

ANATOMSKO-FIZIOLOŠKE OSNOVE REPRODUKCIJE DOMAĆIH ŽIVOTINJA**

T. Smiljaković^{1*}, M. M. Petrović¹, V. Poleksić², H. Alm³, Milan P. Petrović¹, Č. Radović¹, S. Pejčić¹

¹Institut za stočarstvo, Beograd-Zemun, 11080

² Poljoprivredni fakultet, Zemun

³ FBN-Dummerstorf, Nemačka

Corresponding author:

*Tatjana Smiljaković, e-mail:

**Originalni naučni rad – original scientific paper

Apstrakt: Saznanja o formiranju polnih ćelija, oplodnje i bremenitosti su osnove za biotehnički uticaj na reprodukciju. Stoga su u ovom radu prikazane osnove, uz nove podatke, reprodukcije domaćih životinja. Detaljno je opisana morfologija jajnika, sazrevanje jajnih ćelija i spermatozoida, polni ciklus zenki, hormonski status koji se periodično menja u polnom ciklusu, i hormonski status bremenitih zenki.

Savremene metode biotehnologije kod domaćih životinja zasnivaju se na saznanjima iz in vivo i in vitro ispitivanja anatomije i fiziologije, kao i citologije i histologije polnih organa i ćelija, koja su prikazana u ovom radu. U našim uslovima metoda embriotransfera odnosno vantelesne oplodnje je u povoju, a zasniva se na saznanjima o in vivo oplodnji. Embriotransfer je metoda koja će verovatno imati veliku primenu, jer pored dobrih performansi muških grla, omogućava i oplemenjivanje genskim materijalom izabranih ženskih grla. Kao početak rada u toj oblasti, osnova je dobro izučiti osobine jajnika u svim fazama polnog ciklusa, i izolovati jajne ćelije koje bi sazrevale u in vitro uslovima, u odgovarajućim medijima do in vitro oplodnje, i transfera u majke recipijente.

Formiranje polnih ćelija

Mejotička deoba je način formiranja haploidnih polnih ćelija (gameta). Mejoza se dešava u specijalnim organima, polnim žlezdama (gonadama). Muška polna žlezda je testis (semenik), a ženska ovarijum (jajnik). U tim organima vrši

se gametogeneza (nastanak polnih ćelija) od diploidnih primarnih polnih ćelija (Primordial Germ Cells, PGCs). Od njih nastaju mitozom spermatogonije, odnosno oogonije. Takođe od njih nastaju mitotičkom deobom spermatocite, odnosno oocite, koje mejotičkom deobom daju kod muškog pola četiri spermatide a kod ženskog pola jajnu ćeliju (oocitu) i prvo i drugo polarno telo. Od spermatida sazrevanjem nastaju spermatozoidi (spermiji).

Činjenica da krava i ovca pri jednom teljenju, odnosno jagnjenju, daju uglavnom jedno tele, odnosno jagnje, odgovara morfologiji jajnika krave i ovce, kod kojih se uočava jedan zreo folikul. U nekim slučajevima prusutna su dva zrela folikula, po jedan na svakom jajniku. Za razliku od ovih vrsta koje donose po jedan porod, kod svinja se uočavaju jajnici sa po 12-15 zrelih folikula, što odgovara i broju oprasene prasadi.

Jajne ćelije izolovane aspiracijom iz nezrelih jajnika različitih vrsta su različite veličine, ali su u osnovi iste strukture: GV faza (diploten prve mejotičke deobe, Zona pellucida oko jajne ćelije, pa kumulus ćelije koje hrane jajnu ćeliju)(Müller,Hassel, 2003). Na slikama uporedno dajemo izgled jajnika krave, svinje i ovce (slika 1), kao i slike nezrelih jajnih ćelija (slike 2,3) krave i svinje, uporedno.

Spermatogeneza traje kod većine sisara 35-60 dana. Diferenciranje spermatida u zrele spermatozoide dešava se pri prolasku kroz tkivo testisa-žlezdanog epitela. Spermatozoidi napuštaju žlezdani epitel i ulaze u kanale testisa, a odatle u parasemenike, gde se odigrava njihovo dalje sazrevanje. Takođe nakon napuštanja epitela semenika odigravaju se promene u citoplazmi repića spermatozoida.

Iz oogonija se formiraju primarne jajne ćelije, čije sazrevanje se zaustavlja u prvoj mejotičkoj deobi u profazi (u fazi diplotena). Mejoza se dalje odvija u polno sposobnom dobu, neposredno pred ovulaciju kada se stimulacijom pomoću polnih hormona nastavlja mejotička deoba, koja dovodi do nastanka sekundarnih oocita. U citoplazmi jajnih ćelija nalaze se ribozomi, RNK, hranljivi sastojci, koji su neophodni za razvoj u nastanku embriona. Oocite su pomoću jednoslojnog omotača epitelijalnih ćelija (folikularnih ćelija, granuloza ćelija, kumulus ćelija) sa bazalnom laminom zaštićene i grade primarni folikul. Folikularne ćelije, koje okružuju jajnu ćeliju imaju ulogu u njenoj ishrani i zaštiti (Kauffold P., Thamm I., 1985).

U ovarijumu (jajniku) se hormonski aktivira mali broj primarnih folikula. U jednom aktiviranom primarnom folikulu zaokružuju se folikularne ćelije, drugim rečima postaju izoprizmaticne, a oocita počinje da raste. Daljom deobom sloj epitelnih ćelija postaje višeslojan i nastaje sekundarni folikul. Između jajne ćelije i folikularnih ćelija stvara se prostor ispunjen glikoproteinima, takozvana Zona pellucida. Ispunjavanjem tečnošću formira se tercijerni folikul u kome je jajna ćelija pričvršćena folikularnim ćelijama za zid

folikula. Na zidu folikula formira se brežuljak, takozvani Cumulus oophorus, u kome je jajna ćelija okružena granulosa ćelijama (kumulosa ćelijama) i gradi kumulosa-oocitni kompleks (COC). On obezbeđuje jajnoj ćeliji hormone i hranljive sastojke. Direktno na Zona pellucida oslanja se sloj granulosa ćelija (Corona radiata) koje svojim kracima dodiruju plazma-membranu jajne ćelije (Smiljaković, 2006). Za vreme sazrevanja folikula, gubi se veza između granulosa ćelija i Zona Pellucida, nastaje perivitelinski prostor, koji se nalazi između citoplazme i Zona Pellucida. Ceo folikul raste do prečnika 2-50 mm (kod mačke oko 2, svinje 10, krave 20 i kobile 50 mm) a jajna ćelija dostiže veličinu 130-150 µm. Potpuno zreo tercijerni folikul naziva se Grafov folikul. Konačno, dolazi do ovulacije, prska tercijerni folikul i oslobađa jajnu ćeliju.

Folikuli i jajne ćelije dakle, sazrevaju u jajnicima, ciklično promenljivim organima, u kojima je veliki broj folikula. Kod sisara taj broj je od 200 000 do 400 000 primarnih folikula pri rođenju ženske jedinke. Ali jajne ćelije u njima bez daljnjeg sazrevanja nisu sposobne za ovulaciju i oplodjenje. U toku jednog ciklusa, sazreva mali broj folikula, a i od njih ne ovulira svaki, već se razgrađuje (atrezija). Od potencijalno ovulirajućih folikula samo će jedan (krava, konj), ili nekoliko (svinja, miš) dominantnih folikula ovulirati. Sazrevanje svakog folikula zavisi i od spoljašnjih uticaja. Regulacija broja i razvoja ovulirajućih jajnih ćelija je rezultat kontrolnog sistema uz pomoć hormonskih signala. Prvo u toku jednog sazrevanja (maturacije) prolaze jajne ćelije kroz složeno zajedničko dejstvo različitih ćelija folikula i dostižu svoju sposobnost da budu oplodene (**postaju kompetentne za oplodjenje**). Uz to, sazrevanje jedra i dostizanje haploidnog broja hromozoma, zatim citoplazmatsko sazrevanje jajne ćelije, omogućavaju monospermiju pri oplodjenju. Jajne ćelije postaju sposobne za oplodjenje neposredno pred ovulaciju.

U polnim žlezdama se pomoću hormonske kontrole dešavaju mejoze po ontogenetskim periodima. Kod muških individua formiranje gameta počinje sa polnom zrelošću. S druge strane, kod ženki sisara mejoza počinje za vreme embrionalnog razvika jedinke a završava se nakon oplodjenja (Müller W.A., Hassel M., 2003).

Razvoj polne zrelosti i roditeljstva

Razvoj pola i reprodukcija su pod uticajem više hormona. Polna zrelost kod muških jedinki se dostiže kada se formiraju spermatozoidi sposobni za oplodnju, prisutan libido i polna moć. Polna zrelost ženske jedinke se postiže kada ispolji prvi polni žar sa ovulacijom odnosno uspostavljanjem prvog estrusnog ciklusa koji ima normalno trajanje. Vreme postizanja polne zrelosti ne zavisi samo od uzrasta nego je rezultat uticaja brojnih faktora (genetskih i paragenetskih) kao

što su: rasa, ukrštanje, inbriding, telesna masa i intenzitet porasta, način ishrane, ambijentalni faktori, klima, veličina grupe, kretanje i dr. Faktori sredine mogu da pojačaju ili zaustave sintezu GnRH (gonadotropin oslobađajući hormon). Kod mladih domaćih životinja može u uslovima promene štale i transporta, usled povećanog lučenja kortizola da dođe do ubrzavanja razvika polne zrelosti. Kod krave telesna masa više utiče na pojavu prvog estrusa nego uzrast jedinke. **Na primer, kod mlečnih rasa goveda pubertet nastaje sa 35-45 %, a kod mesnatih 45-55 % prosečne telesne mase odraslih krava (Geldermann,2005).** Kod teladi evropskih rasa goveda (*Bos taurus* sp *taurus* domaće rase), pojačanom ishranom, prva prava ovulacija dešava se sa 9-15 meseci, dok kod zebu-goveda (*Bos taurus* sp.*indicus* domaće rase) pubertet počinje sa 15-24 meseca.

Polno zrele životinje zahtevaju jedan dalji period telesnog razvoja da bi bile sposobne za roditeljstvo. Početak roditeljstva takođe varira, a zavisi pre svega od telesne mase životinja.

Polni ciklus kod ženki sisara

Pod polnim ciklusom (seksualnim ciklusom, estrusnim ciklusom) podrazumeva se periodično ponavljajuće stanje u morfološkim (sl.4), biohemijskim i hormonskim promenama ženke sisara u kom se formira jedna ili nekoliko zrelih jajnih ćelija. Istovremeno se javlja polna želja (estrus) i materica (endometrium) ja pripremljena za prihvatanje (nidaciju) oplodene jajne ćelije. Ovulacija se dešava kod većine sisara u određenom vremenskom intervalu pre krvarenja. Nakon ovulacije menjaju se ćelije zida folikula i stvaraju žuto telo.

Polni ciklus može biti sezonski ili tokom cele godine. Na primer, kod domaćih plemenitih rasa goveda, tokom čitave godine se javljaju polni ciklusi i stoga su one poliestrične (nesezonske), dok kod divljih goveda postoji period sezonske poliestričnosti sa nekoliko ciklusa. Takođe, kod mnogih rasa ovaca postoji sezonska poliestričnost, koja se od rase do rase razlikuje u kom periodu godine se estrus javlja. Dužina polnog ciklusa se razlikuje i kod goveda traje prosečno 21 (18-24) dan, a kod ovaca 16,5 (14-19) dana. Dan kada životinja pokazuje potrebu za parenjem označava se kao nulti dan. Polni ciklus je podeljen u faze: preestrusa, estrusa i metestrusa.

Fenotipske promene u polnom ciklusu uzrokovane su promenama koncentracije hormona u krvi i tkivima. Regulacija seksualnih funkcija vrši se u centralnom nervnom sistemu, pre svega u hipotalamusu i žlezdi hipofizi. U hipotalamusu se diskontinuirano luči gonadotropni- oslobađajući hormon (GnRH) koji utiče na oslobađanje hormona hipofize luteinizirajućeg hormona (LH) i folikulostimulirajućeg hormona (FSH). Pri pulsirajućem izbacivanju ovih hormona iz hipofize, oni stižu do jajnika (ovarium). Nekoliko dana pre estrusa

značajno se povećava koncentracija FSH i deluje na sazrevanje folikula i sintezu hormona estrogena u folikularnim ćelijama jajnika. Povećana koncentracija estrogena povećava lučenje LH i dovodi do skoka koncentracije LH, što dovodi do oslobađanja jajne ćelije. Estrogeni, a pre svega estradiol-17 β koji se ubacuje u šupljinu folikula i u krvotok smanjuje simptome estrusa. Unutrašnji sloj folikularnih ćelija nakon ovulacije, u toku metestrusa, pretvaraju se u luteinske ćelije (ćelije žutog tela) i sintetišu progesteron, koji ima gestageni efekat, odnosno omogućava bremenitost. Corpus luteum (žuto telo) sintetiše prvih 5-7 dana ciklusa sve više progesterona, da bi se obično oko 15.-17. dana ciklusa dostigao plato u sintezi progesterona. U toku ove faze progesteron blokira sintezu LH, a FSH se i dalje pulsirajući izlučuje. Na taj način svaki folikul se ponovo razgrađuje (atrezija). Ako ne dođe do bremenitosti, vezivanjem lutealnog oksitocina za receptore na uterušnoj sluzokoži pokreće se luteolitički hormon prostaglandin-F2 α (PGF2 α) i razgrađuje se žuto telo. Tada nastupa nova faza u ciklusu sinteza FSH. Dolazi do novih sazrevanja folikula koji će dovesti do ovulacije.

Ako dođe do bremenitosti, embrion luči Interferon τ koji inhibira transkripciju i sintezu estrogenih receptora na ćelijama uterušne sluzokože. Interferon τ se sintetiše i u embrionu od sedmog dana razvika, što znači na stupnju blastule (blastocista) i blokira sintezu PGF2 α , tako da žuta tela koja sintetišu progesteron ostaju aktivna (*Geldermann, 2005*).

Oplodnja i razvoj embriona

Seksualno ili polno razmnožavanje zavisi od prethodno formiranog gameta i od čina oplodnje. Oplodnja (fertilizacija) je čin u kome se dva gameta spajaju i daju zigot. Tok oplodjenja podrazumeva međudejstvo između spermatozoida i jajne ćelije. Nakon oplodjenja dekonduzuje se glavica spermatozoida i daje muško jedro. Istovremeno se završava druga mejotička deoba i nastaje žensko jedro. U zigotu se nalaze muško i žensko jedro, i taj stadijum se naziva predjedarni stadijum. Orceinom ili fuhsinom se mogu ofarbati jedra. Embrioni koji 48 sati nakon oplodnje još nisu dostigli dvojedarni stadijum, po pravilu se ne razvijaju u blastociste. Najbolje sazrevaju embrioni koji su nakon 48^h na stupnju četiri ćelije. Kod većine životinjskih vrsta oplodjenje se odvija u ženskom organizmu, koji se takođe brine o snabdevanju zigota specijalnim supstancama.

Ovulirana jajna ćelija odlazi u jajovodi tu se uglavnom odigrava oplodnja. Spermatozoidi znači moraju da ``se trkaju`` do jajovoda. U sekretu materice postaju sposobni za oplodjenje i to se naziva kapacitacija spermatozoida. Muški i ženski gameti su u ženskom reproduktivnom traktu samo u određenom vremenskom periodu spremni za oplodnju, jajna ćelija 8-12

sati, a spermatozoidi do 48 sati. Steroidni hormoni određuju put gameta i oplodene jajne ćelije-zigota. Trepaljice u jajovodu, mukoza jajovoda i jajovodna tečnost omogućuju kretanje gameta i zigota. Pod dejstvom estrogena javlja se navala tečnosti u smeru jajnika, a pod dejstvom progesterona navala tečnosti u smeru materice-uterusa.

Nakon prodiranja spermatozoida u jajnu ćeliju, prva deoba obično kod sisara počinje u toku prvih 24 sata. Zatim slede deobe koje se dešavaju u okviru veličine jajne ćelije i nastaje morula. Pri sledećim deobama stvara se šupljina u centralnom delu morule i to je blastocel, a stadijum koji tako nastaje je blastula (blastocist). Mesto krupnijih ćelija naziva se trofoblast, a na suprotnom polu su manje, kompaktne ćelije. One obrazuju unutrašnju ćelijsku masu (ICM, inner cell mass). Iz ICM se razvija embrion, a iz trofoblasta opna embriona. Trofoblast gradi jedan zatvoreni zid, koji je značajan za aktivan transport u i iz blastocela, i takođe za kontakt sa majčinskim tkivom. Kod većine životinja je do stupnja blastule, ta embrionalna loptica okružena sa Zonna pellucida. Konačno na stupnju blastule puca Zonna pellucida i blastocist se ugnjezđuje u unutrašnji zid materice (nidacija, implantacija). Nidacija se dešava kod miša četvrti dana od oplodnje, a kod kobile sedam dana od oplodnje. Metazoe (višećelijski organizmi) prolaze kroz svoju ontogenezu uz specifične procese, koja se delimično može opisati kao razmnožavanje. Kod sisara se razvije embriona dešava unutar materice. Ako su iz dva zigota, blizanci se nazivaju bizigotni blizanci. Ako su se nakon stvaranja zigota, odvojile dve ćelije, tada se nazivaju monozigotni blizanci i to je ređi slučaj.

Savremene metode u biotehnologiji domaćih životinja

Veštačko osemenjavanje podrazumeva uzimanje sperme, čuvanje sperme, pravljenje porcija kao i prenošenje sperme. Koristi od veštačkog osemenjavanja su:

- Smanjenje troškova. Pri takvom tipu uzgoja potrebno je manje zrelih muških grla.
- Smanjenje rizika. Smanjen je rizik prenošenja bolesti, jer se biraju samo zdrava muška grla kao davaoci sperme.
- Organizacija uzgoja. Na primer moguće je u isto vreme osemeniti više ženki.
- Može se zamrzavanjem sperme osemenjavanje vršiti i nakon smrti mužjaka davaoca
- Transport olakšan
- Uspešni u selekciji
- Smanjenje generacijskog intervala

Ali postoje i rizici:

- Nagomilavanje istih gena u populaciji (pogotovo ako je neki gen neželjen)

Metoda je rasprostranjena u našim uslovima, za razliku od embriotransfera, odnosno vantelesne oplodnje koja je u povoju. Embriotransferom se za razliku od vestackog osemenjavanja gde se favorizuju genotipovi i fenotipovi muskih grla, favorizuju kvalitetna zenska grla, a koristi i rizici su isti kao i kod vestackog osemenjavanja. Jajne celije za ovu metodu mogu se uzimati za zivota krave ili kobile pomocu ultrazvukom vodjene sonde (Ovum pick-up), ili nakon zrtvovanja zivotinje. Nezrele jajne celije in vitro sazrevaju, in vitro se vrsi oplodnja i kultivacija ranog embriona do stupnja blastocista (6-7 dan od oplodnje) i implantira u matericu zenke koja je hormonski pripremljena da prihvati blastocist. Po najnovijim saznanjima u FBN-Dummerstorf, Nemacka, je dobijeno zdrebe posle in vitro oplodnje i embriotransfera iz zamrznute jajne celije.

Zaključak

Saznanja o formiranju polnih ćelija, oplodnje i bremenitosti su osnove za biotehnički uticaj na reprodukciju.

Uz veštačko osemenjavanje koje je u redovnoj praksi u našim podnebljima, embriotransfer je metoda koja će verovatno imati veliku primenu, jer pored dobrih performansi muških grla, omogućava i oplemenjivanje genskim materijalom izabranih ženskih grla. Metoda je narocito podesna u selekciji i oplemenjivanju goveda i konja, jer u dosadasnjoj poljoprivrednoj praksi, broj potomaka jednog zenskog grla je bio relativno mali. Kao početak rada u toj oblasti, osnova je dobro izučiti osobine jajnika u svim fazama polnog ciklusa, i izolovati jajne ćelije koje bi sazrevale u in vitro uslovima, u odgovarajućim medijima do in vitro oplodnje, i transfera u majke recipijente.

ANATOMICAL-PHYSIOLOGICAL BASIS OF REPRODUCTION OF DOMESTIC ANIMALS

T. Smiljaković, M. M. Petrović, V. Poleksić, H. Alm, M. P. Petrović, Č. Radović, S. Pejčić

Summary

Knowledge about forming of sex cells, fertilization and pregnancy is basis for biotechnological effect on reproduction.

Beside artificial insemination which is regularly used in practice in Serbia, embryo transfer is method which will probably have wide application, since it enables good performances of male heads and improvement with genetic material of selected female heads. Method is especially useful in selection and breeding of cattle and horses, since in previous agricultural practice, number of offspring from single female head was relatively small. At the beginning it is important to study traits of ovaries in all stages of sex cycle and isolate egg cells which could mature in *in vitro* conditions, in adequate medium until *in vitro* fertilization and transfer into recipient mother.

Napomena: Zahvaljujemo se Odeljenju za reprodukciju, Instituta za biologiju domaćih životinja, Dummerstorf, Nemačka, za metodologiju rada sa jajnim ćelijama, kao i Stanislavu Marinkovu za obradu fotografija. Za citološki i histološki pregled materijala zahvaljujemo se Poljoprivrednom fakultetu u Zemunu. Posebno se zahvaljujemo zaposlenima u Eksperimentalnoj klanici Instituta za stočarstvo, Beograd-Zemun, na pomoći u uzimanju uzoraka za analizu.

Literatura

- GALLI C., LAZZARI G. (2003): In vitro production of embryos in farm animals. 19th scientific meeting AETE. Rostock, Germany.
- GELDERMAN H. (2005): Tier Biotechnologie. Verlag Eugen Ulmer Stuttgart.
- KAUFFOLD P., THAMM I. (1985): Zustandsbeurteilung von Rinderembryonen. FBN-Dummerstorf, Germany.
- MÜLLER W.A., HASSEL M. (2003): Entwicklungsbiologie und Reproduktionsbiologie von Menschen und Tieren. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Germany.
- PETROVIĆ, M. (2000): Genetika i oplemenjivanje ovaca (Monografija). Naučna knjiga Beograd, 365
- SMILJAKOVIC T. (2006): Cytoplasmic Maturation of Bovine Oocytes- Analysis of Signaling Cascades and Factors Which Contribute to the Meiotic

Maturation of Bovine Oocytes. Doctoral thesis. Supervisor: Dr. Wolfgang Tomek. Defended in UNI-Rostock, Germany.