

UDC 636.1.082.453.5(497.5)
Pregledni naučni rad DOI: 10.5937/zaoardz25088P

TRENUTNO STANJE I MOGUĆNOSTI RAZVOJA METODA ASISTIRANE REPRODUKCIJE KOPITARA U SVRHU UNAPREĐENJA UZGOJA I OČUVANJA AUTOHTONIH PASMINA

Nikica Prvanović Babić, Martina Lojkić, Katarina Miljak, Nika Brkljača
Bottegaro, Lidija Medven Zagradišnik, Iva Ciprić, Nino Mačesić, Ivan
Butković, Juraj Šavorić, Ivan Tomić, Goran Bačić, Juraj Grizelj

*Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Ul. Vjekoslava Heinzela 55, 10000
Zagreb, Hrvatska*

nikica@vef.unizg.hr

Sažetak

Asistirana reprodukcija ima sve veći značaj u uzgoju konja u RH. Zbog povoljnog geografskog položaja i blizine velikih centara za ART u EU, danas u Hrvatskoj imamo konje dobivene svim metodama asistirane reprodukcije, izuzev kloniranja. Umjetno osjemenjivanje kao najraširenija, najdugovječnija i najjednostavnija metoda biotehnologije rasplodivanja sa brojnim prednostima za uzgajivače ima veliku važnost u hrvatskom konjogojstvu. Osim što u uzgoju i selekciji ima najveći učinak na genetski napredak, ono omogućuje iskorištavanje i kontrolu plodnosti kobila i pastuha, sprječavanje širenja spolno prenosivih zaraznih bolesti konja, međunarodnu trgovinu ohlađenim i smrznutim sjemenom te korištenje najkvalitetnijih pastuha za rasplod i učinkovitije progeno testiranje preko njegovog potomstva. Osobita važnost iskazuje se i u očuvanju ugroženih izvornih i zaštićenih pasmina konja kroz dugoročnu pohranu duboko smrznutog sjemena pastuha. Također polako se razvija i embriotransfer. Kako bi sve navedene metode zaista zaživjele u praksi ključno je odobrenje centra za prikupljanje i pohranu jajnih stanica, embrija i sperme te tima za embriotransfer u RH. Danas je većina konja dobivena embriotransferom kao i mnogi konji dobiveni umjetnim osjemenjivanjem, rođeno u inozemstvu i uvezeno u RH. Godišnje izvješće Hrvatske agencije za poljoprivredu i hranu pokazuje kako je broj ždrebadi prema broju kobila u RH daleko ispod europskog prosjeka iz čega se zaključuje da je plodnost konja svih pasmina u Hrvatskoj nezadovoljavajuća. Zbog toga što metode asistirane reprodukcije još uvijek nisu prepoznate kao komponenta jačanja uzgoja s jedne strane, te zbog stalne potrebe za usavršavanjem doktora veterinarske medicine s druge strane i dalje znatno zaostajemo za drugim zemljama Europske unije u pogledu uzgoja toplokrvnih pasmina konja.

Uvod

Biotehnologija rasplodivanja ili asistirana reprodukcija (ART, Assisted Reproductive Technologies) podrazumijeva zahvate kojima u kontroliranim uvjetima rasplodujemo životinje i utječemo na genetsku selekciju širenjem poželjne genetike prema željenim proizvodnim svojstvima. Prva generacija biotehnologije bilo je umjetno osjemenjivanje, druga embriotransfer i srodne tehnologije, treća proizvodnja zametaka *in vitro*, a četvrta manipulacija genomom uz pomoć transgeneze i kloniranja.

Primjena ART u Hrvatskoj

Zahvaljujući globalnom tržištu te dobroj prometnoj povezanosti unutar EU, danas u Hrvatskoj imamo konje dobivene svim navedenim metodama asistirane reprodukcije. Također, U Hrvatskoj se već više od 25 godina provodi umjetno osjemenjivanje kobilica, posljednjih se nekoliko godina provodi i embriotransfer, a u 2024 smo po prvi put, u suradnji s talijanskim centrom Avantea smrznuli i za budućnost pohranili embrije pasmine gidran. Dubokosmrznuti embriji u vlasništvu uzgajivača iz Hrvatske prodaju se na online aukcijama, a na natjecanjima u sklopu Hrvatskog Konjičkog Saveza imamo sve veći broj konja koji su rođeni zahvaljujući embriotransferu. Jedini razlog što na turnirima u Hrvatskoj nemamo klonirane konje je samo taj što se u praksi pokazalo kako trošak kloniranja ne opravdava kvaliteta dobivene ždrebadi. Iako o navedenom ne postoje službeni podaci, vrlo je vjerojatno da je preko 80% konja koji se danas natječu u višim kategorijama natjecanja u sklopu Hrvatskog konjičkog saveza (HKS) dobiveno umjetnim osjemenjivanjem i/ili embriotransferom.

Umjetno osjemenjivanje i embriotransfer kobilica

Umjetno osjemenjivanje (UO) kobilica najstarija je i najrasprostranjenija metoda biotehnologije rasplodivanja koja ne zahtjeva specijaliziranu i skupu opremu te je stoga imala najveći selekcijski učinak u konjogojstvu. Interes uzgajivača za primjenom UO-a raste, kako u svijetu, tako i kod nas, kod većine pasmina i uzgojnih tipova konja, osim kod engleskih punokrvnih konja, kod kojih je primjena UO strogo zabranjena od strane uzgojnih udruženja (Allen, 2005.). Embriotransfer (ET) pripada drugoj generaciji biotehnoških metoda kojima se utječe na povećanje rasplodnih potencijala najkvalitetnijih ženskih životinja. Ova metoda uključuje ispiranje maternice davateljice 7. dana nakon ovulacije te transfer zametka u maternicu sinkronizirane primateljice koja će gravidnost iznijeti sve do poroda. Danas u razvijenim zemljama postoje centri koji se bave samo i isključivo embriotransferom od kojeg žive, uz visoki postotak uspješnosti postupka (Hajčić i sur., 2008.). Jedina ograničenja u primjeni ET kod konja su uzgojne udruge koje ne dozvoljavaju registraciju više ždrebadi godišnje od iste kobile, samo iz financijskih razloga. Ipak, danas je transfer

zametaka dozvoljen u većine pasmina. Postupak također zahtjeva visoku stručnost veterinara i tehničku opremljenost centara za provođenje embriotransfera. Primijećeno je da zametci dobiveni intracelularnom spermalnom injekcijom (IntraCytoplasmic Sperm Injection, ICSI), ne razvijaju kapsulu koja predstavlja najveću prepreku smrzavanju zametka. Kako zametci nastali ICSI metodom nemaju kapsule i razvoj im je pod stalnim nadzorom, jedino oni su se pokazali idealnima za mogućnost vitrifikacije i dalje duboko smrzavanje zametka (Janeš, 2020.). Konjski se zametci transferiraju kirurški, izravno u rog maternice ili nekirurški, aplikacijom zametaka u tijelo maternice transcervikalno. Objema tehnikama ostvaruje se stopa gravidnosti nakon transfera od 65-80%, pri čemu su glavni čimbenici uspjeha sinkronost davateljice i primateljice, kvaliteta zametka te dob davateljice (Allen, 2005.). Kako navode Aurich i Aurich (2006.) embriotransfer i s njim povezane tehnike, kao što su cijepanje zametaka i bližnjenje te određivanje spola zametaka, ipak nisu do sada značajnije pridonijeli genetskom napretku u uzgoju europskih sportskih pasmina konja. No, unatoč tome, značajan napredak tehnika zamrzavanja i vitrifikacije konjskih zametaka obećava komercijalnu primjenu ET u konjičkoj industriji te omogućava očuvanje ugroženih pasmina (Allen, 2005.).

Proizvodnja konjskih zametaka *in vitro* i kloniranje

Proizvodnja zametaka *in vitro* (IVP) predstavlja treću generaciju postupaka biotehnologije rasplodivanja, no njezina primjena zahtijeva dobro opremljen laboratorij te dobro obučeno visokokvalificirano osoblje. Proizvodnja zametaka *in vitro* uključuje polučivanje jajnih stanica od živih davateljica, trasvaginalnom ultrazvučnom aspiracijom ili iz klaoničkog materijala te njihovo dozrijevanje (*in vitro* maturation, IVM), oplodnju (*in vitro* fertilization, IVF) i uzgoj (*in vitro* culture, IVC) *in vitro*. Kako navodi Allen (2005.) ove tehnike također omogućavaju korištenje sjemeni slabije plodnih pastuha injektiranjem spermija direktno u jajnu stanicu uz pomoć mikromanipulatora (IntraCytoplasmic Sperm Injection, ICSI). Napredne biotehnoške metode poput kloniranja i transgeneze imaju veliki potencijal u rasplodivanju, no zbog troškova i loših rezultata one se uglavnom koriste u istraživanjima i za sada nemaju komercijalni značaj. Kloniranje je tehnika nuklearne transplantacije koja uključuje fuziju stanica, embrionalnog ili somatskog podrijetla, s enukleiranom jajnom stanicom (iz koje je uklonjena jezgra s njezinim genetskim materijalom), te transfer blastomera i aktivaciju jajne stanice, predimplantacijski razvoj zametaka i embriotransfer (Stice i sur., 1998.). Kloniranje odraslog konja i rođenje kloniranog ždrebeta nazvanog Prometea (Galli i sur., 2003.) izazvalo je golemi interes i potaknulo mnoge rasprave o mogućnostima i opasnostima primjene ove moćne tehnologije, no unatoč velikim očekivanjima pokazala se slaba učinkovitost ove tehnologije, kao i neispunjena očekivanja za dobivanje uspješnog sportskog konja (Hinrichs, 2006., Gambini i Maserati, 2017).

Rasprava

Primjena umjetnog osjemenjivanja i embriotransfera dovela je do rapidnog napretka u sportskom konjogojstvu te se ove metode uspješno koriste već više od 20 godina dok transgeneza i kloniranje za sada nemaju veću komercijalnu primjenu. Umjetno osjemenjivanje, kao daleko najjednostavnija, i u Europi najčešće primijenjena metoda asistiranе reprodukcije, nudi velike prednosti za uzgajivače. Ono omogućava odabir i distribuciju širokog spektra genetskog materijala čime se izbjegava stres uvjetovan transportom rasplodnih grla. Putovanje za kobilu je posebno stresno što znatno može umanjiti njenu plodnost. Umjetno osjemenjivanje zapravo ubrzava postupke oplemenjivanja pasmina i uzgojnih tipova te ubrzava selekcijski učinak jer najkvalitetniji pastusi kroz umjetno osjemenjivanje ostavljaju znatniji uzgojni trag (Prvanović Babić, 2014.), a duboko smrznuto sjeme rasplodnjaka može se i nakon njegova uginuća koristiti u rasplodu. Prednosti umjetnog osjemenjivanja ogledaju se u sprječavanju prijenosa spolno zaraznih, nametničkih i drugih bolesti, a sa zdravstvenog gledišta ujedno se smanjuje i rizik od raznih povreda prilikom manipulacije sa životinjama i uklanjaju tzv. „profesionalne“ bolesti usko vezane s pojačanom seksualnom aktivnosti, poput impotencije i psihičkih problema (Prvanović Babić, 2014.). Prateći trendove u Europi, hrvatsko konjogojstvo se lijepo razvija što pokazuje interes i broj uzgajivača i držatelja konja. Međutim, gledajući Europu gdje je postotak ždrebadi koja dolazi na svijet kao rezultat osjemenjivanja ohlađenim ili zamrznutim sjemenom dosegao oko 90%, kod nas je broj ždrebadi prema broju kobila daleko ispod europskog prosjeka, a to pokazuje Godišnje izvješće Hrvatske agencije za poljoprivredu i hranu (HAPIH, Ivkić i sur., 2022.). Na osnovu toga očito je da je plodnost konja svih pasmina u Hrvatskoj nezadovoljavajuća na što stručna javnost upozorava već dulji niz godina. Upravo bi poticanje primjene umjetnog osjemenjivanja na većem broju kobila direktno i indirektno pridonijelo postizanju cilja poboljšanja plodnosti i mjera kontrole plodnosti kobila, te dostizanju rezultata iz drugih zemalja, članica EU u kojima postotak kobila na kojima se provodi umjetno osjemenjivanje iznosi 40-60%. Kowalczyk i sur. (2019.) u svom su istraživanju, provedenom u 3 vodeća centra za UO kobila (u sjevernoj Francuskoj, Poljskoj i Njemačkoj) ukazali su na porast broja osjemenjenih sportskih kobila u razdoblju od 2013. do 2017. godine, sa 49% na čak 67% te dokazali sve veću popularnost umjetnog osjemenjivanja u uzgoju sportskih konja. Usporedili su također i odabir vlasnika između ohlađenog i DS sjemenastuha te iznijeli podatak da je 2013. i 2014. više od 53%, odnosno 55% kobila bilo osjemenjeno DS sjemenom. Od 2015. do 2017. više od 60% kobila osjemenjeno je ohlađenim sjemenom te je udio kobila osjemenjenih DS sjemenom iznosio ispod 40%. S ekonomskog gledišta za uzgajivače je najisplativija opcija indukcija ovulacije i UO kobila što bliže ovulaciji, uz primjenu što manjeg broja doza sjemenastuha. S obzirom da većina pastuharni u EU nudi pojedinačne doze sjemenastuha (1 pajeta od 0,5 ml ili 1 doza od 20 ml ohlađenog sjemenastuha) u cjenovnom rasponu od 450 do 3.500 eura i više, jasno je da utrošeni broj doza smanjuje trošak uzgajivačima do

konceptije kobile (Kowalczyk i sur., 2019.). Kako navode Aurich i Aurich (2006.) u Njemačkoj je svega 11% uzgajivača sportskih konja navelo jeftiniju cijenu sjemena pastuha kao važan čimbenik za odabir pastuha, a za više od 70% je pedigree pastuha imao ključnu ulogu pri odabiru. Stoga je kod rasplodnih pastuha vrlo bitna procjena sjemena pastuha prije njegova korištenja u rasplodu i umjetnom osjemenjivanju. Loša kvaliteta ejakulata može rezultirati lošom koncepcijom kobila. Procjena kvalitete sjemena pastuha stoga je veoma važan korak u uspješnosti primjene UO kobila (Prvanović Babić i sur., 2019.). Sjeme pastuha koje se stavlja u promet bilo ohlađeno ili duboko zamrznuto, mora biti sakupljeno, obrađeno i skladišteno za potrebe umjetnog osjemenjivanja u EU odobrenim centrima. Primjena ohlađenog sjemena jednostavnija je za UO kobila koje nisu stacionirane u nekom od centara za UO ili veterinarskoj klinici, ali nosi svoje rizike jer se može dogoditi da ohlađeno sjeme ne stigne na vrijeme ili pak da nije dostupno u vrijeme kada bi kobilu trebalo osjemeniti (vikendi i praznici). Na koncepciju kobila nakon osjemenjivanja DS sjemenom utječu kvaliteta sjemena, odabir pastuha, vrsta korištenog razrjeđivača i postupka krioprezervacije kao i odabir i postupak s kobilom te vrijeme i tehnika osjemenjivanja (Morris, 2004.; Metcalf, 2007.). Također, pokazalo se da se i vrlo malim dozama duboko smrznutog sjemena može postići zadovoljavajuća koncepcija kada se osjemenjivanje izvrši histeroskopski ili duboko u rog maternice (Samper i Plough, 2010.). Tako Crowe i sur. (2008.) navode puno bolje rezultate nakon osjemenjivanja kobila DS sjemenom (82,0%), nego primjenom ohlađenog sjemena (69,6%). Ipak, važno je napomenuti kako DS sjemenom pastuha treba biti posebno oprezan zbog mogućnosti prijenosa zaraznih bolesti. Tako se u više navrata virusni arteritis konja prenio umjetnim osjemenjivanjem, a Balasuriva i sur. (2018.) naglašavaju kako postupak smrzavanja sperme dodatno konzervira virus. Virus ne ubijaju antibiotici koji se koriste u razrjeđivačima sjemena te on preživljava proces hlađenja i smrzavanja/odmrzavanja, tako da je UO vrlo važan način prijenosa. Stoga Ministarstvo poljoprivrede donosi Pravilnik o mjerama kontrole arteritisa konja (Anonimus, 2009.), a Naredbom o mjerama zaštite životinja od zaraznih i nametničkih bolesti i njihovom financiranju u 2009. godini se po prvi puta propisuje kontrola svih pastuha koji se koriste za rasplod kao i svih kobila u slučaju pobačaja. Stroga su kontrola i nadzor nad prometom sjemena pastuha prijeko potrebni i u sprječavanju širenja zaraznog metritisa kobila (Contagious equine metritis, CEM). Iako se čini da je rizik od infekcije manji kod kobila uzgojenih UO nego prirodnim pripustom, a jedna je studija objavila da su antibiotici u razrjeđivačima sjemena značajno smanjili stopu infekcije, svejedno je potrebno na početku sezone pretražiti sjeme pastuha na prisutnost uzročnika ove bolesti (Klein i sur., 2012.). Jednom kad se pojavi, uzročnika je teško suzbiti pri čemu je otežano i njegovo dijagnosticiranje jer zahtjeva posebne uvjete za uzgoj. Različiti sojevi cirkuliraju s različitom kliničkom slikom koja je često blaga i neprimjetna te se bolest može pojaviti na području gdje do tada nije dijagnosticirana. Tako se uzročnik 2012. godine pojavio u Južnoafričkoj

Republici, iako se smatralo da je to zemlja bez CEM-a (May i sur., 2016.). Bitno je naglasiti da kobile prilikom postupka umjetnog osjemenjivanja traže dodatni veterinarski stručni nadzor što dovodi do pravovremenog otkrivanja i liječenja zaraznih i nezaraznih uzroka neplodnosti što također utječe na bolju uspješnost rasplodivanja. Ukoliko je kobila prije osjemenjivanja pravilno pripremljena, te ukoliko se svi postupci umjetnog osjemenjivanja sa svježom i rashlađenom spermom provedu stručno i savjesno, postotak koncepcije kobila je čak i veći nego kod prirodnog pripusta i iznosi preko 75%, jer se ranije uoče i izliječe potencijalni uzroci neplodnosti, embrionalne smrtnosti i pobačaja (Prvanović Babić, 2014). U našoj se zemlji UO kobila uspješno provodi dugi niz godina, no jedini sustavni podatci o koncepciji kobila analizirani su u CRSH d.o.o. (Nervo i sur., 2013.) tijekom tri pripusne sezone pokazali su da je koncepcija kobila u prvom ciklusu iznosila 80% za svježe sjeme, 90,9% za ohlađeno te 45,5% za duboko smrznuto sjeme rasplodnjaka. Ukupna koncepcija tijekom prvog i drugog ciklusa, odnosno ukupna koncepcija po sezoni iznosila je 90% za svježe sjeme te 100% za ohlađeno i duboko smrznuto/odmrznuto sjeme pastuha (Nervo i sur., 2013.). Što se tiče razvoja umjetnog osjemenjivanja u RH ono se može usmjeriti u dva smjera. Prvo je uvoz kvalitetnog genetskog materijala, odnosno sperme kvalitetnih rasplodnjaka, što ima veliki značaj u pogledu oplemenjivanja i osvježavanja krvi pri čemu bi se svakako stvorila dobra baza za uzgoj kvalitetnijih sportskih konja. U drugom pak smjeru razvoj umjetnog osjemenjivanja može se usmjeriti ka stvaranju banke sperme, što bi imalo za cilj bolju kontrolu sjemeni kvalitetnih pastuha te povećanje njegove dostupnosti u svim dijelovima naše države, kao i veće mogućnosti njegovog izvoza (Prvanović Babić i sur., 2012.). Daljnji preduvjet za uvođenje umjetnog osjemenjivanja i njegova šira primjena na terenu je edukacija doktora veterinarske medicine u području asistiranog razmnožavanja. Liberalizacija propisa u području uzgoja domaćih životinja unutar granica EU omogućuje da svaki veterinar može naručiti i koristiti ohlađeno sjeme pastuha. Prema Zakonu o uzgoju domaćih životinja (NN 115/18, 52/21) i fizičke osobe (uzgajivači, članovi obiteljskog poljoprivrednog gospodarstva, zaposlenici na poljoprivrednom gospodarstvu), ako su za to osposobljene te raspolažu propisanim opremom i priborom, mogu obavljati na vlastitom stadu (čl. 18. navedenog Zakona). Edukacija u ovom području bi pridonijela da mnoge veterinarske stanice koje vrše stručni nadzor rasplodivanja provodeći ginekološke i transrektalne ultrazvučne preglede kobila mogu na sebe preuzeti UO kobila ohlađenim sjemenom, kao tehniku asistiranog razmnožavanja. Važnost primjene UO kobila se povećava te sve više uzgajivača konja traži uslugu osjemenjivanja svojih kobila, što je najčešće povezano i s liječenjem smanjene plodnosti kobila, pogotovo zbog činjenice da sportske kobile često kasno ulaze u rasplod, nakon završene sportske karijere, kada je njihova plodnost fiziološki smanjena (Prvanović Babić i sur., 2014.). Za terensku primjenu mnogo je jednostavnije UO kobila ohlađenim sjemenom pastuha, uz uvjet da se može organizirati adekvatan transport unutar 24 sata. Razrijeđeno i ohlađeno sjeme

također je pogodno za ergelski uzgoj te se već duži niz godina primjenjuje na Državnoj ergeli Đakovo i Lipik, gdje se provodi polučivanje i razrjeđivanje ejakulata lipicanskih pastuha te UO lipicanskih kobila, čime se smanjuje potreban broj skokova pojedinih pastuha. Na dnevnoj bazi izračunava se potreban broj doza sjemena te se pastusi ne iscrpljuju višekratnim skokovima, a kobile u postupku UO se svakodnevno pregledavaju te se na taj način postiže bolja plodnost pastuha i bolja koncepcija kobila. Primjena DS sjemena, s druge strane, još je uvijek ograničena na centre i specijalizirane klinike, jer zahtjeva višekratne preglede kobila, da bi se osjemenile unutar 6 sati od ovulacije te postigla zadovoljavajuća koncepcija. Šira primjena UO kobila zahtijeva doktore veterinarske medicine, specijalizirane za reprodukciju konja te kontinuirano stručno usavršavanje u ovom polju. Kako navode Aurich i Aurich (2006.) rasplodivanje konja i UO kobila ne smiju se zanemariti u nastavnim programima studija veterinarske medicine. Praksa nekih vlasnika konja da svoje kobile vode na osjemenjivanje izvan RH, dijelom je posljedica nedovoljnog broja stručnjaka u području reprodukcije konja. Kako navode Aurich i Aurich (2006.) "ako se među veterinarima na osigura stručan kadar za primjenu UO kobila, taj bi segment posla mogli preuzeti tehničari pod vodstvom drugih srodnih struka vezanim za znanost o životinjama". Kako bi uzgojili vrhunske sportske i jahaće konje nužno je posezati za elitnim genetskim materijalom. Kako je već rečeno, ulaskom Hrvatske u EU međunarodna trgovina kvalitetnim genetskim materijalom značajno je olakšana, kao i šira primjena UO u konjogojstvu, čime je omogućen napredak i provedba uzgojnih programa sportskih toplokrvnih, kao i izvornih i zaštićenih pasmina konja. Za daljnji razvoj metoda asistirane reprodukcije konja u RH nužno je formiranje EU odobrenog centra za prikupljanje i distribuciju sjemena, jajnih stanica i embrija kopitara. Uz već spomenuti razvoj konjogojstva, takav bi centar bio vrijedna baza za prikupljanje sperme, jajnih stanica i embrija hrvatskih autohtonih pasmina kopitara (konja i magaraca) za banku gena. S obzirom na činjenicu da se radi o strateški važnoj instituciji čija je komercijalna isplativost zbog velikog inicijalnog ulaganja upitna, najlogičniji i jedini moguć put je da se predmetni centar osnuje u sklopu Klinike za porodništvo i reprodukciju Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, po uzoru na slične centre i stanice za umjetno osjemenjivanje i embriotransfer Veterinarskog sveučilišta u Beču i drugim razvijenim zemljama u EU.

Popis literature

1. Allen, W.R. (2005.): The Development and Application of the Modern Reproductive Technologies to Horse Breeding. *Reprod. Dom. Anim.* 40, 310-329.
2. Anonimus (2009.): Pravilnik o mjerama kontrole arteritisa konja. *Narodne novine* 62/2009. 5.

3. Anonimus (2021): Zakon o izmjenama i dopunama Zakona o veterinarstvu. Narodne novine 52/21. 7.
4. Anonimus (2021.): Zakon o izmjenama i dopuni Zakona o uzgoju domaćih životinja. Narodne novine 52/21.
5. Aurich, J., C. Aurich (2006.): Developments in European Horse Breeding and 31 31 Consequences for Veterinarians in Equine Reproduction. *Reprod. Dom. Anim.* 41, 275-279. 13.
6. Galli C, I. Lagutina, G. Crotti, S. Colleoni, P. Turini, N. Ponderato, R. Duchi, G. Lazzari (2003.): A cloned horse born to its dam twin. *Nature* 2003; 424:635.
7. Gambini, A., M. Maserati (2017.): A journey through horse cloning. *Reprod. Fertil. Dev.* 30 (1), 8-17.
8. Hajčić, B.; M. Samardžija, J. Grizelj, T. Dobranić, Z. Makek, I. Getz, N. Prvanović (2008.): Embriotransfer u kobila. *Veterinarska stanica* 39(6), 335-348.
9. Hinrichs, K. (2006): A Review of Cloning in the Horse. *AAEP PROCEEDINGS Vol 52.*, 398-401.
10. Ivkić, Z., D. Pašalić, F. Poljak, D. Solić, M. Molnar, J. Pavičić, V. Tomše Đuranec, D. Tadić, M. Šošić, V. Tissauer, J. Cvitaš (2021): Godišnje izvješće za 2020. godinu - Kopitari. Hrvatska agencija za poljoprivredu i hranu. Centar za stočarstvo, Osijek, 2021.
11. Ivkić, Z., D. Solić, M. Molnar, D. Pašalić, F. Poljak, V. Tomše Đuranec, J. Pavičić, D. Tadić, M. Šošić, V. Tissauer, F. Vrbanić, J. Cvitaš (2022.): 33 33 Godišnje izvješće za 2021. godinu - Kopitari. Hrvatska agencija za poljoprivredu i hranu. Centar za stočarstvo, Osijek, 2022. 36.
12. Janeš, A (2020.): Uloga veterinara u reprodukciji sportskih konja. Diplomski rad. Veterinarski fakultet, Zagreb.
13. Klein c., j.m. Donahue, s.f. Sells, e.l. Squires, p.j. Timoney, m.h.troedsson (2012.): Effect of antimicrobial-containing semen extender on risk of dissemination of contagious equine metritis. *J Am Vet Med Assoc.* 241(7), 916-921.
14. Kowalczyk, a., e. Czerniawska-piatkowska, m. Kuczaj (2019): Factors Influencing the Popularity of Artificial Insemination of Mares in Europe. *Animals* 9, 460; doi: 10.3390/ani9070460
15. May, c.e., a.j. Guthrie, b. Keys, c. Joone, m. Monyai, m l. Schulman (2016.): Polymerase chain reaction-based national surveillance programme to determine the distribution and prevalence of *Taylorella equigenitalis* in South African horses. *Equine Vet J.* 48(3), 307-311. 44.
16. Metcalf, E.L. (2007.): The efficient use of equine cryopreserved semen. *Theriogenology* 68 (5), 423-428.
17. Morris, L.H.A. (2004.): Low dose insemination in the mare: an update. *Anim. Reprod. Sci.* 82-83, 625-632.
18. Nervo, v., a: Orak, m kajganić, n Prvanović Babić, j. Grizelj, juraj, i. Getz (2013): Učinkovitost umjetnog osjemenjivanja kobila svježim, ohlađenim

- i duboko 34 34 smrznutim sjemenom pastuha. Veterinarska stanica 44 (5), 351-358.
19. Prvanović, N., M. Cergolj, m. Čačić, a. Gašpar, s. Horvat, j. Grizelj, i. Getz, m samardžija, t. Dobranić (2008.): Utjecaj pasmine, pariteta i dobi na uspješnost rasplodne sezone i postotak koncepcije kobila. Zbornik radova 4. Hrvatskog veterinarskog kongresa, Šibenik, 5.-8. 11. 2008. Intergrafika TTŽ doo, 239-245.
 20. Prvanović Babić, n., p. Franko, a. Orak, i. Getz, t. Dobranić, j. Grizelj, i. Folnožić, g. Bačić, t. Karadjole, m. Samardžija (2012): Analiza postojećeg stanja i mogućnosti šire primjene umjetnog osjemenjivanja konja u Republici Hrvatskoj. Veterinarska stanica 43, 35-43. 52. PRVANOVIĆ BABIĆ, N. (2014.): Primjena umjetnog osjemenjivanja u konjogojstvu. Zbornik predavanja I. Savjetovanja uzgajivača konja u Republici Hrvatskoj, Hrvatska poljoprivredna agencija, Vrbovec, 25. travnja 2014.; 36-42
 21. Prvanović babiĆ, n., i. Getz, j. Grizelj, g. Bačić, n. Maćešić, t. Karadjole, m. Baban, n. Korabi, m. Samardžija, t. Dobranić (2014): Primjena metoda asistiranе reprodukcije u hrvatskih autohtonih i sportskih pasmina konja. Proceedings and abstracts, 7th international scientific/professional conference, Vukovar, 28th - 30th May 2014. Agriculture in nature and environment protection. Glas Slavonije d. d., Osijek, str. 122-126.
 22. Prvanović Babić, n., m. Lojkić, t. Karadjole, n. Maćešić, g. Bačić, i. Getz, a. Kostelić (2019.): Reproaktivno zdravlje rasplodnih pastuha. Zbornik radova 6. savjetovanja uzgajivača konja u Republici Hrvatskoj, 15. ožujak 2019., Kutina; str., 22- 26.
 23. Stice, s. L., j. M. Robl, f. A. Ponce de leon, j. Jerry, p. G. Golueke, j. B. Cibelli, j. J. Kane (1998.): Cloning: new break throughs leading to commercial opportunities. Theriogenology 49, 129-138.