

OSOBITOSTI HORMONALNOG STATUSA KOBILE TIJEKOM GRAVIDNOSTI

Marija Zaninović, Jelena Ramljak, A. Ivanković

Sažetak

Hormonalni status tijekom gravidnosti kobile značajno se razlikuje naspram drugih domaćih životinja. Tijekom cijele gravidnosti kobile vrlo je izražena hormonalna interakcija između ploda i majke. U ranoj trudnoći javlja se u obliku majčinskog prepoznavanja takvog stanja, jer zametak određenim signalima „obavještava“ majku o svojoj prisutnosti i time produžuje život žutom tijelu. Također, proizvodnja placentarnog estrogena i progestagena, u srednjoj fazi gravidnosti, ovisi o prekursorima sintetiziranim u povećanim gonadama fetusa i u nadbubrežnim žlijezdama fetusa. U zadnjoj fazi gravidnosti, upravo se fetus smatra inicijatorom partusa. Sam, mehanizam nije u potpunosti razjašnjen, no smatra se da je povezan s povišenim količinama kortikosteroida u amnionskoj tekućini koju proizvode nadbubrežne žlijezde fetusa. Potrebno je potpuno razumjevanje hormonalnih osobitosti gravidnosti kobile kako bi čovjek mogao pozitivno utjecati na trenutno prenisku stopu plodnosti konja.

Ključne riječi: kobilica, gravidnost, hormoni.

1. Uvod

Hormoni u tijelu su kemijski "glasnici" koji kemijskim međudjelovanjem prenose signalne međustanične poruke. Po kemijskom sastavu hormoni mogu biti steroidi, prostaglandini, amini, peptidi ili bjelančevine. Starling je 1908. godine uveo pojam "hormon", riječ koja korijen vuče iz grčkog jezika, a znači „poticati“. Naglasio je tri osnovne odlike hormona: da ih sintetiziraju specijalizirana tkiva ili žlijezde, da ih izlučuju u krvotok kojim se prenose do mjesta djelovanja, te da utječu na aktivnost ciljnog tkiva ili organa.

Premda hormoni dolaze u kontakt sa mnogim tkivim staničjem, djelovanje se očituje samo na ciljnim stanicama sa specifičnim receptorima za dotični hormon. Sama regulacija sekrecije hormona može se podijeliti na reakcije s negativnom ili pozitivnom povratnom spregom. Negativna povratna sprega najčešća je u hormonalnoj regulaciji, pri čemu povećana koncentracija određenog hormona ili odgovor ciljnog tkiva na taj hormon, ima inhibirajući učinak na sintezu ili sekreciju istog hormona.

Rad je izvod iz diplomskog rada Marije Zaninović dipl.ing.agr.;

Marija Zaninović, dipl.ing.agr., dr. sc. Jelena Ramljak, prof.dr.sc. Ante Ivanković, Zavod za specijalno stočarstvo, Agronomski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Svetošimunska cesta 25, 10000 Zagreb; (aivankovic@agr.hr)

Pozitivna povratna sprega je u slučajevima kada sekrecija određenog hormona direktno ili indirektno djeluje na povećanje njegove sekrecije.

Ovakav mehanizam je uočen pri naglom rastu koncentracije određenog hormona, no i u tom slučaju javlja se trenutak kada dolazi do protureakcije koja sprječava daljnji rast udjela tog hormona.

Kobile su sezonski poliestrične životinje, odnosno aktivnost jajnika ovisi o sezoni. Sezonska poliestričnost najviše je pod utjecajem dužine trajanja danjeg svijetla (fotoperioda). Kraći zimski dani vidnim podražajem preko ekstrapitalamičkih centara (veliki mozak, talamus) potiču epifizu na proizvodnju i izlučivanje veće količine hormona melatonina. Melatonin potom inhibirajuće djeluje na hipotalamus, odnosno njegovu skokovitu proizvodnju gonadotropin opuštajućeg hormona (engl. *gonadotropin realising hormon*, GnRH) što u konačnici inhibira aktivnost jajnika. Središnji živčani sustav putem neurotransmitera također djeluje na hipotalamus odnosno na izlučivanje GnRH. Jedan od neurotransmitera je *dopamin* koji uz pomoć *beta-endorfina* usporava skokovito izlučivanje GnRH i povećanje izlučivanja *prolaktina*. Tijekom anestrusa niska je skokovita sekrecija GnRH (jedan skok dnevno). Drugi važan neurotransmiter je *neuroadrenalin*, antagonist dopaminu, koji potiče skokovito izlučivanje GnRH, te djeluje na aktivnost jajnika. *Serotonin* potiče oslobađanje prolaktina te smanjuje sekreciju GnRH.

Dva centra u hipotalamusu reguliraju izlučivanje gonadotropnih hormona, *epizodično-tonični centar*, odgovoran za sekreciju bazalnih koncentracija te uspostavljanje i održavanje endokrine funkcije jajnika, te *pulzatorni centar*, odgovoran za skokovitu sekreciju gonadotropina i nagli predovulacijski skok lutemizirajućeg hormona (LH). U proljetnom tranzicijskom razdoblju sukladno povećanju količine danjeg svijetla dolazi do smanjenja koncentracije epifiznog melatonina te prestaje njegovo inhibicijsko djelovanje na skokovitu sekreciju GnRH. Promjene u intenzitetu i frekvenciji sekrecije GnRH važna je u sezonskoj uspostavi spolnog ciklusa i u tijeku same sezone tjeranja (Makel i sur., 2009). Povećanjem sekrecije GnRH, adenohipofiza (*prednji režanj hipofize*) počinje lučiti folikulo stimulirajući hormon (FSH, engl. *follicle-stimulating hormone*) koji potiče rast folikula odnosno tranzicijsku aktivnost jajnika. Kada se učestalost skokovitog izlučivanja GnRH poveća, adenohipofiza intenzivnije izlučuje LH hormon i dolazi do ovulacije.

Tijekom gravidnosti kobile susrećemo brojne specifične i nespecifične hormone, poput progesterona i estrogena koje nalazimo i u spolnom ciklusu. *Progesteron* luče razna tkiva tijekom graviditeta. Između 40. - 70. dana graviditeta sintetizira ga primarno žuto tijelo (*corpus luteum*; CL), da bi do 150. dana graviditeta tu ulogu preuzela pomoćna žuta tijela, a od 150. dana do kraja

graviditeta fetoplacentalni spoj. Osnovna uloga progesterona je održavanje gravidnosti, te priprema uterusa za nidaciju zametka. *Estrogen* je hormon kojeg tijekom graviditeta sintetizira sama blastocista i to u prenidacijskoj fazi, od šestog dana nakon ovulacije kroz cijeli period majčinskog prepoznavanja gravidnosti. Uz blastocistu, ukupnoj količini estrogena doprinosi i placenta, te CL. Placenta kobile proizvodi još i dva karakteristična estrogena; *ekvilin* i *ekvilenin* koji ne nastaju iz kolesterola poput estrogena i progesterona. Estrogen i progesteron funkcioniraju usko spregnuto: progesteron potiče diferencijaciju tkiva rasplodnog sustava, dok estrogen potiče njegov rast; estrogen upravlja sintezom progesteronskih receptora a progesteron pak snižava razinu estrogenskih; estrogen indirektno stvara uvjete za kontrakciju endometrija (sluznica maternice) a progesteron je antagonist u tom estrogen djelovanju. *Prostaglandin F2 α* tijekom graviditeta kobile sintetizira embrij nakon ulaska u uterus, gdje izaziva periodične kontrakcije miometrija između kojih djeluje PGE2 sa suprotnim učinkom. *Prostaglandin E2* luči embrij nakon 5-og dana starosti. Hormon djeluje lokalno, opušta stjenku jajovoda što rezultira otvaranjem ampularno-istmusnog sfinktera na ulazu u maternicu. Lučenje hormona periodično se nastavlja u uterusu izazivajući relaksaciju miometrija maternice nakon djelovanja PGF2 α koji izaziva kontrakcije, te se na taj način embrij premješta u maternici i dolazi u kontakt s njenom stjenkom. *Konjski korionski gonadotropin (eCG)* je složeni glikoprotein koji djeluje na aktivnost FSH i LH te stvaranje sekundarnog žutog tijela na jajnicima koji sintetizira progesteron. Malo zagonetna osobina embrionalnog razvoja je nastanak tzv. korionskog pojasa na vanjskom sloju koriona (vanjska plodna ovojnica posteljice) koji nastaje između 25. i 35. dana po ovulaciji. Nakon penetracije stanica iz pojasa (kroz epitel uteruse sluznice) dolazi do njihovog nakupljanja u stromi maternice i formiranja endometrijske čašice koje proizvodi eCG od 36. do 120. dana. Nakon 120. dana gravidnosti slijedi njihova regresija (Liker, 2004). *Oksitocin* se sintetizira u hipoalamusu, a skladišti u stražnjem režnju hipofize (neurohipofize) otkud se i izlučuje u krv. Djeluje preko oksitocinskih receptora (OTR) koji se nalaze u miometriju, endometriju, mioepitelnim stanicama laktirajuće mlječne žlijezde, ali i u drugim tkivima. Porast broja i osjetljivost OTR u uterusu kobilica (kao i preživaa) ovisi o porastu razine estrogena (Liker, 2004). Tijekom poroda oksitocin potiče kontrakcije miometrija, oslobađanje PGF2 α iz endometrija, te oslobađanje PGE2 iz sluznice cerviksa maternice. Izlučivanje oksitocina potiče podražaj koji nastaje uslijed prolaska ploda kroz grkljan maternice i rodnicu. Druga važna uloga oksitocina je otpuštanje mlijeka, a njegovo otpuštanje potiče akt sisanja ždrebeta. *Relaksin* je polipeptidni hormon iz grupe inzulinu sličnih molekula. Sintetizira ga uterus,

CL ili/i placenta. Kod kobile glavninu relaksina sintetizira tkivo placente. Iako je uloga relaksina poznata u drugih domaćih životinja, u konja nije sa sigurnošću potvrđena.

Kao važan vanjski čimbenik koji utječe na sezonsku aktivnost jajnika, značajan učinak ima hranidba, tjelesna kondicija, temperatura i drugo. Hormon *leptin* kojeg sintetizira i izlučuje masno tkivo također utječe na sezonsku aktivnost jajnika (Ferreira-Dias i sur., 2005). Uočili su da ima najveću koncentraciju tijekom ljeta, te zaključili da povećane količine hormona leptina stimuliraju vezu "hipotalamus – hipofiza – jajnik". Hormon *prolaktin* kojeg izlučuju laktotropne stanice adenohipofize, također ima utjecaj na početak folikulogeneze, odnosno na početak spolnog ciklusa. Sekretiju prolaktina kontrolira prolaktin aktivirajući faktor (PAF) i dopamin kao njegov inhibitor (Makek i sur., 2009). Najveća mu je koncentracija zamjećena neposredno prije početka spolnog ciklusa odnosno u trenutku rasta najvećeg folikula. U jesenjem trazincijskom razdoblju, kada su dani kraći, iznova dolazi do izražaja inhibicijsko djelovanje melatonina, što rezultira ponovnim postepenim padom aktivnosti jajnika. Spolni ciklus kobile sastoji se od četiri faze (diestrus, proestrus, estrus, metaestrus) čije poznavanje je nužno za razumijevanje interakcije spolnih hormona.

2. *Hormonalni status rane gravidnosti kobile*

U ranoj fazi gravidnosti odvijaju se razne morfološke, endokrinološke i imunološke promjene specifične za rod *Equus* i dijelom se razlikuju istovjetnih događaja u drugih srodnih vrsta domaćih životinja. Do oplodnje jajne stanice dolazi na spoju ampule u istmus. Prolaskom kroz jajovod oplodena jajna stanica razvija se do faze morule, koju čine 32. usko priljubljene blastomere (Makek i sur., 2009). Zametak kobile za šest dana od oplodnje ulazi u uterus, dok kod svinje taj period traje 48 sati (kod četverostaničnog embrija) ili kod preživača 72 sata (osmerostanični embrij). Pretpostavlja se da je produženi boravak zametka u jajovodu uvjetovan dužom pripremom uterusa za prihvatanje ploda (Allen, 2000). Prelazak zametka kroz istmus do uterusa u kobile također je interesantan. Van Niekirk i Gerneke (1966) prvi su obratili pozornost na činjenicu da neoplođene *oocyte* ostaju zaglavljene na prelasku ampule u istmus gdje kasnije propadaju, dok oplodena jajna stanica prolazi dalje do maternice (Allen, 2000). Onuma i Ohnami (1975) uočili su međudjelovanje između embrija kod kojega se javljaju strukturalne promjene u *zoni pellucidi* i cilija jajovoda koje trepere. Betteridge i sur. (1979) smatraju da na pokretljivost konjskog zametka ključnu ulogu ima jajovod.

Weber i sur. (1990) zaključili su da embrij 5.-og dana nakon ovulacije luči značajne količine PGE2 koji opušta glatke mišićne stijenke jajovoda i time omogućuje svoj prolazak u uterus dok treperenje cilija olakšava taj prolazak (Allen, 2000).

Jedna od posebnosti konjskog zametka je tvorba glikoproteinske kapsule (ovojnice) na unutarnjoj strani *zone pellucide*. Kapsula postaje vidljiva od 5. do 6. dana starosti zametka te do 8. dana odeblja do 1 μ m (slika 6.) okružujući sferični embrij. Od 18. dana starosti počinje se stanjivati te u konačnici nestaje 23. dana gravidnosti (Stout i sur., 2005). Stout i sur. (2005) u svom su istraživanju ukazali na važnost kapsule u održavanju gravidnosti. Oni su pomoću mikromanipulatora uklonili kapsule sa 15 embrija starih 6. do 7. dana. Nakon učinjenog embritransfera, nijedna primateljica nije uspjela održati gravidnost, za razliku od embrija kojima nije uklonjena kapsula.

Sama uloga kapsule u održavanju gravidnosti dosta je nerazjašnjena, međutim postoje različite pretpostavke temeljene na nekim svojstvima kapsule. Jedno od tih svojstava su njena čvrstoća i elastičnost koja ukazuje na zaštitnu ulogu kapsule u periodu migracije zametka kroz lumen uterusa od 10. do 16. dana nakon ovulacije (Gither, 1984). Oriol i sur. (1993) pretpostavljaju da kapsula podupire migraciju embrija zbog svog neljepljivog efekta uzrokovanog visokom koncentracijom ostataka sijalinske kiseline u glikoproteinima kapsule. Ona ima zaštitnu ulogu jer štiti zametak od majčinskog imunostava i štetnog djelovanja intrauterinskih mikroorganizama (Betterige, 1989). Također se čini da kapsula skladišti inzulinu sličan faktor rasta (Herrler i sur., 2000) i lipokalin P19 sintetiziran od endometrija (Legrand i sur., 2000) za koje se smatra da igraju važnu ulogu u interakciji maternica-zametak u ranoj gravidnosti. Sama kapsula održava sferični oblik zametka koji je za ovu fazu karakterističan za kobile u odnosu na elongiranu blasulu drugih preživača. Samim time što je kapsula direktno u doticaju s endometrijem ukazuje na njegovu vjerojatnu ulogu u komunikaciji embrija i maternice, a time i na održavanje gravidnosti. Kapsula je ta koja prilikom migracije embrija kroz uterus sudjeluje u skupljanju uterušnog sekreta tzv. uterušnog mlijeka, koje je prijeko potrebno za ishranu zametka u ranom embrionalnom razvoju, prije razvoja placente oko 45. dana gravidnosti. Sinteza uterušnih proteina uvelike ovisi o razini progesterona (McKinnon i Voss, 1993), što je još jedan pokazatelj važnosti tog hormona (*hormon čuvanja gravidnosti*). Za prehranu embrija odgovorna je žumanjčana vreća koja je kod kobilica prisutna tijekom cijele gravidnosti iako se značajno smanjuje veličinom. Njen razvoj je zamjetan između 10. i 11. dana gravidnosti, a sposobna je tijekom cijele gravidnosti

proizvoditi bjelančevine čija funkcija nije u potpunosti objašnjena (Sharp, 2000).

Zametak sferičnog oblika ostaje u potpunosti odvojen od maternice, a specifična migracija odvija se od 6. do 16. dana gravidnosti. Danas je poznato da je ta neobična pojava dio procesa majčinskog prepoznavanja gravidnosti (MPT). Pojam MPT prvi je koristio Schort (Allen, 2000), a predstavlja fiziološku pojavu kojom embrij "obavještava" kobilu o svojoj prisutnosti i time održava postojanje CL koji je ključan za sintezu progesterona i održavanje same gravidnosti (Gavião i Stout, 2007). Povišena razina progesterona očituje se tek oko 15. dana nakon ovulacije kada u negravidnih kobila dolazi do regresije CL.

Premještanje embrija posljedica je njegove naizmjenične sekrecije PGE2 i PGF2 α koji uzrokuju naizmjenično grčenje i relaksaciju miometrija (Allen, 2000) te sekrecije progesterona od strane CL na jajniku kobile (Davis i sur., 2003). Ranije spomenuto je pomalo kontradiktorno jer je za odašiljanje svih potrebitih signala potreban upravo hormon PGF2 α , hormon odgovoran za luteolizu, čiju sekreciju embrij želi spriječiti. Na temelju te činjenice možemo zaključiti, da za dio rane embrionalne smrtnosti nije odgovorno pomanjkanje faktora MPT, već neprimjerena ravnoteža PGF2 α hormona (Allen, 2000). Biokemijski signali koje embrij u doticaju sa stjenkom maternice odašilja u svrhu MPT još uvijek su nepoznati. Poznato je, naime, da za razliku od drugih preživača, embrij konja ne proizvodi interferonu slične proteinske molekule koje bi spriječile endometrijsku sekreciju PGF2 α (Allen, 2000).

Već od 6. dana embrij počinje lučiti estrogen (Gavião i Stout, 2007). Međutim, razina estrogena tijekom gravidnosti značajno se ne mijenja u odnosu na razinu kod negravidnih kobila, sve do 30. dana gravidnosti (Makek i sur., 2009). Pokušalo se dokazati da estrogeni u kobila sudjeluju u sprječavanju luteolize kao što kod svinja imaju ulogu redirekcije toka PGF2 α , usmjeravajući ga od uteruse vene prema egzokrinnoj sekreciji u lumen uterusa. Funkcija estrogena u ranoj gravidnosti očituje se u povećanju tonusa uterusa što posebno dolazi do izražaja između 16. i 17. dana, utječući na učvršćivanje embrija (Makek i sur., 2009). Nedavna istraživanja su pokazala da na povećanje tonusa maternice utječe PGF2 α kojeg sintetizira embrij (Gintehr, 1998).

Postoji još jedna značajka za koju se vjeruje da je dio MPT, a leži u činjenici da se broj oksitocinskih receptora (OR) u endometriju značajno smanjuje između 10. i 16. dana gravidnosti (Allen, 2000), odnosno da prisutnost zametka potiskuje povećanje broja i osjetljivost oksitocinskih receptora čime je inhibirana sinteza i sekrecija PGF2 α (Gavião i Stout, 2007). Inače, oksitocin se sintetizira i oslobađa u hipotalamusu, premda ga

izlučuje i endometriju uterusa, a njegovu sintezu i opuštanje potiče estrogen (Liker, 2004). Postoji pretpostavka da endometriju uterusa ima sposobnost lučenja inhibitora koji blokira pretvorbu arahidonske kiseline u PGF2 α .

Zametak se u maternici smješta 16. dan nakon ovulacije u većih pasmina konja, odnosno 15. dan u ponija (Ginther, 1998). Sam proces naziva se učvršćivanje ili fiksacija zametka (Makek i sur., 2009). Bitno je naglasiti da se učvršćivanje ne smije miješati sa stvaranjem fetu-materalnog spoja odnosno s procesom nidacije (Makek i sur., 2009). Fiksacija je rezultat povećanja tonusa uterusa kao i porasta samog zametka (Gavião i Stout, 2007). Na nju utječe smanjena proizvodnja embrionalnih prostaglandina, dok je povećanje uterusa rezultat povećane količine estrogena kojeg počinju izlučivati folikuli koji prethode nastajanju sekundarnih žutih tijela, što je još jedna osobitost graviditeta kobile. Uobičajeno mjesto fiksacije zametka je spoja roga i tijela maternice, neovisno o mjestu ovulacije (lijevi ili desni jajnik; Davis i sur., 2003).

Kapsula se počinje razgrađivati oko 21. dana gravidnosti, primarno zbog enzima koje sintetizira trofoblast i/ili luminalni epitel endometrija (Allen, 2000). Nakon razgradnje kapsule trofoblast je izložen djelovanju okoline, te se počinju razvijati pramenovi koriona u obliku niskih kolumnarnih trofoblastnih stanica koje se još nazivaju areolama (Allen i Wilsher, 2009). Areole omogućavaju privremeno i slabo učvršćivanje zametka te bolju adsorpciju sekreta uterušnih žljezda s kojima su u dodiru (Davies Morel, 1999). Njihova nutritivna važnost očituje se u visokoj stopi spontane embrionalne smrtnost i resorpcije u ovom periodu (70 - 80%) što je izraženo kod zametaka blizanaca fiksiranih na bazi istog roga maternice, tako da je jedan od njih svojom stranom naslonjen na svog "brata" umjesto na nutritivno opskrbljujući endometriju (Allen, 2000).

Otprilike oko 25. dana gravidnosti na spoju amnionske ovojnice i sve reducirajuće žumanjčane vrećice nastaje korionski pojas u obliku prstenaste veze koja se sastoji od transformiranih stanica trofoblasta (Makek i sur., 2009). Rast korionskog pojasa najvjerojatnije je pod kontrolom inzulinu sličnim hormonima rasta (Davies Morel, 1999). Oko 38. dana korionski pojas invadira epitel maternice, a potom migrira u *lamina propiu* (drugi sloj sluznice) kako bi se razvile endometrijske čašice (Makek i sur., 2009).

Nakon perioda fiksacije i prije razvoja endometrijskih čašica, oko 35. dana nakon ovulacije uterus naknadno razvija sposobnost sekrecije PGF2 α , što bi značilo da u tom periodu postoji neki drugi mehanizam sprječavanja luteolize (Gaviao i Stout, 2007). Dakle, ključ važnosti MPT je osiguravanje kontinuirane sekrecije progesterona od strane CL, jer je progesteron potreban

kako za mobilnost embrija, tako i za njegovu fiksaciju i za održavanje gravidnosti. Ukoliko luteoliza uslijedi nakon fiksacije, prekidajući sekreciju progesterona dolazi do embrionalnog uginuća (Ginther, 1998). Tim konačnim povezivanjem embrija s endometrijem uterusa završava embrionalni razvoj, a započinje fetalni, odnosno srednja faza gravidnosti kobile.

2.1. Hormonalna dijagnostika rane dijagnostike gravidnosti kobile

Od metoda rane dijagnostike gravidnosti kobile (do 40. dana gravidnosti) najraširenija je transrektalna ultrasonografija. U terenskim uvjetima pomoću ove metode može se dijagnosticirati gravidnost već od 12. do 14. dana nakon ovulacije, a u laboratorijskim uvjetima i ranije (od 10. do 11. dana nakon ovulacije). Ova metoda ne samo da omogućava otkrivanje gravidnosti, već omogućava procjenu stanja konceptusa (Vanderwall, 2008).

Šestog dana gravidnosti kobile koncentracija progesterona raste na koncentraciju od 6 do 7 ng/mL u perifernoj cirkulaciji (što je uobičajeno i kod negravidnih kobile). Određivanje koncentracije ovog hormona provodi se između 18. i 20. dana nakon ovulacije (Makek i sur., 2009). Međutim, kako progesteron nije hormon specifičan za gravidnost, nije pouzdan pokazatelj (Mckinnon i Voss, 1993). Do lažno pozitivnog rezultata testa (15 - 20%) može doći zbog prisustva perzistentnog CL na jajniku što je čest slučaj pri ranom embrionalnom uginuću nakon perioda MPT (Makek i sur., 2009). Unatoč tome, test na koncentraciju progesterona u krvi može biti dobra dopuna dijagnostičkim metodama poput transrektalne palpacije. Manjak progesterona u krvi dobar je indikator da kobile nije gravidna. Iznimno rijetko je u serumu gravidne kobile razina progesterona niža od 1 ng/mL (Mckinnon i Voss, 1993).

Unatoč nemogućnosti hormonalne dijagnostike graviditeta u novije vrijeme razvija se dijagnostika temeljena na specifičnom glikoproteinu koji se naziva faktor rane faze graviditeta (engl. *early pregnancy factor*, EPF). Neposredno nakon oplodnje dolazi do sinteze specifičnih proteina što izaziva imunološki odgovor. Dokazan je kod miševa već 4 do 6 sati nakon oplodnje. On veže T-limfocite da spriječi prepoznavanje antigena embrija. Njegova primjena imala bi velik utjecaj na uspješnost embriotransfera. U embriotransferu, u kobile donatorice potiče se poliovulacija. Sedam dana nakon oplodnje pristupa se ispiranju maternice donatorice kako bi se embriji prenijeli u maternicu primateljice koja je sinkronizirana s donatoricom. Međutim, u oko 50% donatorica nije došlo do gravidnosti, ili barem zametak nije pronađen. Kako je proces ispiranja skup, ovako rani test kobile 8 dana nakon ovulacije, spriječio bi

neproduktivno ispiranje maternice <http://www.veterinarypartner.com/Content.plx?P=A&A=2094&S=0&SourceID=69>). Još jedna prednost ovakvoga testa je utvrđivanje rane embrionalne smrtnosti odnosno mogućnost da se kobilica pravovremeno pripremi za novi estrusni ciklus ili umjetinim putem ubrza povratak u estrus, čime bi joj se dala prilika da opet koncipira (McKinnon i Voss, 1993). Terenski test za utvrđivanje gravidnosti na temelju EPF uveden je 2003. godine, međutim znanstvenim studijama je utvrđena njegova osjetljivost od samo 53%.

3. Hormonalni status srednje faze gravidnosti kobile

Endometrijske čašice (EČ) predstavljaju složenu mikrofizičku i kemijsku interakciju između fetusa i uterusa (Sharp, 2000). Formiranje EČ ostvaruje se na početku fetalne faze, između 36. i 38. dana nakon ovulacije, prodiranjem trofoblastičnih stanica korionskog pojasa u endometrij. Dva do tri dana nakon ulaska u materničnu stromu one se zaokružuju te diferenciraju u zrele stanice, a ispoljuju se kao bijele okruglaste nakupine na površini endometrija (Knottenbelt i sur., 2003). Stanice EČ su velike i okupiraju veći dio endometrijske strome, ali pri tome ne čine značajniju štetu uterinskim žljezdama premda je utvrđeno da su neke žlezde zadebljane i začepljene jer njihov lumen ometaju EČ (McKinnon i Voss, 1993). U svojoj zreloj fazi kada su najveće i najproduktivnije (oko 60. dana gravidnosti) diferencirane stanice su prepoznatljive kao okrugle, gotovo uvijek dvojezgrene stanice.

Uloga EČ je dvostruka, imunološki odgovor majke na prisutnost stanica EČ, te sinteza i izlučivanje hormona eCG (Daels i sur., 1998). Majčinski imunološki odgovor je prisutan gotovo od samog početka razvoja EČ, a manifestira se kao stanični i humoralni imunološki odgovor (u vidu antitijela). U krvi gravidne kobile se odmah nakon ulaska trofoblastičnih stanica u endometrij pojavljuju citotoksična antitijela koja nisu pronađena u pastuha i kobile koje nikad nisu pripuštane (McKinnon i Voss, 1993). U samom početku ovaj odgovor se manifestira u obliku akumulacije T-limfocita na periferiji EČ, što dovodi do masovne akumulacije T-limfocita, B-stanica, makrofaga i drugih leukocita u stromi oko EČ (Daels i sur., 1998). Vjerojatno EČ proizvode steroide koji im pružaju zaštitu (McKinnon i Voss, 1993). Između 70. i 80. dana gravidnosti, nakon što u središtu EČ dolazi do odumiranja i degeneracije stanica prevladavaju majčini limfociti (Allen, 2000), što rezultira potpunim uništenjem i odljuštavanjem EČ s površine endometrija. Vrijeme uništenja EČ je individualno, ali je obično u periodu od 100. do 140. dana gravidnosti. Endometrijske čašice su jedino placentarno tkivo koje se uništava na ovaj način.

Nameće se pitanje, da li je cijeli proces jednostavna lančana reakcija započeta invadirajućim stanicama bogatim antigenima koji uzrokuju imunološki majčini odgovor, te da li je "borba" između EČ i majčinskog imuniteta koja slijedi sama po sebi čimbenik koji određuje vrijeme regresije? Međutim, na pitanje koji čimbenik pokreće odumiranje stanica u središtu EČ još uvijek nema odgovora.

Korionski gonadotropin je hormon specifičan za gravidnost primata, te roda *equine* (Hoppen, 1994). Ovaj hormon može se naći u krvi kobile od 35. do 42. dana gravidnosti, a koncentracija doseže najvišu razinu između 55. i 65. dana gravidnosti, potom pada i u cijelosti nestaje iz seruma kobile između 100. i 150. dana gravidnosti (Makek i sur., 2009). Ovakva dinamika tijekom gravidnosti se podudara s tijekom razvoja i odumiranja EČ. Čini se da ne postoji hormonalna regulacija u sintezi i sekreciji eCG, već da su limitirajući čimbenici veličina i morfologija EČ. Korionski gonadotropin sastoji se od nekovalentno vezanih α i β podjedinica; α -podjedinica je po sastavu identična podjedinicama hormona hipofize LH i FSH, dok je β -podjedinica identična β -podjedinici LH. Razlika se očituje u glikolizaciji, eCG je najviše glikoliziran od svih glikoproteina (Hoppen, 1994), te ima učinak i FSH i LH hormona što u konačnici rezultira nastankom pomoćnih CL.

Nakon razvoja primarnog CL dolazi do stvaranja novih folikula (pod utjecajem hipofiznog FSH) koji izazivaju estrogenizaciju uterusa i učvršćivanja ploda (Makek i sur., 2009). Primarno CL je glavni izvor progesterona do 40. - 50. dana gravidnosti s istom ulogom do 120., odnosno do 150. dana gravidnosti (Hoppen, 1994). Nakon pojavljivanja eCG u krvi kobile dolazi do povećavanja primarnog CL, te se povećava proizvodnja progesterona. Između 40. i 70. dana iz jednog dijela novonastalih folikula nastaju sekundarna CL (koja nastaju nakon ovulacije), dok iz ostatka novonastalih folikula (od 40. do 150. dana) nastaju akcesorna CL (od neovullirajućih folikula), također pod utjecajem eCG. Broj pomoćnih CL je varijabilan i razlikuje se od kobile do kobile, u pravilu im broj raste od 40. do 150. dana gravidnosti, da bi se njihova potpuna regresija događa (uključujući i primarno CL) do 200. dana gravidnosti.

Stvaranjem pomoćnih CL dolazi do povećanja sadržaja hormona progesterona, ali i estrogena u krvi gravidne kobile (Allen, 2000). Koncentracija estrogena i progesterona iz lutealnog izvora, zbog stimulacije eCG, postepeno se smanjuje jer će tu ulogu preuzeti veza "fetus – placenta". Razina estrogena raste od 30. do 45. dana gravidnosti te ostaje ista do 64. dana kada sekreciju postepeno preuzima fetoplacentarni spoj (Makek i sur., 2009). Razvojem pomoćnih CL koncentracija progesterona raste između 40. i 60. dana gravidnosti, s najvišim vrijednostima od 10 ng/mL između 60. i 140. dana. Iz navedenog se da zaključiti da je uloga eCG poticanje formiranja

privremenog izvora gore navedenih steroidnih hormona u periodu kada fetoplacentarni spoj još nije dovoljno razvijen (Ginther, 1998).

Koliko je ključna uloga EČ i eCG u održavanju gravidnosti kobila još uvijek nije potpuno jasno. Jedna od teorija je da nemaju značajnu ulogu, te da predstavljaju samo evolucijski zaostatak. Ovu hipotezu donekle zagovara Allen (2000) što podupire istraživanjem u kojem je metodom ET (embriotransfer) magareći zametak inplantiran u kobilu što je rezultiralo izostankom stvaranja EČ i sinteze eCG, jer nije uslijedila invazija stanica korionskog pojasa u endometriju maternice. Unatoč toj činjenici 30% gravidnosti je opstalo a jedini uvjet za opstanak ploda bila je prisutnost primarnog CL.

Nekoliko dana nakon invazije stanica korionskog pojasa, neinvanzivne stanice trofoblasta počinju se širiti i sporo izdužujući alantokorion uspostavlja stabilnu vezu s luminalnim epitelnim stanicama endometrija. Tijekom idućih 20 sati deblji mikrovili alantokoriona formiraju interdigitalnu vezu s tanjim mikrovilima endometrija (poput preklapajućih prstiju). Ova interdigitacija odvija se između 38. i 40. dana nakon ovulacije (Allen, 2000). Stvaranje fetoplacentarnog spoja odvija se postepeno daljnjim granjanjem i debljanjem mikrovila. U konačnici 150. dana rezultira formiranjem potpunog fetoplacentarnog sklopa u obliku mikroplacentoma (Makek i sur., 2009). Mikrokotiledonska područja placente omogućavaju učinkoviti prijenos malih molekula između majke i fetusa. Mikrokotiledoni se manifestiraju kao tisuće struktura veličine 1 do 2 mm. Svaki mikrokotiledon je opskrbljen s prilično velikom arterijom s majčinjske strane i s ekvivalentom placentalne vene na fetusnoj strani. Važno je naglasiti da žlijezde maternice i dalje ostaju u funkciji oslobađajući proteinima bogate sekrete u dobro definiran prostor između mikrokotiledona. Na tim mjestima trofoblastne stanice su pseudo slojevite i posebno prilagođene da mogu apsorbirati egzokrini materijal da bi i na taj način prehranile fetus (Allen, 2000).

Iz svega navedenog može se zaključiti da je jedna od uloga placente, prehrana fetusa, odnosno razmijena tvari između fetusa i majke (hranjive tvari, plinovi, štetni produkti fetusa). Sukladno rastu fetusa i njegovih potreba za hranjivim sastojcima, raste i površina posteljice koja u konačnici prekrije cijeli dostupni prostor endometrija, kao i duljina resica. Bilo kakav čimbenik koji sprječava razvoj i rast posteljice može rezultirati rađanjem slabog i krhlog ždrijebeta, a u težim slučajevima i pobačajem. Zasad je još uvijek nepoznat mehanizam kojim se potiče interdigitacija s endometrijem, kao i proces rasta i modifikacije novonastale placente. Vjeruje se da su za glavni mitogenički impuls odgovorni lokalni faktori rasta i inzulinu sličan faktor rasta II kojega izlučuje trofoblast alantokoriona te druga fetalna tkiva kroz gravidnost. Placenta

je, uz navedeno, i endokrinološki organ. Ona luči više hormona: progestin, estrogen, relaksin.

Kobilja placenta ne sintetizira progesteron, već obilne količine *progestina* koji preuzima ulogu progesterona u održavanju gravidnosti tijekom srednje i kasne faze. Progestini se prvi put pojavljuju u krvi majke između 30. i 60. dana gravidnosti a koncentracija im ravnomjerno raste do 300. dana gravidnosti (<http://www.vivo.colostate.edu/hbooks/pathphys/reprod/placenta/equine.html>). Ako se izvrši ovariotomija na gravidnoj kobili između 100. i 140. dana gravidnosti neće doći do pobačaja, što ukazuje da u tom periodu placenta u potpunosti preuzima ulogu održavanje gravidnosti, između ostalog, svojim progestinom (Makek i sur., 2009).

U urinu kobile u fazi srednje i kasne gravidnosti nalaze velike količine *estrogena*. Proizvodnja estrogena u placenti ne bi bila moguća bez udijela fetusnih gonada. Naime od otprilike 80. dana gravidnosti kobile gonade fetusa, bilo muškog ili ženskog, počinju rasti da bi dosegle svoj maksimum 240. dana. Njihov rast polučan je hipertrofijom i hiperplazijom intersticijskih stanica u oba tipa gonada (Allen, 2000) zbog opskrbe placente s prekursorima potrebnim za sintezu estrogena. Prekursor je androgen dehidroepiandrosterone (DHA) koji se prenosi do placente putem krvi pupčanom vrpcom, a prevodi se u više različitih estrogena, ponajviše u *estron*, *equilin* i *equilenin*. Equilin i equilenin su karakteristični za porodicu *Equide* (<http://www.vivo.colostate.edu/hbooks/pathphys/reprod/placenta/equine.html>). Gonade fetusa vraćaju se u normalne proporcije tek u zadnjoj trećini gravidnosti (Allen, 2000). Razina estrogena u serumu i urinu kobile počinje rasti oko 60. dana gestacije, da bi najveću vrijednost dosegla oko 200. dana gravidnosti.

Placenta je kod kobile primarni izvor *relaksina*. Relaksin je polipeptidni hormon iz grupe inzulinu sličnih molekula. Placenta počinje sa sekrecijom relaksina oko 80. dana gravidnosti. Biološki, relaksin djeluje na strukturu veznog tkiva grlića maternice i pubične simfize omekšavajući ih, te sprječava kontrakcije maternice. Ukoliko navedena tkiva nisu izložena djelovanju estrogena relaksin će imati slabo djelovanje. Smatra se da relaksin djeluje i na rast tkiva mlječne žlijezde u zadnjoj fazi graviditeta. Iako su poznate funkcije relaksina u gravidnosti drugih vrsta životinja, kod kobila nisu dokazane sa sigurnošću.

3.1. Hormonalna dijagnostika u srednjoj fazi gravidnosti kobile

Hormonalan dijagnostika gravidnosti u srednjoj fazi gravidnosti temelji se na određivanju razine hormona estrogena i konjskog korionskog gonadotropina.

Tijekom prvih 35. dana ždrijebnosti razina ukupnih estrogena u perifernoj cirkulaciji slična je kao i u diestrusu, uz lagani porast. Značajan porast estrogena javlja se između 35. i 40. dana gravidnosti, zbog stvaranja pomoćnih folikula a zatim se razina snizuje (Davies Morel, 1999). Drugi rast estrogena javlja se između 60. i 100. dana gravidnosti kada doseže vrijednosti kao u estrusu, te nastavlja rasti između 180. i 240. dana nakon čega opada prema porodu (Makek i sur., 2009). U dijagnostici gravidnosti porast estrogena utvrđuje se nakon 80. dana, a pouzdanost testa najveća je nakon 150. dana (Ivanković, 2004). Količina estrogena može se odrediti u urinu (Lunaasovom metodom) i u serumu fecesa. Estrogeni, pošto se izlučuju iz fetoplacnetarnog spoja, ukazuju i na vitalnost ploda (Makek i sur., 2009).

Konjski korionski gonadotropin (eCG) primjenom laboratorijskih metoda može se utvrditi već od 38. pa sve do 120. dana gravidnosti tj. u periodu aktivnosti endometrijskih čašica. Međutim, zbog nepraktičnosti laboratorijskih metoda danas se gravidnost kobile na temelju prisutnosti eCG dokazuje pomoću imunoloških metoda. Primjenom brzih terenskih testova rezultati su vidjivi nakon 30 minuta s 95% točnošću (Makek i sur., 2009). Testovi se temelje na sposobnosti kompeticijskog vezanja eCG na crvena krvna zrnca (sprječavajući njihovu aglutinizaciju) ili prisutna antitijela dokazujući svoje prisustvo u serumu kobile. Postoje tri vrste testa kojima se može utvrditi prisutnost eCG u krvi kobile i time potvrditi njezino gravidno stanje. MIP test (engl. *mare immunologic pregnancy test*) se temelji na inhibiciji aglutinacije senzibilnih crvenih krvnih zrnaca, DLA test (engl. *direkt latex agglutination*) prilikom kojeg se, ako postoji eCG u serumu kobile, dolazi do aglutinacije čestica polistirina unutar dvije minute. ELISA test u kojem eventualno prisutni eCG služi kao antigen i veže se na pločicu s antitijelima. Ova metoda je zahvalna jer se može primjenjivati već od 40. dana gravidnosti, za razliku od prethodne dvije koje su učinkovite od 45. dana gravidnosti. Najveći nedostatak utvrđivanja gravidnosti preko eCG se očituje ukoliko nastane pobačaj nakon 35. dana kada su već uspostavljene EČ, jer će tada test biti lažno pozitivan. Lažno negativan test javlja se ukoliko se kobila testira prije 40.-og dana, odnosno nakon 120.-og dana gravidnosti.

4. Hormonalni status zadnje faze gravidnosti kobile

Obzirom na hormonalni status, zadnja faza gravidnosti započinje od 150. dana (Davies Morel, 1999). Tijekom ove faze graviditeta posteljica je glavni endokrinološki organ koji održava normalni tijek graviditeta svojom proizvodnjom gestagena, estrogena, relaksina i prolaktina. Zadnju fazu

graviditeta karakterizira regresija svih CL koja se javlja oko 180. dana gravidnosti, no točan uzrok ove pojave još uvijek je nepoznat. Posljedično s regresijom dolazi do pada razine progesterona te nakon 180. dana gravidnosti njegovu proizvodnju dalje nastavlja fetoplacentrani spoj. Prijašnja istraživanja su ukazala na pojavu tri nepoznata spoja između 30. i 60. dana gravidnosti. Kasnije je otkriveno da je riječ o progesteronskim metabolitima; 5α pregnan-3,20 dione (DHP), 3β -hidroksi- 5α -pregnan-20-one, 20α -hidroksi- 5α pregnon-3-one (Makek i sur., 2009). Zapravo, tijekom kasne gravidnosti koncentracija progesterona vrlo je niska. Iako placenta sintetizira progesteron (od fetalnog progesterona kojeg proizvodi njegova nadbubrežna žlijezda) on brzo metabolizira u navedene metabolite. Od navedenih prognerona, DHP ima visok afinitet prema gestagenskim receptorima. Deichsel i Aurich (2005) navode da je DHP biološki aktivan, te da utječe na mliječnu žlijezdu, miometriju i centralni živčani sustav. Davies Morel (1999) navodi da je riječ o inaktivnim metabolitima koji vezanjem na progesteronske receptore obavještavaju reproduktivni sustav o niskoj koncentraciji progesterona. Od 300. dana gravidnosti dolazi do naglog rasta razine ovih spojeva što uzrokuje daljnje mirovanje maternice unatoč njenom rastezanju zbog brzog rasta embrija (Deichsel i Aurich, 2005). Njihova razina naglo pada između 24. do 48. sati prije poroda.

Razine estrogena u zadnjoj fazi gravidnosti raste i postižu najveću razinu između 210. i 280. dana, od otprilike 8 ng/mL. Uglavnom je riječ o placentarnom equilinu i equileninu. Njihova koncentracija zatim pada da bi pred sam partus iznosila 2 ng/mL. Postoje dokazi da pred porod ipak dolazi do porasta 17α -estradiola, no unatoč tom porastu razina ukupnih estrogena je snižena (Deichsel i Aurich, 2005).

Koncentracija prostoglandina uglavnom je na istoj razini kao i tijekom rane gravidnosti. Međutim, prema partusu, vidljiv je njihov lagani porast, a značajnije povećanje javlja se tek pri samom partusu kada igraju značajnu ulogu u kontrakcijama miometrija.

Prolaktin je peptidni hormon kojeg izlučuje adenohipofiza (prednji režanj hipofize) čija je uloga vezana uz laktogenezu, poticaj i održavanje laktacije. Za vrijeme ždrijebljenja, izražene su povećane razine ovog hormona, a najveću razinu doseže 2 do 3 dana nakon partusa. Smatra se da je uključen i u pripremu kobile na partus (Deichsel i Aurich, 2005). Kako prolaktin potiče folikulogenezu u prijelaznom razdoblju kada kobila izlazi iz anestrusa i ulazi u estrusni ciklus, smatra se da u ovom razdoblju sudjeluje u poticanju ždrijebećeg tjeranja.

Relaksin u zadnjoj fazi graviditeta doseže najveću razinu oko 175. dana nakon čega lagano opada sve do 225. dana, te zatim raste prema partusu. Za razliku od drugih životinjskih vrsta, kod konja ne postoji nagli porast razine relaksina netom prije partusa. Uz svoje djelovanje na reproduktivni sustav neki smatraju utječe i na rast tkiva mlječnih žljezdi u zadnjoj fazi graviditeta (McKinnon i Voss, 2003).

4.1. Hormoni partusa kobile

Dinamika kretanja razine hormona tijekom graviditeta kobile u odnosu na druge vrste domaćih životinja razlikuje se prvenstveno po razinama progesterona (gestagena) i estrogena. Pred partusno razdoblje karakterizira nagli pad gestagena, kao i ukupnih estrogena. Inicijacija partusa u kobila još uvijek nije do kraja pojašnjena, no vjeruje se da je dijelom slična procesu uočenom u drugim vrsta domaćih životinja. Kod njih fetus potiče i kontrolira partus. Zbog hipoksije i pomankanja prostora u uterusu fetus je izložen stresu. Stres uzrokuje proizvodnju adrenokortikotropnog hormona (ACTH) u hipofizi koji potiče lučenje kortikosteroida, primarno kortizola u nadbubrežnim žlijezdama fetusa. Kortikosteroidi zatim dolazeći u placentu utječu na metaboličke put progesterona koji se konvertira u estrogen. Na taj način se ostvaruje specifičan pad progesterona uz rast estrogena pred partus. Također čini se da promjena metabolizma progesterona utječe na lokalnu produkciju PGF2 α kao i povećanje električnih impulsa kroz miometriju maternica, te se time inducira prva aktivnost miometrija i početak prve faze partusa-faza otvaranja (Deichsel i Aurich, 2005).

Glavni inicijator partusa i u kobile je stres fetusa, zbog kojega dolazi do otpuštanja kortikosteroida iz nadbubrežne žlijezde fetusa, ali ovaj put je riječ o kortizolu, a ne pregnenolonu kao prekursoru za proizvodnju progesterona. Vjerojatno zbog smanjene količine pregnenolona odnosno u konačnici gestagena neposredno prije poroda, nestaje njihov inhibirajući učinak na kontrakcije miometrija. Ovaj val kortizola utječe na završno sazrijevanje nekih unutarnjih organa primarno je riječ o respiratornom i probavnom sustavu. Također se pretpostavlja da utječe i na utero-placentarnu proizvodnju estroadiola 17 β , kao i na sintezu prostoglandina. Povećana koncentracija prostoglandina aktivira kontrakcije miometrija koje stimuliraju oslobađanje oksitocina putem neuroendokrinog refleksa. PGF2 α je čini se odgovoran za dilataciju cerviksa te prvu i drugu fazu partusa - faza istiskivanja ploda. Oksitocin također sudjeluje u snažnim kontrakcijama druge faze partusa, ali kontrolira i treću fazu - faza istiskivanja posteljice (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)

h.gov/pubmed/18704835). Oba hormona postižu maksimalne vrijednosti prilikom partusa, međutim na proizvodnju oksitocina također utječe sisanje ždrijebeta, kada oksitocin stimulira kontrakciju mliječnih alveola odnosno otpuštanje mlijeka, za razliku od PGF2 α koji se nakon partusa vraća na osnovnu razinu (Makek i sur., 2009).

5. Hormonalni disbalans i reproduktivna učinkovitost kobile

Utjecaj managementa kao vanjskog faktora na reproduktivnu učinkovitost konja je značajan. U prilog ovome ide činjenica da stope plodnosti divljih konja iznose 90%, dok je ta stopa u kobila parenih pod vodstvom čovjeka svega 60%. Ovakvo stanje posljedica je čovjekove veće posvećenosti selekciji konja nego njegovoj reproduktivnoj učinkovitosti. Pravilan i stručan menagment potreban je u svim faza reprodukcije konja, od pripreme kobile i pastuha na oplodnju, preko menagmenta same oplodnje, do gravidnosti. Neregularnosti tijekom bilo kojeg od ovih perioda može dovesti do slabe stope plodnosti. Od velike važnosti je menagment prilikom parenja, pravilno i pravovremeno otkrivanje estrusa, ovulacije (Davies Morel, 1999). Tako je istraživanjima utvrđeno da inseminacija kobile 24 sati nakon ovulacije dovodi do značajno više stope rane embrionalne smrti nego u kobila inseminiranih prije ovulacije. Mogući razlog mogao bi biti u promjenjenoj kvaliteti oocite koja utječe na životnu aktivnost embrija. Drugo objašnjenje je da kasnija inseminacija dovodi do proporcionalno kraćeg embrionalnog razvoja koji kompromitira sposobnost embrija da blokira luteolizu. Ovu hipotezu dokazuje činjenica da su embriji, pri kasnijoj inseminaciji, manji u odnosu na embrije kobile koje su osjemenjene prije ovulacije. Istraživanja su pokazala da nema razlike u stopi rane embrionalne smrti između kobile inseminiranih prije ovulacije u odnosu na inseminaciju unutar 6 sati nakon ovulacije.

U današnje vrijeme postoji vrlo jaki pritisak na uzgajivače da se ždrijebad oždrijebi što ranije. Iz tog razloga kobile se pripušta rano, u razdoblju ulaska u sezonu tjeranja kad ciklička aktivnost jajnika još nije dovoljno uspostavljena. Stoga, uzgajivači raznim tretmanima potiču raniji ulazak kobile u estrus što rezultira slabijim stopama fertilitnosti (Davies Morel, 1999). Tako je u kobila koje se oždrijebe ranije u godini zamjećen duži interval između partusa i prve ovulacije, kao i pojava neaktivnih jajnika nakon nje. Time se još jednom stavlja naglasak na fotoperiod, odnosno prirodnu regulaciju reproduktivnog ciklusa, kao glavnog čimbenika poticanja aktivnosti jajnika.

Kondicija kobile igra važnu ulogu utječući na postporođajnu aktivnost jajnika. Interval do druge ovulacije povećan je u kobila slabe kondicije, razina

LH tijekom ždrijebećeg tjeranja je smanjena, a takve kobile imaju slabije izražene znakove estrusa (Nagy i sur., 1998). Za sve priplodne kobile bitno je izbjegavanje stresnih čimbenika, kao npr. uvođenje novih životinja u stado, kompeticija za izvor hrane i slično. Utvrđeno je da stres izazvan odbićem, izraženom boli ili bolestima rezultira sa 30–50% manjom proizvodnjom progesterona u gravidnih kobila (Vanderwall, 2008).

5.1. Unutarnji faktori koji utječu na reproduktivnu učinkovitost kobile

Unatoč fiziološki normalnom estrusnom ciklusu u neke kobile ne pokazuju znakove estrusa, te se takav estrus naziva "tihi estrus" ili "tiho gonjenje". Primjenom umjetnog osjemenjivanja ova pojava ne uzrokuje velike probleme, ali u prirodnom pripustu predstavlja ozbiljan problem. Uočena je veza između sekrecije progesterona i estrogena u predovulacijskom periodu i ekspresiji estrusa. Razina cirkulirajućeg estradiola 17β značajno je niža kod kobila u tihom estrusu nego kod kobila s normalnom ekspresijom estrusa. Također kobile u tihom estrusu imaju značajno duži period između potignute maksimalne razine estradiola 17β i ovulacije. Za indukciju regresije aktivnog CL često se kobile tretiraju sa prostoglandinima, upravo takve kobile pokazuju sklonost k tihom gonjenju (McKinnon i Voss, 1993). Crowell-Davis (2007) navodi da na tihi estrus utječu i socijalni faktori, kao što je inhibicija estrusnog ponašanja u podređenih kobila u prisustvu dominantne kobile. Kobile također iskazuju i naklonost ili odbojnost prema određenim pastusima. Neki uzgajivači kobile sklone "tihom gonjenju" tretiraju s egzogenim estrogenima, na taj način postiže se željeno seksualno ponašanje i prihvaćanje pastuha te izbjegava njegovo moguće ozljeđivanje. Uspjeh takvih tretmana je neprovjeren, nepouzdan i može rezultirati neželjenim posljedicama, kao što je usporen ili ubrzan transport embrija kroz jajaovod što dokazano utječe na održivost embrija u drugih vrsta životinja, može zrokovati promjene na endometriju i prekid gravidnosti. S druge strane primjena egzogenih estrogena nešto prije pripusta povećava broj spermatozoida u jajovodu ovce i zečice. U svakom slučaju, dosadašnje znanje o efektima aplikacije egzogenih estrogena nije dovoljno da bi se takav tretman preporučio (McKinnon i Voss, 1993).

Hormonalne abnormalnosti iskazuju se ukoliko dođe do neravnoteže u vezi "hipotalamus-hipofiza-jajnik". Najviše hormonalnih nedostataka je uzrokovano abnormalnostima hipofize. Potpuno zakazivanje hipofize (neoplazija) je rijetka, međutim može doći do privremene nefunkcionalnosti koja se najčešće ispoljava na početku ili pri kraju sezone tjeranja. U tijeku tog tranzicijskog razdoblja može doći do odgođenog/produženog estrusa ili tihih ovulacija. Očito je

potrebno određeno vrijeme da se ciklus stabilizira na uobičajenih 20 do 22 dana tijekom sezone parenja. Uzrok se dijagnosticira kroz ponašanje kobile, nemogućnost detektiranja estrusa ili s druge strane očit kontinuiran estrus, te uz pomoć rektalne palpacije jajnika. Ovakvi poremećaji su danas sve očitiji zbog ljudskih pokušaja da se kobile pare što ranije u sezoni (Davies Morel, 1999).

Zbog razvoja tehnika biopsije uterusa i korištenje endoskopa, postignuto je bolje razumijevanje promjena unutar uterusa. *Hipoplazija* je termin koji predstavlja nedovoljno razvijenu maternicu za održavanje gravidnosti. Ovaj poremećaj najviše utječe na endometrijske žlijezde koje postaju premalene i nedovoljne za održavanje gravidnosti. Posljedično tome stopa embrionalne smrtnosti je visoka. Ovakvo stanje javlja se u kobilama koje su prerano parene, prije 18 mjeseci starost, ili kao rezultat produžene involucije maternice nakon partusa, ali može biti i posljedica kromosomskih abnormalnosti. Da bi se utvrdilo napredovanje involucije maternice primjenjuje se rutinski unutarnji pregled 48 do 96 sati nakon partusa. U slučaju da se pari kobila kod koje se maternica nije vratila u početno stanje puno je veća vjerojatnost da će doći do infekcije što smanjuje šanse za uspješnu gravidnost. Infekcije uterusa mogu uzrokovati trajnu hipoplaziju.

Najčešći uzrok infertilnosti kobile su infekcije uterusa, obično je riječ o *endometritisu*. Reproductivni sustav kobile nije u stanju lagano ukloniti infektivni organizam, gnoj i eksudate nastale infekcijom. Iz tog razloga može se razviti kronična infekcija koja, ako se pravovremeno ne uoči i ne liječi, može u konačnici rezultirati trajnom infertilnošću. Glavni uzrok infekcije je nedovoljna briga o higijeni prilikom pripusta ili pri internom pregledu reproductivnog sustava kobile. Veliki problem kod infekcija maternice je mogućnost neotkrivanja kroz duži period, time ne samo da se utječe na plodnost kobile već ona dalje širi svoju infekciju, preko pastuha na druge kobile. Zbog toga je poželjno uzimanje brisa kobile kako bi se infekcija uočila na vrijeme. Endometritis karakterizira povećan količina sluzi koja često curi iz vulve, visoki broj leukocita u krvi i povećana opskrba uterusa krvlju. U slučaju da se pojavi edem, rektalnom palpacijom se osjeti da je uterus uvećan i flacidan. Estrusni ciklus kobile može biti također skraćen, jer zbog iritacije endometrija prerano dolazi do sekrecije PGF2 α i regresije CL. Razlikujemo tri osnovna tipa i infekcija; akutni, kronični i septični. *Akutna infekcija* se razvija naglo sa simptomima koje karakterizira iregularni estrusni ciklus i dokazi gnoja na repu kobile. Infekcija uzrokuje dubinsko krvarenje, degeneraciju luminalnih epitelnih stanica, a u teškim slučajevima i degeneraciju strome. Infektivne čestice dolaze u konatakt s reproductivnim sustavom kobile direktno preko penisa prilikom

pripusta, a do infekcije dolazi zbog zatajenja odgovarajućeg imunološkog odgovora kobile. Liječenje akutnog endometritisa počinje s pokušajem da se koregira bilo kakva fizička abnormalnost reproduktivnog sustava. Sama infekcija se tretira s uterinskom infuzijom antibiotika šitokog spektra ili antiseptika u 400 do 500 mL sterilne slane otopine. *Kronična infekcija* uterusa (pirometra) je relativno rijetka i uobičajeno se razvije iz akutne infekcije. Uzrok kornične infekcije može biti i trošenje i oštećenje maternice. Kobile obično djeluju zdravo, ali često ne ulaze u estrusni ciklus zbog nemogućnosti uterusa da proizvede PGF2. Obično se liječi infuzijom ili inekcijama antibiotika ali rezultati su loši. *Septična infekcija* je najozbiljniji oblik infekcije uterusa. Glavni uzrok je propadanje dijelova zaostale posteljice i tkiva ploda nakon partusa. Infekcija se brzo širi a apsorbacija toksičnih produkata može dovesti i do smrti kobile. Najbolji lijek je prevencija, odnosno adekvadan pregled uterusa nakon partusa da se utvrdi kompletno izbacivanje posteljice i lohija, kao i apsolutna higijena pri partusu (Davies Morel, 1999). *Folikularna atrezija* jedan od poremećaja koji koči ovulaciju. U tim slučajevima određeni folikuli se razvijaju do veličine od 3 cm, međutim niti jedan se ne razvije u dominantni i time ne dolazi do ovulacije. Folikularnoj atreziji doprinose tumori granuloznih stanica, ovarijske ciste, infekcije uterusa i nedostantna hranidba. Često kada se uspostavi estrusni ciklus problem nestane. *Perzistentnost i zatajenje CL* su također uzroci infertiliteta kobile. Perzistentnost CL je puno uobičajenija pojava i važan uzrok anestrusa u kobilama. Do ovog poremećaja dolazi zbog zatajenja u endometrijskoj sekreciji PGF2 α ili nemogućnosti CL da reagira na taj hormon. Na ovaj problem ukazuje nedostatak estrusnog ponašanja, a potvrđuje se rektalnom palpacijom. Jedan od uzroka može biti infekcija uterusa kao i embrionalna smrt nakon uspostavljanja endometrijskih čašica. Ovaj problem se uglavnom uspješno rješava aplikacijom PGF2 α . Uzrok anestrusa također mogu biti ovarijske ciste koje se izgledom manifestiraju kao grozdasta nakupina. Ciste na granuloznim stanicama su najučestaliji tumor koji se javlja na jajnicima i značajan uzrok anestrusa u kobile. Obično se javljaju kod kobila u dobi od 5 do 7 godina starosti i to na jednom jajniku. U ovim slučajevima potrebno je odstraniti problematični jajnik, te će preostali uspostaviti normalnu reproduktivnu aktivnost. Infekcije i bolesti jajnika su vrlo rijetke uglavnom probleme izazivaju tumori, ciste i deformacije a ne patogeni organizmi (Davies Morel, 1999).

Reproduktivni sustav kobile rijetko može održati više od jednog fetusa s uspješnim ishodom. Bližnjenje uzrokuje manjak prostora u uterusu što često dovodi do smrti jednog od fetusa uglavnom zbog limitirane veličina placente i nedovoljne opskrbe oba ploda potrebnim nutrijentima. Zbog takve restrikcije dolazi ili do spontanog pobačaja jednog ili oba ploda ili do mumifikacije

manjeg ploda koji pri partusu biva izbačen iz tijela majke. Preživjelo ždrijebe imat će manju porodnu masu i biti boležljivije. Ako se detektiraju rektalnom palpacijom u ranoj gravidnosti, obično se potakne abortus injekcijom PGF2 α . Točni postotak bližnjenja nije poznati, ali se zna da otprilike u 25% slučajeva se u estrusnom ciklusu mogu naći dva dominantna folikula, međutim stopa bližnjenja nije toliko visoka što upućuje da ipak jedan dio tih dominantnih folikula regresira ili ne ovulira pravovremeno za oplodnju (Davies Morel, 1999).

Postotak rane embrionalne smrtnosti se kreće od 5 do 25% od čega se 55% dogodi do 40.-og dana gravidnosti, a 75% do 50.-og dana gravidnosti (<http://www.vetmed.wisc.edu/data/coursematerial/bosu/ER-lecture8-nopics.pdf>). Razlozi embrionalne smrti su mnogobrojni i raznoliki kao što se već dalo zaključiti iz različitih mogućih abnormalnosti reproduktivnog sustava, kao i neadekvatnog menagmenta. Znamo da je za prelazak embrija iz jajnika u maternicu odgovorna njegova sekrecija PGE2, što znači da u slučaju da embrij ne uspostavi tu sposobnost sekrecije doći će do njegovog propadanja kao što je slučaj s neoplođenim jajnim stanicama. Zbog važnosti jajovoda kao okoliša za razvoj embrija, lezije zasigurno igraju ulogu u preživljavanju embrija u ovoj fazi razvoja. Endokrinološki vrlo je važno održanje potrebne razine progesterona koji čuva gravidnost. Do snižene razine progesterona, koja u konačnici uzrokuje embrionalnu smrt, može doći zbog više razloga kao što su poremećaji u procesu majčinskog prepoznavanja gravidnosti, prerana luteoliza primarnog CL zbog iritacije endometrija ili nedovoljna sekrecija progesterona od strane primarnog CL (McKinnon i Voss, 1993). Jedan od razloga rane embrionalne smrti u periodu migracije embrija kroz uterus može ležati u njegovom pretjeranom lučenju PGF2 α (Allen, 2000). Mjesto intrauterinske fiksacije embrija je također važno za njegovo preživljavanje. Iako nije uobičajeno, do fiksacije može doći u tijelu uterusa, umjesto u bazi jednog od uterušnih rogova. Istraživanja su pokazala da ukoliko se embrij fiksira u kaudalnom dijelu uterusa u blizini cerviksa dolazi do vrlo visoke stope rane embrionalne smrti (72%). Razlog ovoj pojavi zasad nije utvrđen. Za razvoj i prehranu embrija u uterusu, do uspostavljanja placente, odgovorne su uterinske žljezde koje stimulira progesteron, što još jednom naglašava važnost progesterona u održavanju gravidnosti, ali i važnost zdravog endometrija za preživljavanje embrija (McKinnon i Voss, 1993). Sa stajališta uzgajivača je vrlo važno u kojem trenutku nastupi embrionalna smrt, odnosno abortus. U slučaju da plod uginje prije nastajanja endometrijskih čašica (36. - 40. dana) kobila uspostavlja novi estrusni ciklus u roku od mjesec dana. Međutim u slučaju da do uginuća dođe nakon formiranja endometrijskih čašica nastavit će

se proizvodnja eCG i time doći do formiranja pomoćnih žutih tijela, pa stoga do estrusnog ciklusa ne dolazi sve do njihove regresije odnosno za koja 3 mjeseca. Još jedna neugodna nuspojava je što će u tom slučaju testa na gravidnost, koji se temelji na razni eCG, biti lažno pozitivan (Makek i sur., 2009). Logika nalaže da bi i laktacija kao veliki potrošač energije i/ili zbog specifičnog hormonalnog statusa kobile prilikom laktacije ona također mogla utjecati na preživljavanje zametka. Međutim dvije studije na terenima nisu ustanovile značajne razlike u stopi embrionalne smrtnosti između laktirajućih i nelaktirajućih gravidnih kobila. S druge strane postoje novija istraživanja kod kojih je ustanovljena viša stopa rane embrionalne smrtnosti u laktirajućih kobila u odnosu na nelaktirajuće kobile. Očito zasada nema sigurnih dokaza o utjecaju laktacije na preživljavanje embija (Vanderwall, 2008).

6. Manipulacija hormonima u reproduktivnim tehnikama

6.1. Upravljanje estrusnim ciklusom

Kobila je životinja dugog dana kojoj sezona tjeranja na sjevernoj polutki traje od travnja do studenog, a na južnoj od listopada do svibnja. Uzgajivači punokrvnjaka, a sve češće i ostali, registriraju ždrijebe 1. siječnja u godini bez obzira na stvarni datum ždrijebljenja. U industriji trkaćih konja je stoga najpogodnije da se kobila ždrijebi netom nakon 1. siječnja u godini kako bi ždrijebe postiglo svoj maksimum. Pošto gravidnost traje 11 mjeseci, da bi ždrijebljenje nastupilo u prvom mjesecu, pripust bi se trebao vršiti u veljači. Nametnuta sezona tjeranja bi stoga trebala početi dva mjeseca prije nego prirodna. I druga uzgajivačka društva imaju tendenciju nametanja sezone tjeranja kobile ranije, kako bi ždrijebad postigla maksimalnu veličinu za prezentaciju na raznim "prezentacijama" i tako povećali njihove šanse za uspjeh. Postoji više načina na koje se može ranije inducirati sezona tjeranja u kobile: tretman svijetlom, hormonalni tretman i kombinirani tretmani.

U intenzivnom uzgoju kobile u samo 10% kobile javlja se estrus i ovulacija izvan sezone tjeranja. Taj postotak je značajno manji u ekstenzivnom uzgoju. Pod tretmanom svijetla, hranidbe i uz prisustvo pastuha postotak estrusa i ovulacija izvan sezone značajno raste. Od svih navedenih vanjskih čimbenika najbitniji je svijetlo. Uobičajeni omjer svijetla i mraka za posticanje estrusa je 16 h svijetla naspram 8 h tame, što se može primjeniti naglo ili postepeno. Početak tretmana može početi od studenog uz uvjet da je kobila prethodno iskusila jesensku redukciju svijetla. Unutar četiri tjedna, ako se sa svjetlosnim tretmanom počelo rano u prosincu, doći će do proljetnog linjanja kobile, a dva

do četiri tjedna nakon toga započet će folikularna aktivnost. Općenito, što se ranije u godini započne sa svijetlosnim tretmanom to je duži interval do prvog estrusa i ovulacije. Međutim, teško je inducirati ovulaciju prije veljače. Uobičajno je da induciranje počinje rano u prosincu, što rezultira aktivnošću jajnika u veljači. Noviji radovi ukazuju da u konja postoji fotosenzibilan period koji se javlja između 1 i 3 ujutro, te ako se kobilica 8 sati nakon sumraka tretira s jednim satom svijetla, doći će do istog efekta kao i u režimu 16 h svijetla naspram 8 h tame. Međutim u praksi je lakše izvediv tretman 16 h svijetla naspram 8 h jer je vrijeme sumraka varjabilno. Iako je ovaj tretman vrlo učinkovit, vrijeme reakcije kobile na njega vrlo je varjabilno i individualno. Navedenu varjabilnost mogu smanjiti hormonalni tretmani (Davies Morel, 1999).

Korištenje *egzogenih hormona* kao sredstvo poticanja tjeranja izvan sezone pokazalo se vrlo učinkovito kod ovaca. Hormoni poput eCG, hCG i FSH nisu učinkoviti ili su slabo učinkoviti u tretmanu kobilica. Međutim uporaba neprerađenog ekstrakta hipofize kroz period od dva tjedna potiče aktivaciju estrusnog ciklusa kobilica u anestrusu. Svi hormoni koji se koriste za poticanje aktivnosti jajnika su uspješni samo u tranzicijskom razdoblju. Hormon *GnRH* je odgovoran za indukciju hipofize na sintezu i sekreciju FSH i LH. Bilo koji način primjene GnRH pokazao se donekle uspješan u poticanju aktivnosti jajnika kobile. *Progesteron* se također pokazao pouzdan ali kao što je već rečeno samo na kobilicama u tranzicijskom razdoblju. Poznato je da pad koncentracije progesterona potiče sekreciju FSH i LH koji potiču razvoj folikula i u konačnici ovulaciju. Znači ako se progesteron umjetno aplicira kobilici i zatim postepeno mu se smanjuje razina (oponašajući prirodno smanjenje), inicira se povećanje razine FSH i LH. Tretman se provodi kroz period od 10 do 12 dana, a od 7. do 10.-og dana nakon tretmana dolazi do estrusa i ovulacije. Umjetni progesteron primjenjuje se oralno ili intramuskularno (*injektivno*). U novije vrijeme koriste se progesteronske intravaginalne spužvice natopljene prirodnim progesteronom. Prednost spužvica je brže postizanje estrusa i ovulacije, već nakon 2 do 4 dana u odnosu na 8 do 10 dana nakon oralne aplikacije umjetnog progesterona. Također je potreban manji angažman. Manjkavost je ta što se spužvica može zagubiti i uzrokovati vaginitis koji premda ne utječe na koncepciju, narušava izgled kobile. Premda oralna primjena ne zahtjeva angažman veterinaru, ima svoje mane. Umjetni progesteron se treba mješati s hranom, a neke kobile odbijaju takvu hranu ili ne pojedu cijelu količinu, te se ne zna točan unos progesterona. Tretman progesteronom nije pogodan za dugotrajnu primjenu jer se povezuje sa smanjenom proizvodnjom neutrofila u reakciji tijela na bakterijske infekcije. Od prostoglandina se koristi *PGF2 α* koji

je odgovoran za regresiju CL, a time i početak novog ciklusa odnosno estrusa. Primjenjuje se u serijama od dva do tri injektivna tretmana u 48 satnim intervalima. Ovaj tretman u 73% kobile rezultira ovulacijom. Negativna strana ovog tretmana su moguće nepoželjne nuspojave. Hormon PGF2 α aktivira glatko mišićje pa može doći do dijareje, znojenja i lagane kaudalne ataksije. Nepoželjne pojave su minimalne ili ih uopće nema ako se pridržava preporučene doze pri primjeni ovog hormona. U svrhu poticanja sezone tjeranja koristi se i *prolaktin*. Točna priroda povezanosti između prolaktina i sezone tjeranja nije sasvim razjašnjena. Međutim za sezonu tjeranja je karakteristična povišena razina prolaktina uz sniženu razinu dopamina. Tretiranjem kobila u anestrusu s prolaktinom rezultira naglim folikularnim razvojem. Također ako se kobile u tranzicijskom razdoblju tretira s dopamin antagonistima kao što je to domperidone, ovulacija često nastupi ranije u godini. Međutim, ne reagiraju sve kobile očekivano, a vrijeme reakcije na tretman je varijabilan. Bolji rezultati postižu se u kombinaciji sa svjetlosnim tretmanom koji se primjenjuje dva tjedna prije primjene dopamin antagonista. Nijedan od ovih protokola tretmana se ne koristi u praksi, ali možda baš u njima leži ključ buduće hormonalne manipulacije estrusnog ciklusa u kobila (Davies Morel, 1999).

Iako se korištenja svijetla u indukciji estrusa ranije u godini pokazalo vrlo uspješnim vrijeme reakcije na tretman je vrlo varijabilno. S druge strane hormonalna terapija je učinkovitija i vrijeme reakcije je zadovoljavajuće, međutim djeluje samo ukoliko su kobile u tranzitnom razdoblju. Kombinacijom ova dva tretmana bi stoga moglo otkloniti nedostatke pojedinačnih tretmana. Tretman svijetla se u tom slučaju koristi za prevođenje kobile u tranzitno razdoblje, a hormonalni tretman za usklađivanje pojave estrusa i ovulacije. Obično je riječ o kombinaciji svjetlosnog režima (*16 sati svijetla i 8 sati tame*) s 10 do 15 dana primjene progesterona. Neki od najboljih rezultata bili su postignuti korištenjem sličnog režima s primjenom PGF2 α . Prvih 6 do 8 tjedana (*u studenom ili prosincu*) primjenjuje se svjetlosni režim (*16 sati svijetla naspram 8 sati tame*) zatim slijedi desetodnevna primjena progesterona (*sredina siječnja*), nakon čega se idućih 10 dana aplicira PGF2 α koji potiče luteolizu CL. U 82% slučajeva kobile ovuliraju 9 do 16 dana nakon tretmana i koncipiraju u 65% slučajeva. Iako ima mnogo načina da se potakne sezona tjeranja odnosno ciklička aktivnost jajnika, većina ih je preskupa i/ili zahtjeva previše vremena za primjenu u komercijalnom uzgoju. U praksi se većinom koristi svjetlosni tretman uz povećani udio energije u hranidbi kobila, te oralnom primjenom progesterona u tranzitnom periodu (Davies Morel, 1999).

6.2. *Supresija estrusnog ciklusa*

Estrusna aktivnost se često veže uz slabu koncentraciju i spremnost na rad, a samim time i lošim preformansama kobile. Najdrastičniji način supresije estrusnog ciklusa je ovariotomija koja je ireverzibilna. Alternativa je hormonalna manipulacija. Poznato je da je u diestrusu prisutna visoka razina progesterona, stoga umjetnom primjenom progesterona se diestrus može produžiti i time obustaviti ciklička aktivnost jajnika, odnosno pojava estrusa. Najnovija istraživanja također ukazuju da i umetanje male staklene kuglice (promjera 25 – 35 mm) u maternicu produžava život CL. Ona simulira ranu fazu gravidnosti kobile svojim kontaktom s površinom endometrija. Nadalje u teoriji bi se mogla onemogućiti ciklička aktivnost jajnika blokiranjem GnRH i njegovog utjecaja na hipofizu. Manipulacija estrusnog ciklusa kobile ne omogućuje predviđanje točnog vremena kada će nastupiti ovulacija. Međutim, dokazano je da manipulacija estrusnog ciklusa ne utječe značajno na stopu koncepcije. Mnogi navedeni hormonalni režimi zapravo smanjuju nasumičnu pojavu ovulacije u populaciji kobila nego što omogućavaju točno predviđanje vrijeme ovulacije. Unatoč tome manipulacija estrusnog ciklusa omogućava da se u tijekom kraćeg perioda vrše pregledi i testiranja jajnika što uvelike smanjuje radne troškove (Davies Morel, 1999).

6.3. *Embriotransfer*

Embriotransfer je biotehnološki postupak u reprodukciji kojim se zametak, dobiven transvaginalnim ispiranjem davateljice sedam dana nakon ovulacije, prenosi u maternicu sinkronizirane primateljice koja gravidnost iznosi do kraja. Postotak uspješnosti ovog zahvata se kreće između 65 i 80% (Hajčić i sur., 2008). Prvi uspješan embriotransfer u konja je obavljen u kirurškim putem u Japanu 1974. godine. Zadnjih 15 godina ostvaren je značajan napredak po pitanju uspješnosti embriotransfera, a razvile su se i nekirurške metode postupka (Davies Morel, 1999). Jedna od važnijih prednosti ovog zahvata je mogućnost dobivanje ždrijebadi od zametka starih vrijednih grla koje nisu u stanju zanjeti ili održati gravidnost. Embriotransfer također omogućava i učinkovitiju reprodukciju iznimno vrijednih kobila. Također, kobile koje sudjeluju u sportskim natjecanjima ne moraju propustiti sezonu da bi vlasnici dobili ždrijebe. Embriotransfer, također omogućava dobivanje ždrijebadi mlađih kobila nego što je to uobičajnije, znači od dvogodišnjih davateljica (Hajčić i sur., 2008). Za uspješan embriotransfer potrebno je sinkronizirati estrusni ciklus davateljice i primateljice, što se obično postiže egzogenom hormonalnom

terapijom. Nedavna istraživanja pokazuju se najbolji rezultati postižu ako kobila primateljica ovulira 24 sata nakon kobile davateljice, kompenzirajući tako bilo kakva moguća oštećenja embrija prilikom embriotransfera.

Sinkronizacija davateljice i primateljice se odvija na sličan način pomoću PGF2 α koji se može kombinirati s humanim korionskim gonadotropinom (engl. *human chorion gonadotropin*, hCG). U embriotransferu se teži istovremenom sakupljanju što više embrija davateljice što se postiže superovulacijom (poliovulacije). U kobila je stopa uspjeha superovulacije značajno manja, u odnosu na druge domaće životinje, a glavna kočnica je pronalaženje adekvatnog hormonalnog sredstva. Određeni uspjeh je postignut primjenom ekstrakta hipofize, komercijalno poznatog kao *Pitropin*. Nadalje postignuti su određeni rezultati i korištenjem humanog menopauzalnog gonadotropina (engl. *human menopausal gonadotrophin*, HMG). Nažalost, učestalo korištenje hCG kroz tri ili više spolnih ciklusa rezultira imunizacijom kobile te gubi svoju svrhu. Stoga ga se ne bi smjelo koristiti više od jednom ili dvaput tijekom rasplodne sezone. U svrhu poticanja ovulacije može se koristiti i eCG međutim on nije komercijalno dostupan (Hajčić i sur., 2008). Primateljice se tretiraju slično kao davateljice, ali bez pokušaja poticanja superovulacije i pripusta. Međutim potrebno je izvršiti rektalni pregled kako bi se potvrdila sinkronizacija i pravovremena ovulacija (Davies Morel, 1999).

Specifičnosti gravidnosti kobile pomažu ali i odmažu prilikom embriotransfera. Činjenica da je embrij kobile prvih 20 dana odvojen od maternice i okružen kapsulom osigurava da su štete za embrij i davateljicu svedene na najmanju moguću mjeru prilikom transfera. Međutim pošto je kod kobile teško izazvati superovulaciju provodi se i alternativa u vidu bisekcije embrija kojim se dobivaju dva identična embrija-blizanca (Davies Morel, 1999). Za bisekciju je potreban embrij u fazi morule. Varijabilno vrijeme boravka embrija u jajovodu i faze ulaska embrija u maternicu (morula/mlada blastocista) uvjetuje nisku stopu uspješne ekstrakcije. Problem se očituje i prilikom dubokog zamrzavanja embrija gdje također na uspješnost utječe stadij embrija, što je embrij stariji to je manja šansa za uspjehom (Allen, 2000). Bez dubokog zamrzavanja embrija komercijalna uporaba embriotransfera ne može oživiti stoga su potrebna daljnja istraživanja (Davies Morel, 1999).

Primjena tehnologije ET omogućuje uzgajivačima dobivanje podmlatka i od starijih kobila, bez da ih se izlaže nepotrebnim situacijama. Jajne stanice starijih kobila nisu toliko pouzdane u postupku ET kao jajne stanice mladih konila (Davies Morel, 1999). Iako su daljnja istraživanja klasificirala tipove degeneracija i/ili svojstvene morfološke defekate prisutne u oocitama starijih

kobila, još uvijek nije utvrđeno kako i kada nastupaju te specifične abnormalnosti koje utječu na razvoj embrija (Vanderwall, 2008).

6.4. Dodavanje egzogenog progesterona

U slučaju kada unatoč prisustvu zameka u uterusu dođe do regresije CL nužno je dodavanje egzogenog progesterona. Također ako se ustanovi da je embrij premalen za svoj stadij razvoja, opravdano je korištenje egzogenog progesterona. Isto vrijedi i ako se klinički dokaže postojanje endotoksije zbog prisustva teške bolesti, koje može uzrokovati embrionalnu smrt zbog štetnog djelovanja endotoksina koji potiču sintezu PGF_{2α}. Progesteronska terapija se prekida između 100. – 120. dana kada se uspostavi u potpunosti funkcionalni fetoplacentarni spoj. Trenutno na tržištu ne postoji komercijalni progesteron za kobile. Koriste se u pravilu dva preparata, sintetski progestin *altrenogest* dnevnom oralnom primjenom 0,44 mg/kg i progesteron u ulju dnevnom intramuskularnom primjenom 0,2-0,3 mg/kg. Iako su se oba preparata pokazala učinkovitima kao vanjski izvor progesterona, njihova najveća mana je potrebna dnevna primjena. Sve je veći interes za preparatima progesterona koji se mogu primjenjivati na tjednoj ili dužoj bazi. U tu svrhu se čak koristio i sintetski dugotrajni progestin namjenjen za žene, međutim nije pokazao rezultate bez endogenog izvora progesterona. Nedavno je dokazano da intramuskularnom primjenom komponente dugotrajne formulacije koja sadrži 1,5 grama progesterona svakih sedam dana pruža dovoljnu količinu progesterona za održavanje gravidnosti kojoj nedostaje njegov endogeni izvor (Vanderwall, 2008).

6.5. Indukcija ždrijebljenja

Dužina gravidnosti kobile varijabilnija je nego u drugih domaćih životinja u kojih se primjenjuje indukcija partusa. Indukcija partusa obično se koristi kao pomoć u menagmentu partusa kako bi se na vrijeme osigurala spremnost osoblja i prostorija. Naravno, indukcija se koristi u hitnim slučajevima poput povreda zdjelice kobile, produžene gravidnosti, kolika pred partus, izrazito bolnih zglobova ili kostiju u kasnoj gravidnosti. U konačnici može se koristiti u znanstvene i edukacijske svrhe (Davies Morel, 1999). Induciranje poroda se unatoč navedenim razlozima preporuča samo u iznimnim situacijama, kao što su po život opasne situacije za kobilu ili ždrijebe.

Da bi se pristupilo indukciji poroda moraju biti zadovoljeni određeni uvjeti koji upućuju na spremnost kobile i ploda na partus. Jedan od uvjeta je

trajanje gravidnosti, koje bi trebalo biti minimalno 330 dana. Međutim i tada se trajanje gravidnosti gleda samo u kobinaciji s drugim znacima. Najvažniji znak spremnosti kobile i ploda na partus je razvijenost mamarnih žlijezda te početna sekrecija kolostruma. U kobila koje su bređe prvi put ne dolazi do značajnog razvoja mamarnih žlijezda i proizvodnje kolostruma do neposredno prije partusa, što treba uzeti u obzir. S druge strane kod kobila koje nose blizance može doći do uranjenog razvoja mliječnih žlijezda i laktacije. Jedan od potrebnih uvjeta je i proširenje cerviksa premda je taj preduvjet dosta diskutabilan (Bleeker i sur., 2001). Naime, vrijeme kada nastupi proširenje cerviksa kao i veličina proširenja značajno varira između kobila. Unatoč tome proširenje cerviksa kao i relaksacija pelvisa, te relaksacija vulve dobri su znaci prepartusne faze. Upravo zbog te varijabilnosti između kobila u iskazivanju prepartusnih znakova pravovremena indukcija partusa je rizičan posao što treba imati na umu (Davies Morel, 1999). Sve metode indukcije partusa se temelje na primjeni hormona koje nalazimo u povišenim razinama i tijekom prirodnog partusa.

U preživača najbolji rezultati u indukciji partusa su dobiveni primjenom kortikosteroida. Neka istraživanja pokazuju da u kobila ako se dnevno aplicira 100 mg dexametazona tijekom četiri dana nakon 321. dana gravidnosti, rezultat će partusom živog i zdravog ždrijebeta tjedan dan nakon tretmana. Međutim drugi znanstvenici zapažaju da isti postupak u ponija rezultira mrtvorodenom ždrijebadi i zaostanjem posteljice. Bitno je napomenuti da broj kobila u većini studija je malen. Ova naizgled manja uspješnost primjene kortikosteroida kod kobila u odnosu na preživače vjerojatno je rezultat drugačije endokrine kontrole partusa. Prirodna razina kortikosteroida u cirkulaciji majke i fetusu niža je od razine u preživača, pa je stoga i njihov utjecaj u indukciji manji. Kod ovariotomiziranih kobila se partus ne može inducirati kortikosteroidima što ukazuje njihovo djelovanje preko jajnika (Davies Morel, 1999).

Progesteron se primjenjuje tijekom četiri dana, u kasnoj fazi graviditeta te uzrokuje partus nakon otprilike tjedan dana nakon primjene. U preživača progesteron ne inducira partus. Ovo odstupanje u kobila u odnosu na preživače bi se moglo objasniti u slučaju da se u kobila javlja sličan endokrinološki mehanizam partusa kao što je ustanovljen u žena gdje se progesteron u fetusnim nadbubrežnim žlijezdama konvertira u kortikosteroide i time potiče partus.

Prostoglandini daju brže rezultate nego progesteron ili kortikosteroidi. Intrmuskularna primjena 250 µg fluprostenola je dovoljna da već nakon dva sata započne partus u kobila. U slučaju da primjena prostoglandina nije pravovremena i kobila nije neposredno prije partusa, neće imati utjecaja. Nepravovremena aplikacija može dovesti do poteškoća pri partusu, uključujući

slabo vitalnu ždrijebad i nedovoljnu relaksaciju cerviksa (Davies Morel, 1999). Od nedavno se aplikacija prostoglandina E2 koristi u svrhu proširivanja cerviksa što olakšava partus u kombinaciji s drugim hormonalnim tretmanima (Bleeker i sur., 2001). Pomalo začuđujuća činjenica je da prirodni prostoglandini ne utječu na indukciju partusa. Razlog zašto sintetizirani prostoglandin djeluje je nepoznat, ali zna se da ne djeluje preko jajnika već vjerojatno preko uterusa, jer ne utječe na ovariotomizirane kobile pred partusom. Zanimljivo je da su prirodni prostoglandini u kombinaciji s glukokortikoidima također efikasani (Davies Morel, 1999).

U prirodnim okolnostima razina oksitocina raste značajno tijekom druge faze partusa kada uzrokuje snažne nagle kontrakcije. Prilikom primjene oksitocina blizu termina dolazi do trenutačnog otpuštanja prostoglandina, kao što dolazi i tijekom prirodnog partusa (Davies Morel, 1999), te parus započinje već nakon 15 - 30 minuta (Bleeker i sur., 2001). Potrebana količina oksitocina ovisi o endokrinološkoj ravnoteži kobile u trenutku aplikacije. Već i niske razine oksitocine od samo 5 μ mogu inducirati ždrijebljenje u nekim slučajevima, čak kad kobile nisu neposredno pred partus. U počecima primjene oksitocina koristile su se visoke razine od 60 do 120 μ , kasnije je ustanovljeno da uz pravovremenu aplikaciju dovoljno je i 1 μ da se uspješno inducira partus (Davies Morel, 1999). Estogen sam po sebi je neefektivan u indukciji partusa, međutim u kombinaciji s oksitocinom potpomaže širenju cerviksa, a time i partusu.

7. Zaključak

Još uvijek postoji cijeli niz nerazjašnjenih endokrinoloških i fizioloških mehanizama koji reguliraju reprodukciju kobile, odnosno gravidnost. Iako se u zadnjih 30 godina puno toga istražilo, otvaraju su nova pitanja. Tako priroda signala, kojim embrij odaje svoje prisustvo majci čime održava žuto tijeko i svoj opstanak, još nije otkrivena. Pretpostavlja se da signal, barem inicijalno nije endokrinološkog karaktera, jer i umetanje staklene kuglice u uterus kobile također u velikom postotku produžava život primarnog žutog tijela. Stručnjaci se također ne mogu složiti u kojoj mjeri su važne endometrijske čašice i njihova proizvodnja eCG, odnosno prisutnost pomoćnih žutih tijela za održavanje gravidnosti. Također je nepoznat točan mehanizam koji dovodi do regresije sekundarnih žutih tijela. Nepoznanica je i zašto fiksacija embija u stražnjem dijelu uterusa rezultira tako visokom stopom embrionalne smrti. Prvo logično objašnjenje bi bilo da sam položaj na neki način sputava razvoj embrija, možda zastupljenost uterušnih žlijezda u tom predjelu uterusa nije dovoljna za

preživljavanje ploda, ili je problem u nemogućnosti pravilnog razvoja posteljice i smještaja ploda u lumenu uterusa. Iz navedenog proizlazi da je hormonalna kontrola graviditeta kobile izrazito kompleksna i zasad još uvijek nedovoljno istražena. Unatoč postojećim nepoznicama čovjek je dosadašnja saznanja uspio primjeniti na postupke reprodukcije konja u svoje svrhe. Teško se ne zapitati o smislu promjene sezone tjeranja kobila koje je u biti, u suprotnosti s prirodnim procesom. Vjerujemo da bi se u ovom slučaju, kao i u drugima, moglo uštedjeti dosta novca i vremena čovjekovom prilagodbom fiziološkim zakonitostima reprodukcije konja, a ne obrnuto.

LITERATURA

1. Allen, W.R. (2000): The physiology of early pregnancy in the mare. Proc 46th Ann. Conv. Am. Soc. Eq. Pract., 138-154.
2. Allen, W.R., Wilsher, S. (2009): A review of implantation and early placentation in the mare. Placenta 30 (12), 1005-1015.
3. Betteridge, K.J., Eaglesome, M.D., Mitchell, D. (1979): Embryo transport through the Mare's oviduct depends upon cleavage and is independent of the ipsilateral corpus luteum. J. Reprod. Fertil. Suppl. 27, 387-394.
4. Betteridge, K.J. (1989): The structure and function of the equine capsule in relation to embryo manipulation and transfer. Equine Veterinary Journal 21 (S8), 92-100.
5. Bleeker, J.A.M., Geiss, J., Huber, M. (2001): The century of space science. Elsevier Health Sciences. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
6. Crowell-Davis, S.L. (2007): Sexual behavior of mares. Hormones and Behavior 52 (1), 12-7.
7. Daels, P.F., Albrecht, B.A., Mohammed, H.O. (1998): Equine Chorionic Gonadotropin Regulates Luteal Steroidogenesis in Pregnant Mares. Biology of Reproduction 59 (5), 1062-1068.
8. Davies Morel, M.C.G. (1999): Equine Reproductive Physiology, Breeding and Stud Management. 3rd edition, CABI.
9. Davis, J.S., Rueda, B.R., Spaniel-Borowski, K. (2003): Microvascular endothelial cells of the corpus luteum. Reprod. Biol. Endocrinol., 1: 74-89.
10. Deichsel, K., Aurich, J. (2005): Lactation and lactation effects on metabolism and reproduction in the horse mare. Livestock Production Science 98 (1-2), 25-30.
11. Ferreira-Dias, G., Claudino, F., Carvalho, H., Agricola, R., Alpoim-Moreira, J., Robalo Silva, J. (2005): Seasonal reproduction in the mare: possible role of plasma leptin, body weight and immune status. Domestic Anim. Endocrinol., 29, 203-213.
12. Gavião, M.M.F., Stout, T.A.E. (2007): Maternal Recognition of Pregnancy in the Mare - a mini Review. Revista Lusófona de Ciência e Medicina Veterinária 1, 5-9.

13. Ginther, O.J. (1998): Equine pregnancy: Physical interactions between the uterus and conceptus. (<http://www.ivis.org/proceedings/aaep/1998/Ginther.pdf>)
14. Gither, O.J. (1984): Intrauterin movement of the early conceptus in barren and post partum mares. *Theriogenology* 21 (4), 633 – 644.
15. Hajčić, B., Samardžija, M., Grizelj, J., Dobranić, T., Makek, Z., Getz, I., Prvanović, N. (2008): Embriotransfer u kobila. *Veterinarska stanica* 39 (6), 335-348.
16. Herrler, A., Pell, J.M., Allen, W.R., Beirer, H.M., Stewart, F. (2000): Horse conceptus secrete insulin like growth factor-binding protein. *Biology of Reproduction* 62 (6), 1804-1811.
17. Hoppen, H.O. (1994): The equine placenta and equine chorionic gonadotrophin-an overview. (<https://www.thiemeconnect.com/ejournals/abstract/eced/doi/10.1055/s-0029-1211287>).
18. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18704835> (preuzeto studeni 2010)
19. http://www.vef.hr/org/porodnistvo/nastava/seminari/spolni_ciklus_kobile.pdf (preuzeto studeni 2010)
20. <http://www.vef.hr/org/porodnistvo/studenti/materijali/placentacija.pdf> (preuzeto studeni 2010)
21. http://www.vef.hr/org/porodnistvo/studenti/materijali/prvanovic7_predavanje.pdf (preuzeto studeni 2010)
22. <http://www.veterinarypartner.com/Content.plx?P=A&A=2094&S=0&SourceID=69> (preuzeto studeni 2010)
23. <http://www.vetmed.wisc.edu/data/coursematerial/bosu/ER-lecture8-nopics.pdf> (preuzeto studeni 2010)
24. <http://www.vivo.colostate.edu/hbooks/pathphys/reprod/placenta/equine.html> (preuzeto studeni 2010)
25. Ivanković, A. (2004): Konjogojstvo. Hrvatsko agronomsko društvo, Zagreb.
26. Knottenbelt, D.C., Le Blanc, M., Lopate, C., Pascoe, R.R. (2003): *Equine stud farm medicine and surgery*. SAUNDERS, Elsevier Science Limited.
27. Legrand, E., Krawiecki, J.M., Tainturier, D., Cornière, P., Delajarraud, H., Bruyas, J.F. (2000): Does the embryonic capsule impede the freezing of equine embryos? Proceeding of the 5th International Symposium on Equine Embryo Transfer, Saari, Finland. Havemeyer Foundation Monograph Series 3, 62–65
28. Liker, B. (2004): Interna skripta, Agronomski fakultet, Zagreb.
29. Makek, Z., Barec Getz, I., Prvanović, N., Tomašković, A., Grizelj, J. (2009): Rasplodivanje konja. Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb.
30. Mckinnon, A.C., Voss J.L. (1993): *Equine reproduction*. Lea & Febiger.
31. Nagy, P., Huszenicza, G., Juhász, J., Kulcsár, M., Solti, L., Reiczigel, J., Abaváry, K. (1998): Factors influencing ovarian activity and sexual behavior od postpartum mares under farm condition. *Theriogenology* 50 (7), 1109-1119.
32. Onuma, H., Ohnami, Y. (1975) Retention of tubal eggs in mares. *Journal of Reproduction and Fertility, Suppl.* 23, 507–511.

33. Oriol, J.G., Sharom, F.J., Betteridge, K.J. (1993): Developmentally regulated changes in the glycoproteins of the equine embryonic capsule. *Journal of Reproduction and Fertility*, 653–664.
34. RupiĆ, V. (2004): Interna skripta. Agronomski fakultet, Zagreb.
35. Sharp, D.C. (2000): The early fetal life of the equine conceptus. *Animal Reproduction Science* 60-61, 679-689.
36. Stout, T.A.E., Meadows, S., Allen, W.R. (2005): Stage specific formation of the equine blastocyst capsule is instrumental to hatching and to embryonic survival in vivo. *Animal reproduction science* 87 (3-4), 269-281
37. Van Niekirk, C.H., Gerneke, W.H. (1966): Persistence and parthenogenetic cleavage of tubal ova in the mare. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 33, 195-232.
38. Vanderwall, D.K. (2008): Early Embryonic Loss in the Mare. *Journal of Equine Veterinary Science* 28 (11), 691-702.
39. Weber, J.A., Geary, R.T., Woods, G.L. (1990): Changes in accessory sex glands of stallions after sexual preparation and ejaculation. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 186(7), 1084–1089.

SPECIAL FEATURES OF THE HORMONAL STATUS OF MARES DURING PREGNANCY

Summary

Hormonal status of the mares during pregnancy is significantly different in relation to other domestic animals. Throughout the pregnancy the mare and fetus hormonal interacts with each other. During early pregnancy developing embryo signals its presence to the maternal organism to prolong the lifespan of the primary corpus luteum. Also, the production of placental estrogen and progestagens in later stages of pregnancy, depends on the precursors synthesized in increased fetal gonads and in adrenal glands of the fetus. In the last stage of pregnancy, it is fetus who initiates parturition. Mechanism of parturition is not fully understood, but is considered to be associated with increased amounts of corticosteroids in the amniotic fluid produced by the adrenal glands of the fetus. Fully understanding of the hormonal features of pregnancy in mares is vital, because only than man could enhance fertility rate in a horse which is currently very low.

Key words: mares, pregnancy, hormones.

Primljeno: 15.12.2010.