vef.hr), dr. sc. Iva GETZ, dr. med. vet., izvanredna profesorica, dr. sc. Marko SAMARDŽIJA, dr. med. vet., redoviti profesor, dr. sc. Nino MAĆEŠIĆ, dr. med. vet., izvanredni profesor, dr. sc. Tugomir KARADJOLE, dr. med. vet., redoviti profesor, dr. sc. Goran BAČIĆ, dr. med. vet., redoviti profesor, Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Hrvatska; Natko KARAJIĆ, dr. med. vet., Zagreb, Hrvatska; Darko ŽELJEŽIĆ, dr. med. vet., viši stručni suradnik, Hrvatski veterinarski institut, Zagreb, Hrvatska; dr. sc. Vladimir MAGAŠ, dr. med. vet., docent, Veterinarski fakultet Univerziteta u Beogradu, Srbija

## Pregled biotehnologija

### Manipulacija jajničke aktivnosti

Jajnička se aktivnost može kontrolirati mehaničkim (ablacija dominantnog folikula pod kontrolom ultrazvuka) ili hormonalnim postupcima (Bo i sur., 2003.). Ovi se postupci koriste u liječenju postpartalne aciklije, preganjanja i cista na jajnicima (Rhodes i sur., 2003.) te za sinkronizaciju ciklusa. Kontrola estrusa uvedena je kako bi se olakšalo otkrivanje estrusa i postiglo UO u točno određeno vrijeme. Sinkronizacijom estrusa izbjegavaju se problemi oko otkrivanja estrusa čime se povećava postotak koncepcije. Osim toga, sinkronizacija je neizostavan dio u primjeni ET u domaćih životinja. Kako bi umjetno kontrolirali estrus, krave moraju dosegnuti pubertet i imati normalnu cikličku aktivnost (Noakes, 1997.). Metode sinkronizacije temelje se na dva osnovna principa: produživanju lutealne faze primjenom progestagena i skraćanju lutealne faze regresijom žutog tijela nakon aplikacije prostaglandina  $F_{2\alpha}$  ( $PGF_{2\alpha}$ ) (Gordon, 1996.).

Sinkronizacijski protokoli uključuju uporabu gonadotropnog releasing hormona (GnRH), progestagena (PRID (Engl. *Progesteron releasing intraovaginal device*) i CIDR (Engl. *Controlled internal drug release device*), prostaglandina  $F_{2\alpha}$ , gonadotropina (humani korionski gonadotropin (hCG), konjski korionski gonadotropin (eCG), estrogena (estradiol benzoat, estradiol cypionat) te čimbenika rasta (goveđi somatotropin, inzulin). Hormonalni se pripravci koriste zasebno ili u kombinaciji, ovisno o proizvodnim sistemima i troškovima.

Jedan od najučinkovitijih protokola sinkronizacije s gravidnošću od 50-75% je Ovsynch protokol (Thatcher i sur., 2004., 2006.), zajedno s brojnim modifikacijama, koji omogućuje UO u točno određeno vrijeme, bez prethodnog otkrivanja

estrusa. Ova metoda uključuje primjenu GnRH i  $PGF_{2\alpha}$ .

Jedan od najjednostavnijih protokola sinkronizacije ciklusa je uporaba  $PGF_{2\alpha}$ . Aplikacijom prostaglandina ili njegovih analoga izaziva se regresija žutog tijela, čime se upravlja cikličkom aktivnošću jedinke (Noakes, 2001.). Period od primjene  $PGF_{2\alpha}$  do pojave estrusa i ovulacije ovisi o stadiju razvoja dominantnog folikula u trenutku primjene  $PGF_{2\alpha}$ . Prostaglandini se koriste za sinkronizaciju estrusa skupine krava ili junica za pripremu UO-a; za pripremu davateljica i primateljica u postupku ET; za regulaciju spolnog ciklusa i prilikom problema s otkrivanjem estrusa (tiho gonjenje).

Primjena progestagena ili egzogenog progesterona temelji se na spoznaji da progestagen djeluje na isti način kao žuto tijelo. Apliciran u organizam goveda progestagen će blokirati oslobađanje gonadotropina preko 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.). Progestageni se mogu koristiti i kod krava koje nisu u ciklusu jer senzibiliziraju hipotalamusno-hipofizarno-jajničku vezu.

Primjena gonadotropnog releasing hormona ili njihovih agonista izaziva porast koncentracije folikulostimulirajućeg (FSH) i luteinizirajućeg hormona (LH). LH će izazvati ovulaciju ili luteinizaciju većih folikula prisutnih u vrijeme tretmana, što će omogućiti endogeni porast FSH te dovesti do stvaranja novog folikularnog vala (Thatcher i sur., 2001.).

Primjena progesterona u kombinaciji s GnRH i  $PGF_{2\alpha}$  pospješuje pojavu estrusa i koncepciju (Xu i Burton, 2000.). GnRH potiče folikulogenezu kako bi u trenutku aplikacije  $PGF_{2\alpha}$  na jajniku bio prisutan dominantni folikul. Ovulacija je moguća nakon prestanka djelovanja negativne povratne sprege progesterona uklaňanjem CIDR umetka (Noakes, 2001.).

Kako bi se postigla optimalna kontrola ciklusa potrebno je poznavati fiziologiju hormonalne regulacije jajničke aktivnosti i interakciju između majke i zametka u svrhu poboljšanja reproduktivne učinkovitosti. Sinkronizacijski postupak može povećati pojavnost abnormalnog estrusa i rane embrionalne smrtnosti (MacMillan i sur., 2003.). Odgovor na sinkronizacijski protokol ovisan je o folikularnom statusu u vrijeme započinjanja postupka, starosti i kondiciji krave, vremenskom odmaku od zadnjeg teljenja i dr. (Rhodes i sur., 2003.).

### Umjetno osjemenjivanje

Umjetno osjemenjivanje najstarija je i najprimjenjivija reproduktivna biotehnologija u stočarstvu i glavni uzrok genetskog napretka u posljednjih nekoliko desetljeća. UO ima važnu ulogu u kontroli spolno prenosivih bolesti te omogućuje jednostavni prijenos i trgovinu genetskim materijalom.

Zajedno s krioprezervacijom sjemena, UO omogućuje maksimalno iskorištavanje reproduktivnog potencijala genetski vrijednih rasplodnjaka na način da jedan bik može proizvesti i do 50 000 teladi godišnje. UO je neizostavan dio u programima ET (Funk, 2006.).

Procjenjuje se da je porast mliječnosti zabilježen u drugoj polovici 20. stoljeća u najvećoj mjeri prouzročen velikim genetskim napretkom upravo zbog uporabe UO (Gordon, 1994.).

Prilikom UO krave se osjemenjuju polaganjem sjemena u tijelo maternice što rezultira gravidnošću od 55-60% (Verberckmoes i sur., 2004.). Vaginalno i plitko cervikalano osjemenjivanje treba izbjegavati jer su rezultati osjemenjivanja vrlo loši (Tomašković i sur., 2007.), dok je osjemenjivanje u rog maternice rizično zbog mogućnosti ozljede endometrija (Parkinson, 2001.). Kada koristimo vrijedno sjeme poput seksiranog, preporuča se intrakornualno UO u svrhu poboljšanja reproduktivne učinkovitosti (Hunter, 2003.).

Iako varijabilna plodnost između bikova bitno utječe na ovu biotehnologiju, otkrivanje estrusa predstavlja ključni čimbenik koji utječe na uspješnost UO, a time i optimalno rasplodivanje. Netočno otkrivanje estrusa vodi nepravovremenom UO, smanjenom postotku gravidnosti i produljenom međutelidbenom razdoblju. UO je potaknulo veću primjenu sinkronizacijskih programa koji ne zahtijevaju otkrivanje estrusa, čime je postalo još učinkovitije.

### Embriotransfer

Embriotransfer (MOET = multipla ovulacija i embriotransfer) metoda je asistirane reprodukcije koja se već desetljećima sustavno koristi kod goveda, malih preživača, konja te divljači za genetsko poboljšanje stada i dobivanje velikog broja potomaka od najkvalitetnijih ženskih životinja (Merton i sur., 2003.).

ET je biotehnoški postupak kojim se kravama u ranoj gravidnosti ispiru zametci iz maternice koji se zatim premještaju u maternicu sinkronizirane primateljice kako bi se nastavio unutar maternični razvoj te se na poslijetku rodila normalna i za život sposobna mladunčad.

Primjena ET u rasplodivanju goveda omogućuje brži genetski napredak stada uz znatno skraćenje generacijskog intervala uporabom rasplodnog potencijala elitnih plotkinja (Gordon, 1996.). Postupak progenog testiranja bikova ubrzan je, inducira se rađanje blizanaca, sprječava se prijenos zaraznih bolesti te postoji mogućnost da i slabo plodne i neplodne životinje mogu imati potomstvo (Getz i sur., 2001.). Osim toga, ET omogućuje lakši međunarodni transport i trgovinu duboko smrznutim zametcima čime se smanjuju troškovi i pomaže aklimatizacija živih životinja. Zametci su jeftiniji za transport od odraslih životinja, a manji je i rizik od prijenosa zaraznih bolesti. Presađeni u

domaće primateljice, ET zametci imaju prednosti nad odraslim životinjama, jer primaju pasivni imunitet preko kolostruma, a imaju fiziološku i prirodnu adaptaciju u novoj sredini. Nadalje, ET je od iznimne važnosti za očuvanje autohtonih i ugroženih pasmina te primjenu drugih metoda asistirane reprodukcije kao što su dijeljenje zametaka (Engl. embryo splitting) u svrhu dobivanja blizanaca te određivanje spola zametaka (Engl. *embryo sexing*) (Gordon, 1996.).

Varijacije u broju dobivenih zametaka, neodgovarajući superovulacijski odgovor te poremećeni transport spermija nakon superovulacije uz nisku stopu gravidnosti (Peterson i Lee, 2003.) predstavljaju glavne ograničavajuće čimbenike koji utječu na uspješnost MOET programa. ET se dobiva prosječno 5 do 8 zametaka od krava i 1 do 3 zametka u junica, a postupak se kod iste davateljice može ponoviti 3 do 4 puta godišnje. Oko 20% davateljica ne reagira na superovulacijske programe i ne proizvede niti jedan zametak. Postotak gravidnosti u primateljica iznosi 50-60% (Makek i sur., 1997.), s najvećim uspjehom nakon transfera svježih zametaka, dok su junice najbolje primateljice (Thibier, 2005.). Na uspješnost MOET programa utječe i odabir zametaka za transfer. Morfološka ocjena zametaka najčešća je korištena metoda prilikom procjene kvalitete uzgojenog zametka, zbog jednostavnosti izvedbe i neinvazivnosti (Lojkić i sur., 2014.). Glavni nedostatak ove ocjene je njezina subjektivnost (Aguilar i

sur., 2002.) pa velik broj zametaka klasificiranih kao dobri u terenskim uvjetima, pokazuju znakove degeneracije kada se gledaju pod svjetlosnim ili elektronskim mikroskopom. S obzirom da je kvaliteta zametka jedan od ključnih čimbenika koji utječe na uspjeh ove tehnologije, potrebno je razviti objektivne metode koje su primjenjive u terenskim uvjetima (Velazquez, 2008.).

ET zahtijeva sinkronizaciju davateljice i primateljice kako bi se osigurao rani embrionalni razvoj u smislu elongacije zametka i majčino prepoznavanje gravidnosti od strane primateljice.

Postupak ET obuhvaća odabir krava davateljica na osnovu uzgojnih i reprodukcijskih vrijednosti, superovulaciju davateljica u svrhu oslobađanja većeg broja jajnih stanica u jajovod nakon ovulacije, UO i ispiranje maternice 6. do 8. dana ciklusa (Makek i sur., 1996.). Izolirani zametci klasificiraju se i ocjenjuju na osnovu razvojnog stadija i kvalitete (Wright, 1998.). Prema kvaliteti, zametci se svrstavaju u one prve, druge i treće klase, neoplođene jajne stanice i degenerirane zigote i zametke. Goveđi zametci klase I. i II. u stadiju razvoja od kasne morule do blastociste daju najviši postotak koncepcije nakon ET. U tabeli 1. prikazan je postotak gravidnosti nakon transfera zametaka različite kvalitete. Transfer zametaka u primateljice provodi se tehnikom beskrvnog transfera između 6. i 8. dana ciklusa primateljice. Zametci se polažu u prednju trećinu ipsilateralnog roga maternice.

**Tabela 1.** Postotak gravidnosti nakon transfera zametaka različite kvalitete [Siedel i Siedel, 1991.].

Kvaliteta	Zametci		% gravidnosti
	Broj	%	
Izvrсна	275	54	63
Dobra	152	30	58
Srednja	42	8	31
Loša	42	8	12

### Proizvodnja zametaka *in vitro*

Žensko tele rađa se sa zalihom od približno 150 000 jajnih stanica u jajniku. Uzevši u obzir da je prosječni životni vijek krave 8 godina te da ima 17 ciklusa godišnje, dolazimo do izračuna da krava ima potencijal ovulirati 136 jajnih stanica tijekom života. Ostale jajne stanice propadaju s atrezijom folikula. IVP govedih zametaka omogućuje iskorištavanje jajnih stanica koje bi u fiziološkim uvjetima propale, kako bi se smanjio gubitak vrijednog genetskog materijala. U veterinarskoj medicini ova se tehnologija počela primjenjivati krajem osamdesetih godina 20. stoljeća rođenjem Virgila, prvog teleta oteľjenog nakon oplodnje *in vitro* (Brackett i sur., 1982.). Danas se ova tehnologija rutinski koristi u znanstvene i komercijalne svrhe te u svrhu očuvanja genetskog materijala u sklopu banke gena. Unatoč visokim troškovima, u državama poput Italije i Japana, zabilježena je komercijalna IVP teladi za tov (Galli i Lazzari, 2003., Hamano i sur., 2006.).

IVP se sastoji od tri koraka: dozrijevanja (IVM) i oplodnje (IVF) jajnih stanica *in vitro* te uzgoja (IVC) oplođenih jajnih stanica do stadija morule/blastociste. U ovom stadiju zametci se mogu presaditi u primateljice ili smrznuti.

IVP omogućuje dobivanje zametaka od plotkinja visoke genetske vrijednosti koje ne mogu dati potomstvo prirodnim putem. Može se primijeniti u reproduktivno zdravih krava i junica, a isto tako i u krava s neodgovarajućim superovulacijskim odgovorom i krava koje zbog različitih abnormalnosti spolnih organa ne mogu razviti zametak. Isto tako, omogućuje dobivanje potomstva od visoko vrijednih plotkinja u agoniji ili neposredno nakon uginuća ili klanja, gravidnih životinja tijekom prva tri mjeseca gravidnosti, plotkinja u puerperiju i ženske teladi (Imai i sur.,

2006.). Iako moguća, IVP u juvenilnih životinja nije naišla na širu primjenu zbog manjeg broja proizvedenih zametaka u odnosu na odrasle životinje i invazivnosti postupka. Iako korištenje juvenilnih životinja može skratiti generacijski interval, mogu se javiti problemi u selekciji zbog nedostatnih informacija o proizvodnim rezultatima roditelja (van Arendonk i Bijma, 2003.).

Razvoj ove tehnologije, osim ubrzanog genetskog napretka, omogućuje i razvoj drugih biotehnologija kao što su određivanje spola zametaka lančanom reakcijom polimerazom (PCR= Polymerase Chain Reaction) te kloniranje i proizvodnja genetski modificiranih životinja (Hoshi, 2003.).

Jajne stanice za IVM se mogu dobiti od živih životinja postupkom transvaginalne punkcije folikula (Ovum pick-up (OPU)) te usisavanjem jajnih stanica iz folikula jajnika sakupljenih na klaonici neposredno nakon klanja krava i junica (Galli i Lazzari, 2003., Karadjole i sur., 2010.). Primjenom OPU tehnike u zdravih davateljica tijekom 6 mjeseci može se dobiti i do 50 zametaka, odnosno 3 do 4 puta više nego klasičnim ET (Bols i sur., 1995.). OPU se može ponavljati 2 puta tjedno, a izvodi se u hormonalno stimuliranih i nestimuliranih davateljica (Getz, 2004.). Stimulacijski protokoli koji se koriste za krave u OPU/IVF programima razlikuju se od onih za proizvodnju zametaka *in vivo*. Svrha superovulacijskih protokola u MOET programima je povećati broj ovulacija bez štetnog utjecaja na kvalitetu zametaka. Svrha stimulacijskih protokola prije OPU je povećati broj folikula pogodnih za punkciju (van Wagtenonk-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.). Utvrđen je pasminski utjecaj na superovulacijski odgovor i

učinkovitost OPU/IVP programa (Getz i sur., 2008., Karadjole i sur., 2008., Lojkić i sur., 2013.).

Uz IVP vežu se abnormalnosti u embrionalnom, fetalnom i postnatalnom (sindrom velikog teleta) razvoju (McEvoy, 2003.). One su povezane s poremećenom ekspresijom gena važnih za razvoj zametka (Lonerger i sur., 2003.). Zbog neoptimalnih uvjeta uzgoja i dodatka makromolekula, hormona i čimbenika rasta zametci proizvedeni *in vitro* imaju manji broj stanica i veći indeks apoptoze u odnosu na zametke proizvedene *in vivo* (Koo i sur., 2002.). Dodatak seruma u medije ubrzava razvojnu kinetiku zametka, povećava broj blastocista i izlazak iz zone pelucide (Holm i sur., 2002.). Ubrzani razvoj povezuje se i s negativnim posljedicama poput nepravilne kompakcije morule, preuranjene blastulacije i poremećene genske ekspresije (Rizos i sur., 2003.). Nakon transfera IVP zametaka učestalija je pojava embrionalne smrtnosti, a osim toga svaka dodatna mikromanipulacija zametcima uzgojenim *in vitro* umanjuje njihovo preživljavanje, što je glavna zapreka njihovom učinkovitijem korištenju. Ipak, zadnjih je godina postignut znatan napredak u uvjetima uzgoja *in vitro*, što se očituje rastom broja gravidnosti nakon transfera u odgovarajuće primateljice.

### Duboko smrzavanje zametaka goveda

Duboko smrzavanje zametaka omogućuje dugotrajnu pohranu vrijednog genetskog materijala, transport i učinkovitije iskorištavanje biotehnoloških postupaka poput ET ili IVP. Za duboko smrzavanje odabiru se zametci dobre kvalitete i smrzavaju se neposredno nakon ispiranja davateljice. Postotak gravidnosti neznatno je manji u odnosu na svježje zametke (Leibo i Mapletoft, 1998.). Kako bi se izbjegla oštećenja, zametci se hlade optimalnom brzinom hlađenja (0,5 °C po minuti),

uz dodavanje krioprotektora koji osiguravaju preživljavanje zametaka nakon smrzavanja. Uporabom visoko permeabilnih krioprotektora poput etilen glikola, omogućuje se izravan transfer zametaka u primateljice, bez prethodnog uklanjanja krioprotektora i uporabe mikroskopa (Voelkel i Hu, 1992.). Ovom se metodom sadržaj pajete nakon otapanja u vodenoj kupelji izravno polaže u maternicu krave. Krioprotektor napušta zametak u maternici, bez osmotskog stresa. Postotak gravidnosti jednak je kao i kod uporabe glicerola (Leibo i Mapletoft, 1998.). Kako je smrzavanje zametaka proces koji zahtijeva skupu laboratorijsku opermu i vremenski je zahtjevno, očekuje se da će postupak vitrifikacije ubrzo nadomjestiti klasično smrzavanje zametaka. Ovim izrazito brzim postupkom smrzavanja zametak se kratko izlaže vrlo visokim dozama krioprotektora, nakon čega se izravno uranja u tekući dušik. Na taj se način izbjegava formiranje kristala leda koji prouzroče najveća oštećenja tijekom smrzavanja (Grizelj, 2006.).

Zametci uzgojeni *in vitro* manje su vitalni od *in vivo* uzgojenih zametaka, a njihovo smrzavanje često je manje uspješno. Mediji za uzgoj zametaka *in vitro* ne utječu samo na njihov razvoj, nego imaju značajan utjecaj na njihovo preživljavanje nakon smrzavanja. Primjerice, dodatak seruma u medij za IVC prouzroči nakupljanje lipida u stanicama trofoblasta (Ferguson i Leese, 1999.). *In vitro* uzgojeni zametci imaju promijenjeni lipidni metabolizam (Abd El Razek i sur., 2000.), što je uzrok je povećanoj osjetljivosti zametka na djelovanje slobodnih kisikovih radikala nakon smrzavanja i odmrzavanja. Smanjeno preživljavanje nakon smrzavanja posljedica je i morfoloških oštećenja poput nepotpune kompakcije, nepotpunih međustaničnih veza, abnormalnosti mitohondrija i fragmentacije koje su češće u IVP

zametak. I razvojni stadij zametaka utječe na posljedice dubokog smržavanja pa zametci kasnijeg razvojnog stadija imaju veću toleranciju na smržavanje od zametaka u ranijem razvojnem stadiju (Dinnyes i sur., 1999.). Iako se uspjeh smržavanja zametka može povećati ovisno o metodi krioprezervacije, kvaliteta *in vitro* uzgojenog zametka ostaje glavni čimbenik koji utječe na njegovu kriotoleranciju.

### Kontrola zaraznih bolesti

Proizvodnja velikog broja ET i IVP zametaka i mogućnosti međunarodne trgovine, postavila je pitanje regulacije zakonskih normi. Zdravstveni je savjetodavni odbor za sigurnost (HASAC), unutar Međunarodnog društva za embriotransfer (IETS) odigrao važnu ulogu u prikupljanju i širenju znanstvenih informacija o prijenosu zaraznih bolesti ET (Thibier, 1998.). Međunarodno društvo za ET donijelo je propise vezane uz sanitarnu kontrolu proizvodnje zametaka da bi se smanjio rizik mogućeg prijenosa zaraznih bolesti (Thibier, 1998.). Brojna istraživanja pokazala su da se goveđim zametcima ako se poštuju propisi vezani uz sanitarnu kontrolu ne prenose zarazne bolesti. Prema riziku prijenosa, patogeni su svrstani u nekoliko kategorija (Stringfellow i sur., 2004.).

Kategorija 1 obuhvaća bolesti ili uzročnike bolesti za koje postoji dostatno dokaza da je rizik od prijenosa zanemariv, pod uvjetom da se s goveđim zametkom prilikom prikupljanja i prijenosa pravilno rukovalo. Pravilno rukovanje uključuje mikroskopski pregled zone pelucide, ispiranje zametka i prema potrebi ispiranje u tripsinu.

Uzročnici koji spadaju u kategoriju 1 su: enzooska leukoza goveda, slinavka i šap, bolest plavog jezika, *Brucella abortus*, virus zaraznog goveđeg rinotraheitisa, bolest Aujetzkog i goveđa spongiformna encefalopatija.

Kategorija 2, 3 i 4 su bolesti o kojima je provedeno manje istraživanja o mogućnostima prijenosa i potrebna su daljnja *in vivo* i *in vitro* istraživanja (npr. goveđa virusna diareja). Zanemarivi rizik od prijenosa zaraznih bolesti putem ET omogućuje očuvanje vrijedne genetike u slučaju izbivanja epidemija (Wrathall i sur., 2004.) i omogućuje uzgoj stada slobodnog od zaraznih bolesti.

### Međunarodni promet zametcima

Primjena spomenutih biotehnologija omogućuje međunarodni transport i trgovinu genetskim materijalom, čime se smanjuje rizik od prenošenja zaraznih bolesti i troškovi, jer više nije potreban transport živih životinja. Osim smanjenog rizika od prenošenja zaraznih bolesti, trgovina dubokog smržavanja zametcima omogućuje i smanjene troškove karantene, mogućnost odabira životinja iz šire genetske baze te bolju prilagodbu životinja na novu sredinu. Prilagodba je osobito važna u tropskom i subtropskom području gdje tele ima mogućnost prilagodbe unutar maternice te postnatalno sisanjem krave primateljice koja je udomaćena na tom području (Mapeltoft i Hasler, 2005.).

Propisi Međunarodnog društva za ET vezani uz sanitarnu kontrolu proizvodnje zametaka omogućuju siguran transport *in vivo* proizvedenih zametaka podrijetlom od davateljica seropozitivnih na neke patogene (Thibier, 1998.). Istraživanja vezana uz zametke *in vitro* pokazuju da je struktura zone pelucide koja je važna za obranu od pateogena različita od strukture zone pelucide zametaka proizvedenih *in vivo*. Time je rizik transporta IVP zametaka veći u smislu kontrole zaraznih bolesti pa se više pažnje treba posvetiti serološkim testiranjima davateljica jajnih stanica (Mapeltoft i Hasler, 2005.).

### Pregled ostalih biotehnologija

Učinkovita IVP preduvjet je za primjenu naprednijih biotehnologija poput klo-

niranja, transgeneze, određivanja spola potomstva i dr. Ove biotehnologije omogućuju izravno manipuliranje genomom životinja da proizvedu nešto poželjno ili da odstranimo nepoželjno. Primjenom različitih biotehnologija poput seksiranja, multiplikacija genoma zametka bližnjem ili transferom jezgre (kloniranje) može se postići još brzi genetski napredak prijenosom genoma iz nukleusnih stada u proizvodne jedinice.

### **Određivanje spola spermija i zametaka (seksiranje)**

Kontrola spola mladunčadi izuzetno je važna u govedarskoj proizvodnji. U prirodnoj reprodukciji omjer spolova je otprilike 50:50. Mesna industrija preferira mušku telad zbog boljih tovnih karakteristika i prirasta, dok u mliječnom govedarstvu ženska telad predstavlja najpoželjniju i najprofitabilniju jedinku. Iz tog razloga razvijene su metode kojima možemo kontrolirati spol buduće jedinke, a osnivaju se na određivanju spola spermija ili zametka.

Spermij koji nosi X kromosom u goveda sadrži 3,8% više DNK od spermija s Y kromosomom. Na osnovu ove činjenice spermiji se mogu odvojiti citometrijskom analizom DNK u glavi spermija. Protočnom citometrijom omogućeno je odvajanje X- spermija i Y- spermija s točnošću od 90% i više (Garner i Seidel, 2008.). Nedostatak ove tehnologije je sporost (u jednom satu se može odvojiti 10 milijuna spermija svakog spola, što odgovara jednoj dozi za UO), lošija plodnost i slabije preživljavanje nakon dubokog smržavanja, uglavnom radi oštećenja spermija te kratak životni vijek seksiranog sjemena u genitalnom traktu (Amann, 1994.). Jedan od ograničavajućih čimbenika koji utječe na širu primjenu je cijena seksiranog sjemena koja je znatno viša u odnosu na cijenu komercijalnog sjemena (Seidel, 2009.).

Druga mogućnost je određivanja spola zametka lančanom reakcijom

polimerazom. Ovom se tehnikom ispituje specifična DNK Y kromosoma koja se umnožava pomoću PCR. Uspjeh gravidnosti koristeći seksirane *in vivo* proizvedene zametke ne razlikuje se od uspjeha gravidnosti u klasičnim MOET programima. Za razliku od njih, IVP seksirani zametci rezultiraju manjim postotkom gravidnosti nakon transfera u primateljice (Lopes i sur., 2001.). Seksiranje zametka predstavlja najprecizniju metodu određivanja spola, no invazivnost postupka biopsije te skupa tehnologija usporavaju širu primjenu.

### **Proizvodnja genetički istovjetnih životinja**

Proizvodnja genetički istovjetnih jedinki u govedarstvu može se postići razdvajanjem blastomera do 4- staničnog stadija razvoja zametka, bližnjem, odnosno cijepanjem (*splitting*) zametka u stadiju morule ili blastociste ili transferom jezgre (*nuclear transfer*) (Wells, 2003.).

### **Bliženje**

Klonirane ovce, koze i goveda dobivene su prije 30-ak godina tehnikom cijepanja zametaka. Naime, sposobnost skupine stanica odstranjenih iz zametka da nastave razvoj iskorišteno je za dobivanje genetski identičnih jedinki koje potječu iz istog zametka. Višestanični goveđi zamci cijepaju se s pomoću mikromanipulatora na dva ili na četiri dijela, a polovice ili četvrtine zametka mogu se prije transfera opet staviti u nadomjesne zone pelucide ili se transferiraju gole (Christie, 1996.). Uz uspjeh gravidnosti od 50%, ovom tehnologijom moguće je dobiti preko 100% teladi više nego samo MOET-om (Gray i sur., 1991.). To je izuzetno bitno kada se od visokovrijedne davateljice ispiranjem dobije samo 1 do 2 zametka (Seidel, 1984.).

Bliženje omogućava proizvodnju identičnih životinja te ima specifičnu primjenu samo za određene proizvodnje.



Uz druge manipulacije genomom (transgenezu) bližnjeje ima aplikaciju u farmaceutskoj industriji (Piedrahita, 2000.). U mliječnih krava mogu se proizvesti tovnj blizanci od jajnih stanica iz jajnika sakupljenih na klaonici i osjemenjenih *in vitro* s mesnatim bikom, čime se osigurava da ta telad ima barem 75% tovnje genetike, a proizvedeni su na najjeftiniji način (Matković i sur., 2000.).

### Kloniranje

Prema Velazquez (2008.) do 2007. godine u svijetu je registrirano oko 160 laboratorija u 37 zemalja od kojih se 75% bave kloniranjem domaćih životinja (govedo, svinja, ovca, bivol).

Kloniranje je tehnika nuklearne transplantacije koja uključuje fuziju stanica embrionalnog ili somatskog podrijetla s enukleiranim jajnom stanicom (iz koje je uklonjena jezgra s njezinim genetskim materijalom) te transfer blastomera i aktivaciju jajne stanice, predimplantacijski razvoj zametaka *in vitro* i embriotransfer u primateljice (Stice i sur., 1998.).

Kloniranje odrasle ovce (Wilmot i sur., 1997.) izazvalo je golemi interes i potaknulo mnoge rasprave o mogućnostima i opasnostima primjene ove moćne tehnologije. Slijedeći uspjeh klonirane Dolly, proizvedeni su i goveđi klonovi koristeći fetalne stanice fibroblasta, stanice jajovoda, granulosa stanice, stanice fibroblasta kože te stanice mišića (Hasler, 2003.).

Transfer jezgre somatskih stanica (SCNT) predstavlja vrijednu tehnologiju u smislu umnožavanja superiornog genotipa i proizvodnje identičnih transgenih jedinki. Moguće primjene uključuju kloniranje genetski vrijednih bikova kako bi se povećala dostupnost sjemena na tržištu, multipliciranje jedinki visokih proizvodnih rezultata nakon uginuća, smanjenje troškova progenog testiranja (Galli i sur., 2003.), očuvanje ugroženih pasmina goveda, osobito kada

nije dostupan mužjak (McEvoy, 2003.). SCNT može imati i veliku primjenu u istraživanjima epigenetskih modifikacija (Dindot i sur., 2004.), mehanizama diferencijacije i starenja (Tsunoda i Kato, 2000.) i ljudske neplodnosti (Zavos i Illmensee, 2006.).

Ipak, unatoč brojnim istraživanjima, uspješnost kloniranja vrlo je niska. Zajedno s IVF, SCNT je povezan s visokom embrionalnom i fetalnom smrtnošću, teškim teljenjima, velikom porođajnom masom i slabim postnatalnim preživljavanjem. Svega 5-15% kloniranih zametaka preživi do porođaja (Wells i sur., 2004.). Većina preostalih zametaka propadne u raznim stadijima razvoja zbog fetalnih i placentalnih abnormalnosti poznatih kao „sindrom kloniranja“ (Tsunoda i Kato, 2000.).

Osim učinkovitosti, za širu primjenu potrebno je i prihvaćanje ove tehnologije od strane javnosti. Prema istraživanjima, ne postoji razlika u kakvoći mesa i mlijeka između kloniranih i nekloniranih goveda (Yang i sur., 2007.). Američka Agencija za hranu i lijekove (FDA) proglasila je meso i mlijeko kloniranih životinja sigurnim za konzumaciju.

### Transgeneza

Transgeneza je postupak genetske modifikacije životinja. Razvoj rekombinantne DNK tehnologije omogućio je izolaciju i modifikaciju gena te unošenje novih gena u genom životinja. Strana DNK može se stabilno integrirati u genom sisavaca i dalje nasljeđivati prema Mendeljevim zakonima.

Prvo genetski modificirano govedo proizvedeno je 1989. godine (Roschlau i sur., 1989.). Oko 25 životinjskih vrsta danas je uključeno je u razvoj transgenskih linija za temeljna biomedicinska istraživanja i primjenu (Houdebine, 2005.). Genetski modificirane životinje nisu uključene u komercijalne programe rasplodivanja, no njihova uloga je znatna u farmaceutskoj industriji i medicini.

Transgenska tehnologija može se koristiti u proizvodnji proteina u mlijeku i serumu krava za terapijske svrhe u humanoj medicini (*biopharming*) (Keffer, 2004.). Proizvodnja je usmjerena i k uzgoju životinja s organima imunološki kompatibilnim za humanu transplantaciju (ksenotransplantacija). Transgenska tehnologija nailazi i na primjenu u poljoprivredi, proizvodnjom goveda koja su genetski modificirana za poboljšanje sastava mlijeka i otpornosti prema bolestima (Paape i sur., 2002.). Proizvedene su linije krava s visokim udjelom kazeina (Brophy i sur., 2003.) i otporne na mastitis prouzročen *S. aureus* (Wall i sur., 2005.).

S obzirom na visoku cijenu postupka i uzgoja genetski modificiranih životinja i činjenicu da su proizvodna svojstva životinja uglavnom regulirana ne jednim nego s više gena, vjerojatno je da će se ova tehnologija više koristiti u farmaceutskoj nego u govedarskoj industriji.

## Zaključna razmišljanja

Metode asistirane reprodukcije primjenjuju se u govedarstvu već desetljećima. Dok je UO godinama najisplativiji i najkorišteniji način širenja poželjnog genoma, druge tehnologije nailaze na primjenu s većim ili manjim uspjehom. Od tehnologija koje se temelje na transferu zametaka, MOET ima najširu primjenu. Unaprjeđenje ovih postupaka omogućuje i napredak u detekciji estrusa i sinkronizacijskim postupcima. IVP zametaka ima veliki potencijal u govedarstvu i, uz bolje uvjete uzgoja koji bi osigurali veću učinkovitost, mogao bi zamijeniti klasične programe MOET-a. Određivanje spola spermija i zametaka ima komercijalnu primjenu sa zadovoljavajućim rezultatima. Naprednije tehnologije poput transgeneze i kloniranja zbog visokih troškova i nezadovoljavajućeg uspjeha nisu naišle na širu primjenu iako je njihov

potencijal velik, posebice u farmaceutskoj industriji i konzervacijskoj biologiji.

## Sažetak

Više od pet desetljeća istraživanja re-produktivne biologije omogućilo je razvoj biotehnoloških postupaka koji povećavaju učinkovitost mesnog i mliječnog govedarstva. Ovi postupci omogućuju manipulaciju gametama i zametcima u svrhu poboljšanja plodnosti i genetskog napretka. Usvajanje i primjena postupaka asistirane reprodukcije u rasplodivanju krava ima dalekosežne posljedice u komercijalnom uzgoju stoke. Umjetno osjemenjivanje, embriotransfer i proizvodnja zametaka *in vitro* tehnologije su koje se sustavno primjenjuju u uzgojnim programima diljem svijeta omogućavajući brzi genetski napredak, skraćenje generacijskog intervala, kontrolu zaraznih bolesti i smanjenje proizvodnih troškova. Umjetno osjemenjivanje desetljećima je najisplativiji i najkorišteniji način širenja poželjnog genoma. Embriotransfer je tijekom posljednjih 30 godina postao međunarodno prihvaćena metoda rasplodivanja s preko 500 000 zametaka proizvedenih *in vivo* godišnje. Propisi Međunarodnog društva za embriotransfer vezani uz sanitarnu kontrolu proizvodnje zametaka omogućuju siguran transport *in vivo* proizvedenih zametaka, bez rizika od širenja zaraznih bolesti. Od ukupnog broja zametaka, oko 15% godišnje ih se proizvodi *in vitro*. Ova tehnologija omogućuje dobivanje zametaka od plotkinja visoke genetske vrijednosti koje ne mogu dati potomstvo prirodnim putem, a zbog veće učinkovitosti s vremenom bi mogla zamijeniti klasične programe MOET-a. Postupci asistirane reprodukcije poput embriotransfera i *in vitro* proizvodnje zametaka zajedno s krioprezervacijom, od izuzetne su važnosti u očuvanju izvornih i ugroženih pasmina goveda. Njihova primjena nezaobilazna je u programima uspostave banke gena koji pomažu u očuvanju farmskih genetskih resursa. Osim navedenog, ove biotehnologije povećavaju ponudu visokokvalitetne stoke te primjenu naprednih biotehnologija. Određivanje spola spermija i zametaka nudi stočarima mogućnost odabira spola teleta,

a time i isplativiju proizvodnju mesa i mlijeke. Napredne biotehnologije poput kloniranja i transgeneze imaju veliki potencijal u rasplodivanju, no zbog troškova i loših rezultata one se uglavnom koriste u istraživanjima te u farmaceutskoj industriji.

**Ključne riječi:** *asistirana reprodukcija, govedo, embriotransfer, in vitro tehnologija, transgeneza, kloniranje*

## Literatura

1. ABD EL RAZEK, I. M., G. CHARPIGNY, S. KODJA, B. MARQUANT-LEGUIENNE, P. MERMILLOD, C. GUYADER-JOLY and P. HUMBLLOT (2000): Differences in lipid composition between *in vivo*- and *in vitro*- produced bovine embryos. *Theriogenology* 53, 346.
2. AGUILAR, M. M., C. S. GALINA, H. MERCHANT, F. MONTEL, R. CENSECO and Y. C. MARQUEZ (2002): Comparison of stereoscopy light microscopy and ultrastructural methods for evaluation of bovine embryos. *Reprod. Domest. Anim.* 37, 341-346.
3. AMANN, R. P. (1994): Issues affecting commercialization of sexed sperm. *Theriogenology* 52, 1441-1457.
4. BO, G. A., P. S. BARUSELLI and M. F. MARTINEZ (2003): Pattern and manipulation of follicular development in *bos indicus* cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 78, 307-326.
5. BOLS, P. E. J., A. VAN SOOM and A. DE KRUIF (1995): Transvaginal ovum pick up (OPU) in the cow: a new disposable needle guidance system. *Theriogenology* 43, 677-687.
6. BRACKETT, B. G., D. BOUSQUET, M. L. BOICE, W. J. DONAWICK, J. F. EVANS and M. A. DRESSEL (1982): Normal development following *in vitro* fertilization in the cow. *Biol. Reprod.* 27, 147-158.
7. BROPHY, B., G. SMOLENSKI, T. WHEELER, D. WELLS, P. L'HUILLIER, G. LAIBLE (2003): Cloned transgenic cattle produce milk with higher levels of  $\beta$ -casein and  $\kappa$ -casein. *Nat. Biotechnol.* 21, 157-162.
8. CHRISTIE, W. B. (1996): Embryo Transfer In Large Domestic Animals, In: Arthur G. H., D. E. Noakes, H. Pearson, T. J. Parkinson: *Veterinary Reproduction and Obstetrics*. Seventh Edition. London, Philadelphia, Toronto, Sydney, Tokio: WB Saunders Company Limited. Pp. 677-693.
9. DINDOT, S. V., P. W. FARIN, C. E. FARIN, J. ROMANO, S. WALKER, C. LONG and J. A. PIEDRAHITA (2004): Epigenetic and genomic imprinting analysis in nuclear transfer derived *Bos gaurus/Bos taurus* hybrid fetuses. *Biol. Reprod.* 71, 470-478.
10. DINNYES, A., P. LONERGAN, T. FAIR, M. P. BOLAND and X. Z. YANG (1999): Timing of the first cleavage post-insemination affects cryosurvival of *in vitro* produced blastocysts. *Mol. Reprod. Dev.* 53, 318-324.
11. FERGUSON, E. M. and H. J. LEESE (1999): Triglyceride content of bovine oocytes and early embryos. *J. Reprod. Fert.* 116, 373-378.
12. FUNK, D. A. (2006): Major advances in globalization and consolidation of the artificial insemination industry. *J. Dairy Sci.* 89, 1362-1368.
13. GALLI, C. and G. LAZZARI (2003): *In vitro* production of embryos in farm animals. Proceedings of the 19<sup>th</sup> Scientific meeting of AETE, 12-13 September 2003, Rostock, Germany. Pp. 93-101.
14. GALLI, C., R. DUCHI, G. CROTTI, P. TURINI, N. PONDERATO, S. COLLEONI, I. LAGUTINA and G. LAZZARI (2003): Bovine embryo technologies. *Theriogenology* 59, 599-616.
15. GARNER, D. L. and G. E. SEIDEL (2008): History of commercializing sexed semen for cattle. *Theriogenology* 69, 886-895.
16. GETZ, I. (2004): Uspješnost stimulacije jajnika krava u postupku transvaginalne ultrazvučne punkcije i uzgoja *in vitro* govedih zametaka. Disertacija. Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Zagreb, Hrvatska. (In Croatian).
17. GETZ, I., M. KARADJOLE, M. SAMARDŽIJA, N. MAČEŠIĆ, Z. MAKEK, T. KARADJOLE, T. DOBRANIĆ, G. BAČIĆ and 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.
18. GETZ, I., M. MATKOVIĆ, Z. MAKEK, A. TOMAŠKOVIĆ, M. CERGOLJ and M. LOJKIĆ (2001): Asistirana reprodukcija u govedarskoj proizvodnji. Zbornik radova "Veterinarski dani", Opatija 2001., 83-92.
19. GORDON, I. (1994): Laboratory Production of Cattle Embryos. *Biotechnology in Agriculture*, Cab International, pp. 11.
20. GORDON, I. (1996): Controlled Reproduction in Cattle and Buffaloes. CAB International, Wallingford.
21. GRAY, K. R., K. R. BONDIOLI and C. L. BETTS (1991): The commercial application of embryo splitting in beef cattle. *Theriogenology* 35, 37-44.
22. GRIZELJ, J. (2006): Uspješnost metoda klasičnog zamrzavanja i vitifikacije konjskih zametaka. Disertacija. Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Zagreb, Hrvatska.
23. HAMANO, S., M. MIYAMURA, H. TUCHIYA, Y. WATANABE, A. SATO, M. HARASAWA, A. HAMAWAKI and M. YOSHIKAWA (2006): Mass production of cattle from IVM, IVF and IVP embryos in Japan. *J. Reprod. Fert.* 52, S77-S85.
24. HASLER, J. F. (2003): The current status and future of commercial embryo transfer in cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 79, 245-264.
25. HOLM, P., P. J. BOOTH and H. CALLESEN (2002): Kinetics of early *in vitro* development of bovine *in vivo*- and *in vitro*-derived zygotes produced and/or cultured in chemically defined or serum-containing media. *Reproduction* 123, 553-565.
26. HOSHI, H. (2003): *In vitro* production of bovine embryos and their application for embryo transfer. *Theriogenology* 59, 675-685.

27. HOUDEBINE, L. M. (2005): Relationship between animal transgenesis and reproduction. *Reprod. Nutr. Dev.* 45, 363-376.
28. HUNTER, R. H. (2003): Advances in deep uterine insemination: a fruitful way forward to expolito new sperm technologies in cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 79, 157-170.
29. IMAI, K., M. TAGAWA, H. YOSHIOKA, S. MATOBA, M. NARITA, Y. INABA, Y. AIKAVA, M. OHTAKE and S. KOBAYASHI (2006): The efficiency of embryo production by ovum pick up and *in vitro* fertilization in cattle. *J. Reprod. Dev.* 52, S19-S29.
30. KARADJOLE, M., I. GETZ, M. SAMARDŽIJA, N. MACESIĆ, B. ZEVRNJA, M. MATKOVIC, T. KARADJOLE, G. BACIC, I. FOLNOZIC and S. VINCE (2011): The effect of follicle size on developmental competence of bovine oocytes collected by Ovum pick-up. *Proceedings of the 12<sup>th</sup> Middle European Buiatric Congress*, 18-22.05. 2011, Pula, Croatia, pp. 153-159.
31. KARADJOLE, M., I. GETZ, M. SAMARDŽIJA, N. MAČEŠIĆ, M. MATKOVIC, Z. MAKEK, T. KARADJOLE, G. BAČIĆ, T. DOBRANIĆ and M. POLETTO (2010): Developmental competence of bovine immature oocytes and quality of embryos derived from slaughterhouse ovaries or live donors by ovum pick up. *Vet. arhiv* 80, 445-454.
32. KARADJOLE, M., I. GETZ, M. SAMARDŽIJA, N. MAČEŠIĆ, Z. MAKEK, T. KARADJOLE, G. BAČIĆ, T. DOBRANIĆ, M. KNEŽEVIĆ and 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 24<sup>th</sup> Scientific Meeting of A.E.T.E.*, 12-13 September, 2008, Pau, France. P. 172.
33. KEEFER, C. L. (2004): Production of bioproductsthrough the use of transgenic animals models. *Anim. Reprod. Sci.* 82, 5-12.
34. KOO, D. B., Y. K.KANG, Y. H. CHOI, J. S. PARK, H. N. KIM, K. B. OH, D. S. SON, H. PARK, K. K. LEE and Y. M. HAN (2002): Aberrant allocations of inner cell mass and trophoctoderm cells in bovine nuclear transfer blastocysts. *Biol. Reprod.* 67, 487-492.
35. LIEBO, S. P. and R. J. MAPLETOFT (1998): Direct transfer of cryopreserved cattle embryos in North America. *Proceedings 17<sup>th</sup> Convention of AETA*, 12-14 October 1998, San Antonio, Texas, USA, pp. 91-98.
36. LOJKIĆ, M., I. GETZ, M. SAMARDŽIJA, N. MACESIĆ, M. MATKOVIC, T. KARADJOLE, G. BAČIĆ, N. PRVANOVIĆ BABIĆ, J. GRIZELJ, S. VINCE and I. FOLNOŽIĆ (2013): Effect of breed on efficiency of oocyte collection and subsequent bovine embryo production. *Congress Proceedings XIII<sup>th</sup> Middle European Buiiatrics Congress*, Beograd: Serbian Buiiatrics Association, Faculty of Veterinary Medicine, pp. 426-431.
37. LOJKIĆ, M., M. ČAVLEK, G. BAČIĆ, I. GETZ, M. SAMARDŽIJA, N. MAČEŠIĆ, T. KARADJOLE i M. ČANIĆ (2014): Morphology evaluation of bovine embryos produced *in vitro*. *Vet. stn.* 45, 187-193.
38. LOJKIĆ, M., S. UVODIĆ, I. GETZ, M. SAMARDŽIJA, J. ALADROVIĆ, N. MAČEŠIĆ, T. KARADJOLE, G. BAČIĆ, M. MATKOVIC and M. BENIĆ (2016): The influence of follicle size on the developmental kinetics of bovine embryos. *Vet. arhiv* 86, 613-622.
39. LONERGAN, P., D. RIZOS, A. GUTIERREZ-ADAN, T. FAIR and M. P. BOLAND (2003): Oocyte and embryo quality: effect of origin, culture conditions and gene expression patterns. *Reprod. Domest. Anim.* 38, 256-267.
40. LOPES, R. F., F. FORELL, A. T. OLIVEIRA and J. L. RODRIGUES (2001): Splitting and biopsing for bovine embryo sexing under field conditions. *Theriogenology* 56, 1383-1392.
41. MacMILLAN, K. L., B. E. SEGWAGVE and C. S. PINO (2003): Associations between the manipulation of patterns of follicular development and fertility in cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 78, 327-344.
42. MAKEK, Z., M. CERGOLJ, I. GETZ, M. HERAK, A. TOMAŠKOVIĆ i T. DOBRANIĆ (1997): Embriotransfer u goveda. *Praxis vet.* 45, 153-159.
43. MAKEK, Z., M. HERAK, M. CERGOLJ, I. BARAC-GETZ and 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.
44. MAPELTOFT, R. J. and J. F. HASLER (2005): Assisted reproductive technologies in cattle: a review. *Rev. Sci. Tech.* 24, 393-403.
45. MATKOVIC, M., I. GETZ, Z. MAKEK, P. BOŽIĆ, A. TOMAŠKOVIĆ i M. CERGOLJ (2000): Biotehnologija rasplodivanja: mogućnosti primjene u stočarstvu Hrvatske. *Zbornik radova, Drugi hrvatski veterinarski kongres Cavtat*, 10-12. listopada 2000., str. 215-224. (In Croatian).
46. McEVOY, T. G. (2003): Manipulation of domestic animal embryos and implications for development. *Reprod. Domest. Anim.* 38, 268-275.
47. MERTON, J. S., A. P. W. De ROOS, E. MULLART, L. De RUIGH, L. KAAL, P. L. A. M. VOOS and S. J. DIELEMAN (2003): Factors affecting oocyte quality and quantity in commercial application of embryo technologies in cattle breeding industry. *Theriogenology* 59, 651-674.
48. NOAKES, D. E. (1997): Normal non-pregnant animal. pp. 3-16. In: *Fertility and obstetrics in cattle* second edition. Blackwell Science Ltd.
49. NOAKES, D. E. (2001): Normal oestrus cycles: Endogenous and exogenous control of ovarian cyclicity. In: *Arthur's Veterinary Reproduction & Obstetrics* eighth edition. W.B. Saunders Company Ltd. Pp. 3-53.
50. PAAPE, M., J. MEHRZAD, X. ZHAO, J. DETILLEUX, C. BURVENICH (2002): Defense of the bovary mammary gland by polimorphonuclear neutrophil leukocytes. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 7, 109-121.
51. PARKINSON, T. (2001): Artificial insemination. In: *Arthurs Veterinary Reproduction and Obstetrics*, 8<sup>th</sup> Edition, Saunders Company, USA, pp. 751-778.

52. PETERSON, A. J. and R. S. LEE (2003): Improving successful pregnancies after embryo transfer. *Theriogenology* 59, 687-697.
53. PIEDRAHITA, J. A. (2000): Targeted modification of the domestic animal genome. *Theriogenology* 53, 105-116.
54. PIETERSE, M. C., K. A. KAPPEN, Th. A. M. KRUIP and M. A. M. TAVERNE (1988): Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning of ovaries. *Theriogenology* 30, 751-762.
55. RHODES, F. M., S. McDOUGALL, C. R. BURKE, G. A. VERKERK and K. L. MacMILLAN (2003): Treatment of cows with extended postpartum anestrus interval. *J. Dairy Sci.* 86, 1876-1894.
56. RIZOS, D., A. GUTIERREZ-ADAN, S. PEREZ-GARNELO, J. DE LA FUENTE, M. P. BOLAND and P. LONERGAN (2003): Bovine embryo culture in the presence or absence of serum: Implications for blastocyst development, cryotolerance, and messenger RNA expression. *Biol. Reprod.* 68, 236-243.
57. ROSCHLAU, K., P. ROMMEL, L. ANDREWEA, M. ZACKEL, D. ROSCHLAU, B. ZACKEL, M. SCHWERIN, R. HÜHN and K. G. GAZARJAN (1989): Gene transfer experiments in cattle. *J. Reprod. Fertil.* 38, 153-160.
58. SEIDEL, G. E. (1984): Application of embryo transfer related technologies to cattle. *J. Dairy Sci.* 67, 2786-2796.
59. SEIDEL, G. E. (2009): Sperm sexing technology The transition to commercial application An introduction to the symposium "Update on sexing mammalian sperm". *Theriogenology* 71, 1-3.
60. SIEDEL, J. E. and S. M. SIEDEL (1991): Training manual for embryo transfer in cattle. FAO Animal production and Health, Rome, Italy, pp. 77.
61. STICE, S. L., J. M. ROBL, F. A. PONCE DE LEON, J. JERRY, P. G. GOLUEKE, J. B. CIBELLI and J. J. KANE (1998): Cloning: new break throughs leading to commercial opportunities. *Theriogenology* 49, 129-138.
62. STRINGFELLOW, D. A., M. D. GIVENS and J. G. WALDROP (2004): Biosecurity issues associated with current and emerging embryo technologies. *Reprod. Fertil. Dev.* 16, 93-102.
63. THATCHER, W. W., F. MOREIRA, J. SANTOS, R. C. MATTOS, F. L. LOPES, S. M. PANCARCIL and C. A. RISCO (2001): Effects of hormonal treatments on reproductive performance and embryo production. *Theriogenology* 55, 75-89.
64. THATCHER, W. W., J. A. BARTOLOME, A. SOZZI, F. SILVESTRE and J. E. P. SANTOS (2004): Manipulation of ovarian function for the reproductive management of dairy cows. *Vet. Res. Commun.* 28, 111-119.
65. THATCHER, W. W., T. R. BILBY, J. A. BARTOLOME, F. SILVESTRE, C. R. STAPLES, and J. E. P. SANTOS (2006): Strategies for improving fertility in the modern dairy cow. *Theriogenology* 65, 30-44.
66. THIBIER, M. (1998): Introduction. The establishment and evolution of the International Embryo Transfer Society: personal observations. In: *Manual of the International Embryo Transfer Society: a procedural guide and general information for the use of embryo transfer technology, emphasizing sanitary procedures* (D. A. Stringfellow & S. M. Seidel, eds.), 3<sup>rd</sup> ed. International Embryo Transfer Society, Savoy, Illinois, pp. 1-6.
67. THIBIER, M. (2005): The zootechnical applications of biotechnology in animal reproduction: current methods and perspectives. *Reprod. Nutr. Dev.* 45, 235-242.
68. TOMAŠKOVIĆ, A., Z. MAKEK, T. DOBRANIĆ i M. SAMARDŽIJA (2007): Rasplodivanje krava i junica. (M. Samardžija i sur., ur.). Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, (In Croatian).
69. TSUNODA, Y. and Y. KATO (2000): The recent progress on nuclear transfer in mammals. *Zool. Sci.* 17, 1177-1184.
70. VAN ARENDONK, J. A. M. and P. BIJMA (2003): Factors affecting commercial application of embryo technologies in dairy cattle in Europe – a modelling approach. *Theriogenology* 59, 635-649.
71. 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.
72. VELAZQUEZ, M. A. (2008): Assisted reproductive technologies in Cattle: Applications in livestock production, biomedical research and conservation biology. *ARBS* 10, 36-62.
73. VERBECKMOES, S., A. VAN SOOM, I. De PAUW, J. DEWULF, C. VERVAET and A. De KRUIF (2004): Assesment of a new utero-tubal junction insemination device in dairy cattle. *Theriogenology* 61, 103-115.
74. VOELKEL, S. A. and Y. X. HU (1992): Direct transfer of frozen thawed bovine embryos. *Theriogenology* 37, 23-37.
75. WALL, R. J., A. M. POWELL, M. J. PAAPE, D. E. KERR, D. D. BANNERMAN, V. G. PURSELL K. D. WELLS, N. TALBOT and H. W. HAWK (2005): Genetically enhanced cows resist intramammary staphylococcus aureus infection. *Nat. Biotechnol.* 23, 445-451.
76. WELLS, D. N. (2003): Cloning in livestock agriculture. *Reproduction* 61, 131-150.
77. WELLS, D. N., J. T. FORSYTH, V. McMILLAN and B. OBACK (2004): The health of somatic cell cloned cattle and their offspring. *Cloning & Stem Cells*, 6, 101-110.
78. WILMUT, I., A. E. SCHNIEKE, J. McWHIR, A. J. KIND and K. H. S. CAMPBELL (1997): Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 385, 810-813.
79. WRATHALL, A. E., H. A. SIMMONS, D. J. BOWLES and S. JONES (2004): Biosecurity strategies for conserving valuable livestock genetic resources. *Reprod. Fertil. Dev.* 16, 103-112.
80. WRIGHT, J. M. (1998): Photographic illustrations of embryo developmental stage and quality codes. In: *Manual of the International Embryo Transfer Society, 3<sup>rd</sup> ed.* (Stringfellow, D. A. and S. M. Siedel, Eds.). IETS, Savoy, Illinois. pp. 167-170.
81. XU, Z. Z. and L. J. BURTON (2000): Estrus synchronization of lactating dairy cows with GnRH, progesterone, and prostaglandin F<sub>2α</sub>. *J. Dairy Sci.* 83, 471-476.

82. YANG, X., X. C. TIAN, C. KUBOTA, R. PAGE, J. XU, J. CIBELLI and G. SIEDEL Jr. (2007): Risk assesment of meat and milk from cloned animals. *Nat. Biotechnol.* 25, 77-83.
83. ZAVOS, P. M. and K. ILLMENESEE (2006): Possible therapy of male infertility by reproductive cloning: one cloned human 4-cell embryo. *Arch. Androl.* 52, 243-254.

## Application of assisted reproductive technologies in cattle production

Martina LOJKIĆ, DVM, PhD, Assistant Professor, Iva GETZ, DVM, PhD, Associate Professor, Marko SAMARDŽIJA, DVM, PhD, Full Professor, Nino MAČEŠIĆ, DVM, PhD, Associate Professor, Tugomir KARADJOLE, DVM, PhD, Full Professor, Goran BAČIĆ, DVM, PhD, Full Professor, Faculty of Veterinary Medicine University of Zagreb, Croatia; Natko KARAJIĆ, DVM, Zagreb, Croatia; Darko ŽELJEŽIĆ, DVM, Senior Associate Expert, Croatian Veterinary Institute, Zagreb, Croatia; Vladimir MAGAŠ, DVM, PhD, Assistant Professor, Faculty of Veterinary Medicine University of Belgrade, Serbia

More than five decades of research in reproductive biology have resulting in the development of biotechnologies in the cattle industry to increase efficiency in beef and dairy production systems. These technologies are related to gamete and embryo manipulation aimed at improving fertility and genetic progress. The application of assisted reproductive technology in stockbreeding has tremendously altered the rate of genetic improvement in breeding programmes and strategies. Artificial insemination, embryo transfer and *in vitro* embryo production are technologies systematically applied in breeding programs around the world. They enable rapid genetic progress, shortening of the generation interval, control of disease transmission and reduction of production costs. Worldwide, artificial insemination has been the most efficient and useful way to improve the genetic quality of the herd. Over a period of thirty years, embryo transfer has become an internationally accepted technology with over 500,000 *in vivo* produced embryos per year. The recommended handling procedures of the International Embryo Transfer Society enable the safe export of *in vivo* derived embryos, without the risk of disease transmission. Approximately 15% of embryos produced annually are produced by

*in vitro* technology. This technology enables embryo production from cows of high genetic merit that cannot produce offspring by conventional reproduction. Improvements in OPU/IVF programs would have a great impact on the cattle industry and could replace the traditional MOET programs in the near future. Furthermore, they are important for the development and operation of a gene bank for the cryoconservation of animal genetic resources, to preserve indigenous and endangered breeds of cattle. In addition to genetic progress, the application of these biotechnologies in animal breeding permits high quality breeding stock to be available on the market and enables the application of advanced technologies. Semen and embryo sexing allows for identification and selection of sex, which can assist in the more efficient management of resources. Cloning and transgenesis have great potential in the cattle industry, though due to their low efficiency and high costs, these technologies are predominantly applied in experimental settings and the production of pharmaceuticals.

**Key words:** *assisted reproductive technologies, cattle, Embryo transfer, in vitro technology, transgenesis, cloning*