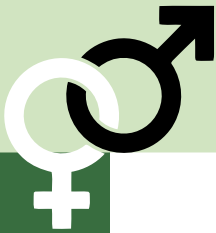


► Darie G., Cibotaru E., Iurcu Iu.,
Pîrlog A., Rotari D.

BIOTEHNOLOGII ÎN REPRODUCȚIA TAURINELOR



Darie G., Cibotaru E., Iurcu Iu., Pîrlog A., Rotari D.

**BIOTEHNOLOGII
ÎN REPRODUCȚIA TAURINELOR**



Maximovca 2022

CZU 606:636.2

D 19

În lucrare sunt prezentate materiale cu privire la apariția, dezvoltarea și utilizarea biotehnologiilor de reproducție a taurinelor care reprezintă ansamblul metodelor, procedeele sau operațiilor care se folosesc pentru obținerea în condiții optime, a unor noi generații de animale, din ce în ce mai performante. Biotehnologiile de reproducere a animalelor reprezintă domeniul cel mai nou și de perspectivă a biologiei contemporane, motiv pentru care deplina formare a specialiștilor în domeniul obținerii produselor de origine animală va fi condiționată de pregătirea teoretică și practică în acest domeniu.

Materialele expuse în monografie au fost examinate și aprobate pentru editare la ședința Cnsiliului științific al Institutului Științifico-Practic de Biotehologii în Zootehnie și Medicină Veterinară. Proces verbal nr. 1 din 28 ianuarie 2022.

Monografia a fost elaborată în cadrul proiectului 20.80009.5107.20 ”Managementul potențialului genetic și a producțiilor animalelor de rasă reproduse și exploatate în condițiile pedoclimaterice ale Republicii Moldova”.

Recenzenți:

Igor Petcu, doctor în agricultură, conferențiar universitar - Institutul Științifico-Practic de Biotehologii în Zootehnie și Medicină Veterinară – Director adjunct pentru știință.

Ion Balan, doctor habilitat în biologie, conferențiar universitar - Universitatea Agrară de Stat din Moldova - Facultatea de Medicină Veterinară - Departamentul Clinică II.

Descrierea CIP a Camerei Naționale a Cărții din Republica Moldova

Darie, G.

Biotehologii în reproducția taurinelor / Darie G., Cibotaru E., Iurcu Iu., Pîrlog A., Rotari D. – Maximovca: Print-Caro, 2022. – 244 p.: fig.20, fot.31, tab.14

Referințe bibliogr.: p. 238-246. – 100 ex. ISBN 978-9975-56-995-8.

Tipar executat la tipografia ”Print-Caro”
str. Columna, 170

CUPRINS

	INTRODUCERE	4
1	ALEGEREA VACILOR PENTRU REPRODUCȚIE	12
2	FUNCȚIA DE REPRODUCERE LA VACĂ	21
3	SPERMATOGENEZA	41
4	RECOLTAREA MATERIALULUI SEMINAL	52
5	NOȚIUNE DE SPERMOGRAMĂ ȘI TIPURI DE SPERMOGRAME	59
6	DILUAREA SPERMEI	68
7	CONSERVAREA SPERMEI	77
8	STRUCTURA OVARULUI	93
9	TEHNOLOGIA REPRODUCERII TAURINELOR	123
10	NUTRIȚIA ȘI ÎNTREȚINEREA TAURINELOR DE REPRODUCȚIE	128
11	ÎNSĂMÎNȚAREA ARTIFICIALĂ LA VACĂ	143
12	REGLAREA NEURO ENDOCRINĂ A CICLULUI ESTRAL	159
13	ETAPELE BIOTEHNOLOGIEI ÎNSĂMÎNȚĂRILOR ARTIFICIALE	165
14	MANIPULAREA MATERIALULUI SEMINAL CONGELAT	194
15	METODE DE INOCULARE A SPERMEI	201
16	TRANSFERUL DE EMBRIONI	205
17	INDICII DE REPRODUCȚIE	211
18	GESTAȚIA	214
19	PARTURIȚIA	223
	BIOBLOGRAFIE SELECTIVĂ	235

INTRODUCERE

Reproducerea animalelor prezintă numeroase aspecte biologice, tehnologice și economice, care influențează direct nivelul cantitativ și calitativ al producțiilor animaliere, ceea ce sublinează interdependența dintre producție și reproducție în zootehnia modernă.

Progresele tehnico-științifice remarcabile care s-au înregistrat în cadrul științelor biologice, implicit celor zootehnice, au influențat puternic gândirea biologică și tehnologică asupra reproducției, pe linia aplicării creatoare a rezultatelor cercetărilor științifice.

De asemenea, reproducția animalelor, prin biotehnica însămînțărilor artificiale și optimizarea indicilor de natalitate și de prolificitate, contribuie substanțial la grăbirea ritmului și a gradului de ameliorare a efectivelor. Vintilă I și col. menționează că ameliorarea este un proces fundamental filogenetic și ca atare, dinamica ei este condiționată strict de succesiunea ritmică a generațiilor, deci, de reproducție. Selecția – factorul de bază al ameliorării nu trebuie înțeleasă ca o simplă alegere a plus – variantelor genetice dintr-o generație, ci ca o realizare a unei generații noi de indivizi adulți din aceste plus – variante, ceea ce înseamnă iarăși reproducție în primul rînd și posibilitatea pe care reproducția le-a oferit ameliorării prin realizarea însămînțărilor artificiale, mai ales în condițiile în care acțiunea se poate baza pe sperma congelată, sau de perspectivele pe care le prezintă la animale transferul de embrioni, inducerea estrului „extra sezon”, provocarea poliovulației, obținerea de produși „liberi” de germeni patogeni.

În același timp cunoștințele noi, moderne, din domeniul reproducției animalelor, dobîndite în condițiile revoluției tehnico-științifice contemporane, trebuie bine însușite și corect aplicate de către specialiștii care lucrează în diferite sectoare ale zootehniei.

Nauc V. și colab., Milovanov V. au demonstrat că mecanismul biologic al crioconservării constă în reducerea metabolismului celular, ca rezultat al scăderii temperaturii la nivel celular. Dependent de nivelul temperaturii, conservarea se realizează pentru o perioadă mai scurtă sau mai lungă de timp. În primul caz, prin scăderea temperaturii la 0-5°C (temperatura de refrigerare) are loc o încetinire a metabolismului, celulele putînd fi păstrate doar cîteva zile. Această metodă nu este de interes pentru conservarea

resurselor genetice ale animalelor de fermă, ci doar pentru a facilita în anumite situații realizarea însămînțării artificiale.

Ostașco F., demonstrează că scăderea temperaturii sub punctul de congelare determină evacuarea apei intracelulare și cristalizarea celei reziduale, astfel încît în lipsa unui sistem apos (specific celulelor vii) metabolismul celular este redus. Eliminarea apei intracelulare se realizează datorită mecanismului osmotic, mediile de crioconservare (diluante) avînd în compoziția lor substanța crioprotectoare care modifică presiunea osmotică. Pentru ca apa să poată fi evacuată eficient din celule, după plasarea celulelor în mediile de crioconservare e necesară parcurgerea unei etape de echilibrare (a presiunii osmotice). Odată cu inițierea congelării, o parte din moleculele de apă din mediul extracelular vor cristaliza, ceea ce determină reducerea volumului de lichid și implicit creșterea concentrației substanțelor în mediul rămas. Ca urmare a efectului soluției, apa intracelulară va continua să traverseze membranele biologice în tendința firească de a dilua mediul extracelular și de a echilibra astfel presiunea osmotică. Fenomenul continuă pînă la cristalizarea completă a moleculelor de apă libere atît din mediul extracelular, cît și din cel intracelular.

Medvedev P.M. și col., Milovanov V. și col. Nauc V. și col. au demonstrat că alături de apa de constituție (5-10%), o cantitate mică de apă liberă nu va putea părăsi sistemul celular, constituind așa numită apă reziduală (10%). Dacă apa de constituție (legată) nu cristalizează, indiferent de nivelul temperaturii, în schimb apa liberă va forma cristale în interiorul celulelor. Dependent de nivelul temperaturii, pot avea loc și alte fenomene la nivel celular. În acest sens, se consideră că la -150°C toate procesele biologice intracelulare încetează, iar la -196°C (temperatura azotului lichid) toate reacțiile termice din sistemele apoase sunt sistate, rezultînd așa numita anabioză. Datorită acestor fenomene, pentru stocarea celulelor pe perioade îndelungate se practică depozitarea în azot lichid, sau mai rar în ultra-congelatoare ($\sim 150^{\circ}\text{C}$). Menținerea continuă a celulelor la aceste temperaturi asigură o conservare de calitate, precum și o supraviețuire acceptabilă a celulelor consecutiv decongelării, chiar și după perioade îndelungate de timp. În urma evacuării apei intracelulare, are loc o puternică deshidratare celulară, fenomen care determină pătrunderea în celule a agenților crioprotectori cu molecule mici (agenți crioprotectori interni). Dependent

de nivelul metabolic înregistrat în acel moment, agenții crioprotectori pot exercita o acțiune citotoxică. În aceste condiții, timpul necesar deshidratării, corelat cu o acțiune citotoxică cât mai scăzută a agenților crioprotectori (respectiv nivelul temperaturii celulare), au o influență majoră asupra succesului crioconservării. Pe de altă parte însă, după cum concluzionează Ostașco F. și col. viteza scăderii temperaturii este dependentă de tipul celular, raportul volum: suprafață celulară, compoziția mediului de congelare, permeabilitatea membranelor celulare etc. Cu privire la tipul celular, crioconservarea gameților reprezintă extremele în lumea animalelor în condițiile în care spermatozoizii conțin cea mai mică cantitate de apă, iar ovocitele cea mai mare. Din acest punct de vedere evacuarea apei solicită rate de scădere a temperaturii diferite și implicit un proces de congelare ce are o durată ce poate influența viabilitatea celulară prin intermediul citotoxicității celulare exercitate de agenții crioprotectori. Tipul celular nu influențează succesul crioconservării doar prin volumul celular și implicit a cantității de apă ce trebuie evacuată. Un alt parametru important pentru eficiența deshidratării este reprezentat de raportul volum-suprafață celulară. Și din acest punct de vedere spermatozoizii beneficiază de un avantaj, datorită formei lor, avînd un raport mai mic în comparație cu ovocitele sau chiar cu embrionii. Acest raport mare oferă practic o suprafață membrana-ră mult mai mare în raport cu volumul celular și implicit o eficiență mai mare în evacuarea apei intracelulare. Vintilă I. și col., prin cercetări au demonstrat că se reduce astfel cantitatea de apă reziduală și efectele negative exercitate de cristalele de gheață intracelulare asupra arhitecturii celulare. Aceasta înseamnă că rata de scădere a temperaturii trebuie corelată cu capacitatea celulelor de a elibera în exterior apa pe care o conțin, respectiv cu timpul necesar pentru evacuarea acesteia, celulele mari, sferice (ovocite, embrioni) avînd o capacitate mult mai redusă de echilibrare, comparativ celulelor cu volum mic și forme particulare (spermatozoizi, eritrocite etc.).

Acțiunea frigului provoacă leziuni la nivelul membranelor celulare, a arhitecturii citoplasmice, a organelor și ADN-ului, ce conduc la o scădere drastică a calității și chiar a viabilității celulare, proces denumit șoc criogen. Ostașco F. și col., au demonstrate, că principala acțiune negativă a temperaturilor scăzute se consideră a fi exercitată la nivelul membranelor, care suferă o pierdere a permeabilității selective. În acest sens, s-a demonstrat faptul că temperaturile negative determină o instabilitate a le-

găturilor monocovalente, o reducere a mobilității moleculelor lipoproteice și o schimbare a structurii biochimice membranare. Temperaturile scăzute induc la nivelul membranelor o creștere a concentrației colesterolului membranar și o trecere a fosfolipidelor din starea fluidă, în cea gelatinoasă și apoi cristalină, ambele procese avînd ca rezultat reducerea treptată a flexibilității membranelor. Creșterea raportului acizi grași nesaturați: saturați și scăderea raportului colesterol-fosfolipide conduce la o instabilitate structurală a celulelor.

Platov E. a demonstrat, că un alt efect al scăderii temperaturii este reprezentat de reducerea treptată a cantității de ATP, cu consecințe negative asupra eficienței funcționării pompelor de ioni (Na^+ și K^+) și implicit asupra mecanismului de reglare a volumului celular. Reducerea temperaturii determină scăderea vitezei de ieșire a ionilor și creșterea intracitoplasmatică a concentrației acestora. În paralel, membranele celulare se depolarizează, influxul ionilor de Ca^{2+} crește, rezultînd o hidrolizare a fosfolipidelor, respectiv o creștere exagerată a permeabilității membranelor, cu consecințe negative asupra viabilității celulare. Mediile de congelare (diluanți) conțin substanțe cu rol de protecție a celulelor împotriva efectelor distructive ale temperaturilor scăzute. Aceste substanțe poartă denumirea generică de agenți crioprotectori, iar dependent de modalitatea lor de acțiune sunt interni și externi.

Totodată, succesul crioconservării spermei depinde de o serie de factori, incluzându-se aici calitatea inițială a spermei, tehnologia de crioconservare, precum și susceptibilitatea specifică a spermatozoizilor la stresul termic, mecanic și osmotic în timpul procesului de răcire și congelare.

Faptul ca după 1990, domeniul animalelor din specia taurină, au făcut ca cercetările privind această specie să înregistreze un regres, din 2010, preocupările specialiștilor și interesul crescătorilor din domeniu au început din ce în ce mai mult să se îndrepte spre această specie, care este una din cele mai importante specii din cadrul economiei țării.

Sensibilitatea celulelor seminale conduce la obligația ca în toată perioada de timp petrecută în afara condițiilor naturale, adică între momentul recoltării și al însămînțării să se ia toate măsurile pentru a proteja spermatozoidul de agenții cu acțiune dăunătoare asupra viabilității sale.

Este bine cunoscut faptul că, atît mobilitatea cît și activitatea metabolică a spermatozoizilor variază odată cu temperatura. În stare congelată

spermatozoizii sunt imobili, iar activitatea lor metabolică este complet întreruptă. Dacă scăderea temperaturii se face brusc, se instalează șocul termic care se concretizează în creșterea permeabilității membranei celulare și pierderea în consecință a proteinelor, lipidelor, potasiului și a fosforului lipidic (Milovanov V. și col.).

Chiar dacă în etapa actuală numărul bovinelor a înregistrat în țara noastră o scădere, pe plan mondial creșterea bovinelor are un caracter ascendent, cum și îmbunătățirea efectivelor și creșterea eficienței economice.

Specializarea bovinelor pentru obținerea unui nivel maxim de eficiență economică, a căror însușiri productive sunt împinse pînă la limitele extreme ale fiziologiei, predispun organismul la o labilitate a echilibrului lor organic și mai ales a sistemului neuroendocrin, ori de cîte ori se manifestă asupra lor perturbările ale factorilor de mediu, exploatarea excesivă, în neconcordanță cu asigurarea factorilor de mediu pe măsura cerințelor și nivelul de producție, determină tulburări de o intensitate mai mică sau mai mare ale funcției de reproducție, care contribuie tot mai mult la instalarea infecundității sau a sterilității. Forțarea potențialului productiv al bovinelor implică dereglarea frecventă și cu impact a mecanismelor de reglare și autoreglare a proceselor fundamentale ale reproducției (Miclea V. și col.).

Problematica patologiei reproducerii a fost și este pe ordinea de zi a tuturor întrunirilor pe plan național și internațional în domeniul reproducției și a însămînțărilor artificiale precum și în domeniul cercetării științifice.

Abordarea o asemenea tematică, rămîne în continuare de mare actualitate, iar studiul etiopatogeniei, infecundității și sterilității poate contribui la rezolvarea unei dintre cele mai importante probleme din domeniul reproducției taurinelor.

Importanța însămînțărilor artificiale

Însămînțarea artificială reprezintă o metodă biotehnică de optimizare a funcției de reproducere la animale domestice, constituind veriga de bază în activitatea de ameliorare (Milovanov V.).

Prin însămînțarea artificială se înțelege operațiunea propriu-zisă de introducere a materialului seminal în organele genitale femele, folosind un instrumentar adecvat specificului anatomic și fiziologic al acestei specii.

Fondatorul însămînțărilor artificiale la animale este considerat savantul rus Ilia Ivanov, care și-a desfașurat activitatea în acest domeniu în perioada 1890-1935.

În secolul al XX-lea și mai ales în a doua jumătate a acestuia, însămînțările artificiale trec din stadiul experimental în stadiul de largă aplicare practică, fiind astăzi o practică foarte raspîndită în toate țările cu zootehnie avansată.

Însămînțările artificiale s-au extins în practică datorită unor evidente avantaje de ordin zootehnic, sanitar-veterinar și științific.

Importanța zootehnică

Avantajul major al practicării însămînțărilor artificiale îl constituie ameliorarea genetica a efectivelor prin folosirea rațională și intensivă al reproducătorilor masculi de o mare valoare biologică, pe un efectiv foarte mare de femele, față de cel care poate fi cuprins prin folosirea acestora la monta naturală. În acest sens, materialul seminal dintr-un ejaculat poate fi fracționat în sute sau chiar mii de doze cu care pot fi însămînțate tot atîtea femele, față de monta naturală care aceasta este folosită pentru însămînțarea unei singure femele. În cazul în care un taur este folosit într-un sezon de reproducție nu poate monta eficient decât în medie 50-70 femele, comparativ cu încărcătura de femele pe taur în cazul însămînțărilor artificiale, care poate ajunge și pînă la 8.000, fiind în medie de 3.500 femele.

Un alt avantaj deosebit este faptul că prin utilizarea tehnicilor moderne de congelare a materialului seminal în azot lichid, un reproducător de mare valoare zootehnică poate fi utilizat la reproducere mulți ani, chiar și după moartea lui (dacă s-a constituit un depozit).

De asemenea, prin practicarea acestei tehnici, avem posibilitatea de a utiliza la reproducție doar tauri testați în privința transmiterii ereditare a unor însușiri morfo-productive superioare, existînd posibilitatea unei selecții riguroase, aprecierea valorii de ameliorare realizându-se prin metoda testării după descendenți, asigurându-se astfel progresul genetic scontat de la o generație la alta.

Un alt avantaj zootehnic al însămînțărilor artificiale îl constituie posibilitatea schimbului internațional de gene valoroase, chiar la distanțe continentale, fără transportul și aclimatizarea reproducătorului, ci numai prin transportul unor recipiente cu azot lichid, care conțin materialul.

De asemenea, prin examenul complex și sanitar-veterinar se pot depista reproducători cu diferite anomalii congenitale ale aparatului genital sau cu tulburări ereditare ale spermatogenezei, care ar fi greu sau deloc depistabile în cazul monei. Astfel, se poate aplica o profilaxie genetică a sterilității.

Importanța sanitar veterinară

Extinderea înșămînțărilor artificiale la taurine s-a înscris și ca măsură eficientă de stăpînire sau chiar eradicare a unei serii de boli cum ar fi bruce-loza, vibrioza sau trichomonoza cu etiologie parazitată și infecțioasă.

Prin folosirea acestui procedeu, există posibilitatea de a se obține produși:

*** de la femele cu anumite anomalii ale tractului genital, care prin practicarea monei naturale nu pot fi fecundate ca de exemplu:

- anomalii anatomice în structura gîtului uterin (cervix), care constituie obstacole mecanice în înaintarea spermatozoizilor către zona de fecundare;
- spasmul vulvo-vaginal care determină refularea spermei depusă de mascul în segmentul vaginal;
- secreții cu efect nociv asupra spermatozoizilor la nivelul vaginului sau cervixului;
- controlul de laborator și eliminarea de la reproducție a masculilor a caror spermă prezintă gameți anormali și care nu au capacitate fecundantă;
- controlul de laborator al stării sanitar-veterinare a spermei brute sau congelate, pentru a preveni difuzarea bolilor infecto-contagioase de la taurii contaminați.

Importanța științifică

Interesul științific asupra înșămînțărilor artificiale prezintă multiple aspecte.

În primul rînd, s-au putut efectua importante cercetări științifice asupra biochimiei, histochemiei și imunologiei reproducției: în general și a spermei în special, astfel încît există astăzi o bogată literatură de specialitate în care celula sexuală masculă este studiată la nivel biochimic, molecular

și la nivel de microscopie electronică. Aceste cercetări științifice au constituit baza pentru progresul rapid, mai ales în ultimii ani, în domeniul metodelor de laborator pentru testarea capacității fecundante a spermei, a congelării materialului seminal și a aplicării practice a însămînțărilor artificiale.

În cercetarea științifică, însămînțarea artificială a permis obținerea de hibridi între specii diferite aparținând aceluiași gen care în mod normal nu se împerechează.

În concluzie, putem spune că o activitate cu caracter prioritar în strategia de dezvoltare a taurinelor o reprezintă ameliorarea genetică a efectivelor, activitate de vîrf, care se poate realiza prin lucrări de selecție efectuate pe baza controlului oficial al performanțelor productive și prin practicarea unei reproducerii dirijate, cu precădere prin însămînțarea artificială.

1. ALEGEREA VACILOR PENTRU REPRODUCȚIE

O ramură de importanță a agriculturii prezintă creșterea bovinelor deoarece furnizează cel mai mare volum de produse animale necesare omului și cea mai mare cotă materie primă pentru industrie alimentară și industrie ușoară.

Obținerea unor producții sporite și de calitate superioară, conform cerințelor pieței, stă în atenția specialiștilor în zootehnie, care prin munca lor în domeniul cercetării, contribuie la îmbunătățirea și perfecționarea tehnologiilor de creștere, întreținere, furajare și reproducție.

În țările Uniunii Europene tendința actuală este reducerea numărului de taurine și compensarea producției animaliere prin creșterea potențialului productiv folosind metode moderne de reproducție și de îmbunătățire a tehnologiilor de exploatare.

Aferent celor prezentate, referitor la situația actuală și de perspectivă a creșterii taurinelor în țara noastră, principalele obiective vizează în primul rând, creșterea parametrilor funcționali ai exploatațiilor existente, îmbunătățirea potențialului genetic și aplicarea unei biotehnologii de reproducție moderne.

Biotehnologiile de reproducție sunt reprezentate de totalitatea măsurilor cu caracter zootehnic organizatoric și sanitar veterinar aplicate în scopul perfectării speciei și obținerii unui număr cât mai mare de produși de la același număr de femele.

Tehnologiile de reproducere au influență directă asupra majorării producției de lapte ca urmare a faptului că derularea normală a funcției de reproducere este declanșarea lactației și a producției de carne deoarece printr-o reproducție bună se obțin mai mulți produși disponibil pentru creștere/îngrășare.

Reproducția este și un indicator al eficienței biologice și economice într-o fermă. Rentabilitatea maximă se obține doar de la vacă de lapte care are o durată de exploatare lungă ceea ce se obține numai printr-o exploatare rațională de la animale sănătoase.

În creșterea taurinelor, performanțele economice sunt puternic influențate de realizarea unui vițel în fiecare an calendaristic. Anul și vițelul nu este un slogan ci criteriu al eficienței managementului.

Pentru o bună fertilitate este nevoie de sănătatea animalelor, astfel suc-

cesul reproductiv devine un indicator de bunăstare. Succesul unei producții este influențat și de factorii genetici care determină diferențe individuale între performanțele reproductive chiar dacă sunt exploatate în aceleași condiții. Cauzele care determină alterarea funcției de reproducție sunt numeroase, pornind de la alegerea și pregătirea animalelor pentru reproducție pînă la factorii de exploatare, stresul, însămînțarea, gestație, fătarea.

Toate aceste aspecte de care depinde rezultatele în reproducție fac să fie un sector dificil, iar diagnosticul infertilității un factor greu de precizat. Crescătorul și însămînțătorul au un rol important în desfășurarea unei producții eficiente.

Realizarea potențialului genetic actual a fost posibilă printr-o activitate susținută a crescătorilor în reproducție privind înregistrarea reproducției la fiecare femelă și a producției de lapte, dar și folosirea însămînțărilor artificiale. Tot acest program de urmărire a reproducție este însoțit de instruirea permanentă a crescătorilor privind alcătuirea planului de monta și fătări, descoperirea la timp a femelelor în călduri, efectuarea la momentul potrivit și în condiții optime a însămînțărilor ce are, urmarea perioadă de gestație și cum decurge fătarea.

Orice îmbunătățire a managementului reproducției duce la o mai bună și profitabilă fermă de vaci cu lapte.

Acum preocuparea permanentă a crescătorilor, să fie de a asigura tot ceea ce înseamnă confort respectiv bunăstarea animalelor pentru a beneficia de potențialul genetic în care a investit.

Este necesar de a investi în genetică, fiindcă genetică superioară aduce un spor de producție de lapte și carne, cu același efort depus de crescători. Astăzi nu este suficient să fii bun, pentru a reuși, trebuie în mod obligatoriu, să fii foarte bun. Cunoștințele și experiențele tradiționale sunt de mare ajutor în creșterea taurinelor însă, acestea nu trebuiesc considerate nici definitive și nici suficiente. Se recomandă folosirea pe scară largă a biotehnologiilor moderne ca una dintre cele mai avantajoase metode de reproducție a animalelor ce permite realizari în zootehnie și progresul al acestui important factor al economiei naționale.

În zootehnia occidentală performantă au început să apară limitele creșterii producției. Aceasta înseamnă că tehnologiile clasice oricît de performante ar fi ele singure nu mai sunt în stare să asigure în viitor o creștere ascendentă, liniară și constantă a producțiilor în zootehnie.

Speranța pentru evitarea apariției limitelor creșterii și împingerea lor cât mai departe de momentul actual sunt biotehnologiile moderne. Ele sunt chemate să completeze tehnologiile clasice și să le facă mai productive și mai eficiente.

Vintilă I. și col., afirmă că biotehnologiile avansate bazate bine pe metodele biologiei și geneticii moleculare au ca scop perfecționarea directă a mecanismelor genetice ale organismului, manipularea principalelor funcții ale acestora așa cum sunt funcția de reproducere, a glandei mamare, funcției creșterii și dezvoltării și cele ale apărării organismului. Toate contribuie fie la îmbogățirea genomului animalelor fie la obținerea unui plus de descendenți limitele naturale de reproducere a speciei fie la trecerea de la estimarea valorii genetice a indivizilor la precizare.

Succesele obținute pînă în prezent constituie premise ale accelerării fără precedent modificării structurii genetice a populațiilor de animale de interes zootehnic cu ajutorul selecției și hibridării (Bogdan A. și col).

Vintilă I., precizează că realizările biotehnologiilor moderne aplicate în zootehnie pot fi grupate în următoarele direcții:

1. Creștere considerabilă a numărului descendenții de la un cuplu de animale prin manipularea funcției de reproducție a masculului cu ajutorul însămînțărilor artificiale, fecundității intra citoplasmatică conduse precum și pe cea a femelei pe calea super ovulației, embrio transferului și biotehnologiile asociate acesteia.
2. Îmbogățirea genomului animalelor domestice prin transgeneză și sporirea deliberată a diversității genetice în populație.
3. Cartarea genomului animalelor domestice și folosirea markerilor genetici precizarea valorii genetice a animalelor, făcînd posibilă aplicarea selecției asistată de molecule de AND, atît în faza embrionară cît și în cea post natală precum și obținerea de animale numai din sexul dorit de crescător.

Aceste date au un impact pozitiv în ameliorarea structurii genetice a populațiilor de animale de interes deoarece rezultatele lor contribuie la modificarea valorică a fiecărui dintre factorii ecuației efectului de selecție.

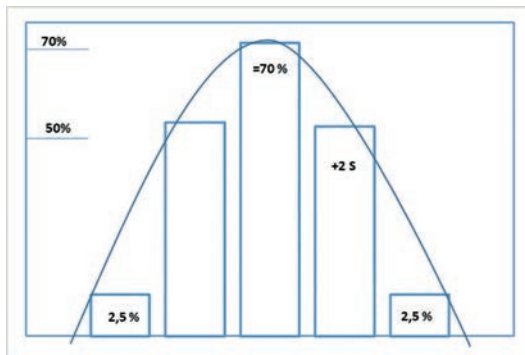
1. Modificarea structurii genetice a populațiilor de animale determinate de selecție poate fi accelerată de biotehnologii moderne.

Vintilă I. și col., au demonstrat că valoarea genetică a unei populații mare de animale este media unei caracteristici morfologice sau fiziologice.

Populațiile de animale de interes zootehnic indiferent de gradul lor de perfecționare genetică sunt alcătuite din 68% indivizi mediocrii (media $x \pm 0$ abatere standard).

La această categorie autorii mai adaugă încă 16% animale mai bune decât cele care alcătuiesc mediocritate precum și alte categorii reprezentând tot 16% animale ce sunt inferioare genetic mediei ± 0 sigmă. În orice populație 2,5% dintre toți indivizii sunt excelenți din punct de vedere genetic, iar 2,5% sunt cei mai răi din acest punct de vedere.

Din alt punct de vedere se menționează că valoarea genetică a indivizilor care compun o populație de animale domestice se distribuie după o curbă Gauss. Ea are o medie (x) și trei abateri standard (a) îndreapta mediei care constituie + variantele genetice ale populației și tot atâția abateri standard în stînga mediei, dar care contribuie variantele genetice ale acesteia. Dimensiunile medie și a unei abateri standard sunt proprii pentru fiecare caracteristică biologică luate în parte. Ea se poate afla prin calcul plecînd de la dimensiunea caracterului pe care-l are fiecare animal din populație. Numărul indivizilor care se cuprind într-o abatere standard este de asemenea diferită. În prima abatere standard în plus sau în minus față de medie se găsesc 68% din totalul animalelor din populație. În cea de a doua abatere standard (\pm) față de medie se găsesc doar 27% dintre indivizi, iar în cea de-a treia abatere standard (\pm se găsesc doar 5% dintre ei sau cîte 2,5% de fiecare extremă a clopotului lui Gauss (fig. 1).



Producția de lapte

Figura 1. Proprietățile curbei Gauss.

Media + 6 abateri standard, cîte trei de fiecare parte a mediei, constituie media populației și reprezintă de fapt structura genetică a populației respective pentru fiecare caracter cantitativ luat în considerare. Ea este dată de proporția (frecvența) genelor și genotipurilor care stau la baza caracterului studiat.

Legea Hardy Weinberg stipulează că într-o populație în care toți indivizii aceștia participă cu același număr de descendenți la producerea noii generații, structura genetică a acesteia nu se modifică, reiese că atunci cînd la producerea generației următoare participă numai cîtiva indivizi aleși după valoarea lor genetică, structura genetică a populației din generația următoare se va modifica, ea va fi altfel decît generația acesteia.

Un astfel de procedeu de reproducere a populației se numește **selecție**, iar modificarea obținută se numește efect de selecție. Dacă procesul de reproducere a populației continuă să se realizeze numai cu animale care au fost alese pe aceleași criterii atunci structura genetică a populației va căpăta o evoluție ascendentă al care-i „genom,, se va „îmbogăți,, mai ales cu gene care fac parte din grupul de gene preferat de selecționare.

Efectul selecției reprezintă o modificare de o anumită valoare a structurii genetice a populației, el se notează cu litera grecească (Δ) asemănător cu notația unei anumite modificări din fizică.

Fiindcă este vorba de modificare de structură genetică (g) efectul selecției se va nota cu Δg .

Gradul de modificare a structurii genetice datorat selecției depinde de:

- A. intensitate de selecție
- B. ponderea genelor aditive care stau la baza caracterului dezvoltării măsurat cu $-h^2$.
- C. intervalul dintre generații.

Cu cît se aleg mai puține animale din populație fie să producă generația următoare cu atît gradul de modificare a structurii genetice a populației va fi mai mare. Proporția de animale care se alege să producă generația următoare poartă denumirea de intensitate de selecție.

Ea este cu atît mai mare cu cît reproducerea populației se realizează cu participarea unei proporții mai mici de animale.

Intensitatea de selecție se măsoare fie în valori absolute corespunzătoare caracterului considerat (kg, cm, sec) fie în unități de abatere standard (i). Efectul de modificare a structurii genetice a populației (efectiv de selecție)

se obține cu adevărat și în mod repetat numai dacă animalele din populație sau efectiv destinate să producă generația următoare se aleg după criterii care pot să măsoare cât mai aproape de adevăr valoare genetică aditivă fiecărui animal astfel regresia descendenților față de părinți va lua valori foarte mari. Efectul genelor induse care stau la baza dezvoltării unui caracter cantitativ se regăsesc la descendenții acestora. Ele sunt acelea care dau ceea ce se numește predicția valorii de transmitere a caracterului la descendenți. Aceasta înseamnă că cu cât dimensiunea unui fenotip al unui caracter economic (lapte, carne) se realizează mai ales pe baza valorii genelor sale aditive cu atât și este mai mare calitățile lui după performanța proprie a animalului este mai precis (Cîrlan M.).

Vintilă I. și col. afirmă că gradul de participare a genelor cu interacțiune aditivă în felogeneza unui caracter cantitativ poate fi măsurat pe o populație cu ajutorul coeficientului de heritabilitate (h^2).

El măsoară cât din diferențele medii dintre indivizi pentru una și aceeași caracteristică biologică sunt produse de efectele genelor aditive și cât din acestea sunt produse de efectele genelor neaditive luate împreună cu cele datorate factorilor de mediu. Din această cauză valoarea h^2 se exprimă în procente sau în fracție zecimală. Se cunoaște că ea poate lua valori între zero și 100 procente în funcție de gradul de participare a genelor aditive la dezvoltarea caracterului considerat. Din literatura de specialitate se cunoaște că în cazul în care pentru un caracter valoarea coeficientului h^2 atinge 80 % sau 0,8 se va recunoaște că la baza dezvoltării sale stă mai ales gene aditive 80% dintre toate genele care-l determină. Invers, pentru caractere cu $h^2=0,10$ genele care-l determină nu reprezintă decât 100% din totalul acestora. Aceasta înseamnă că performanța proprie pentru un caracter cu h^2 cu valoare superioară ne va spune mai mult despre valoarea genetică aditivă a acestuia decât pentru patru caractere cu h^2 cu valoare scăzută. Valoarea lui h^2 ne dă indicații cu privire la precizia aprecierii valorii de ameliorare a animalului. Diferența dintre performanța proprie a unui individ față de a altui individ caracterizată cu valoare h^2 ne dă o cifra care reprezintă valoarea genetică aditivă a animalului sau valoarea lui de ameliorare (Maximilian C.și col).

Maximilian C.și col. au demonstrat că dacă numai efectul genelor aditive existente în performanța unui individ pentru un caracter se va regăsi la descendența sa și nu se va întâmpla la fel și cu efectele genelor sale me-

ditative atunci se înțelege că pentru aprecierea valorii genetice a unui individ nu ne va interesa decît valoarea genelor sale aditive. Vintilă I. și col. au demonstrat că dacă în performanța unui animal se cuprind atît efectele genelor aditive cît și efectele celor negative precum și pe cele ale mediului este foarte important de găsit o modalitate de a le separa unele de altele cu o probabilitate cît mai mare posibilă. Precizia însă a valorii genetice a animalului poate fi obținută numai prin genotiparea cu ajutorul markerilor ADN și a sondelor moleculare.

Din literatura de specialitate se cunoaște că intervalul dintre generații este factorul care contribuie substanțial la gradul de modificare a structurii genetice a unei populații pe un anumit interval de timp de regulă un an. Cu cît intervalul dintre generații este mai scurt cu atît progresul genetic sau gradul de modificare a structurii genetice pe unitate de timp este mai mare. Predicția cuantumului de modificare a structurii genetice a efectivului de animale supus selecției este extrem de important pentru majoritatea fermelor sau pentru asociație de crescători deoarece procesul selecției presupune angrenarea unor cheltuieli care trebuie să fie recuperate din progresul genetic obținut pe generație.

Se poate afirma că ecuația efectului de selecție ne ajută să argumenteze financiar propunerile de ameliorare a structurii genetice prin selecție, iar beneficiarul să poată decide în cunoștință de cauză asupra angajării sau a cheltuielilor pe care le presupune execuția proiectului.

Intensitatea de selecție care este dată de producerea de animale din efectiv care se aleg cu scopul de a fi folosite pentru obținerea generației următoare, animalele alese vor constitui lotul de selecție sau nucleul de selecție. Modificarea structurii genetice va fi cu atît mai mare cu cît proporția de animale alese în nucleul de selecție va fi mai mică. Alegerea dintr-un efectiv sau populația numai a animalelor care s-au dovedit a fi cele mai valoroase din punct de vedere genetic pentru a forma nucleul de selecție va atrage după sine crearea unei diferențe reale dintre media valorii acestora și de a efectivului din care s-au ales. Aceasta este diferența de selecție notată cu S și se va utiliza în ecuația Δg . Într-o populație cu variată constantă ($x \pm 3$) abateri standard (T), mărime din diferențe de selecție este diferită în funcție de proporția animalelor alese în lotul nucleului de selecție. Cu cît ea va fi mai mică cu atît și valoarea diferenței de selecție sporește. Acest fenomen se întîmplă deoarece cu cît sunt mai puține animale incluse în

lotul de selecție cu atât vor ajunge aici mai puține animale care nu fac parte din elita populației. Ca urmare media lotului de selecție va crește în valoare ceea ce va atrage după sine accentuare a diferenței dintre el și media populației din care s-a extras.

Așa dar, pentru a obține o sporire substanțială intensității de selecție (diferențe de selecție) de la numitorul ecuației Δg se micșorează cât mai mult posibil proporția animalelor cuprinse în lotul sau nucleul de selecție. Acest lucru însă nu poate fi îndeplinit fără urmări negative în economie și finanțele fermei. Micșorarea numărului de animale în lotul de selecție pentru limitele admise de caracteristicile reproducerii speciei și a parametrilor tehnologici realizați în fermă atrage după sine micșorarea nepermis de mult ai efectivului de animale din fermă cu fiecare generație care se succede proporția de animale alese pentru întregirea lotului de selecție este dictată de următorii factori, numărul de descendenți de sex feminin pe care îi pot produce 100 femeile din ferme dar care să supraviețuiască pînă la vârsta reproducerii și durata medie de exploatare a animalelor din fermă. Dacă aceste restricții se vor introduce într-o ecuație vom obține o proporție minimă de animale care pot fi alese și introduce în lotul de selecție care este direct proporțională cu proporția anuală de femele care se nasc, supraviețuiesc și se dezvoltă pînă la vârsta de reproducție. La animalele monototice (taurine, ovine, cabaline) numărul din descendenții de sex feminin la 100 femeile mame nu depășește 0,4.

Este cunoscut din practică că procentul de reformă „normal”, este de circa 20 procente, sporirea acestuia din cauze tehnologice negative care ar duce la infecunditate sau mortalitate va atinge după sine și sporirea procentului de rețineri în lotul de selecție.

Singura posibilitate de a micșora proporția de animale care sunt alese în lotul de selecție cu scopul de a mari valoarea diferenței de selecție este că fie să se micșoreze procentul de reformă a femelelor din fermă să crească durata de exploatare, fie să se sporească cât se poate de mult fertilitatea femelelor din fermă să crească valoarea lui F.

Dacă se pot realiza aceste condiții proporția animalelor destinate să contribuie cu descendenții la generația următoare poate fi micșorat considerabil fără să scoată însă efectivul de animale din fermă. O astfel de acțiune va determina sporirea valorii diferenței de selecție. La rîndul său din state de selecție la valori ridicate va atrage după sine sporirea gradului de modificare a structurii genetice a populației.

Vintilă I. afirmă, că biotehnologiile moderne pot să sporească valoarea lui F folosind tehnologia transferului de embrioni, producerea embrionilor în vitro și clonarea animalelor care sporesc numărul de descendenți care pot fi obținute de la o femelă de 4-6 ori peste limitele speciei. Aceasta înseamnă că numărul de femele necesare să fie inclus în lotul de selecție poate să scadă aproape de tot afîtea ori.

Dacă în fermă unde se efectuează selecția cu participarea embrion transferului, embrionii obținuți se vor sexa înainte de transfer și se vor folosi doar embrioni de sex feminin sau se vor însămînța femelele numai cu spermatozoizi sexați, numărul de descendenți de sex feminin obținuți de la o mamă va crește considerabil ceea ce va permite micșorarea la maximum a proporției de animale reținute în lotul de selecție care se va reprezenta pozitiv în creșterea efectului de selecție sau a progresului genetic care se va obține în fermă sau în populație.

Superovulația și recoltarea de embrioni se face numai la femelele de elită din efectiv, iar acestea alcătuiesc în majoritatea lotului de selecție, urmarea va fi o creștere în dimensiune ale diferenței de selecție cu urmări pozitive de aceeași mărime a valorii Δg . Biotehnologiile moderne pot să mărească și valoarea coeficientului de ereditabilitate care este un parametru genetic al populației obținut din raportul dintre varianta genetică aditiv caracterului considerat și varianta totală a acestuia în populație.

La alegerea vacilor pentru prăsilă suplimentar și după datele înscrise în registru: greutatea corporală, cantitatea de lapte zilnică, cantitatea de grăsimi a laptelui, cantitatea de furaje consumat pentru a produce un litru de lapte, care este variabilă în funcție de puterea de asimilare, care diferă de la o vacă la alta. Acestea erau criteriile după care se alegeau vacile și taurii pentru monta naturală, acum un secol.

Astăzi concurența între rase este între caracterele lor economice, performanțele de producție și a capacității de adaptare. Pentru viitor este binevenită afirmația lui Johannes Aumann *"fiecare prognoză trebuie să plece de la o analiză temeinică a trecutului și prezentului dar, să aibă în vedere și transformările viitoare"*.

Pentru o dirijare eficientă a reproducției trebuie să se facă o centralizare a datelor, astfel încă din anul 1970 a existat preocuparea din partea F.A.O. pentru punerea la punct a unor sisteme uniforme de înregistrare a datelor asupra producției de lapte și carne. Astfel s-a creat INTERBULL,

un subcomitet al Comitetului internațional pentru controlul performanțelor de creștere – ICAR, responsabil cu coordonarea internațională a valorii de creștere, cu sediul la Uppsala, compus din 7 țări – Suedia, Elveția, Germania, Franța, Austria, Italia și Slovenia.

O vacă de lapte devine rentabilă dacă este precoce, fecundă, productivă și longevivă.

2. FUNCȚIA DE REPRODUCERE LA VACĂ

Principala funcție a aparatul genital la vacă este de:

***producerea de gameți femeli;

***dezvoltarea fătului și expulzarea lui.

Aparatul genital la vacă este situat în cavitatea lombară și este format din: gonade, ovare, căile genitale, oviducte, uter, vagin, vestibul vaginal și vulvă.

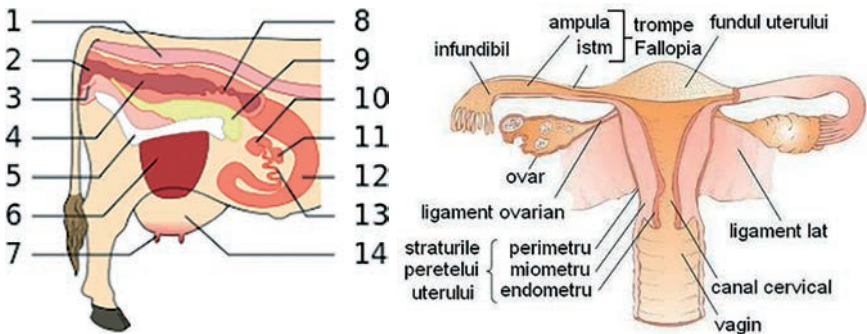


Figura 2. Aparatul reproducător la vacă

1-rect; 2-vulva; 3-clitor; 4-vagina; 5-os stern; 6-glanda mamară; mameloane; 8-colul uterin; 9-vizica urinară; 10-pavilionul oviductului; 11-ovar; 12-cornul uterin; 13-oviductele; 14-glanda mamară

Ovarul la vacă, este un organ par, situat în cavitatea abdominală, înaintea deschiderii bazinului, la marginea anterioară a ligamentelor largi. În cavitatea abdominala, ovarele sunt susținute de ligamente proprii (me-

zo-ovarium), iar între ovar și vârful cornului uterin se găsește ligamentul utero-ovarian.

Ovarul are două funcții: *funcția gametogenă și funcția endocrină*. *Funcția gametogenă*, prin care ovarul produce, la fiecare ciclu estral, câte o ovocită matură, aptă pentru fecundare.

Funcția endocrină - ovarul secretă hormoni steroizi (estrogeni și progesteron) care pregătesc căile genitale pentru fecundație, nidație, gestație și modulează funcția complexului endocrin hipotalamo-hipofizar.

Oviductul este primul segment al căilor genitale femele. În apropierea ovarului oviductul formează o dilatație în formă de pîlnie, care nu aderă la ovar, numită pavilionul oviductului. Acesta are rolul de a capta ovocita, după ovulație. Pavilionul se continuă cu ampula oviductului, care are lumenul mai larg. În ampulă se produce fecundația. Ampula oviductului se continuă cu un segment, cu lumen îngust, numit istm. În istm, spermatozoizii capacitați „așteaptă” să se producă ovulația. Istmul se continuă cu vârful cornului uterin printr-o deschidere îngustă numită joncțiunea utero-tubară, la nivelul căreia se găsește un sfîcter, cu rol de valvă.

Uterul este compus din: două coarne uterine, corpul uterin și gîtul uterin, fiind susținut de ligamentele largi. Uterul asigură condiții pentru nidație și desfășurarea gestației pînă la termen.

Coarnele uterine. La vacă, coarnele uterine sunt dispuse cu mica curbură ventrală și marea curbură dorsală, iar lungimea este de aproximativ 30-35 cm. La nivelul unghiului de divergență există un ligament interocornal, format din două cute musculo-seroase.

Mucoasa coarnelor și corpului uterin prezintă 80-120 carunculi care sunt dispuși pe 4 rînduri paralele. În timpul gestației, la nivelul carunculelor se realizează angrenajul dintre vilozitățile coriale și criptele uterine.

Corpul uterin este un segment scurt (3-4 cm), comunică anterior cu coarnele uterine și posterior cu gîtul uterin.

Structura este asemănătoare cu a coarnelor uterine, cu particularitatea ca peretele corpului uterin este mai gros, iar musculoasa este formată din fibre musculare circulare, la interior și oblice, la exterior.

Gîtul uterin (cervixul, colul uterin) comunică anterior cu corpul uterin și posterior cu vaginul.

Gîtul uterin are o lungime de aproximativ 8 cm, un perete gros și mai consistent la palpare. Mucoasa canalului cervical formează, pe lîngă pliuri longitudinale, și pliuri transversale, care îngreunează pătrunderea pistole-
tului de însămînțare în uter.

Vaginul este un conduct musculo-membranos care participă la copu-
lație. Este așezat în bazin, fiind delimitat anterior de cervix, iar în partea
posteroare de vestibulul vaginal, de care este delimitat prin meatul urinar.

Vestibulul vaginal este un segment comun atît aparatului genital, cît și
aparatului urinar.

Vulva reprezintă deschiderea posterioară a vestibulului vaginal. Este
formata din două labii, dispuse vertical, care delimitează fanta vulvară.
Cele doua labii sunt unite prin două comisuri (comisura superioară și co-
misura inferioara). Comisura inferioară adăpostește o formațiune erectilă
numita clitoris.

Rudimentul de testicul apare atunci cînd embrionul are vîrsta cuprinsă
între 25-30 de zile. În acest stadiu al dezvoltării, apare o aglomerare de
celule din mezoderm numită creasta genitală primordială. Celulele care o
alcătuiesc sunt dispuse în cordoane pe două straturi: unul se găsește la ex-
teriorul formațiunii numită corticala crestei și altul la interiorul formațiunii
formînd medulara crestei genitale.

Cercetările au demonstrat că din cordoanele medularei prin diferenți-
erea celulelor pluripotente se formează testiculul, iar din cordoanele corti-
calei se formează ovarul.

Ele sunt destinate să producă, mai tîrziu, în medulară spermatozoizi și
celule Sertoli, iar în zona corticală, foliculi ovarieni și ovocite.

Este interesant de subliniat că celulele primordiale germinale nu iau
naștere în creasta genitală. Ele se produc mai întîi în pereții sacului vitelin,
de unde la “chemarea“ unor proteine, cu rol chimiotactic, migrează spre
creasta genitală și se așează pe țesutul mezenchimal somatic.

Celulele primordiale germinale în acest stadiu, nu au polaritate de sex
(ele sunt indiferente sexual). Numai după cîteva zile ele se diferențiază în
celule germinale masculine sau feminine.

Se cunoaște din literatura, că atît testiculul cît și ovarul iau naștere
din aceeași formațiune embrionară numită creasta genitală. Testiculul se
formează din medulara crestei, iar ovarul din corticala acesteia. Procesul

se desfășoară în stadiul embrionar după vârsta de cca șase săptămîni și se înfăptuiește în două faze:

a) faza genetică, b) faza hormonală

Faza genetică a gonadogenezei

Se cunoaște din literatură că după ce se realizează fecundația ovocitei se hotărăște sexul individului. Dacă aceasta se înfăptuiește cu un spermatozoid purtător al gonosomului Y, viitorul descendent va fi un mascul. Dimpotrivă, dacă acest lucru se realizează cu un spermatozoid care posedă, pe lângă autozomi și gonosomul X, viitoarea ființă va fi o femelă. Rezultă de aici că sexul individului depinde de prezența sau absența cromosomului Y în celulele embrionului timpuriu. Mai complet spus, sexul individului depinde, în principal, de genele așezate pe cromosomul Y.

Faza genetică a formării testiculului

S-a dovedit (Vintilă I.) că la formarea sexului masculin participă nu numai gene de pe cromosomul Y ci și gene de pe cromosomul X și chiar gene așezate pe cromosomii autozomi, comanda și controlul procesului de transformare a primordiului de gonadă embrionară (creastă genitală) într-un testicul, este dată de o genă existentă doar pe cromosomul Y. Ea este cunoscută sub denumirea de gena SRY. Ea este aceea care declanșează, controlează și reglează expresia tuturor celorlalte gene structurale care participă și ele la sexualizarea individului. Cercetările au dovedit că pe cromosomul Y, pe brațul său scurt, există o regiune numită regiunea determinatoare a sexului. În compoziția sa se găsește gena SRY, responsabilă de inițierea și formarea gonadei masculine (Figura 3).

STADIUL DE DIFERENȚIERE SEXUALĂ sexul masculin

DIFERENȚIEREA GONADELOR

Din mezenchim

⇒ **albugineea+septele
interlobulare**

- PGC pătrund în cordoanele gonadale → transformările spermatogonice și spermiogenetice ⇒ **spermile+celulele de susținere** Sertoli (rol: nutriție + AMH → favorizează degenerescența dM)
- cordoanele gonadale → se tunelizează (la pubertate) ⇒ **tubii seminiferi** → **tubii drepecți** → **rete testis**

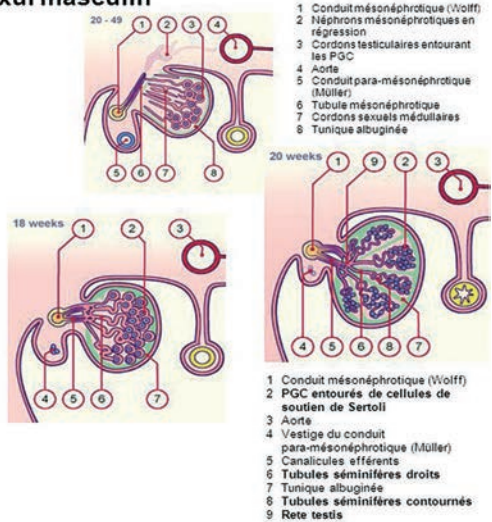


Figura 3. Dezvoltarea gonadelor în timpul embriogenezei

Cercetările efectuate de Vintilă I. și col. pe embrioni de șoarece purtători de gonosomi XX, în nucleul cărora li s-a transplatat porțiunea de cromosom Y, care conține gena SRY, au avut ca urmare transformarea medularei crestei sexuale embrionare într-un testicul funcțional. În felul acesta a devenit clar că gena SRY de pe cromosomul Y este aceea care-i comandă crestei sexuale “să se facă un testicul” și în consecință să devină un mascul autentic. În această regiune a cromosomului Y, gena SRY codifică o proteină, care după ce s-a sintetizat, se leagă de ADN cu ajutorul căreia ea poate să-și exercite funcția de genă controlor (master-gen) care declanșează și coordonează activitatea unui șir de alte gene, care participă la sexualizarea individului.

Datorită genei SRY și numai la embrionul care poartă în celulele sale cromosomul Y are loc o proliferare viguroasă a celulelor cordoanelor sexuale existente în profunzimea medularei crestei genitale. Ele devin „cordoanele seminifere” care dau naștere la tubii seminiferi testiculari ce conțin celulele germinale primordiale, din care se dezvoltă spermatozoidul. Acest proces constituie începutul formării testiculului.

În acest stadiu la embrionii care au în celulele lor gonozomul Y are loc o proliferare a țesutului stromal al crestei genitale. El se vascularizează, iar celulele se condensează în mănunchiuri și se transformă în celule endocrine formînd Glanda Diastematică a lui Leydig sintetizatoare de testosteron.

Faza genetică de formarea ovarului

La embrionii ale căror celule nu poartă în nucleul lor cromosomul Y, ci numai pe cei doi cromosomi X, în creasta genitală se vor dezvolta, pasiv, numai cordoanele din corticala crestei genitale. Celulele acestora proliferază și se condensează în jurul celulelor germinale primordiale formînd foliculii primordiali ai ovarului care conțin ovogoniile (Vintilă I. și col).

Dezvoltarea completă a gonadelor este determinată de numărul de cromosomi X din celulele embrionului.

Deși decizia inițială de a se forma un testicul din creasta genitală embrionară, indiferentă sexual, este inițiată de activitatea genei SRY de pe cromosomul Y, dezvoltarea ulterioară a gonadei depinde de numărul de cromosomi X din celule. Cercetările efectuate de Zinca Victoria și col. au dovedit că gonada masculină, pentru a deveni funcțională, capabilă să producă spermatozoizi, are nevoie de prezența, alături de cromosomul Y și a unui cromosom X. S-a dovedit, că doi cromosomi X, alături de Y, deși duc la formarea unui testicul, celulele lui germinale nu vor forma nici într-un caz spermatozoizi (Miclea V. și col).

Nici gonada feminină (ovarul), care se formează din corticala crestei sexuale embrionare, în lipsa cromosomului Y din celule nu va putea forma la maturitate ovocite, dacă în celulele sale nu există doi cromosomi X.

Etapa hormonală a gonadogenezei

Literatura de specialitate demonstrează că diferențierea celor două sexe nu este completă chiar dacă în celulele embrionului este prezent alături de cromosomul Y și un cromosom X pentru mascul, sau doi cromosomi X în cazul femelei. Prezența sau absența cromosomului Y alături de cromosomul X, sau a doi cromosomi X este doar condiția primordială pentru inițierea formării gonadelor. Diferențierea celor două sexe care să cuprindă nu

numai gonadele, ci și organele tubulare interne și externe ale aparatului genital, se înfăptuiește în cea de-a doua fază a sexualizării, numită faza hormonală (Miclea V. și col., Ladoși I.).

Dezvoltarea organelor tubulare interne și externe, atât la mascul, cât și la femele, este inițiată și condusă de doi hormoni esențiali. Unul secretat de către glanda diastematică a lui Leydig, de curînd formată în spațiul interstițial al primordiului de testicul, numit hormon androgen (hormon steroid) și altul secretat de celulele Sertoli existente în interiorul tubilor seminiferi, numit hormonul glicoproteic inhibitor al canalelor lui Muller sau hormonul antimulerian (Mullerian inhibiting hormone-MIH) (Miclea V. și col.).

La femele organele tubulare interne se dezvoltă în mod pasiv, datorită lipsei hormonilor specificați mai sus.

Organele tubulare interne ale aparatului genital se diferențiază din două feluri de țesuturi primordiale, unipotențiale.

Cele două gonade, testiculul și ovarul se diferențiază din creasta genitală bipotențială sexual. Organele interne genitale tubulare se dezvoltă, însă, din două primordii separate, dar care sunt din punct de vedere sexual unipotențiale. Cele feminine iau naștere dintr-un primordiu de țesut din compoziția rinichiului primitiv (mezonefros) numit conductul sau canalul lui Muller, iar cele masculine iau naștere dintr-un alt primordiu, numit canalul lui Wolff. La feteșii XX canalele Wolff regresează spontan după formarea ovarului primitiv.

În schimb canalele mulleriene cresc, și se dezvoltă în continuare, dînd naștere oviductelor, uterului, cervixului și vaginului superior.

Dimpotrivă, la feteșii XY dezvoltarea organelor interne tubulare are loc în mod activ, sub presiunea hormonilor androgeni, secretați de glanda diastematică a lui Leydig. Ei nu numai că mențin, dar și contribuie la dezvoltarea canalelor lui Wolff, transformîndu-le în epididim, canale deferente și vezicule seminale.

Pentru dezvoltarea organelor interne tubulare masculine, pe lîngă hormonii androgeni, mai intervine și hormonul antimulerian (MIH), secretat de celulele Sertoli, din interiorul tubilor seminiferi. El are sarcina să suprimă dezvoltarea de mai departe a canalelor primitive ale lui Muller.

Miclea V. și col. demonstrează că organele interne tubulare masculine sunt conduse în dezvoltarea lor de către gonada masculină primitivă (tes-

ticul). La femele ele se dezvoltă în mod pasiv, fără intervenția hormonală a ovarului.

Autorii au demonstrat, că în faza embrionară timpurie, în zona genitală se găsesc câteva formațiuni și anume: tuberculul genital, crestele genitale, șanțul uretral și membrana cloacală. Aceste țesuturi sunt bipotențiale sexual și dau naștere organelor tubulare externe ale aparatului genital. La embrionul care are în celulele sale gonosomii XY, sub „presiunea” hormonilor steroizi androgeni, din tuberculul genital, se formează glandul penisului. Din cuta genitală se formează scrotumul, iar din șanțul uretral se formează, prin închidere, uretra.

La embrionii care conțin în nucleul celulelor cromosomii XX (femela), clitorisul se dezvoltă din tuberculul genital, uretra din sacul uretral, iar din cutele genitale se dezvoltă buzele vulvei. La sexul feminin aceste organe tubulare externe se dezvoltă independent de activitatea hormonală a ovarului. Chiar la embrionii care posedă în celulele lor cromosomul Y, alături de cel X, lipsa hormonilor masculini în acest stadiu de dezvoltare este în stare să orienteze primordiile precizate mai sus și să le transforme în organe genitale externe, tubulare caracteristice sexului feminin.

Hormoni implicați în reglarea funcției de reproducere

Din literatura de specialitate se cunoaște că în conducerea funcției de reproducere sunt implicate o diversitate de hormoni sintetizați de tot atâtea tipuri de țesuturi glandulare. Aceștia sunt următorii: **1) Hormoni lipidici; 2) Hormoni proteici și 3) Monoaminele.**

Hormonii lipidici

În această categorie se cuprind: a) hormonii steroizi și b) eicosanoidele *Hormonii steroizi*. În categoria steroizilor intră: a) progestagenele (produse de către ovar și în special corpul galben); b) androgenii (produși de către testicul; c) oestrogenii (produși de foliculii ovarieni); d) corticosteroidii (produși de către glandele suprarenale).

Miclea V. și col. demonstrează că toate cele trei clase de hormoni steroizi precizate mai sus provin din două substanțe și anume: colesterolul și

acetatul din sânge. Colesterolul este considerat “părintele” tuturor hormonilor steroizi.

La ambele sexe celulele glandulare așezate în ovar și în testicul sunt în stare să convertească mai întâi colesterolul, printr-un proces de aromatizare, în niște substanțe cu rol hormonal numit eprogestagene. Acestea sunt: progesteronul, 17α -progesteronul și 20α -hidroxiprogesteronul. Progestagenele la rândul lor sunt apoi convertite în alte două tipuri de hormoni, specifici pentru fiecare din cele două sexe.

La sexul masculin progestagenele sintetizate din colesterol și acetat sunt convertite de către celulele Leydig din testicul în hormoni androgeni. În această familie de hormoni se cuprind: 1) 5α -dihidrotesteronul, 2) testosteronul, 3) androstendiolul și 4) dehidroepiandrosteronul.

La sexul feminin celulele granuloasei foliculului ovarian prin intermediul celulelor glandulare din teaca internă, sunt în stare să preia progestagenele și să le convertească în mai multe tipuri de hormoni estrogeni. Din această familie fac parte următorii hormoni: estradiolul, estriolul și estrona.

Funcții ale hormonilor steroizi

Hormonii steroizi au o structură chimică foarte asemănătoare deși funcțiile lor sunt diferite. Astfel, progestagenele sunt recunoscute că se implică activ în pregătirea mucoasei uterine pentru a realiza și întreține gestația; androgenii au principala funcție de a realiza dezvoltarea și menținerea caracteristicilor de masculinitate și fertilitate a spermatozoizilor, iar estrogenii sunt implicați puternic în dezvoltarea caracterelor de feminitate și realizarea fertilității ovocitelor (Gluhovscii N.și col).

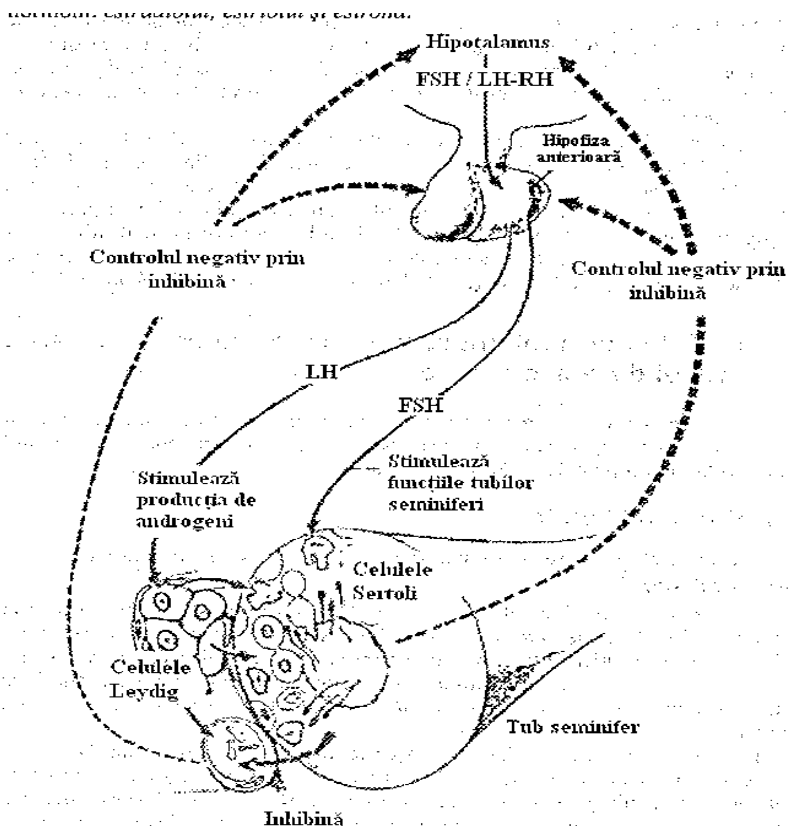


Figura 4. Mecanismele de reglare a sintezei hormonilor care concură la sexogenază și funcționarea aparatului genital (după J.Labussiere)

Miclea V.și col demonstrează că funcțiile acestor hormoni înrudiți ca structură sunt următoarele:

Progestagenele

- 1) Participă din plin la pregătirea mucoasei uterine pentru implanțarea embrionului în mucoasa internă și instalarea gestației.

- 2) Mențin gestația pe tot parcursul dezvoltării fătului.
- 3) Stimulează creșterea glandelor mamare, dar suprasează secreția laptelui.
- 4) Contribuie la pierderea ionului de sodiu (Na) pe timpul formării urinei secundare în nefron.
- 5) Reglează secreția gonadotropinelor (FSH și LH) din hipofiză.

Androgenii

- 1) Induc și mențin diferențierea țesuturilor masculine.
- 2) Induc formarea caracterelor secundare sexuale ale masculului și ale aparatului genital masculin.
- 3) Susțin puternic procesul de formare a spermatozoidelor (spermatogeneza).
- 4) Influențează dezvoltarea comportamentului agresiv al masculului.
- 5) Susțin procesele de sinteză a proteinelor și creșterea somatică.
- 6) Prin intermediul testosteronului, ele reglează secreția gonadotropinelor.

Estrogenii

- 1) Stimulează dezvoltarea caracterelor secundare ale femeii.
- 2) Pregătesc mucoasa uterină pentru transportul spermatozoidelor.
- 3) Cresc permeabilitatea vasculară și susțin formarea edemului.
- 4) Stimulează creșterea și activitatea glandelor mamare și a endometriului
- 5) Pregătesc endometrul pentru acțiunea prostaglandinelor.
- 6) Stimulează anabolismul și calcifierea oaselor.
- 7) Reglează secreția gonadotropinelor (FSH și LH).
- 8) Influențează comportamentul femelelor.

Eicosanoidele

Din această categorie de hormoni fac parte două clase de mesageri celulari: 1) Prostaglandinele și 2) leucotrienele.

Precursorul acestor hormoni lipidici este acidul arachidonic. Ele sunt utilizate în majoritatea țesuturilor organismului așa cum sunt cele ale aparatului genital femel și învelitorile fetale. Rolul lor este multiplu. Cel mai mare rol îl joacă în dezorganizarea corpului galben și reducerea puternică a sintezei și secreției progesteronului.

Hormonii proteici

În această categorie de hormoni se cuprind:

- a) hormonii gonadotropi și foliculostimulatori;
- b) polipeptidele somatotropice;
- c) citokinele;
- d) peptidele mici.

a) Hormonii gonadotropi și foliculo-stimulatori.

Sunt reprezentați de către hormonii:

- 1) FSH (follicle stimulating hormone);
- 2) LH (luteinizig hormone);
- 3) gonadotropine corionice (CG - chorionic gonadotropin);
- 4) hormonul stimulator al tiroidei TSH (thiroid stimulating hormone sau thirothropin).

Hormonii FSH, LH și STH sunt secretați de către glanda hipofiză, iar gonadotropinele corionice sunt secretate de către placenta. Ei toți sunt de natură glicoproteică și au o activitate fundamentală în provocarea, conducerea și reglarea structurii și funcției gonadelor și a comportamentului ciclului sexual.

b) Polipeptidele somatotropice

Din această categorie de hormoni fac parte prolactina, hormonul lactogen placentar, precum și hormonul de creștere sau STH (somatotroph hormon sau somatotropina).

c) Citokinele

Din această categorie fac parte inhibina și activina și hormonul anti-mulerian. Sunt polipeptide cu greutate moleculară mai mică decât 100 kD altoni și sunt sintetizate de către o mare varietate de celule. Citokinele deși nu posedă toate caracteristicile hormonilor, ținesc reglarea funcțiilor multor tipuri de celule, interacționează cu alte molecule și dau efecte diferite. Ele acționează mai ales pe cale paracrină, autocrină și juxtacrină, mediind activitatea hormonilor endocriți așa cum sunt LH și FSH.

Peptide cu moleculă mică

Din această categorie face parte hormonul hipotalamic de eliberare a hormonilor gonadotropi (FSH și LH) din hipofiza sau GnRH (gonadotrophin realising hormone). El are același efect și asupra eliberării hormonilor tirootropici (TSH), a corticotropinelor și somatotropinelor (STH) și a

oxitocinei, din glanda hipofiză unde ele sunt sintetizate. Aceste tipuri de hormoni sunt sintetizați de celulele specializate ale glandei hipofiză, dar nu pot fi eliberați în torentul sangvin pînă ce hormonul GnRH care se sintetizează în hipotalamus, nu dă o astfel de comandă.

Monoaminele

În această categorie de hormoni se cuprind melatonina din epifiză, dopamina din creier, noradrenalina și adrenalina din suprarenală. Toți hormonii de mai sus au molecula foarte asemănătoare. Prin mici conversii metabolice ei pot fi transformați din unul în celălalt, căpătînd în același timp și funcții diferite.

Miclea V. a demonstrat că celulele țintă asupra cărora acționează hormonii pentru a le regla activitatea nu pot fi abordate de către hormoni decît prin intermediul unor receptori. Aceștia pot fi: receptori de membrană sau receptori nucleoplasmatici.

Hormonii, numiți și molecule mesager, se cuplează cu receptorii prin complementaritate de structură, jucînd un rol de ligand. Interacțiunea dintre receptorul specific și ligandul său are ca urmare nașterea unui semnal de activare care este condus pînă la nucleu, determinînd intrarea în funcțiune a operonului specific care produce, fie intrarea celulei în diviziune, fie sinteza unei alte proteine.

Hormonii cu structură similară care fac parte din aceeași familie pot să recunoască și receptorii specifici ai unui membru sau al altuia din familie. Rezultatul va fi următorul: hormonul specific receptorului provoacă intrarea în activitate a celulei la potențialul său maxim. Cuplarea unui hormon înrudit la un astfel de receptor poate determină intrarea în funcțiune a celulei țintă dar la un nivel mult mai scăzut decît potențialul ei. O astfel de acțiune a hormonului înrudit cu „titularul” receptorului se numește acțiune agonistică, iar molecula mesager se numește hormon agonistic.

Unii hormoni steroizi cu structură asemănătoare pot să se lege de un anumit receptor blocându-i activitatea. O astfel de activitate se numește antagonistică, iar structura respectivă este un antagonist al hormonului specific. De exemplu: uneori progesteronul se poate lega de receptorul androgenic al dehidrotesteronului, blocându-i în acest fel activitatea. În acest caz progesteronul devine un hormon antiandrogenic. Pe această bază cercetătorii au sintetizat analogi ai hormonilor steroizi care pot fi folosiți în

manipularea funcției de reproducere, sau chiar în scoaterea din funcțiune a hormonilor steroizi implicați în creșterea tumorilor.

Ciclul ovarian reprezentat de către: maturarea ciclică a foliculilor ovarieni și a ovocitelor, menținerea gestației și parturiția, instalarea pubertății, etc. este condus și reglat de către hormoni. Declanșarea și scoaterea din funcție a acestor procese se realizează pe două căi (Miclea V.și col.):

- a) prin apariția sau dispariția receptorilor;
- b) prin disponibilitatea hormonilor respectivi la locul și la timpul potrivit.

Stimularea receptorului de către hormoni

Waisun O.și col. au demonstrat că stimularea unei celule de către un semnal exterior are ca rezultat, fie sinteza unei proteine implicată într-un lanț metabolic, fie intrarea celulei în diviziune. Ambele se realizează numai dacă genele care sunt responsabile de sinteza proteinelor, implicate în procesul respectiv, sunt scoase din „repaus” și aduse în starea de a începe transcripția informației și imprimarea ei pe moleculele de ARN mesager. Pentru ca proteina, a cărei structură primară este înscrisă în ARN-m să poată fi sintetizată, este necesar ca ARN-m să părăsească nucleul și să ajungă în citoplasmă, să se așeze pe ribozomi, unde începe translația mesajului și punerea unul după altul a aminoacizilor corespunzători codonilor. În acest fel se naște proteina înscrisă în gena stimulată.

Stimularea de către hormoni a operonului unor celule țintă, se realizează pe calea receptorilor membranari sau a celor nucleo-citoplasmatici (factori de transcripție a genelor).

Busato A.și col. au demonstrat că hormonii stimulează celulele pe căi diferite. Acestea sunt de un fel sau de altul, în funcție de natura hormonilor și anume:

- a) hormonii steroizi fiind de natură lipidică pot stimula membrana celulei și în consecință să interacționeze cu receptorii intracitoplasmatici;
- b) hormonii proteici, lipoproteici, polipeptidici sau peptidici, cu moleculă mică stimulează celulele, folosindu-se de receptorii de membrană.

Căile de conducere la nucleu a semnalului declanșat de către hormonii proteici sunt așezate în ordinea următoare: receptorii de membrană →

proteinele sub-membranale —» proteinele citoplasmatiche —» receptorii nucleari (factori de transcripție).

Hormonii de natură proteică (gonadotropi, somatotropi, citokine și peptidaminici) se cupleză la receptorii de membrană. Interacțiunea dintre receptorii și factorii de creștere sau hormonii proteici are ca urmare activarea, receptorilor de membrană și nașterea unui semnal. De acum înainte receptorii funcționează ca și un transductor care conduce semnalul din exteriorul celulei, în interiorul acesteia. Acesta declanșează activarea altor molecule submembranare și citoplasmatiche care transduc semnalul la acceptorii existenți pe cromatina nucleară. Sistemul de molecule intracelulare care conduce semnalul de la membrană la nucleul său, se mai numește și sistemul secundar de conducere a mesajului sau sistemul mesager secundar (Fig.5).

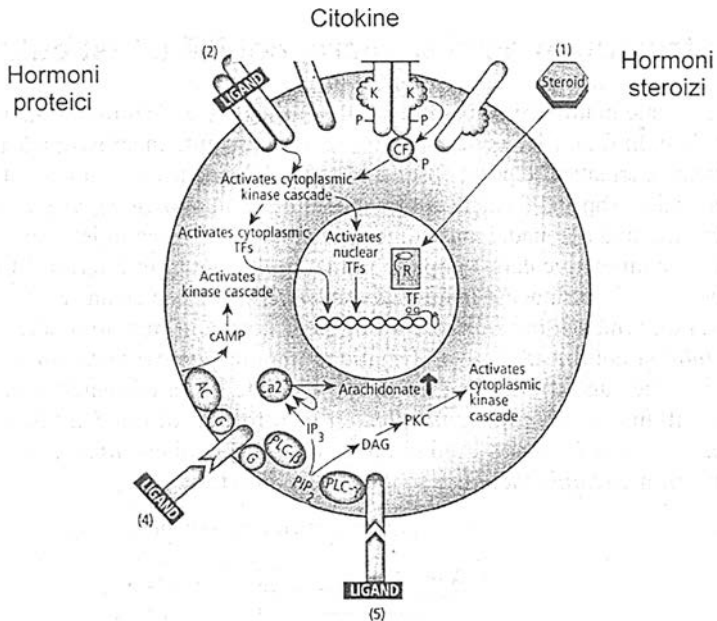


Figura 5. Activarea receptorilor și consecințele acesteia (după Martin H. Johnson și Barry J. Everitt).

Hormonii steroizi (androgeni, estrogeni, corticosteroidi) nu au receptori de membrană. Ei pătrund liberi prin membrana celulară și interacționează cu receptorii intracitoplasmatici activându-i. Semnalul produs ajunge la ADN,

printr-un loc numit acceptor. Aici se găsesc legate de cromatină niște tipuri de proteine denumite factori de transcripție pe care le activează. Urmarea va fi sporirea rapidă a activității de sinteză a ARN-ului mesager de pe gena țintă. Prezența complexului factori de transcripție activați, stimulează activitățile generale ale nucleului, care are ca urmare transferul în citoplasmă a ARN-m sintetizat în reticulul endoplasmatic, unde se găsesc ribozomi, pentru a începe traducerea (translația mesajului) și sinteza de proteine (Fig. 5.).

Activarea moleculelor receptor sau transductor se realizează printr-un proces de fosforilare și schimbare a conformației structurale a acestora. Acest complex de transformări constituie de fapt semnalul care trebuie condus din afara celulei la nucleul acesteia.

Datele figurii demonstrează că: liganzii pot influența funcționarea celulelor și expresia genică nucleară finală, pe o multitudine de căi. 1) Hormonii steroizi trec liber în nucleul celular unde se leagă de receptori (R). Înlocuind proteinele stabilizatoare asociate așa cum este HSP90, conduc la activarea fosforilării; complexul activat poate apoi să se lege atât de ADN, cât și de factorii de transcripție (TF). Hormonii proteici se leagă la receptorii de suprafață unde acționează ca transductori pe diverse căi. 2) Unii liganzi (prolactina, GH-ul, LIF-ul, GM-CSF-ul, TNF-a-ul), se leagă încrucișat cu două lanțuri receptoare (cum ar fi hetero- sau homodimerii). Complexul legat încrucișat activează apoi o serie întreagă de kinaze citosolice, rezultând fie fosforilarea TF-ului în citoplasmă și translocarea lui în nucleu, fie translocarea kinazelor în nucleu unde fosforilează și activează TF-ul. 3) Alți liganzi (citokine ale EGF-ului, insulinei și familiei CSF-J) se leagă și se homodimerizează cu receptorii, ei înșiși fiind kinaze (K). Dimerizarea conduce la o activare kinazică care culminează cu activarea TF-ului. 4) Unii liganzi (LH, FSH, CG, GnRH, oxitocină, vasopresină argininică) se leagă de receptori care ulterior se asociază cu proteine G (G). Proteinele G pot, ulterior, să se comporte în două feluri: a) să stimuleze fosfolipaza G β (PCL/1) care mediază hidroliza fosfatidilinozitolului fosfat (PIP₂) 1,4,5 trifosfat (IP₃) și diacilglicerol (DAG) care eliberează Ca²⁺ și activează proteinkinaza C (PKC), sau, b) modulează activitatea adenil ciclazei (AC) și astfel se formează cAMP. 5) Unii liganzi (ca EGF, spermatozoidul) pot activa fosfolipaza C, (PLC- γ) direct, fără a mai avea nevoie de medierea proteinelor G.

Structura macro și microscopică a testiculului

Se cunoaște, din literatura de specialitate că la toate mamiferele aparatul genital mascul este alcătuit din testicul, penis și căi tubulare. În figura 6, unde este reprezentată structura macroscopică a testiculului și canalelor spermatic se poate observa că testiculul (gonada masculină) este înconjurat la exterior de o capsulă formată din țesut conjunctiv numită albuginee. Ea ține laolaltă întreaga structură a gonadei masculine. Din albuginee pleacă în interiorul testiculului septumuri conjunctive care-1 împarte în mai mulți lobuli. În interiorul fiecărui lobul se găsesc 1-2 tuburi sinuoase numite tubi seminiferi. Ei încep cu un capăt bont așezat la periferia externă a lobulului spre albuginee. Toți continuă apoi spre mediastinul testiculului și confluează într-o formațiune numită rețeaua testiculară (rete testis). De aici, pleacă apoi o mulțime de canale eferente (vasa eferentia) care confluează într-un tub mai gros numit epididim. El este format din mai multe segmente și anume: cap, corp și coadă. Epididimul se continuă apoi cu canalul deferent care se deschide prin canalul ejaculator în uretra peniană (figura 6).

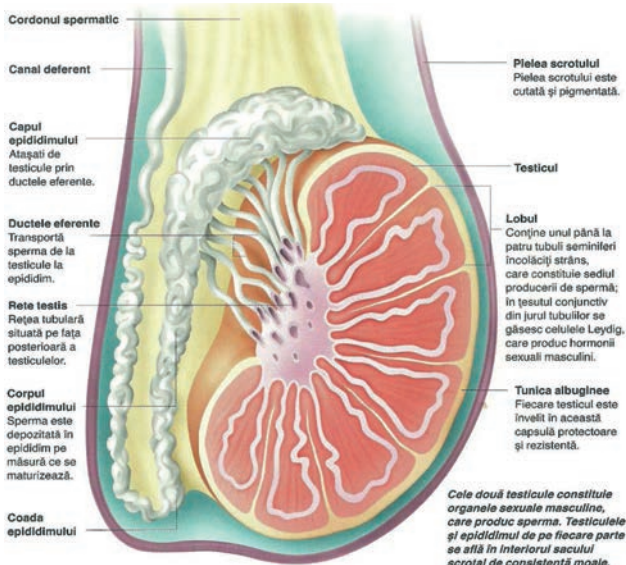


Figura 6. Structura testiculului, epididimului și cordonului testicular. Testicolului este înfățișat în secțiune sagitală ca să illustreze aranjamentul tubilor seminiferi.

Structura microscopică a testiculului

Într-o secțiune transversală printr-un lobul testicular, acolo unde sunt adăpostite cele 1-3 canale seminifere (tubi seminiferi) se pot observa la microscop două zone importante. Ele sunt numite și “spații” intratesticulare. Una dintre ele este constituită din interiorul tubilor seminiferi, iar cealaltă este formată din spațiul dintre tubii seminiferi. Prima se numește spațiul intratubular, iar cea de-a doua se numește spațiul interstițial sau intertubular.

Spațiul intratubular. Pe secțiunea transversală efectuată într-un tub seminifer, se poate observa mai întâi de la exterior la interiorul acestuia, peretele tubului seminifer. Pe suprafața interioară a peretelui este așezată o membrană bazală pe care sunt dispuse mai multe straturi de celule. Marea majoritate a celulelor care formează grosimea peretelui tubului seminifer sunt celulele germinate care dau naștere spermatozoizilor. Ele sunt denumite, în funcție de stadiul lor de diferențiere: spermatogonii, spermatocite primare și secundare, spermatide și spermatozoizi. Aici se mai pot observa un anumit tip de celule mai mari, de formă piramidală, sprijinite cu baza pe membrana bazală numite celule Sertoli. Ele sunt implicate prin funcția lor, de regulă endocrină, în susținerea atât a spermatogenezei, cât și în diferențierea aparatului genital mascul și femel în perioada fetală (Miclea V.și col).

După cum menționează autorii structura peretelui tubilor seminiferi este formată dintr-o membrană bazală alcătuită mai ales din laminină, collagen tip III, sulfat de heparan și entactină. Toate sunt înconjurate de un strat de celule mioide, implicate în contractia tubilor seminiferi și transportul spermatozoizilor spre tubii dreپți, spre rete testis și spre epididim. Se pare că celulele mioide contribuie împreună cu celulele Sertoli la geneza unor produși ai matrixului extracelular precum și la activitatea secretorie a însuși celulelor Sertoli.

Spațiul interstițial. Este reprezentat de suprafața dintre tubii seminiferi în care se găsesc mai multe tipuri de celule și țesuturi. Acestea sunt: țesutul conjunctiv, vase limfatice și sangvine, nervi și celule Leydig, cu rol endocrin (secretă hormoni androgeni), macrofage, fibroblaste. Într-un testicul de porc, țesutul interstițial reprezintă aproximativ 25-30% din greutatea lui.

Cele mai importante componente ale spațiului interstițial sunt celulele Leydig, implicate în secreția de testosteron și susținerea activității sexuale. Se pare că în reglarea producției de testosteron a glandei diastematice a lui

Leydig, contribuie semnificativ și macrofagele, care sunt în stare să stimuleze producția de testosteron.

În figura 7, este prezentată (Schmidt, Solomon-Devis) o secțiune transversală printr-un tub seminifer așa cum se observă la microscopul optic, alături de o schemă care arată în mod explicit tipul de celule care se găsesc în constituția și lumenul tubului.

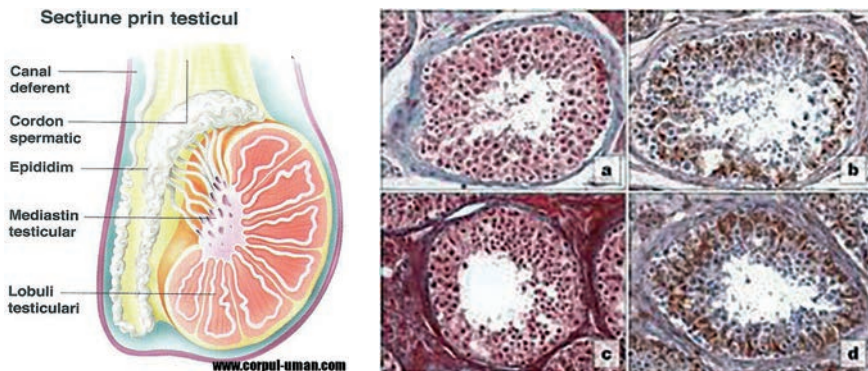


Figura 7. Structura internă a tubului seminifer a) schiță; b) structura microscopică reală (microfotografie - a, b, c, d)

Structura spermatozoidului

Milovanov V. analizând structura spermatozoidului a demonstrat că un spermatozoid este compus din cap și coadă. Capul are o structură complexă formată din mai multe membrane (figura 8). La extremitatea proximală a capului se distinge o formațiune specială denumită capul acrosomal. La partea distală a acrosomului se poate observa o formațiune specială denumită bandă anterioară, urmată apoi de o regiune compactă delimitată distal de o altă bandă, denumită banda serată. Porțiunea cea mai distală a capului este delimitată de un inel, denumit inelul inferior al capului.

Benzile precizate mai sus, precum și inelul posterior, delimitează cele trei regiuni ale capului spermatozoidului;

- *Regiunea acrosomală;*
- *Segmentul ecuatorial;*
- *Segmentul post acrosomal al capului.*

Coadă spermatozoidului poate fi și ea împărțită în mai multe piese și anume (Fig.8):

- Piesa mijlocie sau intermediară, așezată în partea proximală a cozii;
- Piesa principală a cozii spermatozoidului;
- Piesa terminală a cozii.

Fiecare dintre cele 3 piese ale cozii au o structură microscopică specifică, cu rol funcțional caracteristic și esențial pentru deplasarea spermatozoidului în tractul genital femeii și penetrarea sa în ovocită (fig.8).

Ea este formată din două dubleți de microtubuli circulari și doi tubuli centrali. La periferia axonemei se găsesc fibrele dense externe.

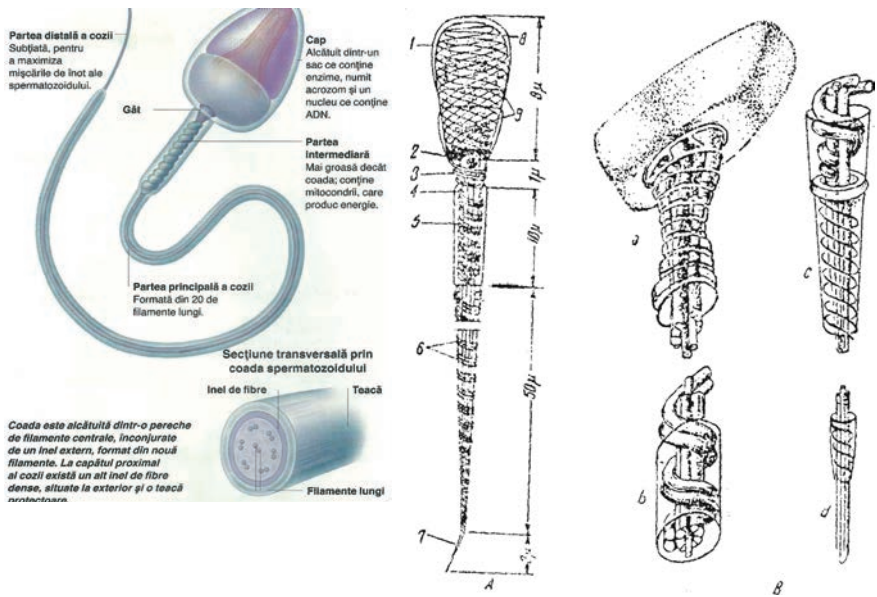


Figura 8. Structura spermatozoidului (după Bretschneider):

A - Structura schematică a spermatozoidului: 1 - galea capitis; 2 - centrozorn; 3 - fibrilele spiralate ale gâtului; 4 - fibrilele centrale; 5 - fibrilele duble ale piesei intermediare; 6 - teacă cozii; 7- piesa terminală a cozii;

8 - acrozom; 9 - cromozomi.

B - Structură a spermatozoidului: a - gâtul și corpul; b - fibrilele spiralate a părții intermediare; c - trecerea de la piesa principală la piesa terminală; d - piesa terminală a cozii

3. SPERMATOGENEZA

Miclea V.și col. specifică că spermatozoidul sau gametul masculin, este o celulă complexă care se formează printr-un proces lung de diferențiere repetată a celulelor germinale primordiale. Procesul are loc în epiteliul tubului seminifer și poartă denumirea de spermatogeneză. Mai întâi are loc formarea capului și numai după aceea se formează coada spermatozoidului. Acest din urmă proces se numește spermiogeneză (Milovanov V.,Miclea V.și col).

După instalarea pubertății testiculul produce zilnic o cantitate uriașă de spermatozoizi. Autorii au demonstrat că într-o secundă, într-un gram de țesut testicular se produc 300-600 spermatozoizi. Aceasta înseamnă că aici trebuie să se desfășoare, cu marea intensitate și continuu, două procese majore: 1) replicarea celulelor stern (de rezervă) pentru a menține și împropăta rezerva de celule de acest fel; 2) diferențierea celulelor de rezervă, în celule din ce în ce mai perfecționate. Fiecare dintre ele se realizează pe două căi diferite. Replicarea celulelor are loc prin mitoză, care asigură o descendență identică cu celula mamă, iar diferențierea celulelor din linia seminală se înfăptuiește prin procesul de meioză. O celulă intrată în meioza dă naștere la două celule fice neidentice genetic una cu cealaltă, dar nici cu “mama” lor.

În figura 8, sunt redată pe secțiune transversală structura internă a unui tub seminifer. Se pot observa mai multe straturi de celule de formă diferită. Acestea pot fi împărțite într-un strat bazal așezat pe membrana bazală, un alt strat așezat deasupra lui numit stratul adluminal și ultimul strat este cel mai intern, numit și stratul luminal.

Faza mitotică a spermatogenezei

Sa demonstrat că pînă la pubertate, în tubii seminiferi există doar celulele care alcătuiesc stratul bazal. Odată cu instalarea pubertății se declanșează diviziunea celulelor. Procesul începe cu replicarea celulelor bazale prin mitoză și continuă apoi cu diferențierea acestora prin procesul de meioză care se sfîrșește cu nașterea spermatozoidului (Milovanov V.).

Celulele din stratul bazal constituie rezerva de celule de unde fazele spermatogenetice își recrutează continuu noi celule care intră în replicare. Din această cauză ele se mai numesc și celule stern spermatogoniale. Ca să devină spermatozoizi celulele stern din stratul bazal, numite spermato-

gonii de tip A se replică de șapte ori și dau naștere unei celule identice cu celula mamă precum și altor celule cu caracteristici diferite numite spermatogonii de tip intermediar. Ele își continuă replicarea de mai departe și după alte cinci mitoze, se transformă în spermatogonii de tip B. Acestea se deosebesc morfologic de spermatogoniile de tip A precum și de cele de tip intermediar. Toate celulele de tip A și B, pe măsură ce se divid, se deplasează în- spre lumenul tubului seminifer formînd un strat de celule care se numesc spermatocite primare de repaus. Ele după replicare nu se separă una de alta, ci rămîn legate între ele printr-o citoplasmă comună care nu se divide formînd ceea ce se numește un sincitiu celular.

Întregul proces de diviziune celulară, de la celula de tip A și pînă la cea de tip B constituie ceea ce se numește ciclul epiteliului seminifer. El se înfăptuiește pe parcursul a 13,5 la taur, 10,4 la berbec și 8,6 zile la vier (tab. 1).

Faza meiotică a spermatogenezei

Odată cu apariția spermatocitelor de repaus se termină faza în care celulele s-au divizat pe calea mitozei. Spermatocitele de repaus intră într-o fază cînd ele se vor multiplica prin diviziunea meiotică. Ținta acestor fenomene este înfăptuirea reducerii la jumătate a numărului de cro mosomi, pe deoparte și realizarea unei diferențieri accentuate a celulelor, pe de altă parte. Acum începe cel de al doilea ciclul al epiteliului seminifer cu durata de 13,5 la taur etc.(Tab 1), și deplasarea sincitiului de ce lule în compartimentul adluminal al epiteliului tubului seminifer.

Tabelul 1.

Durata ciclului epiteliului seminifer și a spermatogenezei la diferite specii de animale (după Deuden)

Specia	Durata (zile)	
	Ciclului epiteliului seminifer	Spermatogenezei
Taur	13,5	54
Berbec	10,4	49
Vier	8,6	34,1
Câine	14,6	54,4
Iepure	10,5	51,8

Faza meiotică a spermatogenezei

Odată cu apariția spermatoocitelor de repaus se termină faza în care celulele s-au divizat pe calea mitozei. Spermatoocitele de repaus intră într-o fază când ele se vor multiplica prin diviziunea meiotică. Ținta acestor fenomene este înfăptuirea reducerii la jumătate a numărului de cromosomi, pe de o parte și realizarea unei diferențieri accentuate a celulelor, pe de altă parte. Acum începe cel de al doilea ciclul al epiteliului seminifer cu durata de 13,5 la taur etc. (Tab 1), și deplasarea sincitiului de celule în compartimentul adluminal al epiteliului tubului seminifer.

Tabelul 1.

Durata ciclului epiteliului seminifer și a spermatogenezei la diferite specii de animale (după Deuden)

Specia	Durata (zile)	
	Ciclului epiteliului seminifer	Spermatogenezei
Taur	13,5	54
Berbec	10,4	49
Vier	8,6	34,1
Câine	14,6	54,4
Iepure	10,5	51,8

Slusarev A.A., Jucova S.A. au demonstrat că meioza începe cu intrarea spermatoocitelor B de repaus în prima fază a meiozei numit preleptonem și leptonem. La sfârșitul celei de-a 16-a zile a ciclului epitelial sau în cea de-a 32 zi de la începutul spermatogenezei, celulele se găsesc în stadiu de zigonem. Acum are loc sinapsul (alipirea cromosomilor), locus la locus între cromosomii omologi. Procesul de meioză continuă, apoi, cu stadiul de diplonem și apoi cu telofaza, când are loc desprinderea cromosomilor omologi unul de celălalt și migrarea lor spre polii opuși ai celulei, soldată cu formarea spermatoocitului secundar haplo id. Întregul proces descris mai sus se desfășoară pe parcursul a 13,5 zile la taur etc. (fig.9.).

Începând cu ziua 40,5 la taur spermatoocita secundară haploidă intră în ultimele două cicluri ale epiteliului seminifer, când ia denumirea de spermatoocidă. Acum are loc completarea diferențierii capului spermatoocidului și formarea cozii acestuia cu toate elementele sale. Întregul proces de formare

a spermatozoidului durează 54 zile la taur, 74 la om, 49 berbec și 34,1 zile la vier.

În tabelul 1, este redată durata ciclului epiteliului seminifer precum și a spermatozoidului în întregime sa, la mai multe specii de mamifere (după Douden).

În ultimele două cicluri epiteliale, spermatida suferă remodelări deosebite ale citoplasmei. Toate la un loc formează ceea ce se numește spermio-geneza. După Milovanov V. în această etapa au loc următoarele evenimente:

- a) Formarea cozii spermatozoidului, necesară propulsiei sale în tractul genital femel;
- b) Se formează piesa intermediară a spermatozoidului, care conține mitocondrii generatoare de energie pentru deplasarea spermatozoidului;
- c) Se formează capul spermatozoidului cu regiunile sale acrosomale, segmentul ecuatorial, precum și regiunea postacrozomală, care sunt deosebit de importante pentru fuziunea spermatozoidului cu ovocita în procesul de fecundație;
- d) Se formează acrozomul cu funcția sa de cuțit enzimatic, atunci când penetrează ovocita;
- e) În nucleul spermatidei se petrec transformări esențiale. Are loc compactarea și împachetarea cromosomilor haploizi, iar corpul rezidual acționează ca un aspirator al citoplasmei în exces și care apoi este fagocitat de către celulele Sertoli, după desprinderea spermatozoidului și intrarea lui în lumenul tubului seminifer;
- f) Terminarea procesului de spermioeneză odată cu formarea spermatozoidului matur. În acest stadiu spermatozoidul matur se desprinde desincitiul citoplasmatic, unde era pînă acum și se eliberează în lumenul tubului seminifer. Acest proces se numește spermiatie.

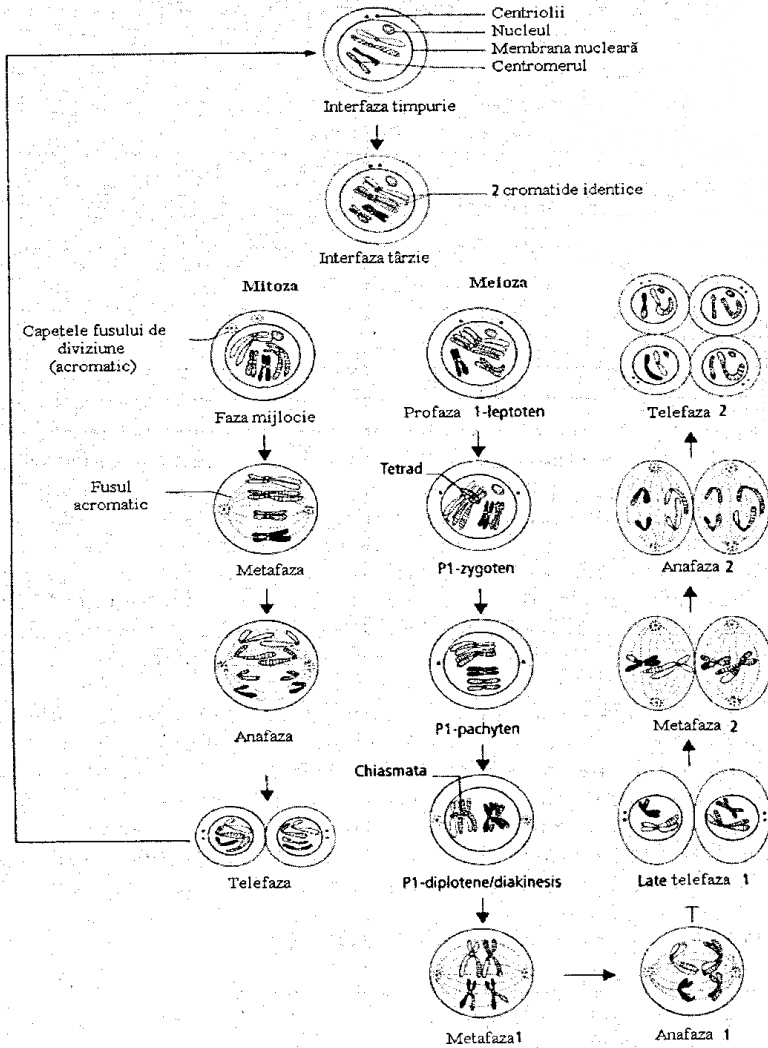


Figura 9. Comportamentul cromosomilor în fazele mitozei (după I. Vintila.)

Formarea spermatozoidului din spermatidă

În figura 10, este redat schematic stadiile principale ale acestui proces precum și explicațiile detaliate (Miclea V.și col).

În structura spermatidei rotunde (1) se poate observa schematic citoplasmă (zona umbrită), nucleul (cercul), aparatul Golgi (G) și doi centrioli (C). La începutul procesului de formare a spermatozoidului din spermatidă, aparatul Golgi dă naștere la o mulțime de granule glicoproteice, care fuzionează, apoi formînd o singură granulă - acrosomul. Ea crește apoi deasupra suprafeței nucleului și formează pînă la urmă structura capului spermatozoidului (2). La unele specii între acrosom și nucleu se formează așa numitul perforator al capului spermatozoidului.

Din literatura de specialitate se cunoaște că în acest stadiu, membrana nucleară își pierde porii. Doi centrioli, (G) așezați unul în opoziție față de celălalt, dau naștere la două formațiuni importante ale spermatozoidului. Din centriolul distal se formează coada spermatozoidului (F), iar din cel proximal se formează gîtul sau piesa care leagă coada de nucleul spermatozoidului.

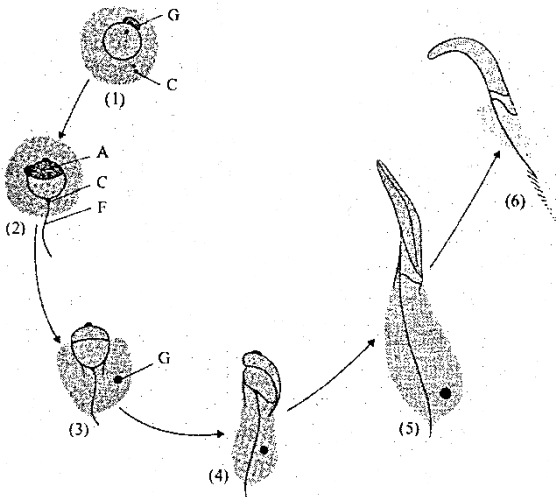


Figura 10. Evoluția spermatozoidului de la stadiul de spermatidă rotundă haploidă pînă în fază de împachetare (după I. Vintila.)

Din figura 10 se pot observa: 1) aparatul Golgi (G) a spermatidei rotunde care va da naștere la niște granule glicoproteice. Acestea se unesc apoi într-o singură formațiune numită acrosom (A) și va crește și se va dispune peste suprafața nucleară formînd o structură asemănătoare capului spermatozoidului (2). Între acrosomi și nucleu, se formează, la multe specii, un element citoskeletic subacrosomal numit perforator. În acest loc membrana nucleară pierde porii nucleari. Cei doi centrioli (C) se așează apoi la polul opus al membranei nucleare. De la centriolul distal, începe să crească în exterior un flagel tipic (F), formată din 9+2 microtubuli (2) iar de centriolul proximal se formează gâtul sau piesa de conexiune care leagă coada (flagel) de nucleu. Nucleul împreună cu capătul său acrosomal de care s-a atașat, se mută între membrana citoplasmatică și începutul prelungirii acesteia (3 și 4). Începe apoi condensarea cromatinei, mai jos de capul acrosomal, generînd o formațiune nucleară caracteristică pentru multe specii de animale numit perforator (3- 6). Acum membrana nucleară devine inutilă și împreună cu nucleoplasma sunt eliminate. Tot în acest stadiu aparatul Golgi se detașează de la capul acrosomal care a devenit complet și se mută într-o poziție posterioară, în timp ce acrosomul începe să-și schimbe forma. Se formează acum de-a lungul axei de dezvoltare a cozii, nouă fibre groase, fiecare aliniate cu un microtubul extern dublu al flagelului. În faza finală a dezvoltării, mitocondriile migrează în partea proximală a flagelului și se condensează în jurul lui, formînd o spirală. La sfîrșitul procesului spermatozoidul se eliberează în lumenul tubului seminifer (6).

Cinetica spermatogenezei. Din cercetările efectuate de Milovanov V. și col. reeșă că deși intrarea în diviziune a primelor celule spermatogoniale se înfăptuiește (la pubertate, iar durata diferențierii acestora pînă la spermatozoizii este de ordinul zecilor de zile), formarea spermatozoizilor în continuu. Cauza o constituie faptul că din stratul bazal al epiteliului tubului seminifer intră în mod continuu în diviziune, la termene diferite, noi și noi celule stern spermatogoniale care-și urmează cursul, paralel cu celelalte.

În figura 11, se poate observa că în fiecare generație și în fiecare ciclu epitelial care au plecat pe drumul de formare a spermatozoidului se găsesc celule germinate în stadii diferite ale mitozei și ale meiozei și toate fazele ciclice prin care trec celulele generatoare de spermatozoizi pînă la formarea completă a acestora, precum și durata lor de desfășurare (după Dadou-

ne și Demulin). Se observă, că celulele spermatocite de rezervă de tip A se divid continuu pe orizontală pentru a forma rezerva de celule a acestora în spermatogonii de tip A. Aceasta din urmă după 16 zile se diferențiază din nou și se transformă în spermatogonie de tip B (urmărește evoluția liniei celulelor pe întregul proces începînd din colțul de jos din partea dreaptă a figurii). În următoarele 16 zile spermatogonia de tip B intră în meioză și parcurge fazele de preleptonem (P); leptonem (L) și zigonem (Z). După 30 zile ele se găsesc în zigonem. Cu această dată ele intră în faza de pahinemy și pe parcursul a 16 zile ajunge în stadiul de diachineză cînd se transformă în spermatocită secundară haploidă (ScII). De acum înainte încep, pe parcursul altora 32 de zile (de două ori 16) toate fazele de formare a pieselor cozii spermatozoidului.

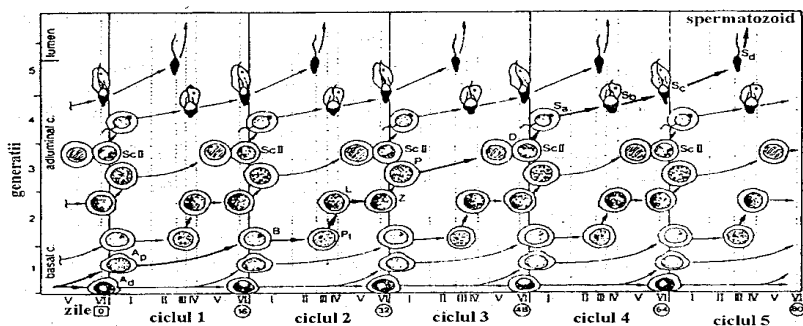


Figura 11. Bariera testicol-sânge (după I.Vintilă)

Ciclu epitelului seminifer

Miclea V. a stabilit că pentru fiecare ciclu, transformările celulare să fie însemnate de la I la mărimea ciclului este indicată de spațiul dintre liniile verticale punctate, care sunt proporționale, în mărime, cu durata lor. În figură se redau simultan și sincron 4-5 generații de celule germinate, în toate punctele tubului seminifer. În figura de mai sus de la stînga la dreapta sau notat transformările în timp a celulelor din tubul seminifer. Întregul proces spermatogenetic cuprinde 4-6 cicluri ale epitelului seminifer și are o durată totală de 74 zile. Ad - tipul de spermatogonie A; Ap - tipul de spermatogonie A din generația a 2-a; B - tipul de spermatogonie B; PI,

L,Z,P,D - preleptonem, leptonem, zigonem, pahinem, diplomem; Sc: - spermatocite secundare, Sa, Sb, Sc, Sd: spermatoide în stadii succesive ale spermatogenezei(după Dadoune și Demulin).

Producția zilnică de spermatozoizi

Eficiența producției zilnice de spermatozoizi se măsoară cu ajutorul numărului de spermatozoizi formați pe zi, per gram de parenchim de țesut testicular, în acest fel, eficiența producției de spermatozoizi este diferită de la o specie la alta.

S-a dovedit (tab.2) că la mamifere, în general, producția zilnică de spermatozoizi, pe gram de țesut testicular, variază între 20-28 milioane, cu excepția taurului și a armăsarului care au o producție zilnică de doar 12 milioane, respectiv 16 milioane de spermatozoizi.

Producția de spermatozoizi se reduce însă cu vârsta masculului. La bărbat de la 5-6 milioane/ g/zi, cîți există la vârsta de 20 de ani, numărul acestora se reduce la 3,8 milioane între 50-90 de ani. În același timp crește substanțial și proporția de spermatozoizi anormali și infertili.

Tabelul 2.

Producția de spermatozoizi și rezervele de celule spermatice la diferite specii de mamifere (prelucrat)

Specia	Greutatea Corporală (kg)	Greutatea testiculelor (gr)	Producția de spermatozoizi pe gram de țesut pe zi (milioane x)	Rezerve extragonadale de celule / Epididim		Numărul mediu de spermatozoizi pe mm ejaculate (10)			
				Cap	Corp	Coadă	Canal deferent	Total	
Taur	1200	800	12	19	42	38	76	69	6000
Armăsar	1000	340	16	9,6	11	50	75	77	7000
Berbec	100	500	21	23	11	126	-	>165	4000
Vier	200	720	23	36	51	104	-	>185	15000
Iepure	4	6	25	0,36	10	16	22	22	120

În prezent se cunoaște că proteinele SDS-solubile ale membranei plasmatice, ale membranelor acrosomului, precum și cele ale matrixului și a creștelor mitocondriilor, se sintetizează preponderent în etapele meiozei și în fazele timpurii ale spermiogenezei. Dimpotrivă proteinele SDS-insolubile ale cozii și ale capului are loc numai în decursul etapelor timpurii și mijlocii ale spermiogenezei (Mallord J.și col).

S-a dovedit că la spermatozoizii recoltați din epididim cromatina care compune cromosomul este puternic condensată. Ea se decondensează numai după ce spermatozoidul a pătruns în citoplasmă ovocitei după fecundare.

Procesul de condensare a cromatinei cromosomilor are nevoie de proteine speciale, altele decât histonele și nonhistonele care compun nucleosomii. Nu poate fi altfel explicat, de ce pe parcursul etapelor care compun spermiogeneza, proteinele cromosomale histone și nonhistone sunt înlocuite și eliminate din celule cu un tip special de proteine bazice. În faza de spermatidă intermediară, după ce a început procesul de spermiogeneză cu formarea capului, a acrosomului și a cozii; spermatozoidului, proteinele bazice, la rîndul lor sunt înlocuite de protamine bogate în arginină (50%) și cisteină (Milovanov V.).

După ce protaminele au fost sintetizate în citoplasmă, ele sunt transportate, apoi, în nucleu pentru a-și îndeplini rolul de determinatori ai condensării cromatinei. Pe acest parcurs protaminele sunt fosforilate pentru a se putea cupla cu ADN-ul formînd un complex protamine-ADN. După complexare ele sunt apoi defosforilate permițînd moleculei de protamină să formeze legături disulfidice între aminoacizii de cisteină care contribuie la condensarea puternică a cromatinei cromosomilor, în scopul de a facilita tranzitarea, cu succes, a spermatozoidului prin epididim.

Reglarea procesului de spermatogeneză

Cercetările au demonstrat (Miclea V.și col) că testiculul dispune de două țesuturi glandulare cu secreție internă (endocrină) una este glanda diastematică a lui Leydig așezată în spațiul interstițial dintre tubii seminiferi, iar cea de-a doua o reprezintă celulele Sertoli din interiorul tuburilor seminiferi.

Celulele Leydig din componența glandei interstițiale sintetizează, din colesterol și acetat, hormoni androgeni, cel mai important fiind testostero-

nul. O parte din el este vărsat în sângele sistemic, iar o altă parte ajunge în interiorul tubilor seminiferi avînd drept țintă celulele Sertoli.

Celulele Leydig mai secretă și hormonul oxitocină care are drept țintă celulele mioide din peretele tubilor seminiferi stimulîndu-le motilitatea.

Celulele Sertoli secretă factorii de creștere așa cum sunt: inhibina și activina care au drept ținte celulele Leydig, celulele din hipofiză și chiar celulele liniei spermatogenezei, care posedă o mulțime de receptori. Ele mai secretă și hormonul antimulerian care are acțiune în embriogeneză pentru stoparea dezvoltării canalelor lui Muller în testiculul primordial. Toți acești hormoni participă la desfășurarea corectă a procesului de spermatogeneză din tubii seminiferi.

Ei singuri însă nu pot conduce spermatogeneză în afara intervenției hormonilor hipofizari LH și chiar FSH. La rîndul lor hormonii LH și FSH care se sintetizează în celulele hipofizei anterioare nu pot să fie eliberați în sânge, dacă nu primesc o comandă pentru eliberare din partea unui hormon gonadotrop ce se sintetizează în hipotalamus numit hormonul de eliberare sau prescurtat GnRH (gonadotroph realising factor hormon). Interacțiunile care se stabilesc între aceștia pot să conducă și să regleze, cu precizie, desfășurarea complicatului proces de spermatogeneză.

S-a stabilit că hormonul hipofizar LH este cel care determină, în primul rînd, stimularea celulelor Leydig să producă testosteron din colesterol și acetat. El se cuplează cu receptorii de membrană ale celulelor Leydig și produce semnalul care ajunge la nucleu și determină sinteza și secreția testosteronului. S-a măsurat că după legarea LH de receptorii de membrană a celulelor Leydig nivelul cAMP sporește după 60 de secunde, iar nivelul producției de testosteron crește și se menține la nivel ridicat în următoarele 20-30 de minute.

Hormonul LH nu acționează singur asupra celulelor Leydig. El este ajutat de prolactina hipofizară, precum și de către inhibină în activarea completă a producției de testosteron a celulelor Leydig.

Testosteronul produs traversează peretele tubilor seminiferi și pătrunde în lumenul acestora legîndu-se de receptorii specifici ai celulelor Sertoli pentru a se implica în susținerea spermatogenezei.

Cercetările speciale au demonstrat că producerea testosteronului nu poate să fie completă, dacă la axa LH-celule Leydig, celulele Sertoli, nu participă și celălalt hormon hipofizar cu acțiune gonadotropă, FSH. S-a demonstrat experimental că FSH-ul hipofizar se leagă de receptorii specifici ai

celulelor Sertoli și stimulează activitatea adenil-ciclazei, sinteza de ARN-m și ribozomal, producerea de lichid testicular, precum și stimularea sintezei de către celulele Sertoli a proteinelor cu rol în susținerea activității hormonale așa cum sunt: proteinele care leagă androgenii (AMB), și inhibina.

Androgenii la rîndul lor stimulează sinteza receptorilor de FSH de pe celulele țintă. Astfel FSH împreună cu testosteronul acționează energie asupra celulelor Sertoli susținînd realizarea completă a spermatogenezei.

4. RECOLTAREA MATERIALULUI SEMINAL

Milovanov V. a demonstrat că însămînțarea artificială este de neconceput fără a avea o tehnică simplă și eficace de recoltare a spermei, în așa fel concepută, încît să nu aibă o influență negativă asupra activității sexuale a masculului sau asupra calității spermei.

Miclea V. și colab., Milovanov V, au demonstrat că la baza tehnologiei de recoltare stau aceiași factori fiziologici ca și pentru actul sexual natural, prin care anumiți stimuli, recepționați la nivelul organelor de simț, declanșează în lanț reflexele sexuale.

Comportamentul sexual la masculi

Miclea V., Ostașco F. au demonstrat că comportamentul sexual variază de la o specie la alta, iar în cadrul acesteia intensitatea de manifestare a elementelor sale componente se diferențiază cu rasa și individual, dar după un model de o similitudine remarcabilă. Masculii tuturor speciilor animalelor de fermă se apropie de femela în călduri, o abordează, timp în care se realizează erecția, după care efectuează saltul, intromisiunea și depunerea materialului spermatic într-un compartiment specific al căilor genital female, vaginul. Toate etapele menționate se constituie ca *reflexe sexuale* la masculi. Corectitudinea și intensitatea lor de manifestare oferă indici importanți, dar nu exclusive, asupra valorii de reproducție a masculilor.

În cadrul comportamentului sexual al masculilor, pe lîngă cele cinci reflexe sexuale (apropiere, erecție, salt, intromisiune și ejaculare) există și aspectele legate de *potența sexuală*. Ea reprezintă capacitatea masculului de a efectua succesiv mai multe monte, pînă la epuizare.

Reflexele sexuale se manifestă la efectuarea montei, dar și la recoltarea spermei pentru însămînțări artificiale, cînd pot suferi unele modificări.

Reflexul de apropiere este format din totalitatea manifestărilor comportamentale a masculilor în prezența femeii în călduri. La majoritatea speciilor masculii se apropie de femelă, realizează frecvente contacte nazo-nazale și nazo-vulvare, o împinge ușor în regiunea flancului sau pe fața inferioară a abdomenului, efectuând o palpăre a acestora, după care poate manifesta un rictus caracteristic al buzei superioare, ridicând capul. Cu siguranță derularea etapelor comportamentale ce formează reflexul de apropiere sunt importante atât pentru mascul cât și pentru femelă în realizarea corectă și reușită a monteii.

Milovanov V. a demonstrat că recoltarea materialului spermatic cu vagina artificială alterează reflexul de apropiere sau îl modifică. El este format acum din manifestările animalului la intrare în sala de recoltare, în apropierea manechinului și a operatorului. Când nu se ține seama de aceste aspecte se înregistrează, de cele mai multe ori, eșecuri în recoltarea producției spermatice.

Reflexul de erecție constă în totalitatea modificărilor de formă, mărime și consistență, care determină îngroșarea, alungirea și rigidizarea penisului, astfel încât este posibilă efectuarea monteii. Ereecția este urmarea aflului crescut de sînge în penis, consecutive unei vasodilației peniene. Ţesutul spongios și corpii cavernoși se încarcă cu sînge în urma stazei provocate de contracția mușchilor bulbo- și ischio-cavernoși. Acumularea de sînge alături de acțiunea unor grupe de mușchi penieni, induce îngroșarea, rigidizarea, alungirea și proiectarea penisului afară din teaca furoului.

Cercetările au demonstrat că, erecția este un reflex înăscut care se desfășoară sub coordonarea sistemului nervos central. Senzațiile auditive, vizuale, olfactive, tactile ajung pe cale centripetă la scoarța cerebrală, de unde pleacă pe cale centrifugă impulsurile nervoase la centrul erecției, situate în măduva sacrală, în dreptul vertebrelor S_1 , S_2 , S_3 . De aici comanda efectoare ajunge la penis, prin intermediul primelor trei perechi de nervi sacrali, producîndu-se dilatarea vaselor peniene și contracția mușchilor bulbo- și ischio-cavernoși. Ereecția poate fi provocată și prin excitarea mecanică a rețelei de receptori aflați în tegumentul penisului. Excitarea electrică a centrului nervos sacral sau de către impulsurile care vin din sistemul nervos central produc erecția (Miclea V., Milovanov V).

Cercetările efectuate au demonstrat (Milovanov V.), că excitabilitatea centrului erecției este coordonată de testicul, sub modelarea sistemului ner-

vos central. Dacă scade secreția de testosteron erecția se diminuează sau chiar dispare. Unele substanțe medicamentoase afrodisiace și parasimpaticomimetice favorizează erecția, mecanismele de acțiune fiind diverse vasodilatație, scăderea pragului de excitabilității scoarței cerebrale și, ca urmare, nu se transmite comanda spre centrul sacral al erecției. Bromurile în doze terapeutice, inhibă centrii cordicali, scăzând excitabilitatea sinapselor neuromusculare efectoare, erecția ne mai avînd loc în condiții normale de excitație.

Reflexul de îmbrățișare (cuprindere, salt), se manifestă prin saltul masculului pe femelă. Cercetările au demonstrat că acest reflex nu este un reflex înăscut, ci se formează cu timpul și nu este specific, masculul putînd efectua saltul pe alți masculi, femele care nu sunt în călduri sau pe femelele din alte specii și se produce numai dacă masculul se poate sprijini pe trenul posterior. În unele afecțiuni (podale, ale membrelor posterioare, bazinului) saltul nu poate fi efectuat.

Miclea V. accentuează că peste reflexul de îmbrățișare se suprapun cele mai multe reflexe condiționate, acțiunea lor fiind favorabilă sau din contra, nefavorabilă.

Reflexul de împerechere (intromisiune, coit), face parte din grupul reflexelor înăscute (după Milovanov V.) și constă în introducerea penisului în vaginul femelei după efectuarea saltului. Împerecherea este condiționată de erecție și salt iar femela în călduri ia o poziție de sprijin, se cifozează facilitînd intromisiunea. Împerecherea este urmată de efectuarea unor mișcări de propulsare și revenire, într-un ritm și număr caracteristic. Acestea realizează erecția deplină și dau posibilitatea perceperii senzațiilor termice, de presiune și frecare, de către terminațiile nervoase de la suprafața penisului. Sub acțiunea lor, este excitat centrul ejaculator, care comandă eliminarea spermei. Mișcarea penisului în vagin este favorizată de secrețiile vaginale și ale glandelor bulbo-uretrale.

Crearea unor condiții asemănătoare celor din vaginul femelei aflate în călduri, a dat posibilitatea recoltării spermei cu vagina artificială la majoritatea speciilor de fermă (Milovanov V.). Cu ajutorul ei se crează cele trei condiții necesare reușitei în recoltare, respective temperaturi, presiune, lubrefiere. Uneori se observă apariția reflexelor de frînare a intromisiunii datorită pregătirii și manipulării defectoase a vaginei artificiale, schimbarea locului și a tehnicianului recoltator, bruscare masculilor, slaba calitate a cămașii vaginale (penisul este foarte sensibil la contactul cu suprafețele

aspre). În aceste cazuri masculii vor fi lăsați în repaus o perioadă de timp, apoi se folosesc la montă, în continuare fiind trecuți treptat din nou la recoltarea cu vagina artificială.

Reflexul de ejaculare constă în eliberarea spermei din căile genitale masculine și depunerea ei într-un compartiment specific al căilor genital female și este un reflex înăscut. Conracțiunile peristaltice succesive ale musculaturii netede din căile genital și glandele anexe împing masa seminală pînă la expulzarea ei în exterior. Centrul nervos al ejaculării este localizat în măduva lombară, cuprinsă vertebrele L₂, L₃, L₄. Senzațiile peniene din timpul împerecherii sunt transmise la scoarța cerebrală, iar de aici comanda ajunge la centrul spinal al ejaculării. Acestea, pe calea plexului lombar și hipogastric, comandă contracția musculaturii netede din căile genitale. Centrul ejaculator lombar poate fi excitat cu ajutorul curentului electric. Metoda este uneori folosită pentru recoltarea de material spermatic la ber bec, taur și vier.

Din literatura de specialitate se cunoaște că în timpul ejaculării au fost depistate mai multe faze. Astfel, mucoasa uretrală, prin glandele sale, încă de la erecție produce o secreție care umectează și curăță canalul uretral. Înaintea ejaculării propriu-zise secrețiile glandelor bulbo-uretrale sunt eliminate avînd rolul de a curăța uretra și a umecta glandul pentru ușurarea intromisiunii. Urmează apoi eliminarea unui lichid dens, bogat în spermatozoizi, amestecat cu secrețiile prostate și apoi a glandelor seminale.

Reflexele sexuale și tipul de sistem nervos

Prin cercetări s-a demonstrat că, reflexele sexuale se derulează pe baza informațiilor ajunse la sistemul nervos central din sfera genitală și mediul ambiant (culese de analizatorii olfactiv, vizual, auditiv). Acesta trimite răspunsuri comandă la centrii spinale și hipotalamus. Interrelațiile hipotalamus-hipofiză arată că hormonii gonadotropi și sexuali intervin major în modul de manifestare a reflexelor sexuale, dar rolul hotărîtor îl are sistemul nervos (Miclea V.). Acest fapt este dovedit de realizarea reflexelor sexuale chiar fără participarea funcțiilor endocrine. Spre exemplu, armăsarul castrat după ce a avut activitate reproductivă poate efectua monta, pe cînd cel castrat la pubertate nu manifestă instinct genezic. Există, prin urmare posibilitatea cerebrală de a restabili pe cale reflexă modificările organice necesare actului monteii.

Rezultă că tipul de sistem nervos determină în mare măsură comportamentul sexual la masculi.

Animalele cu tip nervos echilibrat au temperament vioi sau liniștit. Masculii cu *temperament vioi* se caracterizează printr-o constituție robustă, excitare rapidă, montă energetică, potență ridicată. Reacționează pozitiv la condițiile noi de montă și recoltare. Deoarece reflexele pozitive și inhibitoare se formează repede, vor fi evitate greșelile în tehnologia reproducerii. Datorită aptitudinilor reproductive deosebit de favorabile, sunt cei mai apreciați masculi.

Masculii cu *temperament liniștit* au constituție robustă sau grosolană, timpul de excitare relativ lung, efectuează monta corect iar potența este bună. Condițiile noi de montă sau recoltare, inițial induc o stare de inhibiție, după care survine acomodarea. Au predispoziție pentru îngrășare, însă sunt destul de bine apreciați pentru reproducție mai ales că ejaculatul este cel mai bine reprezentat cantitativ.

Animalele cu tip nervos neechilibrat, sunt cu temperament nereținut și slab. Masculii cu *temperament nereținut* au constituția fină, timp de excitare foarte scurt, efectuează monta energetic, dar potența este scăzută. Condițiile noi de montă sau recoltare nu produc reflexe de frînare ale activității sexuale. Deoarece se epuizează repede, frecvența de folosire la montă va fi mai scăzută. Folosiți intens devin repede retivi și greu de manevrat. În acest caz pentru evitarea accidentelor se reformează.

Masculii cu *temperament slab* sunt caracterizați printr-o constituție debilă, se excită greu, efectuează monta necorespunzător, iar potența este foarte scăzută. Refuză monta în prezența persoanelor străine, când este zgomot sau femela este neliniștită. Se obișnuiesc foarte greu la recoltarea cu vagina artificială. Acești masculi, de regulă, nu se utilizează la reproducție. La alegerea masculilor pentru reproducție este necesară cunoașterea modului de manifestare a reflexelor sexuale. Desigur, animalele trebuie apreciate diferențiat. Particularitățile anatomice ale aparatului genital, gradul de ameliorare a raselor, individualitatea, sistemul nervos și experiența sexuală, sunt factori majori.

Obținerea produsului seminal brut constituie o operațiune biotehnică de mare finețe sub raportul protejării și menținerii comportamentului și potenței sexuale a masculului.

Recoltarea spermei, fără dificultate, presupune următoarele măsuri pregătitoare și anume:

- obișnuirea masculului cu partenerul de recoltare;
- obișnuirea cu sala de recoltare;
- obișnuirea cu tehnicianul recoltator.

Tehnologia de recoltare a spermei la reproducători presupune dotarea centrului de recoltare și prelucrare cu:

- partenerul (manechinul) pentru recoltare;
- vaginul artificial;
- paharul colector.

În vaginul artificial pentru tauri se folosesc pahare colectoare din sticlă cu pereții dubli sau colectoare de o singură întrebuințare, confecționate din polietilenă, în formă de con.



Foto 1. Construcția vaginei artificiale



Foto 2. Recoltarea propriu-zisă

Principiile recoltării spermei

Recoltarea spermei constă din provocarea artificială a ejaculării, fără să aibă loc actul sexual între mascul și femelă. Recoltarea spermei este o operațiune foarte importantă, de aceea mulți cercetători au căutat să îmbunătățească metodele de obținere a spermei, fără să prejudicieze sănătatea masculului. În decursul timpului au fost preconizate o serie de procedee de recoltare, cu aparatură mai mult sau mai puțin adecvată, în mare parte abandonate din cauza impracticabilității lor. Multe dintre ele, cum sînt: recoltarea cu ajutorul condomului, cu ajutorul collectorului de spermă, cu ajutorul buretelui, prin fistulă uretrală etc. au mai mult o valoare istorică sau se folosesc în mod excepțional, în cazul în care procedeele curente de recoltare nu dau rezultate (Milovanov V., Miclea V).

La majoritatea speciilor, recoltarea spermei se realizează cu ajutorul vaginului artificial. În afară de această metodă se mai folosesc: electroejacularea la berbec, taur, păsări, cîine; masajul abdominal, la păsări; masajul ampulelor canalelor deferente și al glandelor seminale, la taur; masturbația sau metoda manuală, la vier și cîine.

Indiferent de metoda de recoltare, folosirea masculilor la înșămînțări artificiale este legată de Milovanov V., Miclea V., Ostașco F):

- apariția maturității sexuale;
- dresarea sau obișnuirea reproducătorilor cu metoda de recoltare;
- condițiile de alimentație, îngrijire și exploatare a reproducătorilor.

Recoltarea spermei este posibilă numai după instalarea maturității sexuale, care este marcată prin:

- elaborarea spermatozoidilor apti pentru fecundarea ovulei;
- prezența dorinței de împreunare;
- dezvoltarea completă a organului copulator.

Dresarea reproducătorilor trebuie să înceapă imediat după instalarea pubertății. Dacă în perioada prepuberală masculii pot fi întreținuți pe grupe, în timpul dresării, ținerea lor separată este obligatorie. Indiferent de metoda aplicată, obișnuirea masculilor pentru recoltare trebuie să se facă cu răbdare, fără bruscări și fără traumatizări ale organului copulator sau ale țesuturilor asupra cărora se acționează. De la început trebuie luate măsuri de protecția muncii, care se referă în principal la conținutul animalelor.

Prin cercetări sa stabilit că, hrănirea reproducătorilor după rații judi-

cios alcătuite și cu furaje de bună calitate are influență pozitivă, atât asupra apariției pubertății, cât și asupra capacității reproductive în timpul folosirii lor la recoltare. Alimentația reproducătorilor cu furaje bogate în hidrați de carbon și proteine grăbește apariția maturității sexuale și asigură păstrarea potenței sexuale, prin stimularea endocrină și gametogenetică a gonadelor. În timpul perioadei genitale trebuie ca nivelul energetic al rației să fie astfel calculat, încât să asigure necesarul pentru desfășurarea normală a funcției de reproducere. Administrarea exagerată a hidraților de carbon duce la îngrășarea masculilor și prin aceasta, la scăderea libidoului, dificultăți în efectuarea saltului și chiar la tulburarea procesului de spermatogeneză.

S-a demonstrat că adăpostirea masculilor trebuie făcută în grajduri igienice, în care să fie asigurate condiții corespunzătoare de umiditate, temperatură, luminozitate, igienă. O atenție deosebită trebuie acordată mișcării reproducătorilor în padocuri, carusel, plimbare la pășune. De asemenea, periodic se recomandă curățirea ongoanelor, pentru evitarea apariției afecțiunilor podale.

Cercetările efectuate (Milovanov V., Antoniu V.) au demonstrat că regimul de recoltare a spermei are o mare influență, atât asupra principalelor caracteristici ale spermei, cât și asupra duratei de folosire a masculilor. Recoltările prea dese duc la diminuarea cantității spermei și la mărirea numărului de spermatozoizi nematurați în spermă, în timp ce recoltările prea rare determină apariția unui procent mare de spermatozoizi patologici în spermă, iar la unii masculi se constată, în cazuri mai rare, masturbație. De aceea, regimul de recoltare se stabilește în funcție de specie, de vârsta reproducătorului și uneori chiar în funcție de necesități. La fiecare ejaculat este necesar să se facă controlul spermei.

5. NOȚIUNE DE SPERMOGRAMĂ ȘI TIPURI DE SPERMOGRAME

Fertilitatea unui reproducător este condiționată de calitatea spermei. Miclea V. și col. au demonstrat că noțiunea de “calitate a spermei” are ca bază de plecare constatările care se referă la compoziția chimică și însușirile ejaculatului, corelate cu capacitatea fecundantă a spermatozozilor. Pentru aceasta, deși metodele ce se folosesc în prezent pentru evaluarea produsului seminal dau decît valori relative, o spermogramă a ejaculatelor folosite la însămînțări artificiale este deplin justificat. Importanța controlu-

lui și evaluării ejaculatelor prin spermograme prezintă următoarele aspecte: spermograme organoleptice: (volumul, mirosul, consistența, aspectul și culoarea), spermograme citologice (mobilitatea, concentrația), spermograme morfologice (spermatozoizimorfi și cu diferite anomalii), spermograme biochimice (componente anorganice, organice).

Indiferent de scopul în care s-a realizat, după recoltare sperma este examinată pentru evaluarea însușirilor macroscopice și microscopice. Acest examen se efectuează imediat după recoltare, prin asigurarea tuturor cerințelor pentru a menține sperma «in vitro» și a nu deteriora calitatea acesteia. În acest scop: se va utiliza un echipament curat, fără urme de substanțe chimice (alcool, antiseptice de orice fel), agent lubrifiant, lichid prepușial, apă sau urină; sticlăria de laborator trebuie să fie confecționată din sticlă neutră, curată, sterilizată și încălzită pînă la temperatura fiziologică (37-38°C); ejaculatul nu se va expune la lumina solară directă și se va evita variația de temperatură a ejaculatului care determină șocarea termică a spermatozoizilor.

Examenul senzorial

Prin examen senzorial se apreciază volumul ejaculatului, culoarea spermei, mirosul, densitatea și prezența valurilor spermatice.

Volumul ejaculatului. Volumul ejaculatului diferă în funcție de specie, iar în cadrul speciei de la o rasă la alta și chiar la același reproducător, de la un ejaculat la altul (Milovanov V.). Determinarea volumului ejaculatului se poate stabili în paharul colector sau în cilindrii građați. În condiții optime de recoltare, volumul ejaculatului se menține în limite constante. La masculii tineri volumul ejaculatului este mai redus, în comparație cu cel al masculilor adulți. Aplicarea unor tehnici de recoltare neadecvate, o frecvență ridicată a recoltărilor, starea de boală, inflamația unor anexe ale aparatului genital, precum și alți factori, cum ar fi alimentația, întreținerea și exploatarea nerațională pot provoca reducerea volumului materialului seminal (oligospermatismul) sau chiar sistarea completă a ejaculării (aspermatismul).

Culoarea spermei. Culoarea spermei diferă puțin de la o specie la alta, dar se află în corelație strînsă cu concentrația de spermatozoizi: la taur este albă sau alb-cremă. Abaterile de la aspectul și culoarea considerate normale, culoarea maronie se datorează pigmentilor sanguine, - culoarea roz-roșietică a spermei evidențiază prezența în ejaculat a sîngelui care extravazează din tractusul genital, uretră sau penis, - culoarea gălbuie denotă

că sperma este amestecată cu urină, - flocoanele de puroi modifică culoarea spermei conferindu-i ejaculatului un aspect neomogen; ele provin din ampulele canalelor deferente sau glandele anexe ale aparatului genital; - infecțiile cu *Pseudomonas spiralis* modifică în galben-verzui culoarea spermei. În toate aceste cazuri sperma nu poate fi folosită.

Aprecierea valurilor spermaticice. La unele specii prin examen macroscopic, în funcție de densitatea și mobilitatea spermatozoizilor se poate constata prezența valurilor, de diferite intensități, provocate de mișcările gametilor. Acest lucru este vizibil în sperma deasă, proaspăt recoltată, la rumegătoare, asemănătoare cu niște valuri, care se agită în paharul colector sau într-o lamă exavată. Sperma mijlocie și rară nu prezintă valuri spermaticice.

Examenul microscopic al spermei

Această operație tehnică se execută imediat după recoltare între lamă și lamelă, la temperatura de 37-38 grade C, folosind platina încălzitoare. La un grosiment de 80-100 se apreciază mișcările „în masă” ale spermatozoizilor, desimea și prezența impurităților, iar la cel de 400-500 se analizează direcția mișcărilor spermatozoizilor în câmpul microscopic, aspectul morfologic al spermatozoizilor ca și prezența sau absența celulelor străine.

La examenul microscopic, efectuat în condițiile arătate mai sus, se pot face aprecieri asupra următorilor indici spermatici:

- prezența sau absența spermatozoizilor;
- desimea spermei;
- gradul de mobilitate a spermatozoizilor;
- aspectul morfologic al spermatozoizilor;
- concentrația ejaculatului în spermatozoizi;
- prezența spermatozoizilor vii și morți.

Aprecierea desimii spermei: desimea optimă pentru spermă este cuprinsă între 0,7-1.0 miliarde de spermatozoizi/ml de spermă.

După Dumitrescu I.și col. sistemul clasic de încadrare a ejaculatelor de spermă după desimea în spermatozoizi este următorul:

- sperma deasă, notată cu D, se caracterizează printr-un număr mare de spermatozoizi în câmpul microscopic. Spațiile dintre spermatozoizi sunt mai mici decât lățimea capului unui spermatozoid. Concentrația spermei este apreciată la peste 1 miliard spermatozoizi/ml spermă;

- spermă mijlocie, notată cu M, la care spațiile dintre spermatozoizi sunt mai mari decât lățimea și mai mici decât lungimea capului unui spermatozoid. Concentrația spermei este cuprinsă între 0,5 și 1,0 miliarde de spermatozoizi/ml spermă;
- spermă rară, notată cu R, la care spațiile dintre spermatozoizii existenți în câmpul microscopic sunt mai rari decât lungimea capului unui spermatozoid, permițând mișcări lejere. Concentrația la o astfel de spermă este sub 0,5 miliarde spermatozoizi/ml spermă;
- spermă foarte rară sau oligospermie, notată cu O, la care în câmpul microscopic se observă doar 5-10 și mai rar pînă la 20 spermatozoizi.
- lipsa spermatozoizilor sau azoospermia, se notează cu A. Pentru ca un ejaculat să fie admis la prelucrare, sperma trebuie să fie deasă, rară sau mijlocie, cu condiția că spermatozoizii să prezinte o bună mobilitate.

Înainte de a proceda la aprecierea desimii spermei este necesar ca aceasta să fie bine omogenizată, pentru ca spermatozoizii sedimentați să se distribuie uniform în plasma seminală.

Aprecierea mobilității spermatozoizilor. Acest indice spermatic se apreciază între lamă și lamelă, concomitent cu desimea spermei. Mobilitatea sau mișcările spermatozoizilor constituie un criteriu foarte important pentru aprecierea calității spermei.

Deoarece spermatozoizii dintr-un ejaculat sunt de diferite vârste, grade de maturitate și de excitabilitate, direcția lor de mișcare în câmpul microscopic poate prezenta următoarele forme de mișcare (după Milovanov V.):

- de înaintare-rectiliniare;
- circulare sau în menaj;
- vibratorii sau ondulatorii;
- de retropropulsie sau mers înapoi (ca racul).

În cazul în care toți spermatozoizii din câmpul microscopic sunt imobili, morți este vorba de fenomenul de necrospermie și se notează cu N.

Cu excepția primei forme de mișcare, celelalte sunt considerate ca mișcări anormale. Ejaculatele în care se constată că peste 20 % din spermatozoizi prezintă una din formele anormale, menționate mai sus, se exclud de la prelucrare.

În activitate de laborator, aprecierea gradului de mobilitate a spermatozoizilor se face după sistemul zecimal și se notează de la 1,0 la 0,1. De

exemplu, dacă 50% din spermatozoizi sunt mobili sperma se notează cu 0,5, sau dacă 80% au mișcări de înaintare, mobilitatea se notează cu 0,8.

Aprecierea mobilității spermatozoizilor se poate exprima și în %, prin raportarea numărului de spermatozoizi cu mișcări de înaintare la numărul celor cu mișcări anormale sau imobili.

De exemplu sperma notată cu 90 % mobilitate, înseamnă că are 10% din spermatozoizi imobili sau cu mișcări de înaintare anormale.

Materialul seminal recoltat se apreciază la moment folosind sistemul de analiză computerizată a spermei (CEROS) care redă informațiile despre mobilitatea fiecărei celule spermatice în parte, prin proiectarea imaginilor electronice ale spermatozoizilor, construcția traectoriei fiecărei celule spermatice, evaluarea simultană și obiectivă a modificărilor minore ale mobilității spermatozoizilor, care pot fi astfel detectate (foto 3.).



Foto 3. Programa CEROS

Concomitent cu aprecierea mobilității se fac și observații referitoare la energia de mișcare a spermatozoizilor. În examinările obișnuite se fac trei distincții și anume:

- mișcări energice, notate cu =+++;
- mișcări moderate, notate cu =++;
- mișcări agonice notate cu =+.

De exemplu, dacă în frotiul examinat, proporția spermatozoizilor cu mișcări de înaintare este de 80 %, iar mișcarea se apreciază ca deosebit de energetică, notarea gradului de mobilitate a spermei se face cu 0,8 +++.

Aglutinarea spermatozoizilor. Acest fenomen, destul de frecvent în ejaculate, constă în grupări și aglomerări de spermatozoizi în formă de stea, adică dispuși cap la cap.

Prin cercetări s-a determinat că cauzele principale ale procesului de aglutinare rezidă din perturbările încărcăturii electrice a spermatozoizilor care poate fi pozitivă sau negativă. S-a demonstrat că, spermatozoizii din tubii seminiferi sunt încărcăți parțial pozitiv, parțial negativ, iar la nivelul epididimului trec în mod unitar la încărcătura electrică ce este caracteristică spermei (Miclea V., Ostașco F).

Încărcătura electrică diferită, a spermatozoizilor vii și foarte mobili, produce, datorită desimii lor în ejaculat, reotaxisul acestora și mișcarea în masă a spermei. O dată cu scăderea mobilității încep să acționeze în mod reciproc forțele spermatozoizilor încărcăți opus, producându-se aglutinarea lor. Aceasta poate fi cauzată chiar și de unele mici modificări ale valorii PH-ului sau de prezența impurităților.

Cercetările efectuate privind frecvența apariției fenomenului de aglutinare este legată de individ cât și de furajarea defectuasă a reproducătorilor. Ejaculatele cu spermatozoizi maturați al cărui înveliș lipoproteic este bine format, sunt mai rezistenți la aglutinare decât cele provenite de la masculi suprasolicitați la recoltare.

În general, sperma cu grad redus de aglutinare nu afectează fecunditatea, însă gradul avansat de aglutinare determină o scădere apreciabilă a acesteia. Ejaculatele cu grad ridicat de aglutinare se elimină de la prelucrarea în laborator.

Densitatea spermei apreciată la microscop este destul de subiectivă și mult influențată de experiența celui ce face examinarea. Datorită acestui fapt, în practica de laborator se fac determinări prin numărătoarea spermatozoizilor din ejaculatul de analizat sau alte procedee indirecte prin care se poate stabili cât mai corect numărul spermatozoizilor dintr-un volum de spermă. Numărul de spermatozoizi se poate raporta în milioane pe microlitru, sau în miliarde pe ml de spermă, notându-se cu litera C.

Determinarea concentrației este obligatorie pentru stabilirea corectă a gradului de diluție a spermei.

Numărătoarea spermatozoizilor se realizează cu ajutorul camerei de numărat și a pipetei Potain sau omogenizatorul de eritrocite. Pipeta de omogenizare are tubul capilar notat de la 0,5 la 1,0. în partea de sus a bulei de omogenizare se află gradația 101.

Se cunosc mai multe tipuri de camere de numărare, dar cel mai des utilizată este camera Thomas. Camera Thomas are înălțimea de 0,1 mm și o suprafață de numărare de formă pătrată cu latura de 1 mm. Această suprafață este divizată în 256 de pătrățele, delimitate prin linii intermediare. Pe cameră sau lamă se delimitează 16 pătrate mari.

Tehnica de numărare. Din proba de spermă, bine omogenizată, se aspiră în pipeta Potain până la diviziunea 0,5 peste care se aspiră apoi o soluție de clorură de sodiu în concentrație de 3 %, până la diviziunea 101. După omogenizare se lasă să treacă în cameră prin capilaritate, cantitatea necesară de spermă diluată. Se așteaptă apoi până ce spermatozoizii se sedimentează pe suprafața rețelei și se începe numărătoarea spermatozoizilor din 80 de pătrățele mici.

Calculul concentrației (C) sau al numărului de spermatozoizi pe ml de spermă se face astfel :

- Dacă în cele 80 de pătrățele mici se numără de exemplu 15 spermatozoizi, în 400 pătrățele, adică într-un milimetru pătrat sunt:

sau 15×5 , cifră care se înmulțește cu diluția și înălțimea camerei. Dacă diluția este de 1 :200, înălțimea fiind de 1 :10 mm, se va înmulți cu 200 și apoi cu 10, adică cu 2 000:

$$15 \times 5 \times 2000 = 150\,000/\text{mm}^2$$

Exprimarea spermatozoizilor pe ml de spermă se face prin adăugarea a trei zeruri și se obțin miliarde pe ml. În exemplul dat, rezultă 150 000 000, respectiv 0,150 miliarde de spermatozoizi pe ml. La determinarea concentrației, prin această metodă, pot apare însă și erori de numărătoare în următoarele situații: nu se respectă exact marcarea de diluție pentru 0,5 și 101 sau lamela de acoperire nu are o suprafață perfect plană. Alte erori pot fi datorate omogenizării incomplete a probei de analizat, absorbția de bule de aer în pipetă, aglutinarea spermatozoizilor, lichid prea mult sau prea puțin pe lama de numărare, oboseala examinatorului și altele.

În acest sens, pentru determinarea concentrației de spermatozoizi în ejaculat, se folosește cu mult succes metoda fotocolorimetrică, ce se bazează pe măsurarea intensității fasciculelor de lumină ce trec prin eșantioanele de spermă ce se examinează. Gradul de opacitate a probelor de spermă puse în cuva aparatului este în raport direct cu gradul de diluție, adică, cu numărul de spermatozoizi pe unitatea de volum (Ostașco F.și col).

Acest procedeu de apreciere este simplu, destul de precis și poate fi

executat de orice persoană din cadrul stațiilor de însămînțare artificială.

Determinarea pH-ului la spermă se poate stabili prin metoda calorimetrică și electrometrică. Metoda colorimetrică se bazează pe folosirea indicatorilor coloranți, cea mai indicată fiind hîrtia de microdiviziune.

Metoda electrometrică se bazează pe aprecierea exactă a diferenței de potențial, citirea pH-ului făcîndu-se direct pe cadranul galvanometrului.

pH-ul ejaculatului proaspăt este cuprins între 7,2 și 7,5. La ora actuală este cunoscut faptul că pH-ul spermei corelat cu concentrația în spermatozoizi poate influența mobilitatea și viabilitatea spermatozoidelor.

Determinarea proporției de spermatozoizi morți din spermă.

Această metodă se realizează cu ajutorul unor coloranți adăugați la sperma de examinat. Cea mai uzuală metodă este colorarea spermatozoidelor morți cu eozină-nigrozină. (Feredean și Buda,). Substanța colorantă are următoarea compoziție: eozină 5 %, nigrozină 10 % (în apă distilată), soluție tampon (fosfat monopotasic și fosfat disodic, cu pH-ul de 7,0) și soluție de glucoza 9,66%. Din aceste soluții se face următorul amestec: soluție de eozină 5 ml, soluție de nigrozină 10 ml, soluție tampon 1 ml și soluție de glucoza 1 ml.

Pentru colorare se iau 2 părți de spermă peste care se adaugă o parte colorant. Amestecul de spermă + colorant se păstrează la temperatura de 35-37 grade C după care se fac froțiuni. Froțiunile se usucă timp de 15 minute la termostat (35-37 grade C). Examinarea preparatelor se face în aceeași zi la microscop cu obiectiv de imersie. Aplicînd această metodă de colorare, spermatozoidii vii apar necolorați, iar cei morți apar colorați.

În momentul citirii froțiului, numărul spermatozoidelor morți se notează separat de cei vii, pînă la atingerea cifrei de 300-400 spermatozoizi. Procentul de spermatozoizi morți din proba de spermă examinată se stabilește astfel:

$$n = \frac{n \times 100}{N}$$

în care:

n - numărul spermatozoidelor morți; N - numărul total de spermatozoizi.

Existența unui număr de spermatozoizi morți (peste 25 %) indică o spermă de calitate inferioară și o slabă capacitate fecundată, fiind exclusă de la prelucrare.

Examenul morfologic al spermatozoizilor

Prezența în spermă a formelor patologice este determinată și de unele procese degenerative ale epiteliului tubilor seminiferi și ale glandelor genitale anexe, cauzate în principal de dereglări ale nutriției, inflamații locale sau de unele boli ale reproducătorilor (Bogdan A. și col).

Tehnica determinării aspectului morfologic al spermatozoizilor constă în diluarea spermei, prepararea frotiului, colorarea acestuia, examenul microscopic și calculul procentului de spermatozoizi anormali.

Diluarea spermei proaspăt recoltate se face în raport de 1:10, într-o soluție de clorură de sodiu, 1 % din care se prepară frotiuri colorate. Prepararea frotiului se face prin metoda picăturii care curge, pentru a se evita strivirea spermatozoizilor și apariția de noi forme anormale. Frotiul astfel preparat se usucă și se fixează la aer. Fixarea se poate face și cu alcool de 96 grade timp de 1-2 minute sau cu o soluție de clorură de amoniu 5 % timp de o oră. Frotiul fixat se clătește cu apă și se colorează.

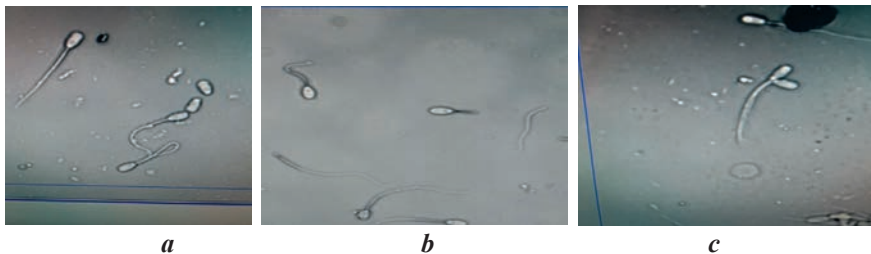


Foto 4. Anomalii morfologice (după Marius Zăhan)
a)-fără cap, b)-fără coadă, c)-cap dublu,

Colorarea frotiului se face cu Giemsa rapid, cu fuxină Pfeifer, cu soluție de albastru de metilen 1 %, roșu de Congo, verde de bromcrezol sau alți coloranți. Depunerea colorantului pe frotiu se face cu o pipetă obișnuită, în strat gros. După 3-5- minute, frotiul se spală cu apă de robinet și se clătește cu apă distilată. Frotiul astfel preparat se usucă la aer sau cu ajutorul hîrtiei de filtru.

Examinarea și numărarea spermatozoizilor se face la un microscop ce mărește de 400-500 ori. Se numără cel puțin 500 spermatozoizi, separat cei cu forme anormale, după care se calculează proporția celor cu forme patologice (Miclea V., Zăhan M).

Cu cît procentul de spermatozoizi patologici este mai mic, cu atît calitatea spermei și fertilitatea reproducătorilor este mai mare. În cazul desfășurării normale a procesului de spermiogeneză și spermatogeneză, numărul spermatozoizilor patologici în sperma de taur nu trebuie să depășească 10-15%.

6. DILUAREA SPERMEI

Răspîndirea însămînțărilor artificiale s-a datorat posibilităților de diluare și conservare a spermei. Diluarea spermei reprezintă o etapă premergătoare și obligatorie pentru conservarea spermei; în rare situații sperma se însămînțează sub formă brută sau imediat după diluare, fără a fi conservată. Păstrarea spermei presupune diluarea și conservarea ei, două etape interdependente ce se aplică succesiv și corelat (Milovanov V). În toate țările care practică însămînțările artificiale, metoda folosită este aceea a utilizării spermei diluate, singura care permite prelungirea supraviețuirii *in vitro* a spermatozoizilor pe o durată de timp mai îndelungată. Pentru aceasta este în primul rînd nevoie de găsirea și aplicarea acelor metode care să permită reducerea cît mai completă, dar reversibilă, a metabolismului spermatozoizilor. În practică, procedeul principal folosit pentru prelungirea vieții spermatozoizilor, prin reducerea sau oprirea temporară a metabolismului se bazează pe acțiunea temperaturii scăzute care a putea fi suportată de spermatozoizii dar are nevoie în prealabil de tratarea spermei cu medii protectoare (Milovanov V., Nauc V., Ostașco F., Darie G). Diluarea permite:

***creșterea volumului total al masei spermatică;

***posibilitatea fracționării ejaculatului în mai multe doze și, deci, însămînțarea unui număr mult mai mare de femele;

***asigurarea unui mediu favorabil prelungirii viabilității și capacității fecundante a spermatozoizilor, etc.

Cercetările pentru găsirea mediului ideal de diluare a spermei au început încă de la introducerea însămînțărilor artificiale și se poate spune fără greșală, că ele coninută și astăzi (Nauc V. Darii G. și col. Marandici E).

În lucrarea sa "Biochimia spermei și a tractului genital mascul" T. Mann rezumă astfel condițiile pe care trebuie să le îndeplinească diluantul ideal:

- să fie izotonic cu sperma;
- să aibă o capacitate ridicată de tamponare a tendinței de acidifiere a mediului;

- să posede înalte calități nutritive;
- să aibă un mare potențial bactericid, sau cel puțin bacteriostatic;
- să aibă o acțiune stabilizatoare asupra substanțelor coloidale protectoare;
- să posede proprietăți antioxidante;
- să prelungească viața spermatozoidului cât mai mult posibil.

La toate aceste proprietăți, Bhattacharya și Gunther mai adaugă următoarele:

- mediul de diluție trebuie să fie transparent pentru a nu împiedica în nici un fel, ba chiar a facilita, examinarea spermatozoidelor;
- să nu conțină nici un fel de particule solide care ar putea prejudicia integritatea acrosomului în timpul mișcării dezordonate a spermatozoidelor;
- să nu conțină agenți de tipul liozimei sau liolectinei, care au efect diminuant asupra capacității fecundante a spermatozoidelor.

Însă un asemenea mediu ideal de diluție, care să răspundă tuturor acestor cerințe nu a fost încă obținut. Totuși numeroasele cercetări întreprinse în acest domeniu (Nauc V.și col. Darie G. Marandici E.,Milovanov V) au reușit să stabilească rolul benefic al diferitor componente potențiale ale mediilor sintetice de diluție, cum ar fi:

- proprietatea citraților, fosfaților, tartraților și a sulfataților, de a opri descompunerea învelișului coloidal lipoproteic al spermatozoidelor, acționând totodată ca un regulator al concentrației ionilor din mediu;
- acțiunea protectoare a lecitinei sintetice sau a lecitinei din gălbenușul de ou asupra capsulei lipoproteice a spermatozoidului în timpul procesului de reducere a temperaturii;
- aportul nutritiv-energetic al zaharurilor, asociați cu proprietatea lor de a împiedica descărcarea sarcinii electrice a spermatozoidelor;
- capacitatea glicerinei, alaninei și lecitinei de a diminua activitatea celulară prin regularizarea metabolismului glicolitic al spermatozoidelor și de a face reversibilă transformarea hidraților de carbon în proteină și acizi grași;
- proprietățile complexe ale gălbenușului de ou, care datorită conținutului în colesterol și caroten stimulează activitatea enzimatică a dehidrogenazelor, iar prin conținutul de aminoacizi stimulează procesele de dezaminare oxidativă din spermă;

- particularitatea glicerinei de a interveni în procesul de cristalizare a apei de constituție prin coborîrea punctului de formare a cristalelor de gheață de la -1,7 grade C la -10,0 grade C și capacitatea sa de a penetra în interiorul spermatozoidului, pentru a înlocui apa de constituție care a migrat în plasma seminală (Ostașco F.);
- acțiunea favorabilă a ocitocinei, prozerinei etc, asupra vehiculării spermatozoizilor în tractul genital femel, ca urmare a stimulării undelor antiperistaltice ale uterului.

Compoziția diluanților utilizați în acțiunea de însămînțări artificiale este foarte diferită, dar în general, după cum menționează I.Dumitrescu și col. marea majoritate a diluanților sunt preparați, fie pe baza substanțelor chimice (citrați, fosfați tartrați, sulfati etc.) fie pe baza substanțelor organice (lapte, hormoni, extracte tisulare).

Indiferent de metoda de conservare a spermei, pentru prelungirea viabilității și a capacității fecundante a spermatozoizilor „in vivo“, sunt necesare:

- reducerea formării și acumulării produșilor rezultați din metabolismul celulelor seminale; neutralizarea substanțelor toxice rezultate din metabolism; trecerea parțială sau definitivă a spermatozoizilor în anabioză.

Cercetările au demonstrat că, aceste deziderate se realizează prin diluarea spermei, realizarea unui mediu cu un pH ușor acid (6,2 - 6,4) sau scăderea temperaturii în timpul diluării, cu menținerea temperaturii scăzute pe toată durata conservării.

Principiile diluării spermei, însușirile generale ale diluanților și clasificarea acestora. Diluția spermei se bazează pe faptul că din numărul total de spermatozoizi depuși prin montă, numai o fracțiune redusă (circa 5%) ajung pînă la nivelul treimii superioare a oviductului, locul unde urmează să se desfășoare fecundația. În acest fel, marea majoritate a spermatozoizilor devin disponibili pentru a fi inoculați altor femele. Experiențele întreprinse au demonstrat faptul că numărul de spermatozoizi necesari pentru însămînțarea unei vaci este de 10-12 milioane, număr care poate fi redus pînă la 5 milioane, fără a fi diminuat nivelul ratei fecundației.

Principiile care stau la baza diluării spermei sunt:

***se diluează numai sperma corespunzătoare calitativ;

***diluantul trebuie să conțină substanțe care să protejeze și să ajute la activarea și menținerea metabolismului spermatozoizilor;

***materialul seminal diluat trebuie să fie aseptizat prin încorporarea unui antibiotic cu spectru larg de acțiune.

După Dumitrescu I. diluanții se pot clasifica după compoziție, scop și specia la care se folosesc.

După compoziție diluanții se împart în salini, pe bază de lapte și sintetici.

Multitudinea rețetelor de diluanți existente, îl pune pe practician în dificultate, în ce privește alegerea diluantului optim, care să se prepare ușor. Să constituie un mediu bun de diluție, să permită exprimarea unui indice ridicat de mobilitate și a unui procent maxim de fecunditate, să fie ieftin și alcătuit din componente accesibile. Momentul primordial de alegerea diluantului îl constituie accesibilitatea și prețul său, deoarece seriozitatea muncii de cercetare dusă de colectivele care au elaborat diluanții cunoscuți face ca marea majoritate a rețetelor recomandate să fie satisfăcătoare în ce privește fecunditatea obținută.

Diluanții salini constau în soluții de concentrații diverse în săruri de fosfați, citrați, sulfați, tartrați de sodiu și potasiu, care au rol de substanțe tampon. Soluțiile mai conțin zaharuri (glucoză, fructoză, zaharoză etc) și gălbenuș de ou, diferențiat cu specia la care se folosesc (Milovanov V., Nauc V., Darie G).

Diluanții pe bază de lapte conțin: lapte proaspăt de vacă ecremat sau lapte praf degresat, cu sau fără adaos de gălbenuș de ou.

Diluanții pe bază de medii sintetice sunt, în prezent, cei mai răspândiți, sunt produși de firme specializate, având în compoziția lor diferite combinații de săruri, lapte, cu adaosuri de vitamine, hormoni, extracte tisulare etc, în funcție de unitatea producătoare, pentru fiecare specie în parte, purtând diferite denumiri comerciale: Laiciphos, Spermasol, Diploten, Triladyl, Seminan etc.

După scopul lor diluanții se folosesc pentru sperma conservată prin refrigerare. După specia de animale la care se folosesc, diluanții se pot pre-

para după aceleași formule, pentru o singură specie sau pentru mai multe specii (taur, berbec, țap).

Tehnica preparării diluanților

Prepararea diluanților diferă în funcție de compoziția acestora. Diluanții salini cu adaos de gălbenuș de ou se pregătesc în doi timpi.

Timpul 1. Se prepară soluția salină prin adăugarea în apa bidistilată a cantităților de săruri prevăzute prin receptura diluantului respectiv. Apa bidistilată se obține în distilatoare de sticlă pentru a nu dăuna viabilității spermatozoizilor. Distilatoarele metalice modifică pH-ul apei distilate prin ionii de metal ce se formează. Soluția salină se prepară zilnic, în funcție de necesar sau pentru mai multe zile, când se păstrează în sticle sterilizate la întuneric, la temperatura de refrigerare. Diluantul salin se prepară la nivelul unor laboratoare zonale sau naționale de unde este expediat unităților specializate în flacoane închise ermetic care se păstrează la frigider o perioadă de circa 6 luni.

Timpul 2. Înainte de folosirea diluantului se adaugă gălbenușul de ou în cantitățile prevăzute în formulele de preparare a acestora. Se folosesc ouă de găină proaspete (1-3 zile) provenite de la un efectiv sănătos. Ouăle se spală cu apă caldă, se dezinfectează coaja cu alcool sanitar, se sparg și se separă gălbenușul de albuș, albușul netrebuind să ajungă în diluant deoarece are o reacție acidă și modifică pH-ul mediului.

După obținerea cantității necesare de gălbenuș de ou se omogenizează cu o baghetă din sticlă sau cu un agitator mecanic timp de 5-10 minute, apoi, gălbenușul bine omogenizat, se adaugă peste soluția salină, sub omogenizare continuă, fără a se forma spumă. Omogenizarea face globulele de grăsime din gălbenuș să fie dispersate, evitându-se aglomerarea acestora, ceea ce ar împiedeca mișcarea spermatozoizilor.

Pentru aseptizarea materialului seminal diluat, se adaugă în diluant antibiotice cu spectru de acțiune cât mai larg, conform rețetelor de preparare. În țara noastră, cele mai folosite antibiotice sunt: penicilina, streptomicina în cantități de 500 U.I. și respectiv 250-500 μg/ml diluant. Se folosesc cele mai eficiente antibiotice conform antibiogramei. Prepararea diluantului cu gălbenuș de ou și antibiotice se face, de regulă, cu 1-2 ore înaintea folosirii, timp necesar ca sărurile de Na sau K să clarifice sau să facă transparente particulele de globuline din gălbenuș.

Substanțele care se introduc în diluant trebuie să fie proaspete, nealterate, chimic pure și să nu conțină impurități toxice pentru spermatozoizi. Sticlăria și ustensilele folosite la prepararea diluantului să fie sterilizate.

Diluanții pe bază de lapte se prepară astfel: laptele de vacă proaspăt, integral sau ecremat, se fierbe sau se pasteurizează la 90-92^o C, se răcește și filtrează printr-o hîrtie de filtru, sterilă. Cînd temperatura laptelui ajunge la 20^o C se adaugă proporția de gălbenuș de ou, stabilită prin receptură, după tehnica descrisă.

Laptele praf degresat se prepară cu apă bidistilată în raport de 1/9, apoi se pasteurizează, se filtrează, se răcește și se amestecă cu cantitatea necesară de gălbenuș de ou (5-10%).

Diluanții sintetici sunt cei mai întrebuițați în prezent. Ei sunt produși de diferite unități specializate și sunt livrați sub formă de pulberi sau granule. Sunt însoțiți de instrucțiunile de folosire. În prezent, aceste medii de diluție se prepară pe scară industrială, ceea ce conduce la uniformizarea și simplificarea tehnicilor de lucru, obținerea unor rezultate bune, în condițiile scăderii prețului de cost.

Diluția propriu-zisă diferă cu specia și cu modul de conservare a spermei.

Diluarea spermei de taur

Pentru conservarea spermei prin refrigerare se folosesc medii pe bază de soluții saline cu adaos de gălbenuș de ou, glucoză, sau diluanții pe bază de lapte. Cel mai frecvent sunt întrebuițați diluanții sintetici, livrați de diverse firme, cu diferite denumiri, în funcție de țara și unitatea producătoare. Diluantul sintetic este un mediu uscat, pe bază de lapte ecremat, echilibrat și sterilizat, la care se adaugă în final 10% gălbenuș de ou și 7% glicerină cu densitate 1,25 (de exemplu Laiciphos). Nivelul relativ scăzut de gălbenuș de ou facilitează examinarea microscopică, fără să influențeze negativ fecunditatea.

Indiferent de natura diluantului, se adaugă cantitățile necesare de antibiotice (preferabil în funcție de antibiogramă), se pasteurizează, se filtrează și se răcesc.

Diluarea spermei pentru conservare prin refrigerare se face în două etape:

***diluția inițială (prediluția), la 37^o C, în raport de 1/1 și în condiții de izotermie;

***diluția finală (definitivă), la 18-20⁰ C, tot în condiții de izotermie, conform raportului final de diluție, calculat în funcție de concentrația spermei brute și a celei diluate în spermatozoizi/mm³ sau pe ml.

Formula de calcul este:

$$\text{G.D.F.} = \frac{C_1}{C_2} \times M \times V \quad \text{în care:}$$

- G.D.F = gradul de diluție finală;
- C1 = concentrația spermei brute în spermatozoizi/ml;
- C2 = numărul de spermatozoizi vii pe care dorim să-i avem în doză;
- M = mobilitatea spermatozoizilor după decongelare, exprimată în sistemul zecimal;
- V = volumul dozei de spermă exprimat în ml.

Exemplu: C1=109; C2=12x10⁶; M=0,6; V=1,0ml.

G.F.D.=109x0,6x1,0/12x10⁶=50, sau cînd V=0,5ml rezultă G.D.F.=109x0,6x0,5/12x10⁶=25.

În această situație, la un volum de spermă se adaugă 49 volume de diluant în primul caz, și respectiv 24 de volume, în cazul al doilea. Precizăm că mobilitatea spermatozoizilor după deconserare se calculează pentru fiecare taur în parte pe baza mediei mai multor determinări.

În acest caz, raportul de diluție final va fi: R.D.F=1/49; R.D.F=1/24.

Pentru calcularea numărului de doze pe care le putem obține dintr-un ejaculat, se înmulțește volumul ejaculatului cu gradul de diluție final obținut și se împarte la volumul dozei.

În exemplul dat, dacă volumul ejaculatului este de 5 ml, numărul de doze va fi; Nr. doze=50x5/1=250; sau N=5x25/0,5=250

Gradul de diluție pentru sperma de taur, oscilează în medie între 20 și 40, astfel încît într-o doză de însămînțare să se asigure 10-12 milioane de spermatozoizi mobili. Mobilitatea minimă admisă pentru sperma de taur conservată prin refrigerare este de 60% sau de 0,6, determinată înainte de a fi însămînțată. După diluare, se apreciază mobilitatea spermatozoizilor și dacă aceasta nu a scăzut cu mai mult de 10% față de mobilitatea spermei brute, diluția se consideră că a fost efectuată în condiții bune și se trece la repartizarea în doze a spermei. Repartizarea spermei în doze se face cu ajutorul unor seringi semiautomate, în fiole de sticlă care se închid apoi la

flacăra oxiacetilenică, sau în fiole care se închid cu dop de plută sau din material plastic.

Pentru conservarea spermei de taur prin congelare se folosesc două medii de diluție care se deosebesc numai prin aceea că unul conține, în plus, glicerină, substanță crioprotectoare.

În acest caz se pot folosi diluanți salini, pe bază de lapte sau sintetici (de exemplu Laiciphos, Tryladil, Seminan etc.) care se prepară după tehnicile descrise. Cantitatea de diluant necesară se separă în două părți egale (A și B). Diluantul B conține în plus față de diluantul A 14-16% glicerină chimic pură, astfel încât concentrația de glicerină, în final, să fie de 7-8%.

Diluantul A se împarte în două părți inegale: o parte (A1) mai redusă (5-10%) se păstrează la termostat reglat la 37° C, iar cealaltă parte, (A2) se lasă la temperatura camerei. Diluantul B se păstrează la frigider sau într-o vitrină frigorifică la 2-4° C.

Diluția comportă 3 etape: inițială, intermediară și finală.

Diluția inițială se face la temperatura de 37° C, în condiții de izotermie, în raport de 1/1, cu diluantul A1, direct în paharul sau eprubeta colectoare. După efectuarea acestei prime diluții, paharul sau eprubeta cu sperma astfel diluată se scot de la termostat și se așază alături de fracțiunea A2 a diluantului, la temperatura laboratorului (18-20° C).

Diluția intermediară se face după circa 20-30 de minute, când cele două componente ating aceeași temperatură, la temperatura laboratorului, adăugându-se diluantul A2 într-un raport care să asigure jumătate din cantitatea totală de diluant calculată prin raportul final de diluție.

După diluția intermediară, paharul cu spermă se introduce într-o vitrină frigorifică sau la frigider, alături de fracțiunea B a diluantului.

Diluția finală se face la temperatura de 2-4° C, tot în condiții de izotermie, după 50-60 de minute de la efectuarea diluției intermediare. Întrucât glicerina este o substanță toxică pentru spermatozoizi, diluantul glicerinat se adaugă treptat, picătură cu picătură, sub o permanentă agitare a recipientului cu spermă.

Congelarea spermei sub formă de granule se bazează pe răcirea rapidă a acesteia, în alveolele unei plăci de zăpadă carbonică rezultând pastile cu un volum de 0,1 ml.

După recoltarea spermei se examinează însușirile ejaculatului, în funcție de care se determină gradul final de diluție și volumul total al spermei

diluate. În acest interval de timp, sperma se diluează în proporție de 1/1 la temperatura de 37° C, în condiții de izotermie între diluant și spermă.

Cel mai frecvent se folosește diluant pe bază de lactoză: lactoză 11% în apă bidistilată - 75,3 ml, gălbenuș de ou - 20 ml, glicerină anhidră - 4,7 ml. După 15 minute de la diluția inițială, se adaugă volumul total de diluant glicerinat, cu ajutorul unui dozator automat, cuplat la un omogenizator. Adăugarea se face la temperatura laboratorului, raportul de diluție fiind foarte strâns (1/2, 1/4), datorat volumului redus al granulei și mobilității mai reduse a spermatozoizilor, comparativ cu alte metode de congelare (Dumitrescu I.și col).

Compoziția diluanților utilizați în acțiunea de însămînțări artificiale este foarte diferită, însă se poate afirma că cea mai mare parte, aparține diluanților salini, pe bază de lapte sau sintetici.

Fiecare țară și unitate specializată în practica însămînțărilor artificiale au rețete specifice pentru prepararea diluanților. Din multitudinea de rețete de preparare a diluanților redăm pe cele mai simple și mai frecvent folosite:

Sulfat de sodiu anhidru (Na_2SO_4)	13,6 g
Glucoză anhidră	12,0 g
Peptonă	5,0 g
Apă distilată (încălzită)	1000 ml
2) Citrat de sodiu ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_5$)	2,9 g
Apă bidistilată	100 ml
Gălbenuș de ou	20%

3) Diluant pe bază de lapte praf

Într-un litru de apă bidistilată se adaugă 100 g lapte degresat apoi se fierbe 10 minute într-un vas conic. După răcire se completează apa pierdută prin evaporare, apoi se adaugă antibioticele.

În prezent, pentru diluarea spermei de taur se folosesc diluanți sintetici, preparați de diverse firme și care încorporează toate substanțele chimice necesare, în laborator urmînd să se adauge, eventual, gălbenușul de ou proaspăt preparat și apa bidistilată. În funcție de firma care-i comercializează, diluanții poartă diverse denumiri: Laiciphos, Spermasol, Dilapten, Triladyl, Seminan, LFRMGJ etc.

7. CONSERVAREA SPERMEI

În prezent, extinderea însămînțărilor artificiale este condiționată într-o proporție însemnată de conservarea spermei. A conserva spermatozoizii animali înseamnă a conserva celulele nu numai în stare vie ci și funcțională. De aceea cercetătorii au căutat să pună la punct metode care să fie cât mai adaptate fiziologic spermatozoidului, în sensul că acesta să-și reducă metabolismul fără a fi afectată capacitatea fecundantă.

Tehnicile de conservare a spermei se pot clasifica în trei grupe (după Dumitrescu I.și col):

- a) - conservarea spermei la temperatura ambiantă (18-20°C);
- b) - conservarea spermei la temperatura de refrigerare (2-4°C);
- c) - conservarea spermei la temperatura de congelare (-79;-196°C).

Conservarea spermei la temperatura ambiantă (18-20°C)

În acest caz, conservarea se bazează pe acțiunea inhibitoare a substanțelor chimice incluse în diluant și care pot fi ușor eliminate pentru a reanima spermatozoizii. În acest scop se folosește acidul carbonic, provenit din barbotarea bioxidului de carbon în masa spermatică cu apa ($\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} = \text{H}_2\text{CO}_3$). Spermatozoizii au un metabolism încetinit atît timp cît concentrația în bioxid de carbon se menține la saturație. Cînd bioxidul de carbon este eliminat, spermatozoizii își recapătă mișcarea și capacitatea lor funcțională (Milovanov V).

Rezultatele obținute prin aceasta tehnica sunt nesatisfăcătoare pentru conservarea spermei de taur, berbec și vier. Tehnica nu permite menținerea puterii fecundante a spermatozoidilor decît pentru un interval de timp de circa 3-4 zile. Este necesar ca fiecare doză să fie pusă într-un ambalaj etanș și separat (fiolă saturată cu gaz carbonic).

Mulți cercetători au propus ca metodă de conservare a spermei la temperatura camerei, prin folosirea laptelui de nucă de cocos (după Dumitrescu I). Experiențele au arătat că acest mediu permite supraviețuirea și prelungirea puterii fecundante a celulelor sexuale masculine de taur timp de circa 3-4 zile la temperatura de 15-20°C, metoda fiind depășită tehnologic de conservarea spermei prin refrigerare și congelare. Sperma este diluată normal într-un mediu culaapte de cocos și repartizată în tuburi păstrate la temperatura de 15-20°C.

Conservarea spermei prin refrigerare (2-4°C)

Această tehnică a fost cea mai folosită pe larg pentru conservarea spermei la toate speciile și se mai folosește în prezent pentru conservarea spermei de vier, armăsar și păsări cu rezultate multumitoare (Miclea V).

Mobilitatea spermatozozilor și activitatea lor metabolică descresc progresiv pe măsură ce temperatura mediului în care se găsesc scade. La un nivel de temperatură care oscilează între 2°C și 4°C, într-un mediu de diluție adecvat, mobilitatea aproape a încetat. Dacă se încălzește mediul, mișcarea spermatozozilor reapare, sperma regăsindu-și activitatea și puterea de fecundație. În general, pentru conservarea la acest nivel de temperatură, se folosesc diluanți salini pe bază de citrat, tartrat de Na și K sau de lapte ecremat, sau cel mai eficient, diluanți sintetici în asociație cu gălbenușul de ou, a cărei principală funcție este de a proteja spermatozozii împotriva șocului „a frigore“.

Pe parcursul conservării, la temperatura de refrigerare, spermatozoidul îmbătrânește progresiv, îmbătrânire care se manifestă printr-o reducere a capacității fecundante. Astfel, dacă se consideră capacitatea fecundantă că este 100 în primele 24 de ore de conservare, se reduce la circa 80 în a doua zi, la 65 în a treia zi și la 50 în a patra zi (Parez M.). În acest caz, centrele de reproducție sunt obligate să reînnoiască stocul de spermă la 2-3 zile pentru fiecare reproducător.

În sperma conservată prin refrigerare, menținerea și prelungirea mobilității spermatozozilor se datorează:

- mediului de diluție, care conține substanțe nutritive și protectoare; reducerii metabolismului spermatozozilor, datorită scăderii temperaturii între 2°C și 4°C.

Conservarea spermei prin refrigerare prezintă, totuși, unele **avantaje**:

- permite difuzarea materialului seminal la punctele de însămînțări artificiale situate la o oarecare distanță față de unitatea producătoare;
- se pot constitui rezerve de spermă pentru două-trei zile care pot fi expediate la solicitarea beneficiarilor, în caz de necesitate;
- contribuie la intensivizarea progresului genetic, prin folosirea pe o scară mai largă a reproducătorilor valoroși.

Conservarea spermei prin refrigerare prezintă și următoarele principale

dezavantaje:

- sperma este conservată pe o perioadă limitată de timp (două-trei zile); dificultăți în asigurarea temperaturii scăzute pe timpul transportului și pe durata conservării;
- sunt pierderi apreciabile de material seminal, prin înlăturarea dozelor care nu au fost inoculate în intervalul de timp de două-trei zile;
- cheltuielile mari cu transportul dozelor, care trebuie să se facă în permanență la un interval de două-trei zile, pentru toate punctele de însămînțări artificiale deservite de centrul respectiv;
- consum crescut de energie pentru menținerea unei temperaturi scăzute, constante (2-4°C).

Conservarea spermei prin congelare

Prin cercetări sa dovedit că la temperaturi sub -15°C, modificările biologice pe care le suferă celulele sexuale masculine în cursul timpului sunt abolite. Conservarea spermatozoizilor se face cu scopul de a opri metabolismul lor de o manieră reversibilă, ceea ce permite conservarea acestora pe o durată de timp practic indefinită (Milovanov V).

Însămînțarea femelelor cu sperma conservată prin congelare reprezintă un procedeu cu maximă eficacitate. Această tehnică se bazează pe menținerea sub formă solidă a spermei, spermatozoizii fiind aduși într-o stare de viață extrem de încetinită, nivel la care reacțiile chimice sunt aproape inexistente, motiv pentru care conservarea mobilității și capacității fecundante a spermatozoizilor se poate face în condiții optime, timp de zeci sau chiar sute de ani.

Spermatozoizii își recapătă mobilitatea și capacitatea fecundantă în momentul revenirii la temperatura corporală.

Milovanov V, a dovedit că agenții criogeni pot fi reprezentați de zăpada carbonică ce asigură o temperatură medie scăzută (-79°C), de aerul lichid (-183°C) și azotul lichid (-196°C). Cel mai răspândit agent criogen în congelarea spermei este azotul lichid. Pentru congelarea spermei la temperaturi foarte joase s-a mai folosit și aerul lichid, un amestec de oxigen și azot lichid, care asigură o temperatură de -183°C, care, în contact cu impurități organice, prezintă pericol de explozie, motiv pentru care în prezent nu se mai folosește (Ostașco F).

Păstrarea azotului lichid la unitățile de producere a materialului semi-

nal, la unitățile beneficiare cît și pe timpul transportului se realizează în recipiente speciale numite containere. După modul de folosire sau destinație, containerele pot fi clasificate astfel:

- containere de punct, cu capacitatea de 5-35 litri;
- containere de stocaj și transport, cu capacitatea de 35-50 de litri;
- containere de depozit (stocaj), cu capacități cuprinse între 100 și 750 de litri.

Containerele sunt confecționate din material inoxidabil sau dintr-un aliaj special pe bază de aluminiu. La marea majoritate a containerelor, construcția se realizează după aceleași principii tehnice: „vas în vas” cu pereți multipli izolatori în vid (foto 5).

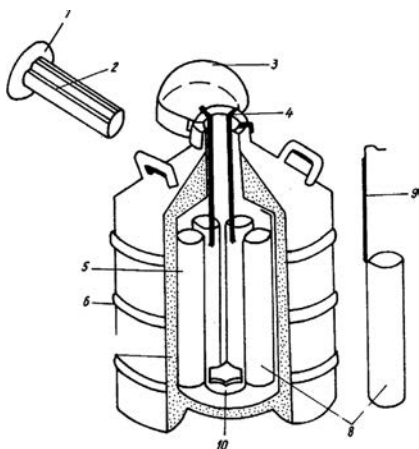


Foto 5. Schema interioară a containerului de punct (după Gh. Liciu și O. Roșca)
1 – dop container; 2 – șanț prin care trece tija canistrei; 3 – capac; 4 – lojă; 5 – cămașă interioară; 6 – cămașă externă; 7 – izolație și vacuum; canistre; 9 – tijă; 10 – limitator canistre.

Partea din dop care pătrunde pe gura sau gîtul containerului, este confecționată din material plastic rigid, care nu opturează ieșirea vaporilor de azot, vapori ce rezultă din fierberea lentă, dar continuă a azotului lichid. Containerele cu care sunt dotate punctele de însămînțări artificiale sunt de capacitate mică, numărul de doze ce pot fi depozitate depinzînd de forma de ambalare a materialului seminal (fiolă, paietă, granulă). De regulă, aceste containere sunt prevăzute cu 6 canistre cilindrice confecționate din tablă inoxidabilă, aliaj de aluminiu sau din material plastic. Pentru ușurința manipulării, canistrele sunt prevăzute cu o tijă a cărei extremitate sub formă de mîner, se sprijină în locașuri speciale practicate la gura containerului. Autonomia containerelor este dată de timpul scurs din momentul efectuării plinului și pînă în momentul cînd

nivelul azotului lichid (cantitatea măsurată în container) nu mai poate asigura conservarea în condiții bune a materialului seminal depozitat. Autonomia containerului este condiționată de tipul constructiv, frecvența manipulărilor, mod de exploatare și întreținere etc și oscilează între 21 și 180 de zile. Pentru determinarea ritmului zilnic de evaporare a azotului lichid, periodic se efectuează cotearea azotului lichid din container.

Fiecare punct de însămînțări artificiale este dotat cu un container în care se găsesc dozele de material seminal necesar, repartizat conform planului de potrivire a perechilor, aprovizionarea cu azot lichid făcîndu-se de către Unitățile de Ameliorare și Reproducție în Zootehnie la intervale de timp corespunzătoare gradului de autonomie a containerelor.

Congelarea spermei prezintă numeroase **avantaje**:

- testarea reproducătorilor după descendenți;
- exploatarea intensivă a celor mai valoroși reproducători;
- depozitarea și folosirea spermei pentru un interval mare de timp;
- se asigură în permanență sperma necesară pentru însămînțarea femelelor, la momentul optim, existînd în acest fel posibilitatea formării de linii și familii cu un potențial productiv ridicat;
- realizarea unor importante economii, prin folosirea rațională, nelimitată în timp, a spermei congelate, comparativ cu sperma conservată prin refrigerare;
- se poate transporta la puncte de însămînțare situate la distanțe mari, fiind nevoie doar de reprovizionarea periodică cu azot lichid;
- se reduc cheltuielile datorate transportului spermei;
- se reduce prețul de cost pe doza de material seminal;
- permite însămînțarea femelelor la pășune, în taberele de vară și în zonele greu accesibile mijloacelor de transport;
- favorizează schimburile internaționale de spermă.

Primele încercări de conservare a spermei au fost făcute în anul 1949 de Parkes, Smith și Polge. Stewart a însămînțat o vacă cu sperma congelată la -79°C și a obținut un produs (I. Dumitrescu și colab.). În anul 1952, Polge și L.E.A. Rowson au introdus în mediul de diluție glicerină și au constatat că această substanță are rolul de a proteja, la temperaturi foarte scăzute, spermatozoizii. Succesul acestei realizări a fost comunicat de Polge și colab. În 1952, la al II-lea Congres Internațional de Reproducție de la Copenhaga. Schema congelării spermei propusă de Polge și colab. În anul

1952, astăzi este mult simplificată, fiind păstrate totuși aceleași principii:

- congelarea cu un diluant cu glicerol;
- scăderea rapidă a temperaturii pînă la -196°C ;
- menținerea spermei congelate la această temperatură (-196°C), pînă în momentul folosirii;
- decongelarea spermei, în vederea inoculării, se face prin imersiunea bruscă a dozei într-o baie la 32°C , chiar în momentul întrebuițării.

Până în 1964, metoda congelării spermei nu a suferit decît mici modificări cu privire la compoziția diluantului, cronologia diferitelor operațiuni și viteza de răcire. Erau atunci propuse două soluții: congelarea în fiole de sticlă de 1-2 ml, congelarea în paiete cu capacitatea de 1,0, 0,5 și 0,25 ml, ultimul tip de ambalaj fiind propus de R. Cassou. Extrema simplicitate, rapiditate și rezultatele foarte favorabile oferite de această metodă au condus la introducerea congelării spermei în paiete din material plastic de către numeroase țări, fiind adoptată congelarea spermei în azot lichid la temperatura de -196°C , mai ușor de obținut și mai eficace decît temperatura de -79°C , asigurată de zăpada carbonică, folosită pînă atunci.

În 1964, comunicările lui Nagase și Niva au repus în discuție congelarea spermei bazate pe următoarele principii:

- folosirea diluanților pe bază de glucoză și fructoză, ușor glicerolați (5%);
- congelarea spermei diluată într-un raport strîns (1/3-1/4);
- congelarea rapidă prin simpla depunere de picături de spermă cu volum redus (0,1-0,2 ml) pe un bloc de gheață carbonică (-79°C);
- rediluarea în momentul decongelării într-o simplă soluție fiziologică de diluant.

Rolul substanțelor crioprotectoare

S-a dovedit că prezența glicerinei în mediul de diluție a spermei, crează condițiile congelării spermei, fără modificări majore, care să afecteze viabilitatea și capacitatea fecundantă a spermatozoizilor. Prin introducerea glicerinei în diluant, punctul de congelare a spermei coboară de la $0,53^{\circ}\text{C}$ la -3°C , iar formarea cristalelor de gheață are loc la -10°C , comparativ cu $1,7^{\circ}\text{C}$ în sperma brută. Cînd începe formarea cristalelor de gheață, temperatura tinde către punctul real de congelare, care se menține pînă cînd congelarea devine completă. În acel moment se stabilește un echilibru între spermă și agentul de răcire. O porțiune de circa 7% glicerină în lichidul de

diluție, determină coborîrea punctului de congelare pînă la -3°C , iar punctul de formare al cristalelor de gheață la -10°C . Cînd se congelează sperma într-un mediu lichid, cristalizarea începe în acea parte a lichidului care este cea mai apropiată de agentul de răcire și se continuă în masa lichidului (Dumitrescu I. și colab. Ostașco F.).

Ostașco F. a demonstrat că dacă coborîrea se face încet, cristalizarea se desfășoară lent, cristalele care se formează sunt mari, ceea ce antrenează o creștere a concentrației în săruri a fracțiunii necristalizate și provoacă ieșirea unei părți din apa intracelulară, diminuînd astfel formarea gheții intracelulare. În cazul în care coborîrea temperaturii se face într-un ritm rapid, cristalele de gheață care se formează sunt mici, rezultînd o substanță destul de omogenă, în care cristalele sunt constituite numai din apă, fapt ce determină o concentrație de electroliți crescută, atît intra- cît și extracelular. În această situație apa intracelulară nu poate ieși în cantitate suficientă, cristalele de gheață se formează în cantitate crescută intracelular, iar aceste cristale își vor mări volumul în momentul congelării și decongelării, fapt care conduce la alterarea structurii spermatozoizilor.

La un moment dat, această concentrație în săruri este atît de ridicată încît lipoproteinele din structura spermatozoidului devin solubile, iar în timpul decongelării permeabilitatea celulară se alterează în așa măsură încît spermatozoidul moare. Acest efect se evidențiază în reducerea cu circa 50% a proporției de spermatozoizi vii din sperma decongelată, astfel mobilitatea spermatozoizilor se reduce de la 70-80% înainte de congelare, la 30-40% după decongelare.

S-a demonstrat că, compușii hidrofilii reprezentați de diverși polialcoli, (glicerol), pătrund ușor în celula seminală prin simpla osmoză, întîrziînd formarea cristalelor de gheață, prin coborîrea punctului de congelare. Pe de altă parte, glicerina limitează efectele soluției, înlocuind o parte din apa intracelulară, atrasă de creșterea presiunii osmotice extracelulare. Alți compuși pot avea rol protector față de membranele celulare (hidrații de carbon, polivinil, piroolidon etc).

Principiile conservării

Milovanov V. a specificat cele mai importante principii care stau la baza conservării spermei:

- păstrarea capacității fecundante;

- menținerea integrității morfo-funcționale a spermatozoizilor;
- aseptizarea materialului seminal;
- folosirea unor tehnologii de conservare adecvate;
- posibilitatea unei depozitări și stocări raționale.

Tehnologia actuală de conservare a materialului seminal urmărește menținerea capacității fecundante a spermatozoizilor un timp cât mai îndelungat din momentul recoltării și pînă la momentul inoculării.

Pentru asigurarea integrității morfo-funcționale a spermatozoizilor în timpul conservării, trebuie să se respecte cu strictețe atît proporția de material crioprotector în diluant, cît și tehnologia propriu-zisă de diluare și conservare. Orice afecțiune a integrității morfologice a spermatozoizilor atrage după sine reducerea și chiar pierderea capacității morfo-funcționale după conservare, și în consecință procente de fecunditate necorespunzătoare.

Aseptizarea materialului seminal prelucrat, în vederea reducerii la minimum posibilitatea de contaminare ale materialului seminal.

În practica conservării spermei o condiție care se impune este ca tehnologia să nu fie laborioasă, să nu necesite o aparatură prea costisitoare și să satisfacă nevoile impuse de procesul de reproducție.

Prin procedeele de conservare se crează condiții de depozitare a unei cantități însemnate de material seminal, timp îndelungat, într-un spațiu cât mai mic. Acest obiectiv poate fi realizat prin conservarea spermei în paiete fine sau sub formă de granule.

Conservarea spermei la temperatura ambiantă (laborator)

Cercetările au demonstrat că la temperatura camerei (laboratorului) sperma de taur se poate conserva pentru o perioadă scurtă de timp (3-6 ore) și pentru o perioadă mai îndelungată (3-4 zile).

Conservarea de scurtă durată se poate face fie sub formă brută, fie sub formă diluată. Sperma brută s-a folosit în perioada de început a introducerii însămînțărilor artificiale și constă în inocularea imediat după recoltare a spermei, fracționată în mai multe doze, în condiții de asepsie. Sperma diluată, păstrată la temperatura camerei, se poate folosi la însămînțare artificială într-un interval de maxim 6-8 ore.

Conservarea pentru o perioadă mai îndelungată a fost consemnată sub numele de anabioză acidă (anabiosis = înviere, revenire la viață).

Diluantul preparat, se barbotează timp de circa 10 minute cu un cu-

rentde CO₂, în prealabil purificat prin trecerea succesivă printr-o soluție de bicarbonat de sodiu 15% și de permanganat de potasiu 3%, pînă cînd pH-ul ajunge la 6,2-6,3. Acidifierea mediului se datorează formării acidului carbonic: CO₂+H₂O=H₂CO₃. Se diluează sperma care se păstrează în ambalaje închise ermetic la temperatura de 18-20⁰ C, timp de 3-4 zile (Milovanov V). Datorită dezavantajelor pe care le prezintă, această metodă de conservare a spermei nu se mai aplică la taur.

Conservarea spermei de taur prin refrigerare (2-4⁰ C)

Această tehnică a fost folosită la taur, cu rezultate satisfăcătoare, nivelul scăzut de temperatură fiind asigurat fie de zăpada hidrică, fie în refrigeratoarele obișnuite.

Tennica de conservare a spermei de taur prin refrigerare este suficient de simplă (Smith și Polge). După efectuarea diluției finale, cu ajutorul unei seringi semiautomate, sperma se repartizează, cîte 1 ml, în fiolele cu capacitatea de 1,5-2,0 ml care se închid la flacără oxiacetilenică. Fiolele se grupează pe tije port-fiole, sau în recipiente din material plastic, pe ejaculate, care se introduc la frigider în vederea echilibrării. După 3-4 ore se pot folosi la însămînțarea artificială a femelelor în călduri, iar pentru transport se folosesc fie frigidere tip, auto, fie termosuri zootehnice, în care se găsește gheață hidrică, ce trebuie să înconjoare din toate părțile dozele de spermă. La punctele de însămînțări artificiale, dozele cu spermă se transferă în frigidere. Expedierea dozelor cu material seminal se face împreună cu un buletin și fișă de utilizare.

Conservarea spermei de taur prin congelare

Congelarea spermei de taur s-a făcut în două variante, după ritmul în care se trece peste punctul crioscopic: lentă și rapidă (Parkes, Smith și Polge).

Congelarea lentă s-a făcut la început și se caracterizează printr-o coborîre lentă a temperaturii spermei, în special de la 35-37⁰C la -30⁰C.

Fiolele cu spermă se introduc într-o baie de alcool etilic, plasată, la rîndul ei, la o temperatură de 2-4⁰ C. În baia de alcool se adăugau la început cantități predeterminate de zăpadă carbonică în scopul reducerii temperaturii după un anumit ritm. Astfel, răcirea spermei între 5⁰ C și -15⁰ C se făcea cu un grad pe minut, iar de la -15⁰ C la -30⁰ C, scăderea temperaturii se făcea cu două grade

pe minut. De la -30°C pînă la -79°C sau -196°C (în funcție de agentul criogen întrebuintat) trecerea fiolelor cu spermă se făcea brusc. În prezent sunt aparate moderne, numite frizere, care în funcție de program, asigură un control electronic al ritmului coborîrii temperaturii. În momentul de față această metodă nu se mai folosește datorită dezavantajelor pe care le prezintă.

Congelarea rapidă a spermei este folosită în exclusivitate în prezent, fiind răspîndită în majoritatea țărilor dezvoltate economic și în curs de dezvoltare.

În funcție de repartizarea în doze, congelarea rapidă se poate face în fiole, paiete și granule.

Congelarea spermei în fiole s-a practicat la începutul folosirii spermei congelate de taur și constituie un procedeu care se mai folosește cu rezultate bune. Fiolele sunt fabricate din sticlă neutră, rezistentă la variații foarte mari de temperatură, iar pe corpul lor se imprimă datele necesare identificării reproducătorului sau codificării necesare în practica de reproducție (Smith și Polge).

Volumul util al materialului seminal diluat este de 1 ml, rezervîndu-se un spațiu de dilatare a lichidului în timpul congelării. Acest spațiu are rolul de a evita, după decongelare, pierderea de material seminal prin refluxare în momentul introducerii în fiolă a pipetei de însămînțare.

După diluția finală a spermei se calculează necesarul de fiole pentru fiecare ejaculat în parte.

Cu ajutorul unui dispozitiv automat sau a unei seringi semiautomate, sperma se repartizează, cîte 1ml, în fiecare fiolă. Fiolele se închid la flacără oxiacetilenică, apoi se fixează în tije port-fiole, confecționate din aluminiu, fiecare tijă fiind prevăzută cu cîte 6 locașuri.

Tijele se grupează pe ejaculate apoi se introduc într-un refrigerator, în vederea echilibrării, unde se mențin 3-4 ore, în funcție de specificul fiecărei unități producătoare. În acest interval de timp, spermatozoizii se adaptează cu diluantul folosit și noul nivel de temperatură, iar antibioticele incluse în diluant își fac efectul specific. După echilibrare, tijele port-fiole se introduc în plan orizontal, în vapori de azot lichid, care se formează deasupra azotului lichid stocat într-un container cu gura largă. La circa 3 cm sub nivelul azotului se găsește o sită confecționată din sîrmă cu ochiurile mici sau dintr-un capac prevăzut pe toată suprafața cu orificii. Pe acest capac grilant se așază tijele port-fiole, vaporii de azot lichid avînd o temperatură de -120°C pînă la -130°C , unde se mențin 8-10 minute. După acest interval de

timp, tijele port-fiole, grupate pe ejaculate, se introduc în canistre metalice care se fixează în containerele cu azot lichid. În aceste containere numite de prestocaj, dozele se mențin până a doua zi, când se verifică mobilitatea spermatozoizilor. Dacă mobilitatea este de cel puțin 30%, tijele port-fiole se transferă în containere depozit, cu capacitate de 200-500 l, unde se păstrează, în azot lichid, până în momentul livrării către diverșii beneficiari. În caz contrar, dozele ejaculatului în cauza se arunca.

Ambalarea spermei în fiole prezintă trei **dezavantaje** majore:

- pot exploda în timpul decongelării;
- ocupă un spațiu de depozitare prea mare;
- necesită o tehnologie de umplere cu o productivitate mai scăzută. Din aceste motive, congelarea spermei în fiole este, în prezent, abandonată în aproape toate țările.

a) Congelarea spermei de taur în paiete

A fost elaborată în anul 1965 de către R. Cassou, în Franța și constituie una dintre cele mai moderne și practice forme de ambalare a materialului diluat, care conferă eficacitate și productivitate sporite. Paieta este confecționată din clorură de polivinil care nu reacționează chimic cu mediul de diluție și este confecționată în două variante:

***paieta mijlocie, cu lungimea de 133 mm, diametrul de 2,5-2,8 mm, grosimea paietei de 0,14-0,20 mm și volumul util de 0,54 ml;

***paieta fină, cu lungimea de 133 mm, diametrul de 1,7-2,0 mm și un volum util de 0,25 ml.

Indiferent de tip, paietele au un capăt deschis, iar celălalt astupat cu un dop „uzinal“ constituit din două straturi de bumbac între care s-a pus un strat de pudră polivinilică preparată cu alcool. Lungimea paietelor este aceeași (133 mm) și întrucât în timpul umplerii se lasă o bulă de aer de 10 mm lungime, lungimea coloanei de spermă este de 103 mm. Pudra de alcool polivinilic, în contact cu un lichid polimerizează și se transformă într-un gel care obturează complet lumenul, ceea ce-i conferă garanția unei protecții absolute a spermei congelate față de germeii florei banale sau patologice prezente eventual în containerul de depozitare.

Pentru imprimarea paietelor se folosește o mașină semiautomată, prevăzută cu un bloc composter și un set de litere și cifre (foto 6). Imprimarea se face cu cerneală specială, rezistentă la azot lichid și cu uscarea rapidă.

Se folosește cerneală de diferite culori în funcție de culoarea paietelor care urmează a fi imprimate, astfel încât, contrastul să fie cât mai evident.

Pe fiecare paietă se imprimă datele necesare pentru identificarea exactă a probei de spermă congelată, întocmai ca pentru fiole. După umplere, capătul deschis al paietelor se astupă cu pudră de alcool polivinilic (dop de laborator) sau se închide prin sudarea cu ultrasunete. La ambele tipuri de paiete, se asigură o bulă de aer cu o lungime de circa 10 mm, absolut necesară pentru a compensa dilatarea coloanei de material seminal în timpul congelării și pentru a favoriza omogenizarea coloanei de spermă după decongelare.



Foto 6. Mașină semiautomată pentru imprimarea paietelor

Tehnica de congelare a spermei în paiete

După efectuarea diluției spermei, conform raportului final de diluție, se calculează necesarul de paiete, care se imprimă cu ajutorul mașinii semiautomate.

Fracționarea ejaculatului în doze de însămânțare se face, de regulă, la temperatura de 2-4⁰ C, manual sau automat.

Umplerea manuală a paietelor. Paietele, imprimate și uscate se prind în brățări metalice căptușite cu cauciuc striat, dimensionate să cuprindă exact 15 paiete mijlocii. Sperma este aspirată în paiete cu ajutorul unei

pompe de vid cu presiunea coloanei de mercur de 30-50 cm. La cordonul de cauciuc al pompei de vid se racordează un pieptene de aspirare prevăzut cu 15 locuri, corespunzătoare numărului de paiete prinse în brățară. La pieptenele de aspirare se atașează brățara cu paiete, astfel încât, prinderea acestora să se facă cu capătul prevăzut cu dopul uzinal. La partea superioară a pieptenului se găsește un orificiu de admisie a aerului care se obturează cu degetul atunci când paietele sunt introduse cu capătul deschis în spermă. Umplerea paietelor se face complet, fără a se lăsa bula de aer. După umplere, paietele se scutură energic, ceea ce îndepărtează surplusul de spermă pe o lungime de circa 10 mm.

Închiderea paietelor se face prin apăsarea lor cu capătul deschis într-un vas care conține pudră de alcool polivinilic. Pudra pătrunde pe lumenul paietelor, astupându-l. Apoi, paietele se introduc cu capătul astupat de pudra de alcool polivinilic într-un recipient cu apă distilată, astfel încât pudra polimerizează și astupă complet și acest capăt al paietei. În acest fel, coloana de spermă este izolată etanș de mediul exterior, protejînd-o de eventualele contaminări. Paietele se desprind din brățara metalică, se șterg cu un prosop uscat, apoi se așază pe niște rame metalice speciale, cu capacitatea de 40-100 de paiete. Stativele cu paietele respective se introduc pentru echilibrare într-un dulap frigorific, la temperatura de 2-4⁰ C, unde se mențin circa 3-4 ore (foto 7).

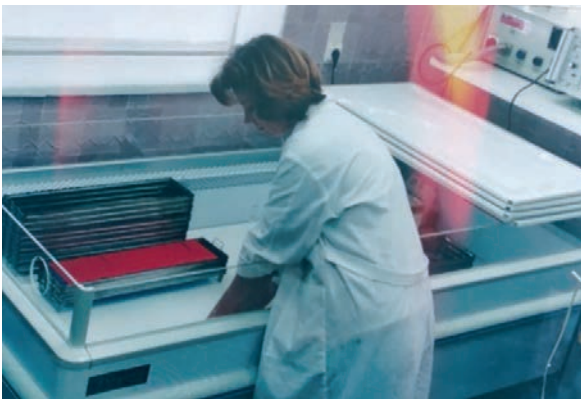


Foto 7. Echilibrarea spermei într-o vitrină frigorifică

După echilibrare, ramele cu paiete se introduc în vapori de azot lichid pentru precongelare, unde sunt menținute 7-8 minute (foto 11). Apoi se adună, se introduc în niște pahare din material plastic cu dimensiuni corespunzătoare canistrelor, numite goblete, acestea se introduc etajat în canistre, care la rîndul lor, se scufundă în azot lichid în containerele de prestocaj (foto 8). Verificarea materialului seminal și depozitarea paietelor cu spermă se face întocmai ca în cazul fiolelor (foto 8, 9 și 10).

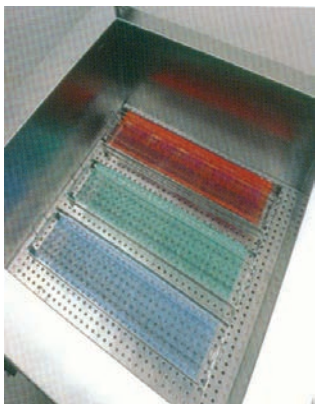


Foto 8. Precongelarea spermei în prestocaj



Foto 9. Containere de vapori de azot lichid



Foto 10. Verificarea calității materialului



Foto 11. Depozitarea dozelor cu material seminal din containerele de prestocaj

O variantă îmbunătățită a umplerii manuale a paietelor este reprezentată de umplerea sub clopot de vid. Paietele sunt închise ermetic prin sudare cu ultrasunete la unul din capete. Sunt apoi individualizate cu toate datele necesare. Se calculează strict necesarul de paiete, în funcție de capacitatea acestora și de volumul total de spermă diluată. Cu capătul deschis, paietele se introduc în paharul cu spermă diluată. La rîndul lui, paharul se plasează sub un clopot de vid. Se pornește pompa de vacuum în vederea scoaterii aerului din paiete, (aspect ce se verifică echinivometric cu ajutorul unei paiete introdusă într-un pahar cu lichid colorat). Apoi se dă drumul la aer, care, datorită presiunii împinge sperma în paiete (foto 13). Paietele se închid la capătul liber cu ajutorul pulberii de alcool polivinilic. Următoarele etape ale congelării sunt asemănătoare celor menționate mai sus. Folosirea acestei metode impune efectuarea unui calcul precis al necesarului de paiete pentru fiecare ejaculat. În caz contrar, fie că paietele nu se umplu, fie că rămîne material seminal neabsorbit în paiete.



Foto 12. Diferite tipuri de containere pentru depozitarea dozelor cu spermă



Foto 13. Ambalarea paietelor sub un clopot de vid

Ambalarea automată a paietelor se face cu ajutorul unor mașini semiautomate a căror productivitate se situează la un nivel de 4000-13000 paiete pe oră. Paietele imprimare cu toate datele necesare, sunt așezate pe un rastel adaptat la conveierul mașinii care transportă paietele pînă în dreptul orificiilor de umplere. La acest nivel se găsesc niște ace racordate prin tuburi de material plastic, la recipientul cu spermă, iar pe partea opusă există același număr de ace, mai scurte, racordate la o pompă de vid. După umplere, paietele trec pe rînd prin dreptul unui emițător (Bronson) de ultrasunete, cu acționare verticală, care închide etanș capătul paietelor. Pentru închiderea paietelor se mai pot folosi bile mici, metalice sau din material plastic care se introduc forțat pe lumenul acestora, închizîndu-se etanș.

Echilibrarea, precongelarea, congelarea, verificarea materialului seminal și stocarea sunt următoarele etape ale congelării identice celor menționate la umplerea manuală.

Ambalarea spermei în paiete prezintă **avantajele**:

***permite o bună individualizare a dozelor;

***se evită contaminarea spermei cu flora microbiană existentă în azotul lichid;

***permite folosirea economică a containerului (maxim de doze în minim de spațiu), aplicabil mai ales în cazul ambalării spermei în paiete fine;

***necesită o tehnică de conservare și inoculare a spermei, simplă.

b) Congelarea spermei în granule (pastile)

Propusă și experimentată de Nagase și Niva, în anul 1964 reprezintă singura formă concentrată sub care se conservă materialul seminal, în contact direct cu agentul criogen (azotul lichid). Se bazează pe congelarea ultrarapidă a spermei diluate într-un raport de diluție strîns, în alveolele unui bloc de gheață carbonică, rezultînd granule de spermă congelate, cu volum de circa 0,1 ml.

Sperma se diluează într-un raport de 1/2-1/4, apoi este lăsată să se răcească pe parcursul a 90 de minute la temperatura de 1-3°C. Echilibrarea spermei se face în frigider, timp de 4-5 ore. Materialul seminal diluat se depune, cu ajutorul unei seringi semiautomate, cîte 0,1ml, în alveolele practicate în niște blocuri de zăpadă carbonică, la temperatura de -79° C.

Placa de zăpadă carbonică se acoperă cu vată sterilă și se lasă circa 7 minute, timp necesar congelării. La expirarea timpului de congelare, gra-

nulele sunt scuturate de pe placa de zăpadă carbonică (sunt suflate cu un curent de aer) și colectate într-un recipient cu azot lichid. Granulele care provin de la același reproducător, se ambalează împreună în recipienti din material plastic, pe care sunt trecute toate datele necesare identificării, apoi se așază suprapus, pe o tijă care se suspendă în azot lichid. Se depozitează numai granulele provenite din probe care după decongelare prezintă cel puțin 30% mobilitate și conțin cel puțin 10 milioane de spermatozoizi vii cu mișcări rectilinii/doză. Acest procedeu de ambalare a materialului seminal are și unele dezavantaje legate de imposibilitatea individualizării sigure a granulelor și a existenței riscului de contaminare cu agenți microbieni proveniți din azotul lichid în timpul conservării.

8. STRUCTURA OVARULUI

Thibault C., și col au demonstrat că ovarul are forma unui bob de fasole acoperit, la suprafață, de o capsulă conjunctivă. O secțiune longitudinală prin ovar pune în evidență o zonă corticală la exterior și o zonă medulară la interior (foto 15).

Stroma zonei corticale este formată din țesut conjunctiv format din fibre și celule conjunctive, celule musculare, vase sangvine și limfatice, nervi simpatici și parasimpatici. Într-un ovar recoltat de la o femelă adultă în stroma corticalei se găsesc o mulțime de foliculi ovarieni aflați în diferite stadii de dezvoltare (Miclea V și col).

Zona medulară este formată din țesut fibroelastic, câteva fibre adrenergice și colinergice precum și ramificații ale arterei ovariene și vase limfatice toate convergînd spre hilul ovarului.

Ovarul la vacă împreună cu oviductul se găsește în cavitatea pelvină, suspendat de către un ligament conjunctiv (numit ligamentul larg), în regiunea lombară.

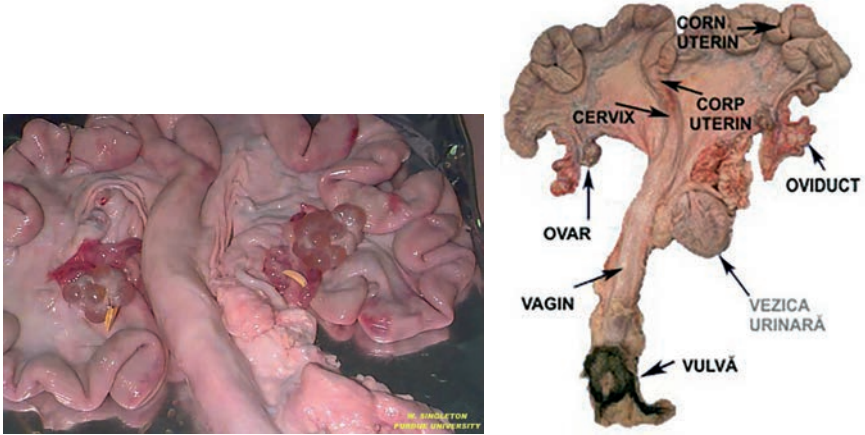


Foto 14. Secțiune longitudinală prin aparatul genital femel la vacă

Structura foliculului ovarian

Sa dovedit că orice tip de foilicul ovarian conține o ovocită în jurul căreia se organizează o mulțime de formațiuni celulare cu funcții diferite și foarte precise (fig.15.).

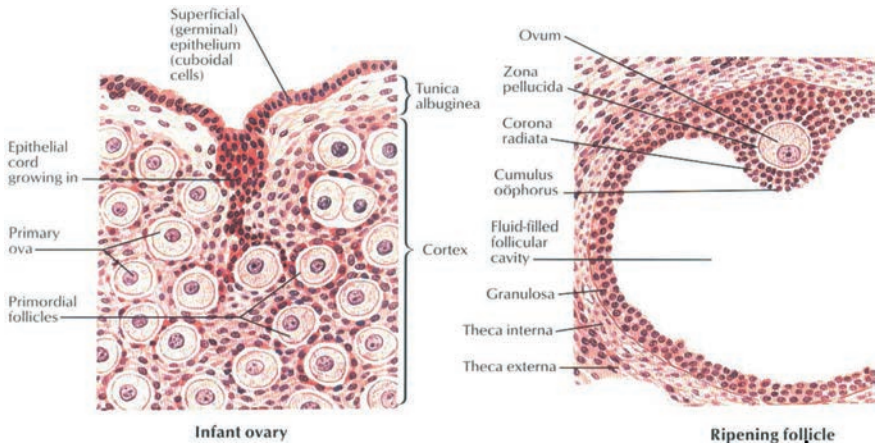


Foto 15. Structura unui folicul ovarian, în faza preovulatorie

Un folicul ovarian în creștere este format din ovocită, înconjurată de câteva straturi de celule cu aspect granulat, care poartă denumirea de *granuloasă* (foto 15).

Peste granuloasă se găsește o membrană denumită membrana propria sau lamina propria (membrana Slavianschi). Deasupra laminei se găsesc câteva straturi de celule ale granuloasei și vase sangvine care secretă estrogeni. Ea poartă denumirea de teacă internă. În jurul tecii interne sunt dispuse încă câteva straturi de celule conjunctive și fibre de colagen care formează împreună teaca externă a foliculului.

Structura ovocitei. Ea se găsește înglobată în foliculul ovarian și ia diferite mărimi, în funcție de stadiul de dezvoltare a foliculului și de stadiul propriu de dezvoltare și maturizare. Indiferent de stadiul de dezvoltare în care se găsește o ovocită este înconjurată la exterior de o anvelopă translucidă, acelulară, formată din glicoproteine numită zona pelucidă (Fig.15). Sub zona pelucidă în jurul ovocitei se găsește o membrană proprie numită membrană vitelină. Între anvelopa translucidă și membrana vitelină se găsește și un spațiu denumit spațiul perivitelin (Miclea V.și col).

Membrana vitelină înglobează în interiorul său citoplasma ovocitei numită și vitelus. Când ovocita își reia meioza, blocată în faza de diploem în stadiul embrionar, vezicula germinală se prăbușește și se transformă, în urma reducerii, la jumătate a numărului de hromosomi, într-un nucleu adevărat.

Membrana vitelină. Este membrana plasmatică care înconjoară ovocita. Structura ei poate fi studiată după ce zona pelucidă a fost îndepărtată, fie mecanic fie pe cale enzimatică sau pe cale chimică (pH- 2,0). Pe suprafața membranei viteline a ovocitei există foarte mulți microvili, care au rol în sporirea suportului mecanic și a volumului ovocitei și chiar în procesul de fecundație.

Microvili sunt prelungiri ale citoplasmei și membranei viteline care se formează cu scopul de a mări suprafața de contact a ovocitei sferice cu mediul înconjurător și poate, pentru a mări probabilitatea de captare a spermatozoizilor care au traversat zona pelucidă. Sa dovedit că citoscheletul de actină pe care-l posedă microviliile are darul să întărească rigiditatea celulei și să-i mențină forma sferică. În lungimea microvililor se găsesc mănunchiuri de filamente de actină (o proteină) care constituie scheletul rigid al celulelor în general, dar și al ovocitei. Actina fiind o proteină contractilă,

în cooperare cu miozina acestea sunt, poate, unicele formațiuni celulare care stau la baza cineticii fenomenelor care se petrec în celule. De regulă filamentele de actină au orientare longitudinală în lungul microvilului ele terminându-se la capătul acestuia într-o substanță amorfă.

Zona pelucidă. Este o envelopă translucidă formată din glicoproteine specific cu rol nu numai de protecție antimicrobiană (prin interferoni), ci și în restricționarea pătrunderii în ovocite a spermatozoizilor proveniți de la altă specie decât cea din care face parte femela.

Ovarul adult și funcțiile sale

Ovarul este organizat pe același model ca și testiculul. S-a demonstrat că toate structurile și procesele care au loc în gametogeneză, urmează un model de dezvoltare unic, pentru ambele sexe (Miclea V.și col). Ovarul are la exterior o capsulă conjunctivă (albuginea) care înconjoară o masă de țesut stromal în care se găsesc foliculii, omologi cu tubii seminiferi din testicul, precum și un țesut interstițial cu rol de glandă endocrină (teaca internă a foliculului), omolog cu celulele glandei interstițiale a lui Leydig, din testicul. Foliculii ovarieni primordiali formați din ovogonii, în jurul cărora se găsește un strat de celule mezenchimale, constituie de fapt unitatea funcțională a ovarului care produce gameții feminini (ovocitele). În testicul unitatea funcțională este tubul seminifer care organizează și produce gameții masculini (spermatozoizii).

Formarea ovulei și a spermatozoizilor decurge după un model asemănător. Și într-un caz și în celălalt se petrec mai întâi procese de proliferare celulară (de multiplicare prin mitoză), urmate apoi de procese de maturare, pe calea meiozei.

Cercetările au demonstrat că la femele, însă, din cauză că ele produc mult mai puțini gameți (ovocite) decât masculii (spermatozoizi), procesele de proliferare celulară sunt mult mai reduse în ovar decât în testicul. Procesele de maturare a gameților pe calea meiozei, sunt însă similare atât la masculi, cât și la femele.

Din această cauză formarea ovocitelor în ovar are o particularitate specială față de formarea spermatozoizilor.

În perioada pre- și postnatală la cele două sexe dezvoltarea gonadelor are câteva particularități.

Dezvoltarea gonadei feminine (ovarul) se dezvoltă pasiv. O astfel de direcție de dezvoltare se păstrează și în faza natală a produsului de concepție (puiului) și durează pînă la pubertate. Dimorfismul sexual, care se manifestă mai accentuat după naștere, se datorează, la mascul, mai ales secreției de androgeni testiculari. La femelă, însă, el se manifestă în absența hormonilor steroizi feminini.

Testiculul sub presiunea hormonului antimulerian, sintetizat de către celulele Sertoli, coboară din abdomen în punga scrotală. Acest fenomen face să crească în lungime ligamentul testicular (gubemaculum testis) atașat de perețele abdominal și-i permite să migreze din abdomen în punga testiculară.

Ovarul spre deosebire de testicul rămîne în cavitatea pelvină suspendat de perețele abdominal cu ajutorul mezenterului ovarian sau mesovarium. Pînă la pubertate, atît testiculul, cît și ovarul cresc ușor în dimensiune.

La pubertate, care are loc mai devreme la masculi decît la femele, începe sinteza de hormoni gonadali (estrogeni pentru femele, sintetizați de celulele glandulare ale tecii interne a foliculului ovarian și androgeni pentru masculi, produși de către celulele glandei lui Leydig, care determină schimbări esențiale în gonade atît din punct de vedere funcțional, dar și structural. Numai începînd cu această perioadă ontogenetică, ovarul devine un organ esențial, care influențează feminizarea individului.

Prin cercetări s-a precizat că dezvoltarea gonadelor masculine este condusă, în faza embrio-fetală, la început de către activitatea genei SRY de pe cromosomul Y și apoi de către activitatea hormonilor androgeni (testosteronul și derivații săi) produsă de celulele glandei interstițiale a lui Leydig, precum și de către hormonul inhibitor al canalelor Muller, secretat de către celulele Sertoli care se găsesc în tubii seminiferi.

Ovogeneza

Ovogeneza sau formarea ovocitei, capabile să fie fecundată, se desfășoară în două faze: 1) *faza proliferativă* (pe calea mitozei); 2) *faza de maturare* (pe calea meiozei).

1. Faza proliferativă, mitotică, a ovogenezei

Vintilă I. demonstrează că celulele germinale primordiale care ajung prin migrare din sacul vitelin în creasta sexuală a embrionului de opt săp-

tămîni continuă proliferarea mitotică imediat după ce corticala acesteia a început să se dezvolte spre a forma un ovar. În acest stadiu celulele germinale primordiale au denumirea de ovogonii, și sunt asemănătoare cu celulele germinale primordiale care s-au stabilizat în medulara crestei sexuale (din care se formează testiculul) și care se numesc spermatogonii. Singura deosebire între cele două sexe este că faza proliferativă a ovogoniilor (mitoza) se termină înainte de naștere la vacă, oaie, capră și șoarece și la scurt timp după naștere la șobolan, scroafa, pisică, iepure și hamster. În acest stadiu toate ovogoniile care se găsesc în ovar intră în faza meiotică de dezvoltare a ovocitei, devenind ovocite primare (analog cu spermatocitele primare de la mascul). Se pare că inițierea procesului de terminare a mitozei (replicare), pentru toate ovogoniile din ovarul primitiv și intrarea lor în faza de început a meiozei, în vederea maturizării, se datorează unui factor special numit factorul de inițiere a meiozei, sintetizat de către celulele țesutului mezonefrosului cu care se învecinează ovarul.

Dezvoltarea ovocitei se desfășoară în interiorul foliculilor ovarieni. Cercetările au demonstrat că consecința acestui proces este că ovarul la vacă, oaie, capră, la naștere conține numai ovocite primare, înconjurate de celulele granuloasei înglobate în foliculii ovarieni primari.

În timp ce ovogoniile intră în prima fază a diviziunii meiotice (profaza) chiar la începutul dezvoltării ovarului embrionar, în jurul acesteia se așează un strat de celule mezenchimale pentru a forma granuloasa foliculului (foto 16.)

2. Faza meiotică (de maturare) a ovogenezei

Prin cercetări s-a demonstrat că aceste celule sintetizează și secretă substanțe speciale formînd o membrană numită membrana propria sau membrana Slavianschi. Ea acoperă spre exterior stratul de celule ale granuloasei. Deși în acest stadiu toate ovogoniile conținute de ovarul embrionar intră în profaza meiozei, procesul nu se desăvîrșește pînă la capăt pentru a trece prin metafază, anafază și să se termine cu diviziunea celor două celule fiice. Ea se oprește în profaza meiozei, în așa numitul stadiu de diploten, cînd foliculul primar este deja organizat (Vintilă I, și col).

În acest stadiu, cromosomii, aflați într-o stare avansată de spiralizare, rămîn în nucleu dînd naștere la vezicula germinativă. Ea constituie nucleul ovocitei primare și ocupă, prin mărimea sa, aproape tot interiorul ovocitei.

Foliculii ovarieni primari în care se găsește ovocita blocată în stadiul de diptoten al profazei rămân în acest stadiu și după naștere. La pubertate, unii dintre ei capătă un semnal pentru ca ovocita să-și reia meioza și să se transforme în ovulă. Reluarea meiozei ovocitelor din foliculii primari are loc doar la pubertate, dar numai pentru câțiva dintre ei. Numai câțiva sunt recrutați pentru a deveni ovocite, restul rămân în această stare (sau devin atrezici) toată viața femelei (faza meiotică a ovogenezei se reia la pubertate).

La pubertate câțiva foliculi primari sunt recrutați, în fiecare ciclu ovarian și „forțați” de către hormonul hipofizar FSH să se transforme, mai întâi, în foliculi secundari sau antrali sau de Graff și apoi în foliculi preovulatorii care ajung repede la ovulație.

Ovocita se dezvoltă în continuare paralel cu dezvoltarea foliculilor ovarieni în care este încorporată.

Creșterea și dezvoltarea foliculilor

Prin cercetări s-a dovedit că foliculul primar, pentru a ajunge la stadiul de folicul secundar sau antral, când animalul ajunge la pubertate. El va parcurge o mulțime de modificări. Are loc o creștere spectaculoasă în dimensiune de la 20 de microni, la 200-400 de microni. În această fază și ovocita primară crește în dimensiune, (fără însă să se reia meioza), atingând în final un diametru de 60-120 microni. Deși în această fază procesul de meioză nu este reluat, pe unele gene din genomul ovocitei primare, începe transcripția informației pe molecule de ARN ribosomal și ARN-mesager, care apoi sunt transferate în citoplasmă. Pe baza lor se sintetizează, apoi, o mulțime de tipuri de proteine. Acestea sunt folosite, mai târziu, de către ovocită în procesul de maturare precum și pentru dezvoltarea embrionului în primele faze de după fecundare. În această perioadă ovocita atinge faza finală a dimensiunii sale. La începutul fazei de creștere a ovocitei primare ea sintetizează și secretă o cantitate mare de glicoproteine care se condensează în jurul membranei viteline (citoplasmatică) formînd o anvelopă translucidă numită zona pelucidă (foto 16 și 17). Ea este aceea care separă ovocita de stratul de celule ale granuloasei care o înconjoară.

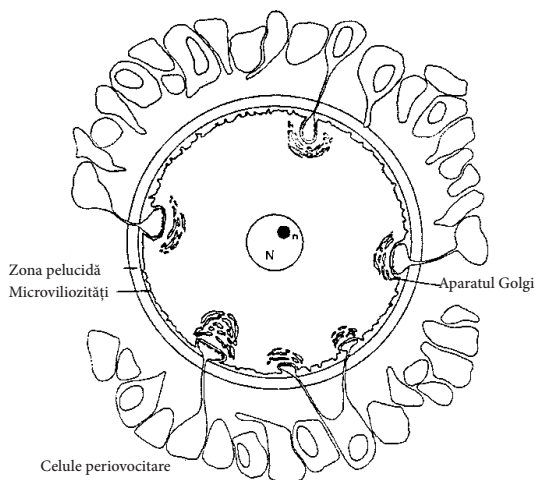


Foto 16. Relația dintre ovocită și celulele granuloase. Se pot observa cum celulele granuloase pătrund în citoplasma ovocitei și contribuie la sinteza și acumularea aici de substanțe noi

Vintilă I., Păcălă N. și col au demonstrat că pe tot parcursul dezvoltării foliculului, celulele granuloase rămân în contact direct cu ovocita, prin intermediul unor prelungiri citoplasmaticе (procese citoplasmaticе) care străbat anelopa translucidă și ajung în vitelus (citoplasmă) formînd așa numitele gap-juncții (Foto.16.). Prin intermediul lor celulele granuloase sintetizează și apoi „pompează” în citoplasma ovocitei molecule cu greutate moleculară mică, aminoacizi și nucleotide pe care ovocita le va folosi, apoi (chiar și pe timpul clivării viitorului embrioni) ca substrat de biosinteză pentru formarea de molecule proprii. Celulele granuloase constituie principala sursă nutrițională a ovocitei. Ele o „alimentează” cu molecule prin intermediul unei adevărate rețele nutriționale avasculară, formată din gape-juncții. Este necesar să se realizeze o astfel de construcție deoarece vasele sangvine ajung la folicul numai pînă în membrana Slavianschi (membrana proprie) unde își „varsă” nutrienții. De aici aceștia ajung în ovocită, via, celulele granuloase.

Tot în faza preantrală de creștere a foliculului ovarian are loc și o proliferare și o condensare de celule stromale deasupra membranei Slavianschi, formînd teaca internă (foto. 16). Pe parcursul proliferării celulelor din tea-

ca internă are loc și o diferențiere a acestora formînd două feluri de celule dispuse în straturi suprapuse. La interior se diferențiază celule glandulare cu proprietăți endocrine (sintetizează estrogeni), iar la exterior un strat de celule ale unei capsule fibroase. Stratul de celule glandulare formează teaca internă a foliculului, iar cel care se dispune la exterior formează teaca externă a foliculului.

Odată cu pubertatea celulele granuloasei, continuă să prolifereze făcînd foliculul preantral să crească în dimensiune. În același timp celulele granuloasei secretă un lichid numit lichid folicular, de natură mucopolizaharidică. La acesta se adaugă și lichid transudat din serul sangvin formînd o cavitate numită antrul folicular, plină cu lichid folicular. Odată cu formarea antrului, foliculul ovarian intră într-o nouă fază de dezvoltare numită faza antrală. Un astfel de folicul ia denumirea de folicul antral. Creșterea lui în dimensiune are loc acum, mai ales, pe calea acumulării de lichid folicular, ajutat și de proliferarea, în continuare, a celulelor granuloasei.

Datorită faptului că în antrul foliculului lichidul se acumulează continuu, ovocita ajunge să „plutească” în lichid. Ea rămîne totuși suspendată de peretele foliculului prin intermediul unui cordon de celule, înconjurată de mai multe staruri de celule ale granuloasei numite acum, cumulus ooforus (cumulus proliger).

Ajuns în acest stadiu de dezvoltare foliculul antral intră în faza preovulatorie, cînd printr-o serie de transformări încearcă să expulzeze ovocita (să ovuleze).

Creșterea foliculului aflat în stadiul preantral este inițiată și condusă fără control hormonal. Procesul este condus doar pînă la un punct de către citokine cu activitate intraovariană paracrină, așa cum este, factorul de creștere epidermal (epidermul growth factor - EGF). Începînd cu intrarea foliculului în faza de folicul antral el are nevoie de un sprijin extraovarian din partea hipofizei. Aceasta îi susține dezvoltarea, de mai departe, prin intermediul hormonilor FSH și LH pe care-i sintetizează. Ei însă nu sprijină, deopotrivă, toate componentele foliculului. FSH-ul țintește granuloasa pentru că numai pe suprafața celulelor granuloasei s-au găsit, în această fază, receptori pentru FSH. Ținta LH-ului este teaca internă pentru că receptori pentru hormonul hipofizar LH nu s-au găsit decît pe membrana celulelor tecii interne.

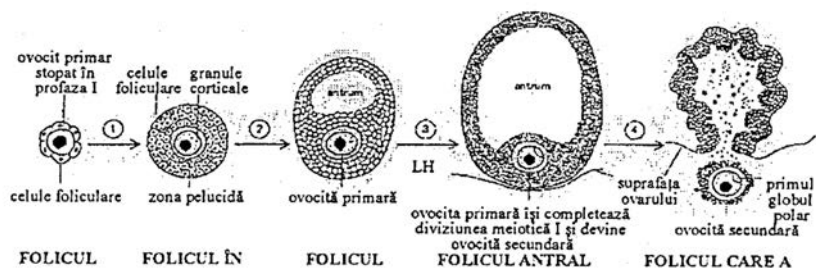


Foto 17. Stadiile de dezvoltare ale foliculului și ovocitei de mamifere (după Alberts și col.)

Celulele tecii interne sub influența LH-ului sunt capabile să convertească colesterolul și acetatul în hormoni androgeni.

Celulele granuloasei dimpotrivă sunt capabile să transforme sub influența FSH-ului prin aromatizare, androgenii în hormoni estrogeni așa cum sunt: - estradiolul și estrona.

În prezent se cunoaște că întreaga cantitate de estrogeni din lichidul folicular provine din activitatea celulelor granuloasei, prin cooperarea, în sinteză, a celor două tipuri de celule (tecale și granulare).

Este demonstrat că întregul proces de creștere și dezvoltare a foliculului antral și preovulatoriu este condus de către hormonii steroizi produși de către teaca internă și granuloasă, sub „presiunea” hormonilor LH și FSH. Estrogenii, sintetizați de către celulele foliculului și deversați, aparțin lichidul folicular și de aici în sânge, au două feluri de activități. Una intrafoliculară și alta în dezvoltarea altor procese metabolice.

Lichidul folicular este bogat în hormoni estrogeni, progestagene și androgeni. Fiecare dintre ei pot fi convertiți unul în celălalt. Astfel, androgenii produși de celulele tecii interne servesc ca substrat pentru conversia lor în estrogeni precum și pentru stimularea activității enzimei aromatoza. Estrogenii la rândul lor pot să se lege de receptorii celulelor granuloasei care sunt stimulate să prolifereze și în același timp să sintetizeze și mai mulți receptori pentru estrogeni. Prin aceasta celulele granuloasei devin mature și pot să realizeze conversia androgenilor în estrogeni. Ele devin un adevărat sistem de feedback pozitiv pentru stimularea puternică a producerii și eliberării de estrogeni în circulație. Prin urmare, expansiunea fo-

liculilor antrali culminează cu un vîrf maxim al concentrației estrogenilor în circulație, dar și în urină. De aici rezultă următoarea idee: prin dozarea estrogenilor din urină noi vom putea cunoaște, cu mare probabilitate, momentul cînd majoritatea foliculilor antrali devin maturi pe ovar (Vintilă I.).

Activitatea estrogenilor și androgenilor în afara foliculului

Steroizii acționează nu numai pe cale paracrină în interiorul și în afara foliculului. Ei stimulează și activitatea unui mare număr de citokine în cooperare cu gonadotropinele. Astfel, activina, o citokină supresează sinteza de androgeni de către celulele tecii interne. În același timp ea stimulează și celulele granuloasei să-și dezvolte activitatea de aromatizare a androgenilor pentru a-i transforma în estrogeni.

Inhibina (citokină) dimpotrivă stimulează producția de androgeni a celulelor tecale și moderează activitatea de aromatizare a celulelor granuloasei. Așadar inhibina și activina, în foliculii antrali, devin un factor de eliberare pentru producția de androgeni și conversia acestora în estrogeni evitînd, astfel, excesul prematur de androgeni.

În concluzie se poate spune că estrogenii în cooperare cu FSH au un rol crucial în creșterea și expandarea foliculilor antrali. Estrogenii împreună cu hormoni foliculo-stimulatori, stimulează apariția de situsuri cu LH, legat pe suprafața externă a celulelor granuloasei. S-a constatat că aceste situsuri sunt cruciale pentru intrarea foliculului antral în faza preovulatorie.

Din literatura de specialitate se cunoaște că în cazul în care foliculii preantrali nu sunt expuși la un nivel corespunzător de FSH și LH ei vor degenera și devin atrezici. De asemenea s-a dovedit că primul pick de eliberare de LH determină sinteza pe suprafața celulelor granuloasei a receptorilor de membrană pentru LH. Dacă pickul de creștere a concentrației de LH în sînge are loc în momentul în care atît celulele tecii interne cît și cele ale granuloasei pot să lege LH-ul, în mod sigur, foliculul antral va intra în faza preovulatorie. În caz contrar el va deveni atretic. Așadar sporirea concentrației de LH în sînge (pickul de LH) are două efecte și anume: a) asupra celulelor foliculului antral, facîndu-l să intre în faza preovulatorie și b) asupra ovocitei, expulzînd-o din folicul odată cu deschiderea acestuia în timpul ovulației.

Creșterea foliculului în faza preovulatorie

Cercetările efectuate în acest domeniu au stabilit că după ce a avut loc ovulația unui folicul în locul său se dezvoltă corpul galben care secretă progesteron. Din acest moment și pînă la ovulația următoare, din cauză că nivelul concentrației de progesteron în sînge este mare, cantitatea de FSH eliberat de hipofiză ajunge la un nivel foarte jos, dar într-o concentrație suficientă pentru a recruta în dezvoltare noi foliculi antrali.

Dacă fecundația și ca urmare gestația a avut loc, după 14 zile corpul galben regresează și concentrația de progesteron în sînge scade dramatic. Foliculii antrali, din această cauză, intră în faza preovulatorie susținută de hormonul FSH. În faza preovulatorie (cca 30-35 ore înaintea apariției căldurilor) hipofiză eliberează o mare cantitate de LH. Acum în sînge apare o concentrație mare de LH, numit valul sau pickul de LH. El este cel care determină foliculul antral să intre și apoi să parcurgă faza preovulatorie.

Pe parcursul a 3-12 ore de la apariția pickului de LH în interiorul ovocitei primare, care se găsește în interiorul foliculului, au loc schimbări dramatice. Acestea sunt membrana nucleară (de fapt a veziculei germinative care conține cromosomii semispiralizați, blocați în profaza meiozei) se rupe și meioza se reia din stadiul de profază blocat încă din stadiul embrionar. De acum încolo, cromosomii omologi, împerecheați prin sinapsis, se așează pe filamentele fusului acromatic formînd metafaza, într-un loc excentric al ovocitului. De aici încolo filamentele fusului acromatic contractîndu-se, în sens opus polilor celulei, fac ca cei doi cromosomi omologi din fiecare bivalent să migreze unul spre „polul nord” al fusului acromatic (mitotic), iar celălalt spre polul sud” al acestuia. La sfîrșitul anafazei, jumătate din setul de cromosomi ai ovocitei primare se găsește la „polul nord” al celulei și cealaltă jumătate la „polul sud” al acesteia. La sfîrșitul telofazei, celula se clivează, rezultînd două celule. Acestea vor conține un număr de cromosomi redus la jumătate, (număr haploid de cromosomi). Procesul descris mai sus mai are încă o caracteristică și anume: citoplasma ovocitei primare se distribuie inegal în cele două celule haploide care rezultă. Într-una intră majoritatea acesteia, păstrînd aproape toată cantitatea de nutrienți din vitelus. Ea formează ovocita secundară. În cealaltă celulă intră, alături de nucleul haploid, numai o mică parte din citoplasmă (vitelus). Din această cauză o astfel de celulă a fost numită globul polar (primul globul polar).

Globulul polar este expulzat de către ovocita primară în spațiul perivitelin cuprins între membrana vitelină și zona pelucidă (foto 18).

Imediat după formarea ovocitei secundare haploide și a primului globular polar, cromosomii intră în cea de-a doua diviziune meiotică, care este de fapt de tip mitotic, formând din microtubuli, fusul de diviziune. Cromosomii se așează în placa ecuatorială și ajung pînă în stadiul de metafază. În acest moment, cea de-a doua diviziune meiotică a ovocitei secundare (și chiar a primului globular polar) este blocată din nou în metafază. În această stare ovocita secundară haploidă este expulzată din foliculul de Graff, prin procesul de ovulație. Se pare că „vinovat” pentru blocarea celei de a doua diviziune meiotică este un complex de proteine numit factor citostatic. Unul din componentele acestui complex este o proteină specifică numită cmos.

Numai după expulzarea ovocitei secundare din foliculul ovarian în lumenul oviductului în urma maturizării citoplasmei și a pătrunderii spermatozoidului în interiorul acesteia, se reia cea de-a doua diviziune meiotică și se desăvîrșește. Rezultatul va fi formarea, din nou, a două celule inegale ca mărime și funcție. Una dintre ele se va numi ovulă sau ovotidă, care conține majoritatea citoplasmei și un nucleu haploid. (un pronucleu). Cealaltă va fi o celulă mică, cu foarte puțină citoplasmă și cu nucleu haploid, care se numește al doilea globular polar.

S-a dovedit, prin cercetări, că genomul ovocitei, ca și al spermatozoidului este blocat și în consecință nu mai are loc transcrierea și translația informației genetice de la nivelul genelor. Din această cauză ovocita pe timpul maturării, trebuie să înmagazineze nu numai substanțe de rezervă (aminoacizi, proteine, acizi grași și glucide), ci și ARN-mesager care să sintetizeze proteinele necesare desfășurării proceselor metabolice care se desfășoară în primele blastomere ale viitorului embrion. ARN-ul mesager care se stochează acum în citoplasma ovocitei trebuie să capete proprietăți speciale care să-i confere “putere de viață” neobișnuit de lungă (supraviețuirea ARN-m în celulele somatice nu este mai lungă de câteva minute la procariote și de câteva ore la eucariote).

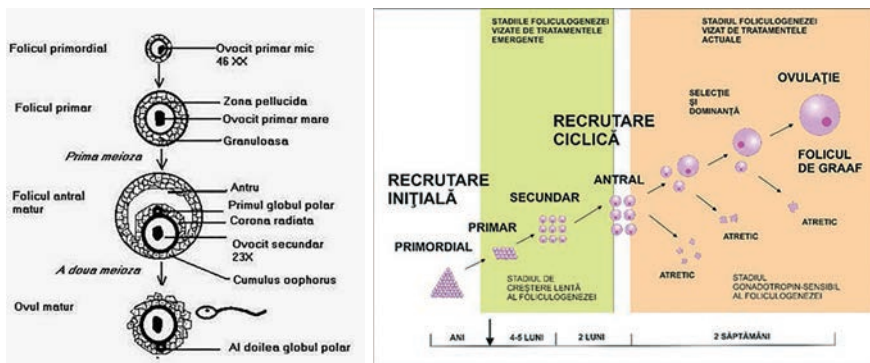


Foto 18. Fazele maturizării ovocitei

Pentru a putea avea loc fecundația este necesar ca și citoplasma ovocitei să se matureze.

Cercetările speciale au dovedit că celulele granulare, care se găsesc așezate în intimitatea ovocitei și alcătuiesc așa numita coroana radiată, sunt conectate organic, cu ovocita. Mai mult decât atât, fiecare din ele emite câte un fel de “picioruș citoplasmatic” care străbate zona pelucidă și se termină printr-un buton bulbos în interiorul citoplasmei ovocitei (Foto. 18.). Prin intermediul acestor celule granulare se „pompează”, în interiorul citoplasmei ovocitare, proteine, aminoacizi, glucide, ARN-mesager și ARN-solubil (produse ale sintezei proprii), îmbogățește depozitul propriu. Are loc și un „ajutor” de sinteză de substanțe noi din partea celulelor granulare, dacă luăm în considerare că volumul unei ovocite este deosebit de mare. Aparatul ei de sinteză (ribosomii, genele) nu este, însă cu nimic mai mare decât cel pe care-l posedă oricare celulă somatică, deși ea este de zeci de ori mai mare decât acestea. Prin urmare pentru a se înfăptui „umplerea” depozitului vitelin al ovocitei este nevoie de celule ajutătoare care să colaboreze pentru sintetizarea de substanțe noi, și care să fie depozitate apoi în citoplasmă ovocitei.

Din momentul în care ovocita încetează să mai crească în dimensiune (înaintea ovulației) toate sintezele din citoplasmă aproape încetează. În ovocita aflată în momentul ovulației, 75%, din totalul ribosomilor sunt neangajați în sintezele de proteine. Se pare că și ribosomii sunt stocați în citoplasmă ovocitei pentru a putea fi folosiți mai târziu, pe parcursul embriogenezei timpurii, pentru sinteza proteinelor.

Celulele iau o anumită formă și pot efectua unele mișcări datorită scheletului lor molecular denumit citoschelet. El este format din actină, tubulină, centrii de microtubuli, lamele nucleare, keratină, substanțe care îndeplinesc roluri diferite în celule. Cercetările au dovedit că pe parcursul creșterii și maturării ovocitelor aceste substanțe iau diferite poziții în spațiul intercelular și formează o diversitate mare de structuri speciale, cu rol deosebit în funcționarea celulei în interfază sau pe parcursul ciclului celular (Lunca N.).

Ovocita secundară în urma ovulației este expulzată din foliculul preovulator împreună cu straturile de celulele cumulare, care o înconjoară (cumulus prolige). Din această cauză o astfel de formațiune poartă denumirea de complex ovoci cumulus (COC). Acum o mare parte dintre procesele citoplasmatică (piciorușe citoplasmatică) ale celulelor cumulusului, se retrag din viteliusul ovocitei eliberându-se din granuloasă. În acest timp aparatul Golgi al ovocitei sintetizează niște granule asemănătoare lisosomilor celulari, care migrează spre suprafața ovocitei, ocupând poziție subcorticală. De aceea ele se numesc și granule corticale. Activitatea și sinteza a proteinelor în citoplasmă ovocitei continuă și chiar au loc sinteze de tipuri noi de proteine, mai ales, pe seama ARN-m transcris de pe gene încă din faza când se găseau în foliculul antral. O astfel de activitate pregătește ovocita pentru a se maturiza și a fi capabilă să înfăptuiască fecundația.

Mecanisme de sinteză specifice ovocitelor

Deoarece ovocitele conțin de sute de ori mai multe substanțe decât cele somatice, Miclea V.și col presupun că acestea dispun de mecanisme speciale de sinteză, ele sunt diferite de cele pe care le au celulele somatice. Care sunt mecanismele speciale de sinteză, precum și sursele de aprovizionare cu substanțe ale ovocitelor în dezvoltare:

- 1) Durata foarte lungă a completării meiozei de la inițierea ei în embriogeneză și pînă la sfîrșitul maturării la pubertate și după pubertate.
- 2) Avînd o durată lungă de stare diploidă ele sintetizează mai mult ARN-m și ribozomal decât o pot face celulele somatice în faza G și S a ciclului celular. Unele ovocite acumulează multe copii de ADN, ceea ce duce la amplificarea sintezelor de substanțe. Unii amfibieni în cursul embriogenezei își multiplică de 1-2 milioane de ori replicatele de gene responsabile pentru sinteza ARN-ribozomal, ceea ce atrage după sine o mare

cantitate de ribosomi în citoplasmă și în consecință o sporire de tot atâtea ori a sintezelor de substanțe.

3) Ca parte din procesul de creștere a ovocitei este dependent de activitatea de sinteză a altor celule accesorii acestora (celulele de susținere sau nutritive, celulele foliculare). Celulele de susținere “pompează” în citoplasmă ovocitei prin intermediul piciorușelor citoplasmatică, produsele lor de sinteză: ribosomi care intensifică sintezele, ARN- mesager, proteine, îmbogățind prin aceasta conținutul ovocitei.

La unele specii de animale celulele de susținere sunt derivate din aceeași ovogonie care a dat naștere ovocitei cu care ele sunt asociate. De exemplu la embrionul de *Drosophila* o ovogonie suferă patru diviziuni mitotice din care se formează 16 celule. Una din aceste celule devine ovocită pe când celelalte vor deveni celule de susținere și rămân atașate prin prelungiri citoplasmatică de ovocită formînd o continuitate (poduri) între ele.

Dacă ținem seama că în celulele de susținere replicația ADN are loc repetat și fără ca celulele să se dividă, ajungem la concluzia că aceste celule au o încărcătură de ADN echivalentă cu sute sau mii de genoame existente în celulele somatice obișnuite. Un astfel de fenomen ne edifică asupra sursei de unde provine dublarea rapidă a masei ovocitelor într-un timp atît de scurt, cît are la dispoziție o ovocită în dezvoltarea ei.

Celulele foliculare sunt o altă sursă care ajută la acumularea rapidă de substanțe de rezervă în citoplasma ovocitelor. Ele sunt așezate sub forma unui strat epitelial în jurul ovocitei și sunt conectate la ovocite prin prelungiri citoplasmatică care ajung adînc în citoplasma acesteia.

Ovocitele mai pot fi aprovizionate cu substanțe nutritive și de către celule care se găsesc în afara ovocitului. De exemplu în ovula de găină, amfibieni și insecte, proteinele care se găsesc în vitelus sunt sintetizate de celulele ficatului (sau echivalentul lor) pe care le secretă în torentul sanguin.

Dacă o ovocită din foliculul prematur este eliberată artificial înainte de completarea tuturor evenimentelor care se soldează cu maturarea ei, atunci ea în mod sigur, va avea o fecunditate foarte scăzută. Aceasta constituie dovada dependenței maturării ovocitei de celulele granuloase. Din această cauză cei care se ocupă de fertilizare “in vitro” un asemenea fenomen nu poate să fie înfăptuit numai după ce ovocitele care sunt scoase chirurgical din foliculi antrali sunt mai întîi cultivate “in vitro” pentru a se maturiza

și numai după aceia să fie puse în contact cu spermatozoizii pentru a fi fecundate (Ventilă I.).

S-a dovedit că LH contribuie la provocarea maturizării ovocitei primare. El însă nu poate să se lege direct de ovocite, pentru a inhiba molecula de cAMP care le ține blocate. Acest lucru poate, însă să fie înfăptuit prin intermediul celulelor granuloase care participă la medierea unei astfel de acțiuni. Din această cauză ovocitele scoase din foliculii antrali și puse la maturat “in vitro”, trebuie să posede încă celule cumulare în jurul lor pentru a putea să se maturizeze complet.

Durata fazelor de creștere a foliculilor ovarieni este diferită în funcție de specia animalului și este prezentată în tabelul 3.

Tabelul 3.

Durata fazelor de dezvoltare a foliculilor ovarieni (ore)

Specia	Faza preantrală (zile)	Faza antrală (ore)	Faza preovulatorie (ore)	Faza luteală (zile)
Oaie	-	4-5	22	14-15
Vaca	-	10	40	18-19
Porc	-	10	41	15-17
Cal	-	10	40	15-16

După Gonsan și Everit, sunt precizate duratele fazelor de creștere a foliculului preantral, antral și preovulatoriu la diferite specii de animal (tabel 3). Se poate observa că faza preantrală de dezvoltare a foliculului este cea mai lungă, iar faza preovulatorie este cea mai scurtă.

S-a dovedit că hormonii foliculostimulatori FSH, LH, estrogenii și progesteronul au un rol fundamental în pregătirea foliculilor ovarieni și aducerea lor pînă la momentul ovulației. Ei conduc și reglează fazele ciclului ovarian (călduri, gestație, recrutarea și creșterea foliculilor ovarieni, ovulație).

Cu ajutorul ultrasonografului s-a putut stabili că pe ovar, în perioada dintre călduri, la vacă, dar și la alte mamifere, au loc apariții și dispariții de foliculi. Imediat după ce a avut loc ovulația și s-a instalat corpul galben are loc prima recrutare și „forțare” să intre în dezvoltare primul val de foliculi. Pe ovarul unor indivizi au loc recrutarea a două sau trei valuri de foliculi.

Spre sfîrșitul fazei luteale a ciclului ovarian are loc selecția foliculului destinat să ajungă la maturitate și să producă ovulația. Acesta poartă denumirea de folicul dominant. El are proprietatea să oprească dezvoltarea de mai departe a restului de foliculi care devin în acest fel atrezici.

La vacă într-un ciclu ovarian, are loc recrutarea a 2-3 de valuri de foliculi. Recrutarea primului val de folicul are loc în primele zile de după ovulație, al doilea val are loc la 11-12 zile de la călduri, iar al treilea val este recrutat în cea de-a 15-17-a zi de la începutul ovulației (fig.12.). Un astfel de fenomen sugerează că de fapt femelele monotocice au tendință de a deveni politocice. Numai selecția unui singur folicul dominant le transformă pe acestea în femele monotocice. El are capacitatea să domine și deci să controleze dezvoltarea de mai departe a celorlalți foliculi congeneri. „Interesul” său este să-i reprezeze pe ceilalți și să-i introducă într-un proces ireversibil de dezorganizare numit atrezie foliculară.

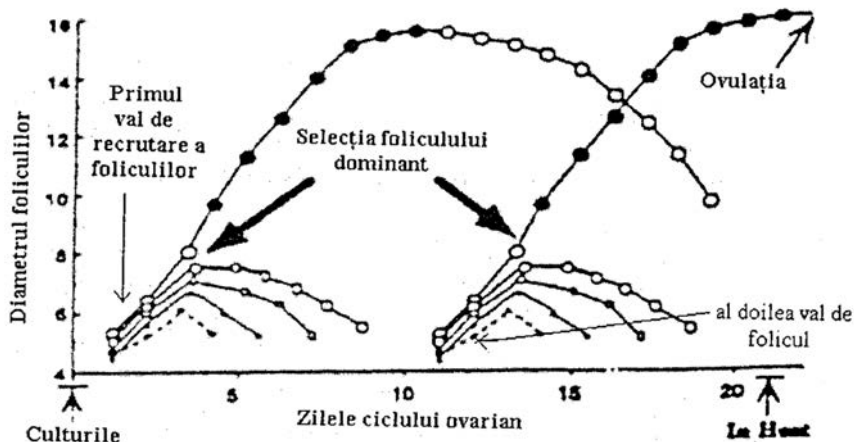


Figura 12. Recrutarea foliculilor ovarieni (după E. Robertson)

Concluzia este că atrezia foliculilor care nu au fost aleși să devină ovulatori este determinată de scăderea concentrației de FSH de la nivelul acestora. Foliculul dominant se poate dezvolta în continuare chiar la concentrații scăzute de FSH. Rezultă de aici că, un adaos parenteral de FSH ar împiedica selecția foliculului dominant și intrarea în dezorganizare a foliculilor neselectați. În consecință un adaos de FSH în ziua 9-14 din

momentul în care a avut loc ovulația, determină continuarea dezvoltării tuturor foliculilor recrutați și aducerea lor la stadiul de foliculi de Graaf care conțin ovocite mature capabile de fecundație. Pe un astfel de fenomen se bazează tratamentele pentru inducerea superovulației la femelele donatoare de embrioni.

Foliculul care a fost recrutat și a plecat în dezvoltare este capabil să secrete hormoni ca estradiolul și estrona. Ei sunt cei care fac să crească sensibilitatea foliculului la hormonii foliculostimulatori (FSH și LH). Cercetările au demonstrat că, în prima etapă, estrogenii singuri, sau poate că împreună cu FSH, induc sinteza receptorilor celulelor foliculare pentru FSH. Aceasta are ca urmare sporirea legăturilor pe care le poate face FSH cu celulele constituente ale foliculului. Ei stimulează și sinteza receptorilor celulari din teaca internă a foliculului pentru cel de al doilea hormon foliculostimulator numit LH iar androgenii inhibă sinteza receptorilor celulari din foliculi, atât pentru FSH cât și pentru LH.

Literatura de specialitate arată că foliculul dominant este selectat de către nivelul concentrației FSH-ului în circulația sangvină. Afirmția este susținută mai ales de faptul că lichidul folicular extras din foliculul dominant conține o foarte mare concentrație de FSH și estradiol. La rândul său estradiolul din circulație inhibă secreția de FSH prin intermediul unui mecanism de feed-back negativ.

Celulele granuloasei foliculilor mici, deși nerecrutați pentru dezvoltare nu pot sesiza concentrația de FSH și în consecință ei nu pot fi stimulați să intre în dezvoltare prin adaos de FSH exogen. Din această cauză, ei nu sunt capabili să aromatizeze hormonii androgeni în estradiol. Acest fapt are ca urmare apariția unei concentrații foarte mari de androgeni în circulație care sunt în stare să determine atrezia foliculilor mici.

Unii cercetători susțin că pe ovare la un moment dat apare o proteină secretată de folicul dominant capabilă să inhibe acțiunea FSH-ului precum și activitatea de aromatizare a androgenilor în estradiol, care ar putea să susțină dezvoltarea foliculului în această etapă. În acest fel foliculii pot fi făcuți să fie mai puțin sensibili la propriul lor inhibitor, din cauză că foliculul dominant secretă acest inhibitor al aromatizării. El poate influența reducerea nivelului de estrogeni în foliculii mici și din această cauză să intre în atrezie.

Rezultă că un folicul care este capabil să lege FSH și LH în cantități

potrivite și în secvențe corecte, va produce o mare cantitate de estrogeni intrafoliculari care vor determina maturarea ovocitei și producerea ovulației. Pe de altă parte un folicul incapabil de legarea unei cantități suficiente de FSH va sintetiza, mai ales, androgenii, și în acest fel va fi supus la atrezie.

Cele două tipuri de metaboliți ai testosteronului, așa cum sunt: estrogenul și 5- α -androgenul, pot exercita acțiuni diferite și diametral opuse asupra foliculilor. Estrogenii conduc ovocitele spre ovulație, iar androgenii conduc foliculii spre degradare și atrezie.

În faza mijlocie și târzie a dezvoltării foliculilor, apariția estrogenilor în circulație marchează începutul fazei mijlocii a dezvoltării foliculilor. Bencsik I. și col. această fază o caracterizează, printr-o creștere rapidă a foliculilor, concomitent cu sporirea nivelului estrogenilor și scăderea relativă a nivelului de FSH, LH și a progesteronului. În prezent se știe că primul puseu semnificativ a estrogenilor în circulație, are loc aproximativ la 82 ore înaintea declanșării ovulației. În acest moment foliculul are o dimensiune aproape 10 mm.

Primul puseu de sporire a nivelului LH în sângele circulant are loc la aproximativ 32 ore înaintea momentului ovulației. El marchează începerea fazei preovulatorii a ciclului ovarian. În această fază are loc și apariția picului de estrogeni și LH. De asemenea în cursul acestei perioade a ciclului ovarian s-a observat și o sporire semnificativă a nivelului progesteronului.

Estrogenii și progesteronul luați împreună au rol de feed-back pozitiv asupra hipofizei obligînd-o să sintetizeze LH. Nivelul progesteronului în sânge începe să crească la scurt timp înaintea apariției picului de LH. Se presupune că progesteronul are acțiune sinergică cu estrogenii, facilitînd sinteza de LH. În acest timp media diametrului foliculului atinge cca. 21 de mm, cînd se declanșează ovulația.

Înainte de ovulație odată cu creșterea foliculilor și intrarea lor în faza preovulatorie, au loc o mulțime de evenimente dramatice, nu numai în modificarea morfologică a acestora ci și în activitatea endocrină. Acestea sunt următoarele (Miclea V. și col):

a) Cu două ore înainte de apariția valului (picului) de LH producția de estrogeni și androgeni crește, pentru o scurtă perioadă de timp, după care urmează o perioadă de declin al sintezei acestora. Creșterea producției de estrogeni și androgeni foliculari coincide cu schimbări semnificative care au loc în teaca internă înainte de apariția picului de LH precum

și cu schimbări marcante în granuloasa foliculului, după câteva ore de la apariția valului de LH.

b) Înainte de ovulație celulele tecii interne nu se mai convertesc în estrogeni, hormonii androgeni sintetizați de către celulele granuloasei. Ele în schimb, sintetizează acum progesteron. Sinteza este susținută de către LH, prin intermediul a noii achiziții de receptori. În același timp celulele granuloasei pierd capacitatea de a lega FSH.

La sfârșitul fazei de creștere preovulatorie a foliculului are loc o rapidă expansiune a cantității de lichid folicular urmată de proliferarea foliculului pe suprafața ovarului, dar și un regres al celulelor tecii interne și a granuloasei. În acest stadiu ovocita și cu o parte din celulele granuloasei, care formează coroana radiată, sunt suspendate în lichid și ancorate de peretele foliculului, numai de către un cordon de celule ale granuloasei (fig.12.).

Foliculul ovarian preovulatoriu devine turgescenț și proieminează pe suprafața ovarului. Peretele său se subțiază la maximum. În acest stadiu o protează, numită activatorul de plasminogen, activează collagenaza secretată de către celulele granuloasei, care împreună cu alte două enzime, una numită renina și alta cu activitate asemănătoare tripsinei, vor digera fibrele de collagen și alte formațiuni ale peretelui foliculului din teaca externă, creînd o breșă. Prin breșa formată se va scurge în pavilionul oviductului lichidul folicular, antrenînd cu el și ovocita. Ea va fi prinsă de către pavilionul oviductului, unde va rămîne în așteptarea spermatozoidului în vederea săvârșirii actului fecundației.

În locul foliculului dehiscent se va dezvolta, în scurt timp, o formațiune glandulară numit corpul galben care secretă hormonul numit progesteron. Rolul său este de-a pregăti mucoasa uterină pentru primirea embrionului și, mai ales, de a menține gestația pe tot parcursul dezvoltării fătului. Progesteronul este antagonistul hormonilor FSH și LH. Din această cauză prezența sa în sângele periferic se opune sintezei și eliberării FSH-ului și LH-ului din hipofiză, în circulația sistemică

Din literatura de specialitate reesă că după ovulație, din componentele foliculare rămase și din cheagul de sânge format, se organizează o nouă structură ovariană cu rol endocrin numită corpul galben sau corpus luteum. El este de formă sferică, avînd, la unele specii, o consistență buretoasă elastică de culoare galbenă, sau cenușiu-roșietică la altele. În timpul diestrului corpul galben produce cantități maxime de progesteron. Dacă în uter

nu există embrioni viabili, după cîteva zile, corpul galben involuează.

Organizarea și evoluția corpului galben parcurge fazele de: organizare, eflorescență și regresie. Faza de organizare debutează imediat după ovulație. Cavitatea foliculară redusă ca mărime, cu un contur neregulat, se umple cu o seriozitate albuminoasă cu aspect sangvinolent, rezultată din lichidul folicular rămas, cheaguri de sînge apărute în urma ruperii vaselor sangvine tecale la momentul ovulației și unele secreții ale granuloasei. În continuare granuloasa se cutează, masa celulară fiind fragmentată de către travee conjunctive, iar stigma se obturează. Apar capilare de neoformație, care pătrund alături de traveele conjunctive, de la nivelul tecii interne, spre interior. Astfel se organizează stroma viitoarei glande. Parenchinul glandelor rezultă din celulele granuloasei și din celulele tecii interne foliculare. Celulele granuloasei și a tecii interne se hipertrofiază, iau o formă poliedrică și se încarcă cu substanțe lipoide, granule albuminoide, pigmenți caroteinoizi și substanțe xantofile. Țesutul luteic rezultat este bogat în substanțe grase (6-12%), colesterol (2-15%), vitamina C (0,5-1g). În urma acestor transformări celulele granuloasei devin celule luteice, alături de care mai există celule mici, care provin din teaca internă, numite celule luteice tecale. Primul tip de celule secretă progesteron în cantități mari, iar al doilea tip are posibilitățile mai reduse de sinteză a progesteronului (Vintilă I).

Faza de eflorescență se caracterizează prin continuarea creșterii celulelor secretorii (luteale), atingerea capacității funcționale maxime și înmulțirea celulelor stromei. În sinteza progesteronului corpul galben pornește de la colesterolul sintetizat de reticulul neted, care după ce trece în mitocondrii își pierde catana laterală transformîndu-se în pregnenolon. Acesta este reluat de reticulul neted și transformat în progesteron de către enzimele glicolitice necesare sintezei steroizilor.

Corpul galben este unul dintre cele mai vascularizate organe. Coloanele de celule luteale sunt separate de cordoane vasculare care îi asigură nutriția, pentru susținerea activității de sinteză a steroizilor. Acesta rămîne eflorescent dacă femela devine gestantă producînd în continuare progesteron, iar femelele negestante corpul galben involuează.

Faza de regresie sau de involuție, la vacă începe după 11-13 zile de activitate și durează 50-60 zile. În această perioadă corpul galben trece prin stadiile de rubrum, nigricans și albicans. Regresia este urmarea unui proces de degenerare grasă. Celulele se vacuolizează citoplasmatic, lizează și apoi

sunt fagocitate de globulele albe. Concomitent cu procesul degenerativ are loc și o proliferare de țesut conjunctiv (Miclea V. și col.).

Schimbările degenerative ale femelelor ce nu au rămas gestante sunt la început microscopice devenind, în continuare, vizibile cu ochiul liber. Celulele luteice își reduc sinteza de steroizi mult mai repede și la un nivel deosebit de drastic comparativ ritmului regresiei morfologice. Corpul galben degenerază concomitent cu reducerea circulației sangvine. Așa cum s-a menționat, degenerarea fizică a corpului galben este mult mai încetată decât degradarea funcțională, pe ovar putându-se remarca și după câteva cicluri sexuale o cicatrice pe locul unde a fost ampalsat corpul galben.

Mecanismele care stau la baza involuției corpului galben sunt în principal coordonate endocrin. Experiențele efectuate la vacă și oaie au arătat că uterul negestant produce la nivelul endometrial prostaglandina $F_2\alpha$, care are un efect luteolitic major. Ca dovadă injectarea acestei prostglandine în artera ovariană sau vena uterină produce, la oaia aflată în diestru, reducerea în câteva ore, a progesteronului sangvin și declanșarea căldurilor. Alături de aceste mecanisme majore mai sunt și altele, secundare, care contribuie la involuția corpului galben, mai frecvent fiind notată acțiunea luteolică a estrogenilor. La unele specii LH-ul în cantități mari poate induce luteoliza. După modul de evoluție Miclea V. deosebește trei forme de corp galben, respectiv: ciclic (de călduri), gestativ și persistent. Corpul galben ciclic (progestativ) se organizează, acționează și regenerează cu fiecare ciclu sexual). Dacă a avut loc fecundația și se instalează gestația, acesta devine gestativ, crește în volum și se menține pînă la parturiție. Înlăturarea corpului galben gestativ în prima jumătate a gestației este urmată de avort.

Pătrunderea spermatozoidului în ovocita are două consecințe fundamentale:

a) activează ovocita și declanșează inițierea celei de-a doua diviziuni de maturare a acesteia care apoi se continuă cu prima replicare a zigotului;

b) punerea laolaltă a celor două seturi haploide de cromosomi provenite de la cei doi părinți și asigurarea moștenirii caracterelor de la părinți la urmași. Procesul de fecundație, la toate mamiferele, are loc în capătul proximal al oviductului, numit ampulă, acolo unde sunt captate ovocitele după eliberarea lor din foliculii de Graaf (foliculi maturi). Pentru ca fecundația ovocitei să se înfăptuiască, cu maximum de probabilitate,

este necesar ca atunci cînd are loc ovulația, spermatozoizii să fi ajuns deja în istmul oviductului unde sunt depozitați și de unde, mai apoi, sunt dirijați progresiv în ampulă pentru a înlîni ovocita matură.

Fecundația

Procesul de fecundație, luat în amănunt, se desfășoară în mai multe etape. Fiecare dintre ele are caracteristicile sale biochimice, biofizice și mecanice. După Vintilă I., acestea sunt următoarele:

- 1) abordarea ovocitei și penetrarea spermatozoidului prin cumulus ooforus;
- 2) interacțiunea care se petrece între spermatozoid și zona pelucidă;
- 3) fuziunea spermatozoidului cu ovocita;
- 4) activarea ovocitei;
- 5) decondensarea nucleului spermatozoidului și a formațiunii pronucleare;
- 6) dezvoltarea pronucleilor masculin și feminin și migrarea pronucleului spermatozoidului la centrul celulei ou sau a zigotului;
- 7) asocierea cromosomilor proveniți de la cei doi gameți parentali pe axa primului clivaj al zigotului.

În figura 19, după Thibout, este dată schema tuturor acestor etape în desfășurarea lor secvențială.

Evenimentele și mecanismele esențiale ale fiecărei din etapele fecundației.

Penetrarea spermatozoizilor prin cumulus ooforus

La majoritatea speciilor de mamifere, ovocita eliberată din foliculul de Graaf, este înconjurată de cîteva straturi de celule cumulare care aderă la zona pelucidă prin intermediul unei matrice acelulare care conține o mare concentrație de acid hialuronic. Pentru ca spermatozoizii să poată aborda zona pelucidă cu scopul de a pătrunde în ovocită, ei trebuie să sufere un proces de maturare pentru a căpăta așa numita putere fecundantă numită și capacitate. Numai spermatozoizii capacitați pot penetra cumulusul ooforus. La bovine stratul de celule cumulare este pierdut la scurt timp după ovulație așa că spermatozoizii, în intenția lor de fecundare, vor interacționa direct cu zona pelucidă.

Interacțiunea spermatozoizilor cu zona pelucidă a ovocitelor

Spermatozoizii nu pot să se lege de zona pelucidă și să o penetreze decât dacă:

- 1) ei sunt recunoscuți de către aceasta, că aparțin aceleiași specii și
- 2) au realizat așa numita reacție a acrozomului.

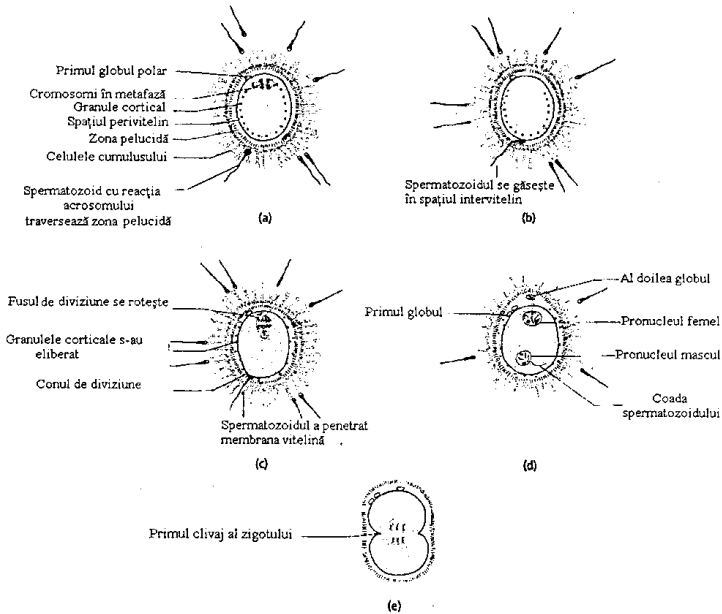


Foto 19. Interacțiunea spermatozoizilor cu zona pelucidă a ovocitelor
a) Spermatozoidul care a suferit reacția acrozomului traversează zona pelucida; b) spermatozoidul ajunge în spațiul intervitelin și abordează membrana viteină; c) spermatozoidul penetrează membrana viteină și apare conul de diviziune. Fusul de diviziune își continuă evoluția și înfăptuiește diviziunea de maturare a ovocitei. d) cei doi pronuclei (femel și mascul) se găsesc în citoplasma ovocitei; e) are loc primul clivaj al zigotului

Zona pelucidă care învește ovocita ca o anvelopă este alcătuită din câteva familii de glicoproteine. Din literatura de specialitate din domeniu se cunoaște că au fost identificate trei tipuri de glicoproteine care sunt implicate în recunoașterea spermatozoizilor fertili ai propriei specii. Acestea se numesc

ZP1 (zona protein) ZP2 și ZP3. Recunoașterea se realizează prin interacția care se stabilește între aceste structuri (substanțe) și niște molecule speciale de pe suprafața spermatozoidului numite receptori spermatici. Enzima galactozil transferaza pare a fi receptorul spermatic care interacționează cu glicoproteina ZP-3 din compoziția zonei pelucide și-i permite spermatozoidului să o penetreze, iar legarea spermatozoidului de proteine ZP-3 ajută în acest proces de către ZP-2, declanșează transformări specifice în interiorul membranei acrozomului. Aceste transformări sunt cunoscute sub denumirea de reacția acrosomului, fără de care spermatozoidul nu poate penetra zona pelucidă.

În structura spermatozoidului, se poate observa că în partea proximală a capului, spermatozoidul posedă un „manșon” compus dintr-o membrană internă și una externă. Membrana acrosomală externă face contact cu membrana plasmatică a capului spermatozoidului. Reacția acrosomală este un proces de exocitoză care survine în urma contactului pe care-l face spermatozoidul cu componentele glicoproteice existente în compoziția zonei pelucide (în special ZP3). În acest moment au loc fuziuni multiple între membrana plasmatică a spermatozoidului și membrana acrosomală externă a acrosomului. Ca urmare ia naștere o formațiune hibridă alcătuită din vezicule membranare și care este apoi eliberată pe suprafața externă a spermatozoidului. În acest stadiu membrana internă a acrosomului interacționează direct cu zona pelucidă atașând spermatozoidul.

În prezent se cunoaște că principalul element care induce și susține fuziunea membranei externe a acrosomului și membrana plasmatică a spermatozoidului (reacția acrosomală) este calciul. Fără mobilizarea lui în citoplasmă o astfel de reacție nu poate avea loc.

După ce reacția acrosomică a avut loc și veziculele membranare au fost eliberate de către contactul spermatozoidului cu suprafața zonei pelucide, spermatozoidul devine atașat de zona pelucidă. Acum el poate traversa zona pelucidă cu structură poroasă și să ajungă în spațiul dintre membrana vitelină și zona pelucidă (spațiul perivitelin). Avansarea lui prin grosimea zonei se face atât prin mișcări ale cozii, care devin hiperactive și în consecință capătă o mare putere de împingere, cât și ajutat de un proces enzimatic cu participarea enzimei hialuronidaza și poate chiar și cu participarea acrozinei, care se eliberează pe timpul reacției acrozomale. Hialuronidaza descompune acidul hialuronic, iar acrozina hidrolizează glicoproteinele

din structura zonei pelucide, facilitând astfel înaintarea spermatozoizilor și ajungerea lor în spațiul intervitelin. Aici, odată ce capul spermatozoidului a luat contact cu membrana plasmatică (vitelină) a ovocitei el devine imobil. În acest moment are loc fuziunea dintre ovocită și spermatozoid. Fenomenul se petrece prin contactul dintre membrana plasmatică a spermatozoidului, care acoperă segmentul ecuatorial al capului acestuia și membrana plasmatică (vitelină) a ovocitei. S-a dovedit că membrana plasmatică a spermatozoidului are capacitate de a fuziona cu membrana plasmatică a ovocitei prin intermediul unei proteine speciale PH30 (posterior head) care se activează numai dacă spermatozoidul a trecut prin reacția acrosomală.

După ce fuziunea a avut loc, membrana plasmatică a spermatozoidului devine parte integrantă a membranei viteline a ovocitei. Aceasta atrage după sine pătrunderea membranei acrosomale interne împreună cu pronucleul și chiar a cozii spermatozoidului, în interiorul vitelusului (citoplasmă) ovocitei.

Activarea ovocitei este o declanșare a unei mulțimi de procese biochimice care se petrec în ovocită și apar în zigot fără de care procesul de fecundație și apoi de clivare a celulei ou (zigotul) nu poate avea loc. Vintilă I. a demonstrat că aceste transformări pot fi grupate în:

- a) procese care se petrec la nivelul membranei viteline;
- b) procese care duc la desăvârșirea celei de a doua diviziuni meiotice și eliberarea celui de al doilea globul polar;
- 3) procese care duc la pregătirea și apoi declanșarea, primului clivaj al embrionului (zigotului).

Fuziunea membranei viteline cu membrana spermatozoidului declanșează eliberarea Ca_2^+ din depozitele intracelulare ale ovocitei și în consecință nivelul intracelular a calciului liber sporește. Această stare are ca urmare o creștere puternică a permeabilității membranei pentru potasiu (K^+) ceea ce duce la o schimbare radicală a potențialului de membrană. Are loc o hiperplazie, în valuri, a membranei viteline de la -2 mV la -40 mV legate mai ales de mobilizarea Ca intracelular.

Ca urmare a acestor transformări, granulele corticalei ovocitei, adiacente membranei viteline, intră într-un proces rapid de transformare. Ele își varsă în spațiul perivitelin, printr-un proces de exocitoză, enzimele hidrolitice pe care le conțin. Acestea la rândul lor, împreună cu hidroliza proteinei ZP3 modifică proprietățile fizico-chimice ale zonei pelucide și ale membranei viteline, ceea ce face ca penetrarea acesteia de către un

alt spermatozoid să devină imposibilă. Are loc în acest fel, un blocaj al spermatozoizilor la acest nivel, făcînd imposibilă înfăptuirea polispermiei (fecundarea ovocitei de către mai mulți spermatozoizi). Din această cauză procesul respectiv se numește blocaj polispermic.

În momentul expulzării din folicul de Graff, ovocita nu este încă pe deplin matură. Maturarea ei începe în interiorul foliculului ovarian aflat în dezvoltare, cînd se produce prima diviziune meiotică cu reducerea la jumătate a numărului de cromosomi și expulzarea primului globul polar. După acest eveniment, atît ovocita cît și globul polar își reiau ciclul celular și rămîn blocate în metafaza celei de-a doua diviziuni meiotice numită și MII (metafaza II). Ovocita se maturizează complet și devine ovulă numai după eliberarea ei din foliculul de Graff, odată cu pătrunderea în interiorul acesteia a spermatozoidului. Acum are loc reluarea meiozei secundare cînd ovocita va parcurge și restul fazelor diviziunii celulare așa cum sunt anafaza și telofaza. Procesul se soldează, în cele din urmă, cu formarea ovocitei mature (ovulă) care conține multă citoplasmă și eliberarea celui de al doilea globul polar care conține, însă, extrem de puțină citoplasmă. O asemenea diviziune asimetrică are loc cu „scopul” de-a reține în ovocită și apoi în ovulă pe lângă ARN-urile mesagere ale multor gene care sunt necesare sintezei continue de proteine noi și a unor structuri și molecule mai apoi necesare dezvoltării zigotului timpuriu pe parcursul perioadei cînd genele lui încă nu au intrat în funcțiune (nu sintetizează proteine noi).

Activarea ovocitei, declanșată odată cu fuziunea și pătrunderea spermatozoidul în ovocită, se manifestă și prin modificarea activității citoscheletului de la nivel cortexului acesteia. Stratul de adină existent în preajma pronucleului, aflat în faza MII, se organizează prin condensare, formînd fusul de diviziune necesar migrării cromatidelor cromosomilor haploizi spre poli celulei și formarea și apoi expulzării celui de al doilea globul polar.

După ce spermatozoidul a pătruns în ovocită și s-a declanșat reluarea meiozei de la faza MII, ca urmare a activării acesteia, procesele de transformare a majorității structurilor din interiorul ovulei se diversifică și se amplifică în mod dramatic. Toate acestea au un singur țel: să se producă combinarea genomului celor doi gameți (ovocită și spermatozoid) și să înceapă prima replicare a zigotului care s-a format. Pentru a atinge un astfel de „obiectiv” este nevoie să se întîmple o mulțime de modificări în nucleul spermatozoidului și al ovulei, precum și în citoplasmă zigotului. Toate

acestea duc la formarea pronucleului masculin (din nucleul spermatozoidului) și feminin (din nucleul ovulei) și organizarea fusului de diviziune pentru a se desfășura prima replicare (diviziune) a zigotului.

Cele mai importante modificări care se petrec acum în celula ou sunt următoarele:

Decondensarea nucleului spermatic

Odată ce spermatozoidul a pătruns în interiorul ovocitei se reia meioza acesteia făcând-o să treacă din faza de metafază în cea de anafază, apoi telofază urmată de formarea ovulei și eliberarea celui de al doilea globul polar. Structurile moleculare din ovocită, care conduc și controlează acest mecanism, au efecte de același sens și asupra stării cromatinei nucleului spermatozoidului. Și în acesta se declanșează procese care duc mai întâi la decondensarea cromatinei, urmată, aproape simultan, de înlăturarea protaminelor care s-au asociat ADN-ului pe parcursul formării spermatozoidului și înlocuirea lor cu histone specifice cromosomilor funcționali. Concomitent în citoplasma ovocitei au loc sinteze de proteine pe baza ADN-urilor mesager (ADN - m), cu durată lungă de viață, depozitate aici pe parcursul formării foliculului ovarian și creșterea ovocitei.

După ce meioza secundară a ajuns la stadiul de telofază, când diviziunea soldată cu formarea ovulei și a globulului polar s-a săvârșit deja, începe și procesul de formare a pronucleilor masculin și feminine (Vintilă I. și col., Păcală N. și col.).

Formarea pronucleilor

Vintilă I. și col. au demonstrat că formarea pronucleilor începe cu recondensarea, aproape simultană, a cromatinei nucleului patern și matern și formarea unor membrane nucleare proprii. Formațiunile care rezultă se numesc pronuclei. Imediat după ce pronucleii masculin și feminin și-au format membranele proprii, cromatidele acestora intră într-un proces de condensare rapidă și inegală.

După câteva ore pronucleul masculin (patern) are dimensiune mai mare decât cel feminin (matern) datorită faptului că, la primul, procesul de decondensare a cromatinei este mai rapid decât la pronucleul feminin.

Procesul de formare a pronucleului patern este condus și controlat

de factori de creștere citoplasmatici specifici, numiți factori de creștere ai pronucleului masculin sau MPGF. Se pare că insuccesul în dezvoltare a zigotilor produși în laborator, din ovocite maturate „in vitro” se datorează, în mare parte, inactivității factorului MPGF care nu se sintetizează sau nu devine activ în condiții de cultură inadecvate.

Sinteza ADN-ului în pronuclei

Linder G.M. și col. au demonstrat că după terminarea diviziunii și expulzarea celui de al doilea globul polar, ovocita împreună cu spermatozoidul care a penetrat-o intră în interfază. Acum are loc în ambii pronuclei, repararea ADN-ului în faza G1 și apoi replicarea acestuia, în faza S, care stă la baza dublării cromatidelor pentru fiecare pereche de cromosomi. Tot acum are loc și o intensificare a sintezelor de peptide și polipeptide pe baza ARN-urilor mesagere depozitate deja în vitelusul ovocitei. Sintezele de noi proteine în fazele de început a embrionului (pînă la 4 celule) nu au loc ca urmare a transcripției genelor proprii ale zigotului, pentru că în această etapă toate genele sunt blocate.

Pe măsură ce transformările se acumulează în citoplasma zigotului începe organizarea de structuri care contribuie la formarea fusului acromatic precum și la migrarea cromatidelor la polii opuși ai celulei, în vederea realizării primei diviziuni de segmentare (clivare) a embrionului sau zigotului. Pentru aceasta, cei doi centrioli materni, dar și paterni, din care iau naștere microtubulii se dispun la polii opuși ai ovocitei și între ei se formează, din adină și microtubuli, filamentele fusului acromatic de care se prind cromosomii prin intermediul centromerului.

Concomitent cei doi pronuclei migrează unui spre altul alipindu-se (nefuzionînd) însă în cele din urmă. Acum are loc ruperea membranei pronucleilor și eliberarea cromosomilor. Ei se prind apoi cu centromerul pe filamentele fusului acromatic al celulei. Materialul genetic al celor doi pronuclei se amestecă formînd așa numita singamie. De aici înainte celula parcurge toate fazele caracteristice diviziunii celulare: metafaza, anafaza, telofaza, diviziune soldată cu clivarea zigotului și formarea primelor două celule denumite blastomere.

9. TEHNOLOGIA REPRODUCERII TAURINELOR

Totalitatea măsurilor cu caracter zootehnic, organizatoric și sanitar veterinar aplicate în scopul perpetuării speciei și obținerea unui număr cât mai mare de produși de la același număr de femele sunt reprezentate de tehnologiile de reproducere (Georgescu Gh.și col).

Tehnologiile de reproducție au influențe directe asupra majorității producțiilor: producția de lapte ca urmare a faptului că indicii normali a funcției de reproducere declanșează lactația. Producția de carne – printr-o reproducție bună se obțin mai mulți produși meniți pentru creștere / îngrișare.

Aurelia Sălăjeanu demonstrează că fecunditatea este procentul vacilor rămase gestante din totalul vacilor însămnțate artificial pe parcursul unui an. Fecunditatea se exprimă prin rata de concepție, respective procentul femelelor gestante după prima însămnțare, din totalul femelelor însămnțate: la vacă fecunditatea normal este mai mare de 86-90%, iar rata concepției (non-return) peste 60%.

Fecunditatea este influențată de:

- neajunsurile organizatorice ca planificarea necorespunzătoare a însămnțărilor artificiale, organizarea neeficientă a depistării femelelor în călduri, însămnțarea defectuasă și calitatea materialului seminal;
- deficiențele tehnice – pregătirea insuficientă și lipsa conștientizării operatorului însămnțător și alegerea greșită a momentului optim de însămnțare;
- deficiențe legate de exploatare, pregătirea necorespunzătoare a femelelor pe durata gestației, furajarea deficitară, condiții necorespunzătoare de igienă la parturiție, deficient de confortul și mișcarea femelelor, lipsa condiției de reproducție (mizerie fiziologică sau condiții de îngrișare);
- deficiente de oridin sanitar – veterinar generate de tratarea cu întârziere sau fără eficacitate a afecțiunilor aparatului genital.

Natalitatea este numărul de produși viabili obținut anual de la 100 de femele, natalitatea este normală (bună) când are valori de peste 85%.

Pentru a obține o natalitate bună sunt necesare reducerea pierderilor prin avort și a mortalităților perinatale. Avorturile nu trebuie să depășească

5% indiferent de cauzele etiologice ca boli infecțioase (bruceloza, leptospiroza etc.), boli parazitare (trichomonoză), cauze nutriționale sau mecanice.

Pierderile prin mortalitate și sacrificări de necesitate trebuie să fie sub 5%; în condiție necorespunzătoare de hrană și întreținere pierderile pot atinge pînă la 25%. Procentul pierderilor din rîndul vițeilor, corelat cu procentul de natalitate, influențează direct efectivul total de taurine (tabelul4).

Tabelul 4

**Numărul de produși viabili obținuți de la 100 de female
(Georgescu Gh.și col.)**

Pierderi (%)	Indicele de natalitate							
	100	95	90	85	80	75	70	65
0	100	95	90	85	80	75	70	65
5	95	90	85	80	75	70	65	60
10	90	85	80	75	70	65	60	55
15	85	80	75	70	65	60	55	50
20	80	75	70	65	60	55	50	45
25	75	70	65	60	55	50	45	40

Reforma tineretului femel – se face o selecție destul de riguroasă în rîndul tineretului femel; reforma pentru tineretul femel poate ajunge la 5-10%.

Reforma femelelor din efectiv poate ajunge pînă la 30% / an.

Vîrsta pubertății tineretului de taurine depinde de precocitatea rasei, sex, zona geografică și condițiile de furajare din perioada de creștere; primul ciclu estral apare înaintea maturității somatice la vițele începînd cu vîrsta de 4-8 luni, dar în mod obișnuit, la vîrsta de 8-17 luni. Pubertatea apare la:

***11-12 luni la rasa Holștein

***8-12 luni la rasa Bălțată cu negru tip moldovenesc

***8-12 luni la rasa Simmental

De regulă, femelele ating pubertatea înaintea masculilor, iar în zonele geografice cu climă temperate pubertatea apare mai tîrziu decît în cele cu climă caldă.

Vîrsta admiterii la reproducție a tineretului taurin depinde de greutatea corporală a rasei și talia dorită în efectivul de vaci adulte; admiterea la reproducție se face atunci cînd tineretul a atins la 70% din greutatea vacii

adulte; admiterea la reproducție la vârste și greutate corporale mai mici poate avea efecte ca stagnarea în creșterea (infantilism) creșterea prevalenței distociilor, obținerea unor viței mici, debili, neviabili și căderea longevității reproductive.

În fermele de vaci obiectivul principal în procesul de reproducție este reprezentat de obținerea unei natalități maxime, respective de a obține un vițel viabil în fiecare an de la fiecare vacă. Pentru îndeplinirea acestui obiectiv se impune o programare judicioasă a activității de reproducție, urmărirea realizării programului propus și exploatarea corectă a reproducătorilor.

Planificarea activității de reproducție se realizează în luna decembrie fiecărui an prin întocmirea planului individual de însămințări și fătări și are valabilitate anul care urmează.

Odată cu planificarea însămințărilor artificiale se procedează la alegerea taurului de la care urmează să se folosească materialul seminal sau practic are loc potrivirea perechilor.

Este cunoscut că la taurine ciclul estral se manifestă pe toată durata anului, planificarea însămințărilor și fătărilor vor avea loc pe toată durata anului. În funcție de caracteristicile și condițiile de exploatare ale fermei se vor practica două sisteme de programare a fătărilor la vaci – însămințări artificiale și fătări eșalonate pe tot parcursul anului și fătări grupate pe un anumit interval de timp. Sistemul de însămințări și fătări eșalonate pe tot parcursul anului urmărește o repartizare uniformă a fătărilor pe tot parcursul anului, astfel încât în fiecare lună a anului să fete 8-10% din efectivul vacilor. În acest caz 80% din structura efectivului de vaci sunt în lactație și 20% în repaus mare. Realizată pe baza stării fiziologice structura optimă are distribuția practică în medie (figura 13):

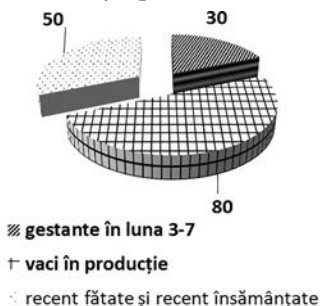


Figura 13. Distribuția categoriilor în sistemul de fătări eșalonate
 50% din vaci recent fătate și însămințate în primele trei luni de la fătare;
 50% din vaci vor fi gestante, iar din acestea 30 % vor fi în repaus mare, la ultimele 2 luni ale gestației.

Avantajele fătărilor eşalonate pe tot parcursul anului sunt: obținerea unor producții constant de lapte, folosirea constantă a forței de muncă în fermă, obținerea unor venituri constant pe tot parcursul anului. Dezavansarea fătărilor eşalonate sunt: necesitatea unor rații bine echilibrate asigurate în fermă printr-o bază furajeră, și respectarea intervenției tehnologice și terapeutice pentru stimularea căldurilor și costul de producție mai ridicat în perioada de iarnă.

Eşalonarea uniformă a fătărilor se realizează prin urmărirea strictă a activităților de reproducție a fiecărei vaci și introducerea în reproducție a vițelilor, putînd fi completată prin stimularea și sincronizarea căldurilor la femele.

Sistemul de fătări sezoniere presupune organizarea fătărilor în sezoane diferite după tacticile practicate – însămintatea artificială a 75-80% din vaci imediat după ieșirea la pășune, începînd cu luna iunie și mai ales în lunile iulie – august și obținerea fătărilor în lunile februarie-aprilie al anului următor sau însămintatea artificială a 75-80% din vaci în lunile decembrie-ianuarie și obținerea fătărilor în lunile august-octombrie.

Gruparea fătărilor favorizează – formarea unor loturi de viței mari și uniforme ca vîrstă și dezvoltarea corporală, reducerea timpului necesar furajării, acțiunilor tehnice și sanitar-veterinar, cum sunt individualizarea, ecornarea, castrarea masculilor, înțarcarea și vaccinarea.

În cazul grupării fătărilor din lunile februarie-aprilie, avantajele sunt: utilizarea masei verzi în prima parte a lactației și reducerea costurilor cu furajarea la rasele de lapte, obținerea și creșterea tineretului taurin alături de vacile mame pe pășune, la rasele de carne, aspect care permite valorificarea tineretului îngrășat la sfîrșitul anului.

Fătările de la sfîrșitul verii și începutul toamnei permit valorificarea la prețuri mai bune a producției de lapte. Sistemul de însămintări și fătări grupate este cel mai eficient sistem în cazul raselor de carne. Pentru a se ușura gruparea fătărilor, se poate recurge la sincronizarea estrului femelelor prin tratamente hormonale prin care se urmărește obținerea vițelilor în sezonul dorit, în acord cu sistemul de creștere practicat, reducerea sau eliminarea timpului necesar depistării estrului femelelor, facilitează diagnosticul gestației și obținerea producției în sezonul cel mai favorabil vînzării.

Programarea introducerii tineretului femel la reproducție

Însămînțarea tineretului femel este condiționată, în principal de vârsta programată a primei fătări. Masa corporală și vârsta recomandată pentru introducerea la reproducție a vițelilor din rasele autorizate în țară sunt la vârsta de 14-16 luni cu masa corporală 365-420 kg pentru rasa Holștein, 16-19 luni și masa corporală de 380-390 pentru rasa Simmental, 16-19 luni și masa corporală 370-380 kg la rasa Bălțată cu negru tip moldovenesc. Practic de cele mai multe ori, introducerea la reproducție depinde de satisfacerea unor niveluri minime privind atingerea pubertății și realizarea a 65-70% din masa corporală caracteristică maturității morfologice. În unele cazuri tineretul taurin femel se admite la reproducție mai timpuriu în cazul existenței unui sistem intensiv de furajare pe durata creșterii și gestației, fapt care permite însămînțarea mai timpurie cu aproximativ două luni față de vârsta menționată mai sus.

Consecințele grăbirii sau întârzierii introducerii la reproducție

Însămînțarea prea timpurie a vițelilor la greutatea mai mici de 65% din masa corporală a rasei la maturitate corporală influențează la diminuarea parametrilor morfometrici la maturitate, diminuarea capacității de ingestie a hranei, creșterea incidenței distociilor și scăderea producției de lapte în primele două lactații (Georgescu Gh.și col).

Amînarea însămînțărilor vițelilor duce la prelungirea perioadei ne-productive, obținerea unui număr mai mic de viței și a unei producții mai reduse de lapte și reducerea fecundității ca urmare a țesutului adipos infiltrat în aparatul reproducător, degenerescența ovarelor, diminuarea producției de lapte pe lactație ca urmare a creșterii producției țesutului adipos din uger.

Se urmărește ca intervalul între două fătări succesive să fie de un an. Pentru ca intervalul dintre fătări să nu depășească un an, avînd în vedere că gestația durează în medie 285 zile, vacile trebuie să rămînă gestante în 80 zile de la fătare. Practic durata repausului de gestație, respect numărul de zile de la fătare la însămînțarea fecundă, condiționează intervalul între fătări, care la rîndul său condiționează natalitatea și nivelul producției de lapte pe lactație și pe viața productivă (Miclea V.și col).

Apariția primului ciclu de călduri, în condiții normale, la aproximativ

21 zile după fătare și dacă vaca nu este însămintată, căldurile se repetă la un interval de 18-21 zile.

Din literatura de specialitate se cunoaște că factorii care influențează apariția primului ciclu estral după fătare sunt:

– nivelul producției de lapte – la vacile cu producții mari primul ciclu estral apare mai târziu și are o intensitate mai redusă decât la cele cu producție mica. Sunt cazuri când vacile nu intră în călduri timp de 2-4 luni, manifestînd o tulburare de reproducție numită anestu după fătare.

– regimul de mișcare – vacile care nu beneficiază de mișcare, fie că nu intră în călduri, fie că manifestă ”călduri liniștite”, greu de observant.

Însămînțarea vacilor este necesar să se facă la 40-60 zile de la fătare, doar cu condiția să se realizeze involuția uterină. S-a constatat că de cele mai multe ori, prima însămintare se efectuează la primul ciclul de călduri, apărut după 30-45 zile de la fătare.

La însămintările efectuate în primele 21 de zile de la fătare, fecunditatea la prima însămintare este de pînă la 30%.

La însămintările la mai puțin de 60 de zile de la fătare fecundația la prima însămintare este sub 50%, iar la însămintarea efectuată la peste 60 de zile de la fătare fecundația la prima însămintare este de peste 60%.

10. NUTRIȚIA ȘI ÎNTREȚINEREA TAURINELOR DE REPRODUCȚIE

Reproducția este baza creșterii taurinelor în perpetuarea ciclurilor de producție și obținerea descendenței, iar nutriția lor corectă este o garanție a realizării potențialului genetic.

Alimentarea și întreținerea taurinelor de reproducție are o mare însemnătate pentru dezvoltarea continuă a ramurii. O alimentație corectă a animalelor începînd de la naștere și pînă la maturitate este un garant al creșterii unei vaci care va naște viței sănătoși și va avea o productivitate înaltă. Iar viabilitatea și sănătatea vițelilor destinați reproducerii depinde în mare măsură de îngrijirea și nutriția vacii-mame în perioada de gestație. În această perioadă pe lîngă asigurarea unei producții înalte de lapte se are în vedere și crearea condițiilor de creștere și dezvoltare a fătului, mai ales în perioada ultimelor două luni a gestației, când creșterea fătului se accele-

rează. În această perioadă rația de alimentație a vacii înțârcate, se adaptează la starea fiziologică a ei, limitarea furajelor succulente și nutrețului combinat, mărirea cantității de grosiere calitative. Prin alimentația corectă a vacii-mame se pun bazele pentru obținerea produșilor sănătoși și viabili, menținerea vacii într-o stare fiziologică normală întru asigurarea ulterioară a unei lactații productive după fătare. În continuare atenția noastră se dublează, adică avem grijă și de nutriția vacii care începe lactația și a noului născut care trebuie protejat, asigurându-i o nutriție corespunzătoare întru crearea unei imunități puternice, unei rezistențe naturale a organismului la provocările condițiilor mediului înconjurător.

Asigurarea unei alimentări corecte include mai multe condiții și norme nutriționale de care ar trebui să se țină cont pe toată perioada de creștere a tineretului de reproducție. Pe lângă cerințele de bază a creșterii taurinelor pentru diverse scopuri (pentru producerea laptelui-marfă, cărnii) care trebuie respectate necondiționat, la creșterea taurinelor de reproducție sunt impuse unele norme de nutriție și întreținere relativ mai mari și mai îmbunătățite. Scopul urmărit este ca să creștem animale dezvoltate, atât corporal cât și fiziologic, care vor naște viței sănătoși și viabili, vor avea o productivitate de lapte înaltă pe o durată de viață cât mai îndelungată.

Spre exemplu, la creșterea vițelelor de reproducție este mărită norma de lapte integral care trebuie administrată în schema de alăptare a lor. În continuare pe parcursul perioadelor de creștere, sunt corectate și ajustate normele de administrare a grosierelor, concentratelor, aditivilor furajeri, altor ingrediente ale rației. O atenție sporită trebuie acordată consumului de grosiere la vițelele de reproducție de la o vîrstă cât mai timpurie, pentru ca să se deprindă a consuma un volum mai mare de hrană fibroasă și în continuare să se asigure creșterea unui tractus digestiv bine dezvoltat. Pe parcursul dezvoltării și creșterii masei corporale se mărește și cantitatea de fin și alte nutrețuri grosiere calitative administrate animalelor, asigurînd astfel norma necesară de substanțe nutritive în rație.

Întreținerea și nutriția vacilor gestante

Întreținerea vacilor gestante se referă la asigurarea unui repaus mamar optim, hrănirea rațională, îngrijirea corespunzătoare, pregătirea către fătare și supravegerea ei în timpul parturii.

Vacile gestante se alimentează conform perioadelor de gestație în care

se află. Avînd în vedere că cheltuielile de energie se măresc în legătură cu gestația, se administrează o rație nutrițională mai înaltă în scopul acoperirii cheltuielilor crescînde de nutrienți în această perioadă. În perioada gestației se acordă o mai mare atenție în ultimele 2-3 luni de gestație. Pe parcursul gestației în medie 284 zile, masa uterului la vacă crește de 10-20 ori. Gestația se poate instala în a doua, a treia sau chiar a patra lună după fătare, dar vacile sunt hrănite ca gestante, de regulă numai în ultimele două luni de gestație, în perioada repausului mamar. O perioadă de înțarcare de două luni este obligatorie mai întîi pentru că permite reconstituirea rezervelor corporale, în special a substanțelor minerale și apoi pentru reglarea neurohormonală a secreției de lapte. În absența acestei perioade, chiar cu rații bine echilibrate, producția de lapte scade considerabil în lactația următoare. Se apreciază că în ultima lună de gestație, la vacă, necesitățile în energie netă cresc cu 50% față de necesarul de întreținere. Compoziția rațiilor vacilor gestante trebuie să conțină o varietate mai mare de diverse nutrețuri însă preponderent fibroase uscate, iar nutrețul combinat se va afla în mărimile 1,5-3,0 kg/cap/zi.

Cerințele în proteine sunt apreciate la 100-110 g PD/UN sau un nivel de 12-14% PB în rații și nu trebuie pierdut din vedere că cea mai mare parte a depunerilor de rezerve din perioada de gestație se realizează pe baza proteinelor. În această ultimă perioadă a gestației are loc o mineralizare intensă a fătului și în același timp se refac și rezervele de minerale ale femelei. În perioada gestației o femelă depune de 4-5 ori mai mult calciu și fosfor decît se găsește în fetus.

Un rol important în nutriția vacilor gestante îl au vitaminele. Cele mai importante vitamine pentru gestație sunt vitaminele A, D, E, K. Vitaminele A și D sunt implicate în metabolismul proteic și mineral, vitamina A intervine în nidație, vitamina D este hotărâtoare pentru mineralizarea scheletului.

În primele 6 luni de gestație necesarul de energie stabilit pentru lactație nu se suplimentează întrucît sporul de gestație este neînsemnat. În ultimele două luni, ale repausului mamar, vacile sunt hrănite conform cerințelor acestei perioade. Normele prevăd suplimentarea în această perioadă cu 1,5-1,8 UN /animal, în luna a VIII-a și 2-3 UN/ animal în luna a IX-a. În cazul vacilor cu potențial ridicat al producției de lapte suplimentarea energiei se face începînd din luna a VII-a. Rațiile vor fi alcătuite din nutrețuri

usor digeribile, puțin voluminoase, cu acțiune ușor laxativă. În amestecul de concentrate se va majora proporția de tărâță de grâu care, prin efectul dietetic, ușor laxativ, stimulează tranzitul digestiv și indirect va facilita actul parturii (fătării).

Întreținerea și nutriția vițelor pentru creșterea junincilor destinate reproducției.

Creșterea și nutriția vițelor pentru reproducție are două perioade:

- perioada intrauterină
- perioada extrauterină Perioada intrauterină include:
 - efectuarea IA (însămânțarea artificial)
 - înregistrarea IA în registru
 - diagnosticul de gestație
 - declararea fătării la medicul veterinar și operatorului pentru IA.

Este foarte important să se respecte perioada de repaus mamar de 60 zile.

Nutriția vacii-mame în repausul mamar să se efectueze în cantități rezonabile cu furaje calitative având în vedere că 80 % din dezvoltarea fătului se realizează în ultimele 2 luni de gestație

În această perioadă (280±15 zile) se recomandă mișcarea activă a animalului

Perioada extrauterină

Perioada 0-6 luni

– *Fătarea*

Înainte de data fătării se pregătește vaca pentru fătare prin plasarea ei în box special și asigurarea așternutului curat

După fătare se declară data fătării și decurgerea procesului fătării medicului veterinar și operatorului pentru IA.

Se asigură întreținerea vițelor în boxe individuale cu așternut curat
Nutriția vițelor în perioada 0-7 zile cu lapte matern administrat artificial din bidon sau găleată.

În primele ore după fătare se administrează colostrul.

- Dezvoltarea rumenului se practică începând cu a 7-a zi de la fătare prin asigurarea la discreție cu fân de foarte bună calitate, concentrate și apă
- Întărcarea vițelor se practică de obicei - când se consumă 2 kg de concentrate/cap/zi.

La vârsta de 6 luni se efectuează prima etapă de selecție după următoorii criterii: originea, dezvoltarea corporală și starea de sănătate.

Perioada 6-12 luni

În această perioadă vițelele se vor întreține în boxe comune și se va asigura mișcarea lor la discreție.

Furajarea vițelilor în această perioadă se va efectua cu: furaje de volum – 1-3 kg /cap/zi

- suculete – porumb siloz la vârsta de 6-8 luni - 6-8 kg, 8-12 luni – 10-15 kg /cap/zi
- concentrate – consum limitat între 2-3 kg /cap/zi
- apă – la discreție

În cazul când lipsește finul se poate înlocui cu semifîn – 1 kg fin = 2 kg semifîn

- Vara se recomandă hrănirea cu masă verde în dependență de vîrstă:
- 6-7 luni – 15-18 kg
- 8-12 luni – 20-25 kg
- Consumul de concentrate – 1-2 kg
- Admiterea la montă a vițelilor să se facă la greutatea reprezentînd minimum 65-70% din greutatea adultă a vacilor.

Junincile trebuie să atingă o greutate corporală de minimum 90% din greutatea vacilor adulte în momentul fătării. Pentru fiecare 50 kg greutate corporală suplimentară a junincilor în momentul fătării se înregistrează o creștere a producției de lapte cu 300 kg în prima lactație. Sporul mediu zilnic de creștere în greutate a junincilor este recomandat să fie cuprins între 700 g și 850 g/zi, cu evitarea îngrășării acestora. Trebuie de exclus riscul depunerilor excesive a depozitelor de grăsime la nivelul aparatului genital și al glandei mamare, care pe parcurs pot avea repercusiuni negative asupra ușurinței la fătare, fertilității și producției de lapte.

Pentru a avea o vacă sănătoasă cu aptitudini reproductive bune pe toată viața și de exploatare ea trebuie crescută și alimentată corect începînd de la naștere și pînă la maturitate.

Vițelele destinate reproducției din primele zile de viață se întrețin în condiții specifice fermei în care se cresc. Condițiile de întreținere în această perioadă sunt acelea ca și pentru tot tineretul taurin indiferent de destinația ulterioară. Se respecta regimul de microclimă, sistemul individual de

plasare în boxuri speciale în încăperi separate de zona de întreținere a vacilor etc. Ulterior, odată cu creșterea masei corporale și a vârstei, vițelelor destinate reproducției li se vor crea condiții îmbunătățite de întreținere. În perioada de viață de la naștere pînă la vârsta de 8 luni se crează premisele pentru manifestarea potențialului bioprodusiv al vițelelor afit în prima lactație cît și pe parcursul întregii vieți productive. Vițelele după naștere se vor întreține în cuști individuale cu următoarele mărimi: lungimea - 120 cm, lățimea - 50 cm, înălțimea - 90-100 cm. Podeaua cuștii va fi din rețea, ridicată de la podeaua încăperii la înălțimea de 30 cm. Poarta din față a cuștii se va amenaja cu adăpătoare și vas special pentru concentrate și adaosuri vitamino-minerale. În cuști vițelele se vor întreține pînă la vârsta de 15 zile iar pe urmă în țarcuri special amenajate, în loturi mici a cîte 10-15 capete, utilate cu standuri speciale de odihnă, mărimile cărora sunt adaptate la dimensiunile animalelor. În dependență de vârsta și dimensiunile animalelor Institutul Științifico-practic de Biotehnologii în Zootehnie și Medicină Veterinară recomandă suprafața de spațiu, dimensiunile standurilor și frontul de nutriție pentru fiecare animal (1) (Bahcivanji M.A., Varban V., Medvedev A., tabelul 5).

Tabelul 5

Dimensiunile și frontul de nutriție

Indicii	Vârsta, luni				
	1-4	4-6	6-12	12-18	18-24
Suprafața la 1 cap, m ²	1,4	2,0	2,5	3,0	3,5
Lungimea cușetei, m	1,4	1,5	1,7	1,8	1,9
Lățimea cușetei, m	0,60	0,65	0,80	0,85	0,90
Front de furajare la un animal, m	0,40	0,45	0,50	0,60	0,70

Vițelele de reproducție necesită îngrijiri speciale și alimentație echilibrată pe toată perioada de creștere iar perioada cea mai esențială este de la naștere pînă la 4-6 luni cînd se crează bazele unei creșteri a unei vițele sănătoasă. Pentru alimentația vițelelor în această perioadă sunt elaborate diverse scheme de alăptare și nutriție în dependență de posibilități, rasă, scopul și metodelor practicate în fermă. Însă indiferent de scopul urmărit atenția fermierului trebuie concentrată pe creșterea unei vițele cu rezistența

naturală sporită și aptitudini reproductive foarte bune. Este știut faptul că vițelul în primele luni după naștere trebuie să consume lapte integral de vacă în cantități care să-i îndeplineze cerințele vitale ale organismului, din simplu motiv că el nu poate consuma alte nutrețuri. Sunt diferite opinii referitor la cantitatea de lapte care trebuie să consume vițelul în această perioadă. În cazul creșterii vițelului de reproducție se recomandă scheme de alăptare cu lapte integral de vacă în cantități de la 200kg pînă la 420 kg în dependență de greutatea vacii adulte și de producția de lapte planificată. Institutul Științifico-Practic de Biotehnologii în Zootehnie și Medicină Veterinară din R Moldova (Sistem de rații tipice pentru taurine) recomandă o schemă de alăptare pentru vițelele de reproducție pînă la vîrsta de 4 luni cu cheltuieli de lapte integral de 350 kg (tabelul 6).

Tabelul 6

Schemă de alăptare pentru vițelele de reproducție pînă la vîrsta de 4 luni

Vîrsta, zile	Masa corp., kg	Rația zilnică , kg								
		Lapte integral,	Lapte degresat	Substituent de lapte		Nutreț combinat	Fân lucernă	Fânaj lucernă	Siloz porumb	Sare,g
				uscat	dizolvat					
1-10	35	6					Depr.	Depr.	-	-
11-20		6				0,1	0,05	.0,05	Depr	2,5
21-30		6	2			0,3	0,05	0,15	0,2	2,5
Total pe I lună	59	180	20			4,0	1	2	2	50
31-40		6	5			0,4	0,2	0,3	0,4	5,0
41-50		6	7			0,6	0,3	0,4	0,6	5,0
51-60		5	9			0,6	0,5	0,5	1,0	5,0
Total pe II lună	83	170	210			16	10	12	20	150
61-70			9,5	0,65	6,6	0,7	0,7	0,5	1,0	7,5
71-80				0,65	6,6	0,8	0,9	0,7	1,2	7,5
81-90				0,65	6,6	0,9	1,1	0,8	1,4	7,5
Total pe luna a III	107		95	19,5	198	24	27	20	36	225

91-100				0,43	4,4	1,1	1,3	1,4	2,4	7,5
101-110				0,22	2,3	1,2	1,4	1,6	2,6	7,5
111-120						1,2	1,6	1,6	3,2	7,5
Total pe luna IV	131			6,5	67	35	43	46	82	225
Total pe 4 luni		350	325	26	265	79	81	80	140	650

Pe parcursul creșterii masei corporale se modifică și rațiile de nutriție a vițelilor. Scopul principal este asigurarea unei creșteri proporționale de dezvoltare a tuturor organelor femelei atât productive cât și reproductive fiindcă trebuie să avem în continuare o vacă funcțional reproductivă și cu producții mari de lapte.

Cum asigurăm acest deziderat? Prin o nutriție echilibrată și balansată preponderent bazată pe nutrețuri fibroase de bună calitate. Rațiile de nutriție pentru vițelele de reproducție se întocmesc conform vârstei, masei corporale și adaosului zilnic în greutate planificat anterior și masei corporale așteptate ale vacii adulte. De exemplu planificăm să avem un efectiv de vaci cu masa corporală de 400-450 kg, sau 500-550 kg sau și mai mari 600-650kg. În acest caz planificăm rațiile de nutriție în concordanță cu scopul propus, lunar pe toată perioada de creștere pînă la vârsta de 28 de luni. La vârsta de însămînțare se acordă o atenție și supraveghere sporită, mai ales în perioada căldurilor, cînd se manifestă comportamentul caracteristic estrului. La atingerea vârstei de 17-18 luni și a masei corporale de 350-380 kg junincile se însămînțează artificial pentru ca la vârsta de 26-27 luni să avem prima fătare. Întru realizarea acestor rezultate este necesar de planificat și de înfăptuit obținerea unui anumit spor zilnic în greutate pe anumite perioade de creștere. Astfel:

- pentru creșterea unor vaci cu masa corporală de 500-550 kg, sporul zilnic în greutate în primele 6 luni de viață ar trebui să constituie 650-700 g/zi;
- în intervalul de vîrstă 7-12 luni sporul zilnic scade pînă la 550-600 g/zi;
- în perioada 13-24 luni 450-500 g/zi;
- în ultimele 2 luni ale gestației să se mărească pînă la 550-650 g/zi.

Creșterea sporului zilnic în greutate în ultimele 2 luni de gestație este legat de dezvoltarea intensivă a plodului și crearea rezervelor de substanțe nutritive în organismul mamei pentru lactația viitoare.

Avînd în vedere că în R Moldova se cresc vaci de lapte preponderent de rase relativ mari cum ar fi Holștin, Simmental, Bălțat cu Negru Moldovenesc se recomandă rații de nutriție pentru vițele de reproducție cu obținerea unor vaci adulte avînd masa corporală de 600-650 kg. Din aceste considerente se recomandă utilizarea normelor de nutriție elaborate de către Institutul de Zootehnie din Rusia pentru nutriția vițelele de reproducție redată în tabelul 7.

Tabelul 7

Norme de nutriție a vițelor de reproducție pentru creșterea vacilor de lapte cu masa corporală de 600-650 kg, cap

Indicii	Vîrsta, luni													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
	Masa corporală pe perioadă, kg													
	48	72	95	118	142	164	186	207	227	248	269	290	309	327
	Sporul zilnic în greutate, g/zi													
	750-800					650-700					550-600			
UNE	2,0	2,2	2,5	2,9	3,3	3,6	3,8	4,1	4,4	4,7	5,2	5,4	5,5	5,7
Energie metabol. MDj-	20	22	25	29	33	36	38	41	44	47	52	54	55	57
Subs.usc. kg	0,8	1,4	2,3	3,1	4,1	4,7	5,5	6,0	6,3	6,8	7,0	7,0	7,1	7,3
Proteină brută,g	280	410	480	515	570	645	670	700	725	740	800	815	830	845
Celuloză brută, g	70	240	460	585	775	845	1070	1210	1320	1385	1495	1540	1560	1605
Grăsime brută,g	215	225	235	240	250	260	270	280	290	295	305	315	325	330
Sare de buc.,g	5	10	15	15	20	25	28	30	32	34	35	37	39	40
UNE la 1 kg subst. uscată	2,3	1,6	1,1	0,9	0,8	0,8	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,8	0,8	0,8
Proteină digerabilă la o UNE, g	120	134	156	136	129	121	117	112	111	111	106	104	104	102
Raportul zahăr/ proteină	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9

Subnutriția și influența ei asupra funcției de reproducție la vițele

Alimentația vițelilor cu rații sărace în substanțe nutritive poate provoca o serie de tulburări metabolice și funcționale care la rândul lor pot conduce la afectarea parțială sau totală a reproducției. În primul rând subnutriția diminuează secreția hormonilor gonadotropi, ca urmare a dereglărilor axului hipotalamo - hipofizo - gonadic, care au o acțiune dominantă asupra coordonării funcției de reproducție. Deasemenea subnutriția vițelilor poate conduce la o dezvoltare slabă a aparatului genital, apariția întârziată a maturității sexuale, a ciclurilor sexuale anovulatorii, hipofuncția gonadotropă adenohipofizară. Astfel la vițele, subalimentația se manifestă prin anestrus foarte prelungit iar ciclurile sexuale au o exteriorizare ștearsă și neregulată.

Întreținerea și nutriția tăurașilor pentru reproducție

Întreținerea tăurașilor pentru reproducție până la vârsta de 6 luni este asemănătoare cu cea a vițelilor. După 6 luni tăurașii se întrețin individual în boxe separate.

Întreținerea taurilor reproducători depinde în mare măsură de tehnologia și de metoda de întreținere în gospodăriile deținătorilor de taurine. Însă toate tehnologiile de întreținere au un singur scop: crearea condițiilor confortabile animalelor întreținute în încăperile fermei. Crearea acestor condiții determină respectarea unor parametri zooveterinari referitor la suprafață, lumină, ventilare, temperatură etc. Spre exemplu, suprafața minimă la un animal în dependență de vîrstă și mărimea animalului (pentru un animal adult trebuie să fie nu mai mică de 3,5m²/cap). Luminozitatea în încăperea să fie de minim 200 lux, viteza de mișcare a aerului trebuie să fie de 0,2-0,3 m/sec pe timp de iarnă și 0,7-0,9 m/sec vara, temperatura nu mai joasă de 10-12 C, umiditatea aerului nu mai mare de 75-80 %, concentrația amoniacului în aer nu mai mare de 10-15 mg/m³, conform parametrilor normelor zooveterinare elaborate de Institutul Științifico Practic de Biotehnologii în Zootehnie și Medicină Veterinară din Moldova (Bahcivanji M., Varban V., Medvedev A.).

O nutriție calitativă și abundentă se asigură chiar din primele ore de viață a vițelei și tăurașului și continue până la maturitate, când se introduc corective în dependență de starea fiziologică a animalului. După 1-2 ore

de la naștere se administrează colostrul matern în cantitate de 0,5 – 1,0 l / cap. Ulterior de 3-4 ori pe zi câte 1,0 litru în primele zile de viață. Administrarea colostrului în primele zile de viață este foarte importantă în vederea asigurării unei imunități înalte a tineretului, a creșterii rezistenței naturale a organismului nou născut la diverse maladii și infecții. Se recomandă ca colostrul să fie muls de la mama fătului, curat și obligatoriu să fie cald, la temperatura de 36-37^o C (Bahcivanji M., Coșman M., și col.). Treptat, timp de o săptămână, se mărește cantitatea de lapte pe zi pînă ajungem la 6 l /zi. Vițelelor și tăurașilor pe toată perioada de creștere pînă la vîrsta de 4 luni li se administrează de la 180 pînă la - 350 l /cap lapte integral, și de la 200 pînă la 600 l de zer. Cantitatea recomandată reprezintă minimumul și maximumul și depinde în mare măsură de posibilitățile deținătorului de animale. Începând cu ziua a 7 se începe deprinderea animalelor cu nutrețul combinat și cu fin de lucernă de calitate superioară. Se utilizează nutrețul combinat special preparat pentru vițeeii sugari denumit starter. În continuare începînd cu a treia lună de la naștere poate fi utilizat nutrețul combinat preparat din cereale integrale cu adaosuri de macuh și tărițe în următoarea componență: crupă de ovăz - 20%, crupă de porumb - 30%, tărițe de grîu-30% și macuh de floarea soarelui – 20%. (Kalașnicov A.P.și col. 2003). Un model al rației de alimentație în această perioadă este expus în tabelul 8.

Tabelul 8

Schema de alimentare a vițelelor de reproducție pînă la vîrsta de 6 luni

Vîrsta, luni	Masa corporală la sfîrșitul perioadei, kg	Cantitatea de nutrețuri pe lună, kg						Subst. minerale, g		
		Lapte		Fin	Siloz starter	Rădăcini	Nutreț. combinat	sare	Calciu fosfat	
		integru	Degresat							
I lună	52	170	0	depr	0	depr	2	0	100	100
2 lună	72	140	0	10	0	10	0	17	300	300
3 lună	92	40	0	30	30	30	0	44	300	450
4 lună	113	0	0	45	70	45	0	57	450	600

5 lună	134	0	0	75	120	45	0	48	600	600
6 lună	155	0	0	100	180	30	0	32	600	750
Total pe 6 luni		350	0	260	400	160	2	198	2350	2800

Supravegherea fătărilor la vaci este o măsură obligatorie atît din motive veterinare cît și asistarea zootehnică. De modul decurgerii fătării depinde în mare măsură atît sănătatea vacii-mame cît și dezvoltarea în continuare a fătului. O pornire sănătoasă la creșterea vițeii este o garanție a unei dezvoltări sănătoase și proporționale în perioadele ulterioare. În perioada de după fătare se acordă atenție sporită nutriției și vacii-mame și fătului, asigurînd astfel o revenire la normalitate a organelor reproductive a vacii și un start al creșterii reușite a produsului (vițică,vițel).

Canțitatea și calitatea hranei influențează funcția de reproducție prin legătura strînsă ce există între alimentație, producerea celulelor sexuale și manifestarea reflexelor sexuale. Hrănirea reproducătorilor masculi cu rații echilibrate, cu nutrețuri de bună calitate duce la dezvoltarea normală a aparatului genital, la apariția maturității sexuale la vîrsta caracteristică speciei, la obținerea unui material seminal de calitate superioară, la manifestarea normală a reflexelor sexuale. Atît deficitul cît și excesul de substanțe nutritive, contribuie la scăderea producției de material seminal. Alimentația poate influența negativ funcția de reproducție în următoarele situații: de subalimentație, de supraalimentație și de alimentație cu valoare incompletă, lipsită de unele substanțe nutritive, sau cînd substanțele nutritive se găsesc:- unele față de altele într-o proporție necorespunzătoare. Subalimentația sau subnutriția se datorează unor rații cu cantități mai reduse de substanțe nutritive decît necesarul. Aceasta apare în urma unor carențe alimentare îndelungate prin lipsa de nutrețuri, sau datorită unor boli digestive. S-a constatat că subalimentația la taurii-reproducători influențează negativ valoarea biologică a materialului seminal prin micșorarea conținutului de hialuronidază, enzimă cu rol hotărîtor în procesul fecundației. De asemenea, subalimentația determină o reducere accentuată a conținutului materialului seminal în fosfatază alcalină și acidă, care după cum se știe,sunt enzimele metabolismului glucidic (glucidele fiind sursa principală a energiei mișcării spermatozozilor).Subalimentația își exercită efectul asupra hipofizei care nu mai poate stimula funcția gonadelor și în

acest fel activitatea androgenică a testiculului este întârziată sau suprimate. Dezechilibrele nutriționale și influența acestora asupra reproducției la masculi În cazul în care substanțele nutritive din rație nu se găsesc într-un echilibru normal (deficit sau exces), funcția de reproducție la masculi este influențată negativ. Dintre substanțele nutritive ce se află într-o legătură mai strînsă cu funcția de reproducție sunt proteinele, vitaminele și substanțele minerale. Carența în aceste elemente poate constitui un factor major al infecundității.

Carența proteică. Administrarea excesivă a proteinelor ca și insuficiența lor în rații duce la tulburări ale spermatogenezei și diminuarea cantității de material seminal. Deasemenea, deficitul proteic din rație scade activitatea sexuală a reproducătorilor, înrăutățește calitatea materialului seminal, ducînd la oligospermie (spermă foarte rară) și chiar azoospermie (lipsa spermatozoizilor). Subalimentația proteică scade rezistența organismului și implicit a aparatului genital, favorizînd instalarea unor inflamații, cum sunt: prostatitele (inflamația prostatei) și chiar orhiepididimite (inflamarea testiculului și epididimului). Pentru a combate tulburările de fecunditate determinate de carența proteică este necesar ca rația reproducătorilor să fie normată conform cerințelor de proteine și ținînd cont de: specie, rasă, vîrstă, greutate corporală, modul de utilizare la reproducție (frecvența recoltărilor de material seminal) etc. Alimentația săracă în proteină și carența în macroelemente (calciu, fosfor), microelemente (zinc, mangan, cupru, cobalt, iod) și în vitamine (A, B, E), produce tulburări în funcția spermatogenetică ce pot degenera în sterilitate. În aceste condiții reproducătorii produc o cantitate mică de material seminal și de calitate slabă, cu un conținut redus de spermatozoizi cu viabilitate și capacitate fecundantă scăzută

Nutriția taurilor reproducători

Taurii reproducători au un rol important în reproducția taurinelor dat fiind faptul producerii de către ei a materialului seminal cu care se însă-mînzează artificial vacile. Din aceste considerente nivelul nutriției taurilor reproducători trebuie să corespundă normelor de alimentație, fiind balansate și echilibrate după toate substanțele nutritive. Nivelul de nutriție al tăurașilor la creștere se planifică pentru a atinge în spor zilnic în greutate de 750-1000 g în dependență de rasă și masa corporală scontată la vîrsta de 16 luni. O nutriție echilibrată a tăurașilor trebuie să asigure o creștere

intensivă a scheletului osos, țesutului muscular, o dezvoltare proporțională a corpului care ulterior vor asigura aptitudini performante la producerea spermei calitative.

Spre deosebire de nutriția vițelilor de reproducție tăurașilor reproducători în perioada de creștere li se administrează mai mult lapte integral, nutreț combinat și mai puține grosiere voluminoase. Pe toată perioada de creștere cheltuielile de lapte integral sunt la nivel de 420-450 kg, iar de lapte degresat – 700-1000 kg.

Tabelul 9

**Schema de nutriție a tăurașilor reproducători pe primele 6 luni
ca la vârsta de 16 luni să aibă 500 kg**

Vârsta, luni	Masa corporală kg	Masa nutrienților, kg							Fosfat g
		Lapte Integral	Lapte degresat	Fîn	Siloz	Rădăcinoase	Nutreț combinat	Sareg	
1 lună	62	240	-	-	-	-	-	100	150
2 lună	90	210	50	11	-	-	12	300	450
3 lună	120	-	310	25	-	10	42	300	600
4 lună	150	-	290	40	15	30	45	450	600
5 lună	180	-	240	60	45	30	51	450	750
6 lună	210		110	90	145	47	56	750	750
Total pe 6 luni		450	1000	226	205	117	206	2500	3300

Nutriția vacilor după fătare

Prin asigurarea unei nutriții corecte cu rații echilibrate în substanțe nutritive conform normelor și cerințelor stabilite și în dependență de masa corporală și sănătatea vacii se atrage atenție sporită la ameliorarea sănătății vacii-mame, la revenirea cât mai grabnică la involuția normală a organelor reproductive și asigurarea creșterii stabile a producției de lapte și menținerii acestei producții pe o perioadă cât mai îndelungată de timp. În primele 2-3

zile după fătare nu se vor administra nutrețuri succulente și se va limita cantitatea de nutreț combinat. După 4-5 zile rația se va suplini cu alte nutrețuri mai valoroase finaj, siloz de porumb, nutreț combinat în așa mod ca la a 13-14 zi de lactație rația să corespundă total cerințelor organismului și producției de lapte. În continuare se va utiliza o rație avansată în nutrienți pentru stimularea producției de lapte în această perioadă. Astfel după 15-16 zile de la parturiție nutriția vacii trebuie să fie abundentă, avînd în vedere scăderea masei corporale în perioada de gestație și o pierdere mare a energiei pentru dezvoltarea fătului. Concomitent cu producția de lapte nu trebuie să uităm de o altă funcție a vacii lactante, de restabilirea organelor reproductive și ciclurilor estrale pentru a pregăti organismul vacii întru continuarea procesului de reproducere prin înșămînțarea artificială și instaurarea următoarei gestații.

Miclea V. concluzionează că admiterea la montă a vițelelor să se facă la greutatea reprezentînd minimum 65- 70% din greutatea adultă a vacilor.

Junincile trebuie să atingă o greutate corporală de minimum 90% din greutatea vacilor adulte în momentul fătării. Pentru fiecare 50 kg greutate corporală suplimentară a junincilor în momentul fătării se înregistrează o creștere a producției de lapte cu 300 kg în prima lactație. Sporul mediu zilnic de creștere în greutate a junincilor este recomandat să fie cuprins între 700 g și 850 g, cu evitarea îngrășării acestora. Trebuie de exclus riscul depunerilor excesive a depozitelor de grăsime la nivelul aparatului genital și al glandei mamare, care pe parcurs pot avea repercusiuni negative asupra ușurinței la fătare, fertilității și producției de lapte.

11. ÎNSĂMÎNȚAREA ARTIFICIALĂ LA VACĂ

La nivelul aparatului genital, după instalarea maturității sexuale și pînă la climacterium, se produc o serie de modificări morfo-fiziologice însoțite de manifestări comportamentale, care se repetă la anumite intervale de timp (Milovanov V. și col.).

Ciclul sexual (gametogen) reprezintă totalitatea modificărilor morfo-fiziologice ale aparatului genital, care se repetă, avînd ca rezultat final eliberarea uneia sau a mai multor ovocite apte pentru fecundare.

Modificările căilor genitale în timpul ciclului sexual

Miclea V. a dovedit că în urma evoluției pe ovar a foliculilor și corpurilor galbeni, într-o succesiune strictă și condiționată reciproc printr-un sinergism de continuitate, la nivelul căilor genitale apar transformări morfologice și funcționale, care crează condițiile realizării etapelor reproductive necesare obținerii unui nou produs de concepție.

Oviductul reprezintă porțiunea ovariană a căilor genitale femele. El este cuprins în mesosalpinx (partea anterioară a ligamentelor largi), avînd un traiect flexuos și lungime variabilă de la o specie la alta. Anatomic oviductul cuprinde trei porțiuni: infundibulum, ampulă și istm.

Infundibulum este situat anterior spre deschiderea bursei ovariene, fiind un conduct larg asemănător unei pîlnii, dispusă cu partea largă spre ovar. Mărimea infundibulumului variază cu specia și vîrsta femelei. Suprafața sa este de 20-30cm² la vacă.

Ampula cuprinde aproximativ jumătate din lungimea oviductului și se continuă posterior cu istmul. Între cele două componente oviductale se găsește joncțiunea ampulo-istmică, care are anumite funcții fiziologice.

Istmul este un compartiment oviductal mai scurt și îngust, care comunică cu vîrful cornului uterin. La acest nivel (zona se numește joncțiunea utero-tubară), trecerea de la oviduct la uter se face morfologic caracteristic, formațiunile existente aici avînd un rol fiziologic bine definit. Funcțional oviductele sunt unice deoarece pot transporta ovula și spermatozoizii, concomitent în direcții opuse. Fimbria colectează ovocitele de la suprafața ovarului și le conduce spre infundibulum, iar de aici printre faldurile mucoasei ajung în ampulă, unde are loc fecundarea și derularea primei diviziuni ale dezvoltării embrionare. Embrionul rămîne în oviduct cîteva

zile – dependent de specie, rasă, individ – după care este transportat în uter. Transportul ovocitei și a embrionului se realizează de către contracțiile mezosalpinxului, musculaturii oviductale, faldurilor mucoasei și cu ajutorul mișcărilor cililor de pe celulele ciliate ale mucoasei, toate găsindu-se sub coordonarea hormonilor ovarieni.

După cum argumentează Miclea V. și col. contracțiile oviductale facilitează amestecarea conținutului oviductal, ajută la denudarea ovocitei, favorizează fecundarea prin realizarea contactului dintre spermatozoizi și ovulă, participă la deplasarea ovocitei și embrionului în lungimea sa. Musculatura oviductului prezintă mai multe tipuri de contracții respectiv: contracții peristaltice izolate la un segment sau punct al peretelui oviductal, contracții ale unui compartiment și contracții la nivelul întregului tub oviductal. Ca direcție, predomină contracțiile orientate spre uter față de cele cu orientare ovariană. În general ampula prezintă activitate contractilă mai scăzută decât istmul.

Frecvența și amplitudinea contracțiilor variază cu faza ciclului sexual. Înaintea ovulației, contracțiile sunt slabe ca frecvență și amplitudine. La ovulație ele devin mai viguroase. Mezosalpinxul și mezotubarium superior, la ovulație se contractă puternic, independent și interminant. Contracțiile mezotubariului sunt mai puternice decât ale mezosalpinxului. Aceste contracții fac ca oviductul să descrie o formă semilunară, cu un capăt pe ovar și celălalt pe vârful cornului uterin, împing fimbria pe suprafața ovarului și modifică continuu oviductul. La ovulație, prelungirile sub formă de mănășă ale fimbrii se contractă ritmic și masează suprafața ovarului.

Tipul contracțiilor poate fi asociat cu schimbările ciclice a cantităților de glicogen conținute în musculatura oviductului. Glicogenul este mai abundent în stratul muscular circular decât în cel longitudinal. De asemenea, cantitatea de glicogen este redusă înaintea ovulației, ridicată în continuare și foarte mare la fătare. Excitabilitatea și capacitatea contractilă a musculaturii oviductului este reglată de hormonii steroizi și prostaglandine. Prostaglandinele E_1 și E_2 produc creșterea tonusului musculaturii longitudinale în partea sa proximală și îl reduc în porțiunea distală. Prostaglandina $F_{2\alpha}$ are efect de relaxare a lumenului oviductului.

Mucoasa oviductului formează spre lumen falduri primare secundare și terțiare. În ampulă, faldurile mucoasei sunt înalte și ramificate descresc în înălțime spre istm, devenind joase la nivelul joncțiunii utero-tubare. Lume-

nul ampulei, datorită înălțimii și ramificațiilor faldurilor mucoasei, devine virtual. Fluidul oviductal, redus cantitativ, permite contractul direct dintre celulele cumulus ooforum (foliculare) și celulele ciliate ale mucoasei.

Mișcarea cililor este influențată de hormonii ovarieni. Ea este maximă la ovulație și scăzută în continuare. După ovulație, bățile cililor din fimbrie sunt sincronizate și orientate strict spre deschiderea pavilionului oviductului. Cilii au capacitatea de a înlătura celulele foliculare din jurul ovocitei pînă la pătrunderea acesteia în oviduct. Numărul celulelor ciliate este maxim în fimbrie și pavilion, pentru a capta și conduce ovocita spre locul fecundației și minim, în istm, deoarece activitatea secretorie este mult mai importantă aici, în scopul asigurării mediului necesar spermatozoizilor, ovulei și ulterior embrionului rezulat din unirea celor doi pigmenți. De regulă, celulele ciliate din fimbrie, infundibulum și ampulă sunt situate mai ales pe vârful faldurilor mucoasei, iar în istm par adîncite între celulele secretorii înalte, datorită faptului că sunt mai mici.

Celulele ciliate din ampulă și istm abia ajung în lumen astfel încît, nu au mare importanță în transportul ovulei, cu toate că bățile lor sunt orientate spre uter. Bățile acestora, sincronizate cu activitatea contractilă a musculaturii oviductale, asigură ovulelor o rotație continuă, esențială, pentru a realiza un cît mai bun contact cu spermatozoizii și, ulterior, același mecanism previne implantarea oviductală.

Infecțiile de la nivelul căilor genitale femele sunt asociate cu importante schimbări ale morfologiei celulare. Se reduce numărul celulelor ciliate sau/și a cililor de pe fiecare celulă ciliată existentă. Ca urmare se acumulează lichid oviductal și apare un proces inflamator cu evoluție spre salpingite. Celulele secretorii ale mucoasei oviductului au suprafața extremității apicale (lumenale) acoperită de numeroși microvili. Ele conțin în citoplasmă granule secretorii, variabile ca număr și mărime, în funcție de specie și faza ciclului sexual. Granulele secretorii citoplasmatică se acumulează în timpul fazei foliculare a ciclului sexual și sunt eliberate în lumen după ovulație. Activitatea secretorie a mucoasei este controlată de hormonii ovarieni, dar s-a observat că este mai intensă în jurul ovulei decît în celelalte puncte ale oviductului, în același moment a ciclului sexual.

Lichidul oviductal realizează mediul necesar pentru fecundație și susținerea primelor etape ale dezvoltării embrionare timpurii. Ritmul de acumulare a lichidului în cele două oviducte se află sub dependența hormonilor

ovarieni. Volumul lichidului oviductal este scăzut în faza luteală, începe să crească la instalarea estrului, ajunge la maxim după ovulație, descrescînd apoi treptat pînă la nivelul caracteristic fazei luteale a ciclului sexual.

Direcția de curgere este în cea mai mare parte spre ovar în cazul în care istmul blochează total sau parțial trecerea lichidului oviductal spre uter. Curenții și contracurenții din lichid, care determină curgerea lui spre uter, respectiv spre ovar, sunt rezultatul schimbărilor cantitative a secrețiilor oviductale din timpul ciclului sexual, bățăilor chinocililor – ce pot varia ca ritm și tip, a schimbărilor constante a diametrului lumenului oviductului în diferitele sale compartimente, în urma contracțiilor musculare și a reorientării faldurilor mucoasei. Direcția de mișcare a lichidului oviductal contribuie la transportul ovulei sau/și embrionului în uter.

Rolul lichidului oviductal este de a hrăni ovocita imediat după ce a fost ovulată, contribuie la capacitatea spermatozoizilor, la asigurarea condițiilor pentru desfășurarea fecundației și a dezvoltării embrionului înainte de nidație. Lichidul oviductal este format din ser sangvin transudat și produsele de secreție ale celulelor mucoasei oviductului.

În final, Miclea V, și col., concluzionează că rolul esențial al oviductului este de a asigura mediul optim nutrițional și protectiv pentru realizarea fecundației și dezvoltării embrionare timpurii. Ajustarea treptată la cerințele gameților se face sub coordonarea hormonilor steroizi produși de formațiunile ovariene caracteristice. Sistemul nervos vegetativ nu intervine major în desfășurarea acestor procese. De remarcat este faptul că sperma și embrionul au la nivelul oviductului proprietăți antigenice, care pot fi recunoscute de către sistemul imunitar matern.

Uterul, este format din cervix, corp și coarne uterine. Din punct de vedere reproductiv de interes este miometrul și endometrul.

Miometrul. În timpul ciclului sexual, este puternic influențat de hormonii ovarieni. Sub acțiunea estrogenilor se intensifică sinteza de fosfolipide, glicogen, ATP și creatin-fosfat, ceea ce sporește potențialul contractil al uterului. Estrogenii sunt responsabili de contractilitatea miometrului care are o mare însemnătate pentru transportul spermatozoizilor. Concomitent sporește receptivitatea miometrului la efectul stimulator al ocitocinei, acetilcolinei și la excitația mecanică sau electrică. Monta, datorită stimulării mecanice a receptorilor vaginali, induce contracția miometrului. Unda de contracție puternică și de lungă durată din perioada estrală, la vacă,

pornește de la cervix spre oviducte facilitând astfel transportul spermatozoizilor după depunerea ejaculatului. Eliberarea de acetilcolină și nora-drenalină, în cazul reacțiilor de frică și apărare, inhibă miometrul în timpul montei și însămînțărilor (I.Boitor).

Progesteronul nu influențează rezervele contractile ale miometrului (glicogen, fosfolipide, ATP, creatin fosfat, actinomiozină), dar mărește potențialul de repaus al membranei celulare musculare. El blochează legătura (mediată de sodiu) dintre receptori și proteinele contractile, precum și transmiterea excitației la nivelul miometrului. Rezultă o activitate contractilă slabă, limitată local și necoordonată, care nu este influențată de ocitocină.

Contrațiile uterine asigurate de stratul muscular sunt corelate cu contracțiile oviductale și mișcările ovariene. Estrogenii inițiază și coordonează tipul contracției uterine la începutul estrului, iar scăderea secreției lor la sfârșitul căldurilor schimbă direcția acestor contracții. Frecvența contracțiilor uterine crește sub acțiunea adrenalinei și noradrenalinei pe întreaga durată a estrului.

Modalitatea prin care acționează hormonii steroizi ovarieni asupra contracțiilor uterine se consideră a fi cuplarea lor cu receptorii citoplasmatici ale fibrelor musculare. Sub acțiunea acestora se activează căi metabolice de stimulare, sau din contra de inhibare, a contracțiilor miometrului uterin. *Endometrul* are o structură glandulară și prezintă numeroase orificii ce sunt deschideri ale glandelor endometriale. Celulele endometriale ciliate sunt mult mai puține decât în oviduct. Celulele neciliate (secretorii) au, la nivel apical, prelungiri citoplasmice bine dezvoltate. Numărul, mărimea, forma și ramificațiile microvililor aplicali depind de stadiul ciclului sexual. Dezvoltarea microvililor aplicali, sinteza, stocarea și eliberarea secrețiilor endometriale sunt coordonate de hormonii ovarieni. După eliberare, materialul sintetizat este depus la nivelul prelungirilor citoplasmice apicale, iar celulele secretorii se ratatinează și își pierd microvili.

Carunculi sunt proeminente la suprafața mucoasei uterine, caracteristice rumegătoarelor, aranjați în patru rînduri ce se întind de la vârful coar-nelor pînă la corpul uterin, avînd în structură, asemănător stromei ovaru-lui, țesut conjunctiv. Mucoasa de la nivelul excavațiilor de pe suprafața caruncurilor este bogat vascularizată și nu conține glande endometriale. La femelele negestante există 70-20 carunculi cu diametrul de 15 mm. În

timpul gestației diametrul caruncurilor poate ajunge la 10 cm, iar suprafața lor devine spongioasă din cauza numeroaselor cripte în care pătrund vilozitățile coriale. Totalitatea vilozităților coriale care pătrund într-un caruncul formează un cotiledon. Andrenajul carancul-cotiledon constituie placentoamele.

Prin cercetări a fost demonstrat că glandele endometriale sunt tubulare, puțin ramificate cu porțiunea terminală ușor spiralată. Au epiteliul glandular simplu, format din celule înalte cu și fără cili și se găsesc răspândite pe suprafața întregului endometru exceptînd curunculii. Densitatea lor variază cu specia, rasa, stadiul ciclului sexual, etc. Datorită creșterii diametrului căilor genitale și a grosimii submucoasei, densitatea glandelor endometriale vază mult în timpul ciclului sexual. În coarnele uterine mucoasa conține mai multe glande endometriale decît în corpul uterin. Acestea cresc rapid prin înmugurire din zona bazală spre exteriorul endometrului. Glandele care nu se deschid la suprafața mucoasei își măresc lumenul chistizîndu-se. În perioada estrală glandele endometriale au o formă aproximativ rectilinie, apoi cresc, încep să secrete, se ramifică și spiralează sub influența sporirii secreției de progesteron a corpului galben.

Sub influența hormonilor steroizi, endometrul suferă modificări ciclice, care sunt expresia unor profunde transformări de ordin histologic și vascular. În faza estrogenică proliferativă (proestrus), sub influența cantităților tot mai ridicate de estrogeni secretați de foliculi evolutivi, endometrul proliferază activ, glandele cresc și își sporesc activitatea secretorie.

Metabolismul endometrului se desfășoară sub acțiunea steroizilor ovarieni. Acesta este concretizat printr-o serie de reacții chimice, care au ca rezultat final eliberarea substanțelor necesare asigurării condițiilor migrării spermatozoizilor, supraviețuirii ovulei, realizării fecundației, nidației, creșterii și dezvoltării produsului de concepție. Dezvoltarea endometrului și embrionului presupune un metabolism activ, realizat îndeosebi prin sinteza și arderea hidraților de carbon. În endometrul animalelor de fermă are loc, în urma unei hiperemii active, creșterea activității mitotice și de sinteză proteică.

După ce corpul galben începe să secrete progesteron, activitatea glandelor endometriale se amplifică, lichidul uterin devenind favorabil nutriției blastocisților liberi, nidației și formării deciduei. Această transformare este posibilă dacă anterior endometrul a fost stimulat de estrogeni.

Dacă fecundația nu a avut loc, corpul galben involuează și producția de progesteron scade iar endometrul se dezagregă. Procesul începe prin vascularizarea epiteliului, infiltrarea cu leucocite și reducerea circulației sangvine. La primate endomerul degenerat este eliminat cu sângele menstrual, iar la animalele de fermă părțile degenerate sunt resorbite.

Fluidul uterin. Volumul și compoziția biochimică a secrețiilor uterine prezintă variații în funcție de stadiul ciclului sexual. În timpul estrului, secrețiile uterine sunt mai ridicate cantitativ decât cele oviductale, dar maximul secretor este atins numai în faza luteală a ciclului sexual. Chimic, secreția endometrială conține mai ales substanțe existente în serul sangvin și mici cantități de substanțe uterine specifice. Acest fapt demonstrează că lichidul uterin își are originea în serul sangvin, care transvazează vasele a căror pereți sunt ușor permeabili, adăugându-i-se produse de sinteză proprii.

Cercetările din domeniu au demonstrat că secreția preovulatorie ridicată de estrogeni este asociată cu sporirea volumului și sintezei de substanțe componente ale lichidului uterin, producând un mediu optim necesar supraviețuirii, capacitării spermatozoizilor și realizării primelor diviziuni premergătoare implantării blastocistului. În această etapă secreția uterină conține ioni de bicarbonat, hidrați de carbon și proteine, în concentrații caracteristice. Odată cu producerea de progesteron în cantități tot mai mari, structura chimică a secreției endometriale se modifică, lichidul uterin fiind o importantă sursă nutritivă pentru embrion, înainte și imediat după fixarea lui în peretele uterin. Funcțiile uterului sunt reprezentate de transportul spermei de la locul depunerii ejaculatului la cel al fecundației, reglarea funcției corpului galben prin producerea prostaglandinei $F_2\alpha$, cu efect luteolitic, și în realizarea nidației, gestației, parturii.

Cervixul are o structură asemănătoare unui sfîcter, care închide comunicarea cu vaginul în cea mai mare parte a ciclogramei reproductive. Cu toate că structura sa este caracteristică diferitelor specii de animale, în general, este format preponderent din țesut fibroelastic, colagen și un strat muscular mai slab reprezentat decât în celelalte compartimente ale căilor genitale. Spre lumen, sunt prezente un anumit număr de creste, prevăzute cu proeminențe. La rumegătoare, acestea se întrepătrund, fiind dispuse sub formă spiralată sau transversal, mărimea lor fiind caracteristică fiecărei specii.

Vacile au în lungimea cervixului, patru astfel de inele a căror proemi-

nențe obturează lumenul, împiedicînd total comunicarea dintre vagin și corpul uterin.

Structura fibroelastică a peretelui cervixului este importantă pentru de-rolarea biodinamicii acestui compartiment, în timpul perioadei estrale a ciclului sexual și mai ales la parturiție.

Mucoasa cervicală este formată dintr-un strat de celule cilindrice, înalte, ce învelește peretele gîtului uterin. Structural sunt două tipuri de celule, respectiv celule ciliate și secretorii.

Bătăile chinocililor antrenează lichidul cervical spre vagin. Celulele neciliate conțin importante cantități de granule secretorii ce se vor elibera în perioada de estru.

Spre deosebire de endometru, celulele secretorii nu alcătuiesc glande, însă numărul lor este foarte ridicat deoarece, în grosimea peretelui gîtului uterin sunt săpate excavații asemănătoare unei frunze de ferigă cu suprafața acoperită de mucoasă. Ele formează așa numitele cripte cervicale, clasificate în funcție de gradul ramificării, în cripte principale și secundare, realizîndu-se astfel o creștere importantă a suprafeței mucoasei cervixului.

Criptele cervicale sunt mai dezvoltate la vacă comparativ altor specii de animale. Mucoasa prezintă falduri înalte și groase la vacă și mult mai mici la oaie. Celulele de la baza faldurilor mucoasei și din criptele secundare reacționează mai intens la stimulul estrogenic din perioada estrală a ciclului sexual, decît celulele aflate mai aproape de lumenul cervixului (vîrful și laturile faldurilor mucoasei). Mucusul secretat de aceste celule (de la baza faldurilor), facilitează migrarea spermatozoizilor spre criptele primare și apoi, la locul de staționare în criptele secundare, datorită consistenței apoase.

Mucusul cervical conține lichid peritoneal, folicular, oviductal și endometrial, dar cel mai bine reprezentate cantitativ sunt secrețiile colului uterin. Chimic, acesta este format din macromolecule de mucine, care au în structură glicoproteine din grupul sialomucinelor. Procentual, în glicoproteine, glucidele reprezintă 75%, iar aminoacizii 25%. Secreția mucusului cervical este stimulată de hormonii estrogeni și inhibată de progesteron. Schimbările cantitative a proprietăților biofizice și biochimice ale mucusului cervical din timpul ciclului sexual crează, periodic, condiții favorabile de pătrundere a spermatozoizilor în conductul cervical. În stadiul de estru crește cantitatea de mucus și PH-ul, scade vîscozitatea și conținutul în celule descumante, condiții ce favorizează migrarea spermatozoizilor în căile genitale femele.

Sub influența estrogenilor, macromoleculele de glicoproteine ale mucusului cervical sunt orientate în așa fel încât, spațiile dintre ele măsoară 2-5 micrometri. În faza luteală a ciclului sexual, ochiurile plasei formate din macromolecule glicoproteice devin mai mici. Rezultă că spermatozoizii pot trece din vagin în cervix, iar în continuare, vor străbate cervixul printre macromoleculele glicoproteice, numai în stadiul de estru.

În timpul ciclului sexual, morfofiziologia cervixului și alte variații, sunt guvernate de hormonii estrogeni. Sub influența estrogenilor, în perioada estrală, celulele secretorii ale cervixului se măresc în volum și secretă cantități mari de mucus filant, care cristalizează sub formă de frunză de ferigă. În urma hiperemierii și edemației estrogenice, cervixul devine mai elastic, canalul cervical se permeabilizează, iar musculatura își mărește contractilitatea.

Progesteronul anulează modificările produse de estrogeni. Canalul cervical se îngustează treptat, devine rigid și apoi se închide, protejându-se cu un mucus vâscos.

Vaginul este compartimentul căilor genitale la nivelul căruia se derulează actul sexual și unde, la unele specii, este depus materialul spermatic în timpul ejaculării. În general vaginul nu are glande. Excepție face vaca, ce prezintă glande mucoide în partea craniană, lângă cervix.

Ca urmare a funcționării ciclului ovarian se produc modificări evidente, dar mai puțin ample comparativ celorlalte compartimente genitale, modificări care reflectă acțiunea estrogenilor și progesteronului. Estrogenii favorizează mitoză și proliferarea epiteliului, urmată de cheratinizarea celulelor superficiale.

Fluidul vaginal își are originea în transudatul vaginal, amestecat cu secrețiile glandelor sebacee și sudoripare. Acesta se amestecă cu mucusul cervical, endometrial, oviductal și celulele epiteliale vaginale descumate. În timpul estrului, vascularizația vaginei crește, iar ca urmare, fluidul vaginal se lichefiază. Unii autori menționează un anumit miros specific produs de vagină în perioada estrală, care permite depistarea femeii în călduri, de către masculii aflați chiar și la mare distanță.

Funcțiile vaginului sunt multiple. Conracțiunile vaginale joacă un rol major în inițierea ejaculării și în transportul spermei, fiind stimulate de fluidul precoital secretat de vagin. După ejaculare, plasma seminală rămâne în vagin, fiind eliminată sau absorbită de pereții acesteia.

Mulți dintre componenții plasmatici absorbiți exercită influențe fiziologice în altă zonă a căilor genitale femele. Cu toate că pH-ul vaginal nu este favorabil supraviețuirii spermatozoizilor (pH acid), interacțiunea complexă dintre mucusul cervical, secrețiile vaginului și plasma seminală, realizează un sistem de protecție, cu durata limitată, pînă cînd spermatozoizii migrează în cervix. Îngustimea canalului vaginal, proprietățile biochimice și microbiologice ale mediului din vagin, protejează căile genitale superioare împotriva populării cu microorganisme. Vaginul servește, de asemenea ca și conduct de eliminare a secrețiilor genitale (oviduct, uter, cervix).

Aceste funcții sunt realizate datorită schimbărilor morfologice, secretorii, biofizice și biochimice din timpul ciclului sexual, coordonate de hormoni steroizi ovarieni.

Căile genitale externe, formate din vestibulul vaginal și vulvă sunt de asemenea, influențate de steroizii ovarieni.

La nivelul vestibulului vaginal, acțiunea estrogenilor se manifestă preponderent asupra epiteliului, care este în continuare a epiteliului vaginal. Acesta proliferază, se edematiază, iar glandele Bartholin, avînd o structură tubo-alveolară asemănătoare glandelor bulbouretrale de la masculi, devin mai active, secretînd un lichid dens și lipicios.

Vulva în estru, are labiile tumefiate, congestionate și îngroșate iar clitorisul (organ erectil cu origine embrionară identică penisului de la masculi) se congestionează, delimitîndu-se clar de epiteliul vestibular. Modificările morfofiziologice ale căilor genitale externe, din stadiul de estru, sunt deosebit de importante pentru depistarea femelelor în călduri. Există, de la individ la individ, diferențe importante privind amplitudinea și dinamica acestor transformări. Sunt femele la care vulva se tumefiază accentuat și într-un ritm rapid. De obicei, ele manifestă și un instinct genezic pronunțat. La alte femele, din contră, edematizarea vulvei este slabă, iar dorința de împerechere ștearsă. Cauza aspectelor menționate sunt particularitățile genetice ale indivizilor și o serie de factori zootehnici cu acțiune asupra reproducției.

Ciclul sexual după fătare

Miclea V.și col.,Păcală N.și col au demonstrat că durata anaestrului postpartum este influențată de factorii genetici (specie, rasă, individ), furajare ,(mai ales conținutul rației în energie), durata alăptării, nivelul produc-

ției de lapte, frecvența mulsului. De asemenea, ritmul involuției uterine și al dezvoltării foliculilor ovarieni, cantitatea de gonadotropine hipofizare și sangvine, concentrația sangvină în hormoni steroizi și dinamica evoluției masei corporale, determină durata anestrului postpartum. La vacă, balanța energetică nutrițională din primele 20 zile de lactație este esențială pentru reluarea activității ovariene. Timpul necesar involuției uterine postpartum este de 4-6 săptămâni.

Cercetările au demonstrat că la toate femelele speciilor animalelor de fermă, anestrul de după fătare prezintă un stadiu estral infertil, slab exteriorizat.

Înțârcarea determină întreruperea anestrului și apariția căldurilor. Primul ciclu de după înțârcare este scurt, din cauza reducerii rapide a cantității de progesteron sangvin, grație imperfecțiunilor funcționale de la nivelul corpului galben. Astfel, suportul luteolitic nu este organizat corespunzător, celulele luteice nu au numărul de receptori LH necesari pentru o funcționare deplină, iar pe de altă parte, uterul începe secreția agentului luteolitic.

Alăptarea noilor născuți prelungește anestrul de după fătare, dependent de gradul de stimulare mamară prin supt, întreținerea și furajarea femelei din perioada gestației-lactației, etc. În etapa de început a alăptării, când frecvența supturilor este mare, nivelul sangvin de prolactină este ridicat și într-un raport invers proporțional cu cel al FSH și LH.

La vaci, intervalul dintre fătare și primul estru cu ovulație, este lung dacă animalul are potențialul genetic ridicat pentru producția de lapte și dacă nivelul acestuia este valorificat prin îngrijire și hrănire. Deoarece la începutul lactației producția de lapte este ridicată, cantitatea de hrană ingerată nu satisface necesarul productiv, apelându-se la rezervele interne ale organismului. Rezultă că influența potențialului genetic asupra duratei anestrului este mai ridicată decât creșterea producției de lapte printr-o furajare stimulative. Cu toate acestea, practicarea unei furajări echilibrate și în concordanță cu cerințele organismului favorizează reducerea duratei anestrului de după fătare. Chiar dacă inițial suptul induce creșterea cantitatea de prolactină din sânge, s-a observat grăbirea involuției uterine la vacile ce alăptează.

Durata anestrului după fătare mai este influențată de rasă și individ. S-a remarcat că la aceeași femelă, la fătări succesive se păstrează, o anumită constanță privind apariția primelor călduri.

Procentul de fecunditate este scăzut la primul estru postpartum, mai

ales la femelele care alăptează. Vacile au fertilitatea maximă la 60-90 zile după fătare.

Pe lângă modificările morfo - fiziologice, în timpul ciclului sexual apare și dorința de împerechere (căldurile).

Pentru determinarea în timp a duratei unui ciclu sexual, se ia criteriu prima zi de călduri și începutul căldurilor următoare, deoarece se poate observa cu ușurința comportamentul caracteristic femelei în călduri.

În funcție de modificările succesive care au loc la nivelul ovarelor și cailor genitale, precum și în comportamentul femelei, în timpul unui ciclu estral, se disting două faze și patru stadii (Miclea V.).

Faza foliculară corespunde perioadei de recrutare, selecție și dominanță foliculară. Modificările morfo-fiziologice ale cailor genitale și de comportament ale femelei sunt datorate hormonilor estrogeni secretați de foliculii antrali. Cuprinde stadiile de proestrul și estrul.

Faza luteală corespunde perioadei de formare și funcționare a corpului galben, fiind delimitată de ovulație și de regresia funcțională a corpului galben. Modificările morfo-fiziologice ale cailor genitale sunt dependente de progesteronul secretat de corpul galben. Cuprinde stadiul de metestrul.

Între faza luteală și faza foliculară a ciclului următor se interpune un stadiu de echilibru - diestrul.

Cele două faze ale unui ciclu estral (foliculară și luteală) sunt separate de ovulație.

Stabilirea stadiilor ciclului sexual se face pe baza datelor de evidență zootehnică, după comportamentul femelei, prin examen clinic intern și extern și prin examen citologic al frotiului vaginal.

La vacă, în timpul stadiilor ciclului sexual se produc următoarele modificări:

– Proestrul sau studiul premărgător căldurilor se caracterizează prin recrutarea valului de foliculii ovarieni și selecția unui folicul dominant (care va ovula), pe unul din ovare. Ovarul pe care se dezvoltă foliculul dominant este mărit în volum și are o consistență mai scăzută.

Coarnele uterine reacționează la palpare, devin ușor rigide. La examenul vaginal cu speculum, pliurile cervicale sunt ușor congestionate, umectate, iar canalul cervical este interdeschis, mucoasa vaginală este hiperemiată, umectată cu un mucus clar și puțin aderent. Frotiul efectuat din secreția vaginală evidențiază celule semicheratinizate, resturi de nuclei leucocite.

– Estrul este stadiul în care femelele manifesta căldurile (libidoul sau dorința de împerechere), datorita nivelului ridicat al concentrației estrogenilor înregistrat la sfârșitul proestrului. Temperatura corporală înregistrează o ușoară creștere.

Prin explorație transrectală, se constată o mărire în volum a ovarului pe care s-a maturat foliculul, care, la palpare, dă senzația unei vezicule subtenșiune, diametrul foliculului fiind de 15-20 mm. Consistența ovarului este mai scăzută, coarnele uterine sunt mai îngroșate, ușor deplasate anterior și se contractă la palpare.

La examenul vaginal cu speculum, cervixul apare congestionat, pliurile florii involte sunt edemațiate, canalul cervical este întredeschis și se prelinge un mucus transparent, filant. Mucusul este abundent și fluid la început, iar spre sfârșitul căldurilor devine vâscos și în cantitate mai mică. Cantitatea de mucus secretat în timpul unui ciclu estral poate ajunge la 800 ml, pH-ul secreției este cuprins între 6,5-7,5.

Vaginul are mucoasa congestionată, umedă și se observă destul de bine plexul venos vestibulo-vaginal. Frotiul vaginal prezintă celule epiteliale descuamate, cheratinizate, cu nuclee picnotice. Vulva este edemațiată, ușor congestionată.

– Metestrul sau post-estru este stadiul cel mai lung al ciclului sexual și corespunde perioadei de formare și funcționare a corpului galben. În acest stadiu, după 5-6 zile de la terminarea căldurilor, pe ovar se poate palpa corpul galben, coarnele uterine sunt îngroșate, dar nu mai reacționează la palpare. Canalul cervical este închis, iar mucoasa vulvo-vestibulo-vaginală și cervicală revine la culoarea roz-pal.

Diestrul constituie stadiul de liniște comportamentală și organică de echilibru hormonal, în care, pe suprafața ovarului se poate palpa un corp galben nefuncțional. Coarnele uterine au consistența cărnos-elastică. La examenul cu speculum vaginal, cervixul apare perfect închis, lipsit de mucus, mucoasa vaginală are o culoare roz-pal (figura 14.).

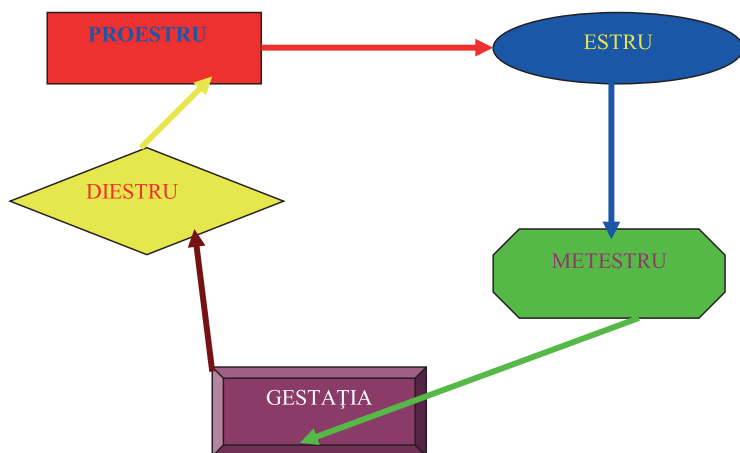


Figura14. Fazele ciclului sexual

Epiteliul oviductelor, endometrul (mucoasa uterină) și glandele uterine, activitatea secretorie a cervixului și mucoasa vaginală, în timpul ciclului sexual, trec prin diverse schimbări. Aceste schimbări au următoarele finalități: permit transportul și supraviețuirea spermatozoidelor și a zigoților, iar uterul asigura condiții pentru implantarea embrionilor.

Oviductul. Mucoasa este formată dintr-un epiteliu pseudo-stratificat, compus din două tipuri de celule: celulele ciliate care au rol în captarea și înaintarea ovocitei și celulele care secretă un lichid ce facilitează fecundația și furnizează un mediu nutritiv pentru spermatozoizi.

Uterul. În cursul ciclului sexual, uterul este supus unei succesiuni de influențe hormonale. Sub influența estrogenilor, endometrul se îngroașă datorită mitozelor, tubii glandulari se măresc, iar rețeaua vasculară se dezvoltă (faza proliferativă). Sub influența progesteronului, glandele uterine se alungesc și devin flexuoase, vasele sanguine se spiralizează, veziculele de glicogen migrează spre apexul celulelor secretorii și își deversează conținutul în lumenul glandular (faza secretorie).

În absența fecundației și implantării embrionului, nivelurile estrogenice și progesteronice scad, determinând deshidratarea și compactarea endometrială.

Vaginul. Mucoasa vaginală se reînnoiește la fiecare ciclu sexual. La debutul fazei foliculare epiteliul mucoasei nu are decât câteva straturi celulare. Sub acțiunea estradiolului, mucoasa se îngroașă ca urmare a diviziunii celulelor stratului bazal, după care celulele stratului superficial se chera-tinizează. Sub acțiunea progesteronului, diviziunile celulare încetează, iar celulele cheratinizate se descuamează.

Taurinele sunt animale poliestrice, la care căldurile se repetă ritmic pe tot parcursul anului. Păcală N. a demonstrat că, totuși, primăvara și toamna căldurile se manifestă mai intens. La vaci, durata ciclului sexual este în medie de 21 de zile, iar la vițele este de 20 de zile, cu variații între 18-24 de zile.

Proestrul are o durata de 3-4 zile iar estrul 18 ore. Durata metestrului este de 16-17 zile (de la ovulație pînă la involuția funcțională a corpului galben), iar diestru are o durată scurtă de 1-2 zile.

Ovulația la vacă este spontană, se produce, în medie, la 12 ore de la terminarea căldurilor.

La vaca, se observă variații sezoniere în ceea ce privește durata ciclului sexual și intensitatea manifestării estrului. Se consideră că toamna este sezonul cel mai favorabil reproducerii acestei specii, deoarece:

- *estrul* este mai dificil de observat iarna, pentru că durata sa este mai scurtă decât primăvara și toamna;
- *ciclurile lungi* (cu durata mai mare de 35 de zile) sunt mai frecvente în decembrie și mai rari în octombrie. Maximum de cicluri normale (21 de zile) se observă din iunie pînă în octombrie;
- *ciclurile scurte* (15-17 zile) reprezintă o situație considerată normală la vaci după fătare, iar la vițele în timpul primăverii și verii. Astfel după fătare primele cicluri sexuale sunt mai scurte cu 4-5 zile.
- *ciclurile foarte scurte* (10 zile) reprezintă un fenomen patologic, avînd ca extremă căldurile care pot deveni permanente (nimfomanie)
- *ciclurile lungi* (mai mari de 25 de zile) sunt adesea rezultatul unor re-sorbții embrionare, după o anomalie de fecundație. Semnalul embri-onar insuficient permite întîrzierea luteolizei fără să o împiedice, ceea ce amîină cu cîteva zile revenirea în călduri.

Cînd se constată cicluri sexuale foarte lungi, dublul sau triplul lui 21 de zile ele pot fi explicate, fie prin neobservarea manifestării unuia sau a doua estrusuri, fie prin absența manifestării căldurilor (călduri liniștite).

În timpul căldurilor, comportamentul vacilor și vițelilor apte pentru reproducere se caracterizează prin: neliniște, scăderea poftei de mâncare, sunt însetate, mugesc des. Dacă vacile sunt în lactație, scade cantitatea de lapte muls acesta își schimbă caracterele organoleptice și coagulează la fierbere.

În grajd, femelele în călduri sunt atente la cele mai mici zgomote. Întorc capul la intrarea persoanelor în adăpost, încetează rumegatul, defecă și urinează des.

La pășune sau în padoc vacile în călduri sunt în permanență mișcare, ling șira spinării, partea inferioară a gâtului, adulmecă vulva altor vaci, sar pe alte vaci și acceptă să fie sărite (foto 20).



Foto 20. Comportamentul vacilor în călduri

Vulva vacilor în călduri este ușor edemațiată, iar pe la comisura inferioară a vulvei se scurge un mucus filant transparent. La unele femele, datorită congestiei puternice a cailor genitale, se produc rupturi ale capilarelor sanguine (mici hemoragii) care imprimă mucusului de călduri o culoare roșietică. Acest aspect se întâlnește mai frecvent la tineret (hemoragii postestrle).

Păcală N. a stabilit că intensitatea cu care se manifesta căldurile depinde de modul de hrănire și întreținere, de starea de sănătate a animalelor

de anotimp și de individ. Femelele sănătoase, cărora li se asigura condiții bune de hrănire și de întreținere, manifestă regulat căldurile și au o fecunditate bună. Vara, la pășune, căldurile se manifestă mai intens decât iarna, în grajd.

Dacă vaca nu a rămas gestantă, căldurile se repetă la intervale de 18-24 de zile, în medie din 21 în 21 de zile. Dacă femela a rămas gestantă căldurile vor reapare numai după fătare. Nerepetarea căldurilor după montă sau însămintare, constituie primul indiciu că vaca este gestantă.

După fătare, la vacile care au fătat normal și sunt în stare bună de întreținere, căldurile pot să apară la 3-8 săptămîni. Perioada optima pentru admiterea la montă sau însămintare a vacilor este între 45 și 85 de zile de la fătare. Nu se recomandă amînarea montei sau însămintării artificiale după acest interval de timp, deoarece nu se mai poate obține un vițel pe an de la fiecare vaca (Stoica Aurelia și col.).

12. REGLAREA NEURO ENDOCRINA A CICLULUI ESTRAL

Hafez E.S.E. a demonstrat că complexul hipotalamo-hipofizo-ovarian depinde, în mare măsură, de nivelul hormonilor ovarieni (estrogeni și progesteroni), care influențează hipotalamusul și hipofiza. Acțiunea curentă a hormonilor sexuali asupra sistemului neuro-endocrin de control se realizează prin mai multe circuite de feed-back (retrocontrol) pozitiv sau negativ, prin circuite neuro-hormonale sau numai hormonale.

Bogdan A. și col.a demonstrat că hipotalamusul participă activ în controlul funcției hipofizare prin intermediul hormonului de eliberare a gonadotropinelor (GnRH), care ajunge în hipofiza anterioară prin intermediul sistemului port-hipotalamo-hipofizar. Secreția hipotalamică de GnRH este ciclică (înainte de ovulație) și tonica, bazală, independentă de stadiile ciclului sexual, care stimulează o eliberare hipofizară scăzută de FSH și LH. Secreția scăzută de gonadotropine, observată în timpul fazei luteale a ciclului sexual este rezultatul unei mai slabe receptivități a hipofizei la GnRH datorită dominanței progesteronice.

Estradiolul, la nivele circulante reduse, exercită un retrocontrol negativ asupra eliberării de LH. În lipsa progesteronului și în concentrații mari,

estradiolul exercită un retrocontrol pozitiv asupra hipotalamusului, induce peakul preovulator de LH (Miclea V.).

Progesteronul exercită un retrocontrol negativ asupra secreției preovulatorii de gonadotropine, datorita diminuării frecvenței pulsurilor de GnRH.

Luteoliza, indusa prin interacțiunea dintre $PgF_2\alpha$ uterină și ocitocina luteală, determină o scădere a progesteronemiei și, prin urmare, o creștere a frecvenței pulsurilor de GnRH. Sa stabilit (Miclea V și col.) că acesta determină o accelerare a secreției pulsative de gonadotropine și o stimulare a dezvoltării foliculilor, însoțită de creșterea secreției de estrogeni. Atunci când concentrația plasmatică de estrogeni este suficient, de crescută, aceștia pierd efectul lor inhibitor, în favoarea efectului de stimulare a centrului hipotalamic al ciclității (hipotalamusul anterior) și determină eliberarea preovulatorie de LH și FSH.

Evenimentele hormonale hipofizare și ovariene din timpul ciclului sexual pot fi următoarele:

- în primele zile de după pikul preovulator de FSH și LH (după ovulație), secreția acestor două gonadotropine este relativ ridicată. În secreția de FSH se constata un al doilea pik postovulator, iar secreția pulsativa de LH este încă foarte frecventa, datorită faptului că nivelul circulat al progesteronului este prea scăzut, pentru a executa un efect inhibitor asupra complexului hipotalamo-hipofizar. Se constată (Boitor I.) un nou val de creștere a foliculilor și, implicit, o secreție crescută de estradiol. Această secreție secundară de estradiol, de la mijlocul fazei luteale, nu poate induce secreția preovulatorie de LH, din cauza efectului inhibitor, din ce în ce mai puternic al progesteronului, secretat de corpul galben, în prima perioada de formare;

- creșterea progesteronemiei induce o scădere a frecvenței pulsurilor de LH, iar foliculii porniți în dezvoltare, în faza luteală, sunt stopați din creștere și urmează calea atreziei foliculare (Miclea V.);

- la sfârșitul fazei luteale, interacțiunea pozitivă dintre ocitocina secretată de corpul galben și $PgF_2\alpha$ uterină induce involuția corpului galben. Titrul plasmatic al progesteronului scade brusc, pulsurile de LH devin mai frecvente și rezultă o nouă creștere foliculara, care, în acest caz, poate fi dusă pînă la ovulație. Fiecare puls de LH este urmat de un puls de estradiol, care în final, determina apariția estrului și secreția preovulatorie de gonadotropine (LH și FSH).

FSH și LH pot exercita un retrocontrol negativ asupra propriilor eliberări, printr-un efect inhibitor la nivelul hipotalamusului. Acest feed-back scurt urmează o rețea vasculară ascendentă, inversa rețelei porte.

Vârsta apariției pubertății

Transformările somatice și fiziologice ale tineretului, în urma cărora dobîndesc aptitudinea de a se reproduce este **pubertatea** sau **maturitatea sexuală**. La bovine, aptitudinea de reproducere este atunci cînd tineretul atinge 40-55% din greutatea adultului, dar vițelele nu vor fi însămîntate decît atunci cînd au 380-400kg (Georgescu Gh.și col).

La femele, ovogeneza începe în perioada fetală, dar creșterea și maturarea foliculilor ovarieni începe la pubertate.

Greutatea corporala (dezvoltarea organismului) este mai importantă decît vârsta, fiind cea care influențează manifestarea primelor semne ale pubertății (Velea C.).

Indiferent de specie, nu se recomanda introducerea la reproducere a unei tinere femele decît atunci cînd a ajuns la 2/3 din greutatea adultului. Rasa și condițiile de întreținere au un rol foarte important în apariția pubertății. La vițele, primele ovulații pot să apară la vârsta de 8-10 luni, dar, în general, nu sunt însoțite de călduri, fiind considerate „ovulații silențioase”, deoarece nu sunt precedate de manifestarea estrului. Această pubertate ovariană este urmată la cîteva săptămîni sau luni de pubertatea comportamentală (ovulații precedate de călduri). Începînd cu aceasta perioada, în absența gestației a lactației sau a afecțiunilor genitale, ciclurile sexuale se repetă fără întreruperi pe întreaga perioadă fertilă a femelei.

Majoritatea vițelurilor din rasele de lapte sunt ciclice la vârsta de 15-18 luni, chiar și iarna, deoarece la aceste rase nu sunt variații sezoniere ale activității ovarelor.

La vițelele din rasele de carne și rasele rustice, influența sezonului este mai evidentă. La aceste femele, mature sexual la vârsta de 15-18 luni, se constată o încetare a funcției ovarelor la sfîrșitul iernii-începutul primăverii (anestiu sezonier), după care funcția de reproducere se reia în aprilie-mai.

Vârsta apariției pubertății este dependentă de factorii genetici, care sunt modulați de condițiile de mediu. Astfel, la vițelele întreținute în aer liber în timpul iernii, pubertatea apare mai tîrziu cu 4-7 luni comparativ cu vițelele întreținute în adăpost (Georgescu Gh).

Ugică V. a stabilit, că nivelul nutrițional are un rol important în apariția pubertății. Atunci când nivelul nutrițional este scăzut și viteza de creștere este mică, pubertatea întârzie. Vișelelor din rasele de lapte, pentru a nu se compromite funcția de reproducere, trebuie să li se asigure un spor în greutate de 700-800 g/zi. Ciclurile sexuale încep să se manifeste la pubertate, după care continuă sau sunt întrerupte de gestație - anestrul de gestație. Manifestarea ciclurilor sexuale este întreruptă și după fătare - anestrul post-partum sau anestrul de lactație.

Anestrul de lactație. Activitatea de reproducere nu se reia imediat după fătare (anestrul post-partum sau anestrul de lactație). Durata anestrului de lactație este cu atât mai lungă, cu cât stimulările glandei mamare sunt mai intense.

S-a constatat că alăptarea este cauza principală a acestei întârzieri. La vacă anestrul de lactație poate fi influențat de stimularea glandei mamare, precum și de nivelul producției de lapte și aportul alimentar.

La vacile lactante primele ovulații apar foarte devreme după fătare (în primele două săptămâni), dar, uneori, pot apărea foarte târziu (după 80 de zile). Majoritatea vacilor manifestă călduri după prima lună sau după o luna și jumătate de la fătare (30-45 de zile). În general, intervalul de timp de la fătare până la primele călduri este mai mare la vacile care alăptează (54 de zile), comparativ cu vacile înțarcate (30 de zile) (Păcală N.).

Absența comportamentului sexual în timpul anestrului postpartum nu semnifică, în mod obligatoriu, absența activității ovarelor. Păcală N. și col. au stabilit că prima, a doua și a treia ovulație sunt însoțite de estru în proporție de 20%, 40% și respectiv 62% din cazuri.

Primele ovulații, detectate prin endoscopie sau prin dozarea progesteronului nu sunt însoțite de manifestarea clinică a căldurilor (ovulații silențioase) și sunt prezente relativ devreme după fătare la vacile mulse și la cele care alăptează (13-15 zile).

Miclea V. și col. remarcă faptul că aceste ovulații sunt fecunde, dar perioada optimă pentru reluarea activității de reproducere este după 45 de zile (perioada în care uterul și-a reluat funcțiile) și nu mai târziu de 85 de zile, deoarece, în acest interval de timp, majoritatea vacilor lactante (85%) au activitate ovariană ciclică.

În fermele de vaci cu lapte, în scopul obținerii unui interval mediu între fătări de 365 de zile este necesar să se inducă și să grupeze căldurile

la vacile aciclice (cu anestru post-partum), prin procedee biotehnice. Acest obiectiv (365 de zile între fătări) este compatibil cu durata gestației, repausul uterin, durata lactației și cu repausul mamar și permite să se obțină în fiecare an fătarea și începutul lactației în aceeași perioadă (în funcție de obiectivele crescătorului) (figura 15).

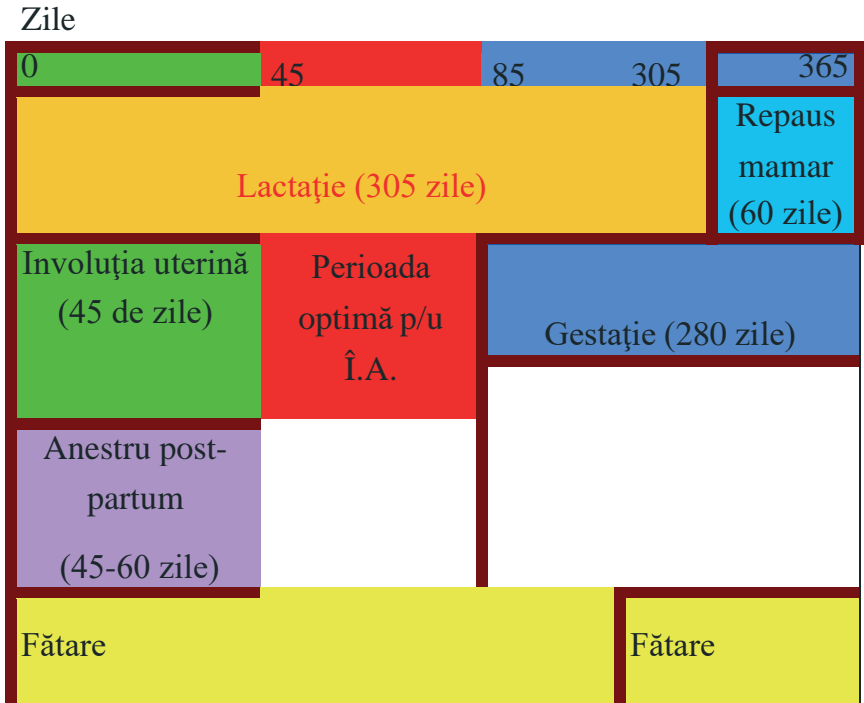


Figura 15. Durata principalelor stadii fiziologice ale ciclului generativ la vacă

Vacile cu potențial productiv ridicat sunt, în general, mai dificil de furajat la sfârșitul gestației și începutul lactației, fiind în același timp, și vacile care au cele mai mari dificultăți în reluarea funcției de reproducere după fătare.

În primele 50 de zile de lactație numai 20-25% dintre vacile cu producții mai mari de 27-30 kg lapte sunt ciclice, comparativ cu 64-70% dintre cele cu producții de lapte mai mici de 20 kg/zi (Tabelul 10).

Tabelul 10

Reluarea activității ovarelor după fătare în funcție de producția de lapte a vacilor (Chupin și Pelot)

Interval de timp după fătare (zile)	Producția de lapte (kg/zi)			Media
	< 20	20-27,5	> 27,5	
25-50 zile	64,2	52,2	25,0	48,9
50-80 zile	66,6	73,9	66,6	69,4

După 50 de zile de la fătare, activitatea ovariană devine independentă de nivelul producției de lapte.

Păcală N. afirmă că există o relație între aportul energetic al rației și performanțele de reproducție. Acest aport are un rol mai important decât aportul proteic al rației. O insuficiență energetică a rației, în perioada repausului mamar sau la începutul lactației, poate determina o întârziere a reluării activității ovarelor după fătare.

Un nivel productiv ridicat și o insuficiență energetică a rației favorizează hipoglicemia și perturbarea funcției ovarului. Dar este foarte important ca la sfârșitul gestației să nu se exagereze cu aportul energetic și proteic al rației, deoarece supra alimentația nu este benefică funcției de reproducere.

În ce privește mineralele, bilanțul fosforului și calciului nu trebuie să fie deficitar în timpul repausului mamar. Carențele în calciu și fosfor, de la începutul lactației, determină o scădere a fecundității. Un exces de fosfor poate avea un efect nefast, dacă bilanțul calciului nu este corect.

13. ETAPELE BIOTEHNOLOGIEI ÎNSĂMÎNȚĂRILOR ARTIFICIALE

Biotehnologia însămînțărilor artificiale cuprinde următoarele etape tehnologice:

1. Depistarea femelelor în călduri.
2. Manipularea spermei congelate.
3. Inocularea spermei (însămînțarea artificială).

Depistarea vacilor în călduri

Prin, ”călduri” se înțelege acea stare de agitație a femelelor, perioadă în care acceptă să fie montate de taur sau pot fi însămînțate artificial. Stadiul de călduri este perioada ciclului sexual cu cele mai semnificative modificări de comportament ale femelelor (foto.21).



Foto 21. Modificările de comportament ale femelelor în timpul căldurilor

Vulva vacilor în călduri este ușor edemațiată (umflată), iar pe la comisura inferioară se scurge un mucus filant, transparent. Dacă mucusul nu este „curat” (prezintă puroi), înseamnă ca uterul este bolnav (endometrită), iar vaca nu se va dirija la montă sau însămînțare, urmînd ca aceasta sa fie tratată de medicul veterinar.

Vacile care nu manifesta calduri în primele doua luni după fătare se vor examina de medicul veterinar și se vor trata corespunzător, în vederea reluării a funcției de reproducere.

Semnele manifestării căldurilor

În fermele de vaci cu lapte, realizarea principalilor indici de reproducție necesită multă experiență managerială, dar și conștiințiozitate în depistarea căldurilor și efectuarea la timp a însămînțării artificiale. Nedepistarea corectă a vacilor în călduri constituie un factor major al ratelor scăzute de gestație.

În vederea stabilirii momentului optim pentru însămînțare, este foarte important sa se cunoască semnele primare și secundare ale manifestării căldurilor.

Semnele primare. În timpul căldurilor, vacile sar pe alte vaci și accepta să fie sărite de alte vaci. O vaca este sigur în călduri atunci cînd stă nemișcată la încercările altor vaci de a o sări sau se mișcă ușor înainte, cu femela care o călărește (reflexul de imobilitate) (foto 22.).



Foto 22. Reflexul de imobilitate

Nu sunt în călduri vacile care pleacă repede atunci când sunt sărite de alte vaci. Pentru ca vacile sa-și poată exprima comportamentul caracteristic stadiului de călduri trebuie lăsate libere ca să interacționeze între ele. În timpul căldurilor, o vacă accepta sa fie “sărită” de 20-55 de ori. Fiecare săritură are o durată de 3-7 secunde.

Semnele secundare. Aceste semne se pot exprima înainte, în timpul sau după stadiul de călduri și nu sunt în relație cu momentul ovulației. Crescătorii de vaci trebuie să cunoască aceste semne pentru a urmări mai atent vacile și a observa apariția reflexului de imobilitate.

Vacile care exprimă semnele secundare de calduri pot fi izolate împreună cu vaci mai active sexual în călduri. Semnele secundare variază ca durată și intensitate în funcție de individ. Cele mai evidente semne secundare de călduri la vacă sunt:

Călăritul altor vaci. Vacile care exprimă acest comportament pot fi în călduri sau se apropie de stadiul de călduri. Acestea trebuie urmărite mai atent pentru a observa reflexul de imobilitate la călăritul altor vaci.

Mucusul de călduri este produs de gîtul uterin și se acumulează în vagin înainte, în timpul și la puțin timp după călduri. Șuvițe de mucus lungi, filante și limpezi atîrnă, în general, de comisura inferioară a vulvei. Uneori mucusul nu apare la exterior decît în timpul însămințării, când se efectuează masajul transrectal al aparatului genital. Mucusul mai poate păta coada, fesele sau regiunea perenială.

Edemul și hiperemia vulvei. În timpul căldurilor, vulva se edamațiază ușor (se umflă), iar mucoasa devine umedă și hiperemeată (roșietică). Aceste semene apar înainte de călduri, se mențin în timpul căldurilor și o perioadă scurtă după călduri. În faza luteală a ciclului estral (la mijlocul ciclului) labiile vulvei au o culoare roz-palidă și sunt ușor aderente între ele.

Mugetul, agitația și mișcarea permanentă. Vacile în călduri sunt mai agitate și atente la tot ce le înconjoară. Atunci când sunt lăsate libere împreună cu alte vaci, vacile care sunt în călduri și cele care urmează să între în călduri (sfîrșit de proestru) urmăresc insistent din spate alte vaci și încearcă să le încalce. Vacile în călduri se odihnesc mai puțin, rămîn nemișcate și atente, în timp ce vacile nu sunt în călduri se așează și se odihnesc.

În timpul căldurilor, vacile mugesc mai frecvent. Cu toate că acestea nu sunt semne sigure de călduri, vacile care exprimă un astfel de comportament trebuie urmărite mai atent pentru a le depista în călduri.

Părul zburlit la baza cozii și flancurile murdare. Ca o consecință a căldurilor părul de la baza cozii și de pe crupă poate fi zburlit sau turtit, uneori se vede pielea. Picioarele și flancurile pot fi murdare cu noroi sau bălegar.

Sprjinirea bărbiei pe spatele altor vaci. Înainte de călărit vacile adoptă o poziție paralelă inversa și sprijină sau freacă bărbia de crupă sau spatele vacii care urmează să fie călărite. Acesta este un semn de acceptare a călăritului. Ambele vaci trebuie urmărite îndeaproape pentru a stabili momentul exact al căldurilor (reflexul de imobilitate). (foto 23).



Foto 23. Sprjinirea bărbiei pe spatele altor vaci

Adulmecarea organelor genitale ale altor vaci se manifestă mai frecvent la vacile în proestrul (înainte de călduri) și în călduri.

Ridicarea capului și a buzei superioare urmează în general, după adulmecarea organelor genitale, fiind mai frecvente dacă vaca urmărită este în călduri și urinează.

Scăderea consumului de hrana și a producției de lapte. Vacile în călduri petrec mai puțin timp hrănindu-se. Studiile au demonstrat o producție mai mică de lapte în timpul căldurilor. Dar sunt și alți factori, în afară de

călduri, care pot determina scăderea producției de lapte într-o anumită zi. Deci, acesta nu este un semn sigur de călduri.

Hemoragia postestrală. Unele vaci și majoritatea vițelilor pot elimina un mucus cu sânge la 1-3 zile după călduri. Această hemoragie arată că vaca a fost în călduri, urmările sunt destul de variabile, ceea ce înseamnă că vaca însămințată poate rămîne gestantă.

Într-o ferma de vaci cu lapte, pentru ca activitatea sa fie profitabilă, este nevoie de multă pricepere în depistarea femelelor în călduri și stabilirea momentului optim pentru efectuarea însămințării artificiale. Factorul limitativ al programelor de însămintare artificială îl constituie eficiența depistării vacilor în călduri.

Diverse studii au arătat ca, în fermele cu efective mari de vaci, nu sunt depistate aproximativ jumătate din căldurile manifestate iar cca 15% din vacile propuse pentru însămintare nu sunt de fapt în călduri. Nedepistarea vacilor în călduri determină pierderi economice pentru crescătorul de vaci, datorita măririi intervalului dintre fătări. S-a calculat că, dacă se compară o vacă cu producția anuală de 8000kg de lapte și cu interval între fătări de 12,5 luni, cu o vacă ce are aceeași producție de lapte, dar cu un interval de 13,5 luni între fătări (un ciclu de călduri pierdut), se înregistrează o pierdere de 35-45 dolari/vacă/an, în funcție de prețul laptelui și al furajelor (după Dairy Herd – SUA).

În vederea unei depistări cât mai eficiente a vacilor în călduri, este important să se cunoască semnele primare și secundare ale căldurilor. În scopul depistării vacilor în călduri, este necesară o observare atentă și continuă a efectivului de vaci. Există momente favorabile pentru depistarea vacilor în călduri (dimineața și seara), precum și anumite locuri de depistare (spațiile de odihnă). În practică, vacile în călduri sunt depistate de două ori pe zi, dimineața și seara.

Cele mai mari șanse de depistare a vacilor în călduri sunt atunci cînd se fac trei observații pe zi, cîte 30 de minute (dimineața devreme, după masă și seara tîrziu, după apusul soarelui), în afara perioadelor de furajare și de muls. Rezultatele obținute sunt diferite, în funcție de numărul observațiilor zilnice (tabelul 11).

Tabelul 11

Ratele de depistare a vacilor în călduri, în funcție de numărul observațiilor zilnice (prelucrare ge autori)

Momentele observării caldurilor	Dimineața	Dimineața și seara	Dimineața, după masă și seara
Ratele de depistare a căldurilor (%)	56,0	79,0	80,0-100,0

Căldurile la vacă au particularitatea că sunt scurte. Durata medie a căldurilor la vacile adulte este de 18 ore, iar la vițele de 15-16 ore. La 30% dintre vaci, durata medie a căldurilor este mai mică de 12 ore. La aproximativ două treimi dintre vaci, căldurile apar noaptea și, ținând seama de durata scurtă, pot trece neobservate între mulsul de seară și cel de dimineața (Tabelul 12). De aceea, se impune o foarte mare atenție pentru observarea acestora, deoarece un ciclu “sărit” face să se piardă 3 săptămîni și, uneori, nu se mai poate obține o fătare pe an, așa cum este de dorit.

Se observă că cele mai multe vaci (43,0%) manifestă căldurile în cel mai inconvenabil moment al zilei (orele 24-6). Acest fapt este considerat ca o cauză majoră a eșecurilor în depistarea vacilor în călduri, la care se adaugă și durata scurtă a căldurilor la unele vaci (sub 12 ore).

Tabelul 12

Momentul debutului manifestării estrului la vaci (după Universitatea Cornell, SUA)

Perioada zilei (orele)	Vaci care manifestă călduri (%)
6,00-12,00	22,0
12,00-18,00	10,0
18,00-24,00	25,0
24,00-6,00	43,0

O parte din vacile care manifestă căldurile în intervalul orelor 24,00 și 6,00 pot fi depistate pe baza semnelor secundare care pot apare înainte, în timpul sau după stadiul de acceptare a montei (călărit). Astfel, în timpul

depistării din seara precedentă sau dimineața zilei următoare pot fi observate unele vaci care manifestă dorința de a încăleca alte vaci, chiar dacă nici una nu acceptă; au părul zburlit pe crupă sau au noroi pe spate, ceea ce dovedește că alte vaci au încercat să le călărească; se mișca mult; mugesc des; se plimbă pe lângă gardul padocului; adulmecă alte vaci; au fesele sau spatele pătat cu mucus de calduri. Aceste vaci sunt pe cale să intre în calduri, sunt în călduri sau au depășit de puțin timp stadiul de acceptare (imobilitate la călărit).

Mucusul hemoragic poate apare la 1-3 zile după terminarea căldurilor; femelele vor fi înregistrate și se vor aștepta căldurile următoare după 17-21 de zile.

Evaluarea eficienței depistării vacilor în călduri

Eficiența depistării vacilor în călduri este definită ca proporția vacilor depistate în călduri, într-un anumit interval de timp, dintr-un lot de vaci destinat însămîntării artificiale. Există o diferență între exactitatea și eficiența depistării căldurilor. Depistarea inexactă a vacilor în călduri se referă la faptul că vacile sunt însămîntate, dar nu sunt în călduri. Depistarea ineficientă a căldurilor se referă la căldurile manifestate, dar neobservate.

Principalii parametri ai eficienței depistării căldurilor sunt:

- 85% dintre vaci să fie depistate în călduri pînă la 60 de zile de la fătare;
- intervalul de la fătare pînă la primul estru să fie mai mic de 75 de zile;
- cel puțin 60% dintre vaci să aibă un interval mediu între călduri de 18-24 de zile;
- maximum 25% dintre vaci să aibă un interval mediu între călduri mai mare de 30 de zile.

Ratele de depistare a căldurilor

Testul de 24 de zile. Vacile incluse în acest test trebuie să fi fătate cu cel puțin 45 de zile înainte, să nu aibă tulburări ale funcției de reproducere (ovare chistice, endometrite, etc.) și să manifeste căldurile ciclice. Acestea vor fi observate dacă manifestă căldurile într-o perioadă de 24 de zile (durata maximă a unui ciclu sexual normal).

Varianta I. La sfîrșitul acestei perioade, numărul vacilor depistate în călduri se împarte la numărul vacilor din lot și se înmulțește cu 100. Exemplu: dacă proprietarul a avut sub observație 30 de vaci, dar numai 10 au fost depistate în călduri în 24 de zile, rata de depistare este de $10:30 \times 100 = 33\%$.

$$\text{Călduri depistate (\%)} = \frac{\text{nr. vaci observate în călduri}}{(\text{total zile vacă din perioadă} : 21)} \times 100$$

Exemplu: dacă într-o perioadă de 24 de zile, dintr-un grup de 40 de vaci, 20 au fost observate în călduri, rata depistării căldurilor se calculează astfel:

$$\text{Călduri depistate} = \frac{20}{(40 \times 24)} \times 100 = 43,7\%$$

Ratele de depistare a căldurilor însămînțabile

Căldurile însămînțabile sunt căldurile care se manifestă după terminarea perioadei voluntare de așteptare. *Perioada voluntară de așteptare* (PVA) este intervalul de timp de la fătare pînă în momentul în care proprietarul sau managerul dorește să însămînțeze vaca.

Numărul căldurilor însămînțabile poate fi estimat după relația:

$$\text{Călduri insamîntabile} = \frac{\text{Media zilelor deschise} - (PVA + 10)}{21} + 1$$

Daca PVA este de 50 de zile, primul estru însămînțabil după 50 de zile ar trebui sa fie depistat, în medie, la 60 de zile după fătare (10 reprezintă jumătate din durata medie a unui ciclu sexual). Zilele deschise reprezintă intervalul de timp de la fătare pînă la însămînțarea fecundă (repausul uterin).

Proporția căldurilor însămînțabile depistate

$$\text{Călduri însămînțabile depistate (\%)} = \frac{\text{depistarea căldurilor vacă}}{\text{călduri însămînțabile}} \times 100$$

Pentru ca acest indice să fie cât mai exact, trebuie înregistrate toate căldurile observate. Proporția căldurilor însămișnabile nu este afectată de rata concepției sau de decizia de a amîna însămișnarea unor vaci.

Factorii care influențază comportamentul vacilor în călduri

Diferiți factori legați de mediul înconjurător, sănătatea și nutriția vacilor, precum și celelalte vaci din cireadă pot influența comportamentul vacilor în călduri.

Tipul adăpostului. Tipurile de adăpost, care permit vacilor să interacționeze între ele în timpul zilei, oferă mai multe ocazii pentru exprimarea comportamentului de călărit și de imobilitate la călărit. Adăposturile închise, cu legarea vacilor la stand, îngreunează exprimarea comportamentului de călduri.

Pardoseala. Săriturile sunt mai puțin frecvente în zonele cu pardoseli de beton, comparativ cu zonele din pămînt. În cazul adăposturilor deschise, betonul alunecos și zonele cu gheață constituie impedimente în exprimarea comportamentului de călduri al vacilor.

Afecțiunile ongloanelor și picioarelor. Vacile cu picioare sau ongloane bolnave sau cu structură slabă a ongloanelor au o activitate de călărit mai redusă. De multe ori acceptă să fie călărite, chiar dacă nu sunt în călduri, deoarece este prea dureros să evite săritul altor vaci.

Densitatea vacilor din adăpost. Dacă sunt cazate prea multe vaci într-o boxă, activitatea de călărit a vacilor în călduri poate fi inhibată sau unele vaci pot fi forțate să accepte călăritul, chiar dacă nu sunt în călduri. În adăposturile deschise, supraaglomerate, unele vaci acceptă să fie călărite, în adăpost sau pe alei, deoarece nu pot evita vacile active sexual (în călduri).

Temperatura ambiantă. Unele studii au arătat că, atunci cînd temperatura zilei este de pînă la 24°C, călăritul vacilor în călduri este mai frecvent. Dar, la temperaturi mai mari de 30°C, dincolo de confortul termic, scade frecvența călăritului. În sezoanele mai reci, activitatea de călărit a vacilor în călduri este mai frecventă, decît în sezoanele cu caniculă. În zilele caniculare, vacile în călduri exprimă mai mult semnele secundare de călduri (linsul, sprijinirea bărbiei pe spatele altor vaci, etc.).

Perioada zilei. În timpul unei zile, se observă că majoritatea săriturilor au loc dimineața devreme și seara tîrziu. Studiile de monitorizare a mani-

festării estrului, pe un interval de 24 ore, au arătat că cca 70% din sărituri au avut loc între orele 19 și 7. Aceste observații sugerează faptul că, vacile exprimă comportamentul de călărit atunci când nu sunt deranjate de activitățile din fermă (furajare, mulș și curățirea adăpostului). De asemenea, vacile în călduri preferă să călărească alte vaci în perioadele mai răcoroase ale zilei (noaptea).

Statusul reproductiv al vacilor din turmă. Se pune problema dacă stadiul ciclului sexual al celorlalte vaci din cireadă influențează comportamentul vacilor în călduri. În grupele de vaci ciclice, s-a studiat comportamentul de călărit și proporția vacilor în călduri. Vacile care sunt la mijlocul ciclului estral (zilele 10-15) au avut cel mul o săritură în perioada de observație și au interacționat slab cu cele în călduri. Vacile în estru au avut, în medie, 2,5 sărituri. De aceea, ratele de depistare a căldurilor depind de numărul vacilor active din cireadă. Atunci când numărul de vaci din lot este mic sau numărul vacilor gestante este mai mare, devine foarte dificil de depistat vacile în călduri, mai ales a celor cu călduri liniștite, deoarece se reduc posibilitățile de interacționare a vacilor.

Factorii nutriționali. Semnele manifestărilor căldurilor, în special comportamentul de călărit, scad în intensitate la vacile care pierd mult în greutate după fătare. Într-o cireadă, poate exista situația în care majoritatea vacilor să fie în anestrul prelungit după fătare. Cauzele probabile ale anestrului sunt: slăbirea accentuată a animalelor, infecțiile uterine, ovarele chistice sau bolile parazitare.

Măsuri manageriale care ușurează depistarea vacilor în călduri

Pentru depistarea eficientă a vacilor în călduri, sunt necesare următoarele practici manageriale:

– Să poată interacționa între ele, în special în timpul serii și dimineața devreme. Adăposturile cu stabulație liberă oferă un timp mai îndelungat ca vacile să interacționeze. În cazul sistemului de întreținere legat, vacile se scot afară de două ori pe zi, timp de 20-30 minute, atunci când există timp suficient ca să fie observate. Se evită observarea vacilor în timpul hrănirii sau în perioadele fierbinți ale zilelor de vară.

– Zonele alunecoase sau noroioase din adăpost sau padoc inhibă activitatea de călărit a vacilor. Vacile care urmează să intre în călduri se țin în locuri cu suprafața aderentă și cu puține obstacole, ca să permită mișcarea acestora.

– Mutarea vacilor într-o zonă separată pentru depistarea căldurilor poate stimula comportamentul de călduri.

– În grupele mai mari de vaci, cele care sunt în proestru sau în estru au tendința să stea împreună.

– Afecțiunile picioarelor și ale ongloanelor inhibă manifestarea semnelor de călduri și îngreunează depistarea vacilor în călduri. De aceea, este necesară scurtarea periodică a ongloanelor și tratarea afecțiunilor picioarelor.

– Când lucrează mai multe persoane într-o fermă, se va responsabiliza o anumită persoană pentru depistarea vacilor în călduri. Ceilalți angajați trebuie să cunoască semnele de călduri și să informeze la timp persoana responsabilă, atunci când observă vaci care manifestă semnele de călduri.

– Pentru a se evita greșeli de identificare a vacilor, se vor folosi medalioane cu numere vizibile, crotalii mari în urechi sau criomarcarea.

– Se vor înregistra toate vacile care manifestă călduri, chiar dacă nu se însămânțează toate. Căldurile următoare pot fi anticipate, iar depistarea va fi mult ușurată. Toate informațiile despre manifestarea căldurilor vor fi înregistrate într-un „Registru de însămînțări artificiale”. Înșămînările din registru permit monitorizarea ciclurilor cu lungime anormală și a intervalelor lungi de la fătare pînă la primul estru sau pînă la prima însămînțare artificială.

– Vacile care sunt cunoscute că au „călduri liniștite” (manifestă slab semnele clinice ale căldurilor) necesită o supraveghere permanentă sau se vor izola împreună cu o vacă aflată în călduri, ca să poată exprima mai ușor comportamentul de călduri.

– În perioada repaosului mamar, vacile vor fi hrănite conform normelor, în așa fel încît la fătare să aibă o stare bună de întreținere, iar în timpul lactației pierderile în greutate să fie minime.

Stabilirea momentului optim pentru însămînțare

Momentul însămînțării artificiale trebuie foarte bine ales. Vaca sau vițica va rămîne gestantă numai dacă însămînțarea se efectuează în timpul manifestării căldurilor.

Durata medie a căldurilor este de 18 ore, dar poate varia între 12 și 30 de ore, în funcție de individ, sezon și de sistemul de întreținere. Ovulația se produce în medie la 12 ore de la terminarea căldurilor.

Fecunditatea maximă se obține atunci cînd vacile sunt însămînțate aproape de sfîrșitul stadiului de călduri, adică la circa 12-18 ore de la începutul căldurilor. Acest interval de timp este necesar maturării funcționale a spermatozoizilor.

Fecundația scade ușor, atunci cînd vacile sunt însămînțate la începutul căldurilor sau după terminarea căldurilor și scade semnificativ, atunci cînd însămînțarea se efectuează la mai mult de 12 ore de la terminarea căldurilor.

Spermatozoizii trebuie să stea în căile genitale ale femelei în călduri cca 6 ore pentru a fi capabili să fecundeze ovocita (să se capaciteze). Viabilitatea spermatozoizilor în căile genitale femele este de cca 18-24 de ore. Manipularea necorespunzătoare a materialului seminal congelat sau tehnica defectuasă de însămînțare artificială poate reduce semnificativ numărul spermatozoizilor viabili și rata fecundității.

După ovulație, ovocita ajunge foarte repede în oviduct. Viabilitatea ovocitei este de 10-20 ore, dar este aptă pentru o fecundație normală în primele 8-10 ore de la ovulație. Mortalitatea embrionară crește foarte mult dacă fecunditatea se produce după acest interval. De aceea, spermatozoizii capacitați trebuie să se găsească în oviduct cu puțin timp înainte de ovulație.

Însămînțarea artificială a vacilor se efectuează conform unei reguli: vacile observate în călduri dimineața se însămînțau după masă, iar cele observate după masă se însămînțau a doua zi dimineața.

La stabilirea acestei reguli au stat rezultatele diverselor experimente, care au arătat că:

- ratele cele mai ridicate de fecunditate (75,0-82,5%), în raport cu manifestarea căldurilor (reflexul de imobilitate), se obțin atunci cînd vacile sunt însămînțate în a doua jumătate a stadiului de călduri, cu condiția că depistarea căldurilor să se efectueze dimineața, la prînz și seara, timp de cel puțin 30 minute (tabelul 13).

Tabelul 13

Ratele de gestație în funcție de momentul însămînțării, în raport cu manifestarea căldurilor (după Păcală N.)

Momentul Î.A.	Femele gestante (%)
Începutul estrului	44,0
Mijlocul estrului	82,5
Sfârșitul estrului	75,0

- cea mai ridicată fecunditate (57,1-85,7%), în raport cu momentul ovulației, se obține atunci când vacile sunt însămînțate cu cel puțin 6 ore și nu cu mai mult de 24 de ore înainte de ovulație (tabelul 14). Ovulațiile au fost înregistrate în medie de la 10,5 ore (3-18 ore) de la terminarea căldurilor (27,6±5,4 ore de la începutul căldurilor).

Tabelul 14

Ratele de gestație în funcție de momentul însămînțării, în raport cu momentul ovulației (după N. Păcală)

Momentul Î.A.	Femele gestante (%)
Cu 24 de ore înainte de ovulație, dar în timpul căldurilor	53,3
13-18 ore înainte de ovulație	85,7
7-12 ore înainte de ovulație	78,6
6 ore după ovulație	40,0
12 ore după ovulație	25,0

Această metodă de însămînțare, în funcție de comportamentul vacii, este foarte răspîndită, propunîndu-se și un ghid pentru identificarea vacilor în călduri și stabilirea momentului optim pentru însămînțare. (fig. 16.)

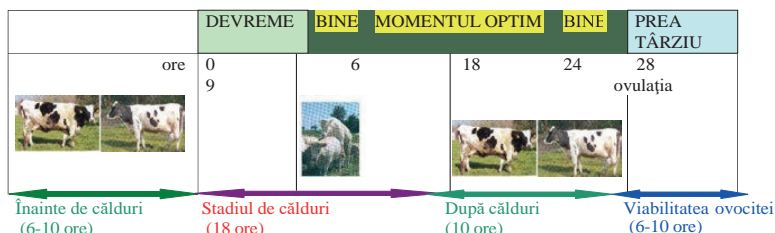


Figura 16. Ghid pentru stabilirea momentului optim de însămînțare artificială la vacă

Momentul optim de însămînțare la vaci și vițele se poate stabili și prin palparea transrectală a foliculului ovarian, cît și prin măsurarea rezistenței electrice a mucoasei vaginale, cu ajutorul unui ohmetru. Însămînțarea se va efectua atunci cînd rezistența electrică este de 30-40 ohmi.

Tehnica însămînțării artificiale

Inocularea spermei congelate în paiete, cu ajutorul pistolului de însămînțare, este cunoscută frecvent sub denumirea de *Metoda recto-vaginală* sau *Metoda bimanuală*. Etapele însămînțării artificiale prin metoda recto-vaginală sunt:

- pregătirea vacii pentru însămînțare;
- decongelarea paietelor cu material seminal;
- pregătirea pistolului de însămînțare;
- însămînțarea propriu zisă.

Pregătirea vacii pentru însămînțare

- Vaca se conționează (leagă) în adăpost, în sala de însămînțare sau într-un loc cunoscut de aceasta, evitîndu-se factorii stresanți;
- Se va examina femela, pentru a fi siguri că este în momentul optim de însămînțare (*sperma se va decongela numai după conțenția și examinarea vacii*);
- Se golește rectul de materiile fecale;
- Regiunea vulvară trebuie bine curățată și ștearsă cu un prosop uscat, pentru a preveni contaminarea căilor genitale (spălarea se recomandă numai dacă animalul este foarte murdar);

Monta

- Monta la animalele de fermă este definită ca fiind împreunarea a doi indivizi de sex opus. Se poate realiza numai dacă masculul manifestă instinct genezic, prezintă potență sexuală, iar femela este în călduri. Actul monei, în practică, are diferite denumiri populare în funcție de specie. La taurine se numește gonit, la suine – vierit la ovine – mîrlit, la caprine – pîrcit, la păsări – călcat.
- În urma monei masculul depune materialul spermatic (ejaculatul) în-

tr-un compartiment specific al căilor genitale femele care este cel mai favorabil pentru realizarea fecundației.

Tipuri de însămînțare natural

- După locul unde masculul depune sperma în timpul actului sexual (montei) se deosebesc grupe de animale cu tip de însămînțare: vaginal, uterin și tubar (oviductal).
- Animalele de tip de însămînțare vaginal sunt vaca, oaia, capra, cățeaua și iepuroaica. La aceste specii în momentul ejaculării, sperma este proiectată, de regulă, vaginal profund. Actul sexual este caracterizat prin: durată scurtă, ejaculare imediată după introducerea penisului în vagin, volum redus al ejaculatului și densitate ridicată. Păstrarea viabilității spermatozoizilor în vagin este dificilă datorită diferiților factori nefavorabili existenți. Ca urmare, separarea spermatozoizilor de plasma spermatică și migrarea spre gîtul uterin trebuie să înceapă imediat. Alături de mișcări proprii, la migrare contribuie contracțiile uterine.
- Animalele de *tip însămînțare uterin* sunt iapa și scroafa. Aceste specii prezintă actul sexual lung, volum mare a ejaculatului, număr de spermatozoizi redus pe unitatea de volum, dar deosebit de ridicat în total ejaculat. Depunerea spermei în uter se face direct la suine, adică glandul penian este în cavitatea uterină în timpul ejaculării și prin suprapunerea glandului penian foarte dezvoltat peste deschiderea largă a cervixului, la cabaline. În acest ultim caz, materialul spermatic este proiectat sub formă de jeturi în uter, iar mișcările de pistonare peniene împing spre gîtul uterin eventualele cantități de spermă depuse inițial în vagin. Volumul mare de spermă ejaculată sub formă de jeturi constituie un factor care mărește durata actului sexual.

Sisteme de montă

În practica creșterii animalelor se cunosc două sisteme de montă: liberă și dirijată.

- Monta liberă constă în întreținerea masculilor împreună cu femelele, acestea fiind montate pe măsură ce intră în călduri. Este un sistem puțin răspîndit (exceptînd unele specii de animale), deoarece prezintă multe dezavantaje: nu se cunoaște data montei și paternitatea produsului, se

produce epuizarea unor masculi prin efectuarea de monte repetate la aceeași femelă, se facilitează transmiterea de boli.

- Principalele avantaje ale montei libere sunt urmare a prezenței masculului între femele, ceea ce permite descoperirea la timp a declanșării căldurilor și efectuarea unor monte repetate. Ca urmare se realizează procente ridicate de fecunditate. Cu toate dezavantajele monta liberă se mai practică în creșterea excesivă a ovinelor.
- *Monta dirijată*, numită și monta la mână, se face sub supravegherea omului care realizează întâlnirea dintre femela în călduri și masculul destinat să o monteze. Rezultă că cei doi parteneri sunt aleși de crescător pe baza unor criterii zootehnice, realizându-se așa numita *potrivire a perechilor*. Cu acest prilej se apreciază și starea de sănătate a organelor genitale a celor două sexe pentru a se evita transmiterea de boli. Monta dirijată cunoaște două variante: monta ambulantă sau rulantă și monta cu sediul fix.
- Monta ambulantă este puțin răspândită.
- Monta cu sediul fix numită și monta la grajd se efectuează de masculii grupați în stațiuni de montă. În unele ferme zootehnice cu efectivemari, masculii sunt în același adăpost cu femelele, dar în boxe separate. Pe măsură ce femelele intră în călduri, masculii repartizați să le monteze se scot la standul de montă pentru vaci. Acest sistem evită inconveniente zootehnice, sanitar veterinar și economice, menționate la monta liberă, fapt pentru care se practică pe scară largă în zonele și speciile de animale unde nu a pătruns însămînțarea artificială.

Pentru desfășurarea unei activități de reproducție eficiente, prin sistemul de montă dirijată, se impune luarea din timp a unor măsuri organizatorice care se referă la conducerea activităților din stațiune și întreținerea reproducătorilor. *Stațiunea de montă* se va dota cu reproducători masculi de înaltă valoare biologică și reproductivă, sănătoși, în număr corespunzător efectivului de femele ce se găsesc în zona de activitate. Utilajele necesare desfășurării montei ca: stand de montă pentru taurine, inele nazale, bastoane de condus etc., vor fi repartizate și completate la nivelul intensității maxime al activității care urmează să se desfășoare.

Reproducătorii vor fi supuși, cu o lună și jumătate sau două luni înaintea începerii campaniei de montă, unei pregătiri speciale, printr-o alimentație care să stimuleze formarea spermei și îngrijire corespunzătoare.

Periodic se urmărește calitatea spermei și afecțiunile podale, respectiv ale aparatului genital. Animalele care suferă de anumite afecțiuni vor fi triate și tratate, iar cele cu boli incurabile se înlătură de la reproducție.

Fiecare femelă adusă în stațiune de montă va fi supusă unui examen clinic înlăturându-se cele bolnave.

Obținerea de rezultate favorabile în activitatea de montă este legată de utilizarea masculilor și femelelor la reproducție numai după ce au ajuns la o vîrstă optimă, reproducătorii să corespundă genotipic și fenotipic exigențelor crescătorilor, iar alimentația să le asigure permanent condiția de reproducție.

Transportul spermatozoizilor în căile genitale femele

Pentru fertilizare, gameții ajunși în căile genitale femele suferă, pînă la întîlnirea lor, o serie de modificări. Durata păstrării capacității fecundante a gameților este scurtă și caracteristică. Indiferent de specie, spermatozoizii depuși, într-un număr foarte mare, în vagin sau uter, rămîn funcțional activi mai multe ore decît ovulele. Viabilitatea, relativ scurtă a gameților face ca fertilizarea să fie posibilă numai dacă spermatozoizii sunt depuși, iar ovula captată de căile genitale femele încît să se realizeze sincronizarea transportului pentru ca întîlnirea lor să se producă într-un anumit comportiment al oviductului. La majoritatea femelelor speciilor de fermă, depunerea spermatozoizilor precede captarea ovulei.

Locul depunerii spermei, în urma împerecherii, este caracteristic speciilor de animale domestice. La vacă și oaie ejaculatul redus cantitativ (are puțină plasmă seminală), dar dens, este depus în partea anterioară a vaginului lîngă deschiderea vaginală a cervixului. Armăsarul, cu toate că produce o cantitate ridicată de material spermatic, o ejaculează sub formă de jeturi în vaginul larg deschis peste care s-a suprapus glandul penian atît de dezvoltat.

Suinele și-au dezvoltat complementar mucoasa uterină și glandul penisului, asigurîndu-se astfel condițiile unei ușoare rețineri a penisului în timpul copulației pentru depunerea uterină a materialului spermatic deosebit de voluminos.

Spermatozoizii părăsesc rapid vaginul sub influența stimulative a secrețiilor acesteia din timpul monte și a componentelor plasmei spermatice. Rămînerea în vagin mai mult de 1-2 ore, conduce la imobilizarea lor de către secrețiile acestui compartiment genital. Trecerea spermatozoizilor în

cervix se realizează prin mișcările proprii și contracțiile cervicale. Plasma seminală are un rol important în susținerea fiziologică a spermatozoizilor și implică a deplasării lor spre cervix.

În transportul spermatozoizilor se cunosc trei posibilități: transportul rapid, colonizarea rezervelor, respectiv eliberarea lentă din rezervoare și transportul spre oviduct.

Transportul rapid. Imediat după ejaculare o parte dintre spermatozoizi străbat structura micelară a mucusului cervical, pătrunzând în canalul cervical. Această fază durează 2-10 minute. Intrarea în canalul cervical este facilitată de capacitățile cinetice proprii spermatozoizilor și creșterea activității contractile a miometrului, respectiv mezosalpinxului din timpul preludiului și a ciclului sexual. Aceștia străbat contractul cervical în 1,5-3 minute putând ajunge, în scurt timp, în ampula oviductală.

Fecundarea ovulei există aici și se face numai dacă numărul spermatozoizilor din transportul rapid atinge pragul critic necesar realizării acestui proces fiziologic.

Colonizarea rezervoarelor de spermatozoizi

Miclea V. și col. au demonstrat că spermatozoizii ajunși în canalul cervical, exceptând pe cei din transportul rapid, sunt blocați și dirijați de structura micelară a mucusului cervical spre criptele cervicale unde se formează adevărate rezervoare. Aici își păstrează nealterate capacitățile cinetice și metabolice, fiind protejați de o distrugere singură prin fagocitare, la nivel uterin. Acest fapt este reliefat de numărul extrem de redus al leucocitelor din mucusul cervical. Din rezervoare, spermatozoizii se desprind treptat asigurându-se astfel, timp mai îndelungat, concentrația oviductală necesară realizării fecundației. Rezultă că numărul și mărimea rezervoarelor, alături de concentrația spermatozoizilor din ele, sunt factori importanți ai mecanismelor de realizare și îmbunătățire a ratei fecundației. Spermatozoizii care nu populează rezervoarele părăsesc cervixul prin propriile mișcări sau transportați pasiv de concentrațiile cervicale și uterine.

La speciile cu ejaculare uterină rezervoarele spermatice sunt localizate la nivelul joncțiunii utero-tuvare (scroafă), sau în glandele endomitriale (cățea). Există dovezi că la unele specii transportul spermei este influențat de prostoglandinele conținute în ejaculat.

Eliberarea spermatozoizilor din rezervoare și transportul spre oviduct

Miclea V. și col. au demonstrat că după formarea rezervoarelor, spermatozoizii sunt eliberați secvențial operioadă mai lungă de timp. Eliberarea lor se face sub acțiunea mobilității proprii și a activității contractilor desfășurate de miometru și mezosalpinx. Desprinderea treptată a spermatozoizilor din anumite zone ale rezervelor, formează un curent constant de spermatozoizi ce ajung în oviduct pentru a realiza fecundarea ovulei. Nu toți spermatozoizii desprinși ajung în oviduct deoarece o mare parte sunt dispuși prin intermediul anumitor mecanisme fiziologice care, împiedică probabil și polispermia, proces letal pentru dezvoltarea embrionară. Pierderile de spermatozoizi mai importante sunt cele vaginale și uterine. Pierderile vaginale sunt date de incapacitatea spermatozoizilor de a ajunge în cervix, iar pierderile uterine apar în urma unui proces intens de fagocitare spermatică de către leucocitele pilimorfonucleare. În cervix majoritatea leucocitelor se găsesc în masa de mucus cavitat.

Transportul spermatozoizilor în cervix. Cercetările efectuate de Ladoși I. au demonstrat, că mucoasa cervicală, cu sistemul de falduri și cripte, alături de mucusul cervical, permit trecerea spermatozoizilor în apropierea momentului ovulației și nu permit migrația acestora în alte faze ale ciclului sexual. Acționează ca rezervoare de spermatozoizi dar și protejează spermatozoizii față de mediul ostil din vagin și împotriva fagocitării uterine, în același timp, suport energetic pentru spermatozoizi. De asemenea, mucoasa cervicală reține spermatozoizii cu defecte sau morți și participă la capacitatea acestora.

Mucusul cervical existent la nivelul deschiderii vaginale a cervixului, conține secreții peritoneale, oviductale, endometriale și cervicale, dar și celule descuamate din epiteliul mucoasei căilor genitale și leucocite. Structural este constituit dintr-o fracțiune vâscoasă care formează o rețea tridimensională, prin ochiurile căreia curge fracțiunea apoasă. Fracțiunea vâscoasă conține glicoproteine hidrolizate de enzime proteolitice ale spermatozoizilor.

În timpul perioadei estrale a ciclului sexual, spermatozoizii penetrează ușor fracțiunea apoasă a mucusului prin mișcările proprii și datorită proprietăților fizice ale acestui lichid în mișcare. Fracțiunea vâscoasă, cu

ochiurile sale organizate în rețea, orientează spermatozoizii către criptele cervicale. Un număr redus de spermatozoizi ajung în punctele de minimă rezistență ale rețelei, le străbat cu ajutorul enzimelor proteolitice, migrînd spre uter și oviduct, în cadrul a ceea ce numim transportul rapid.

Mobilitatea spermatozoizilor le mărește capacitatea penetrantă. În urma contracțiilor cervixului, în lumenul său, alături de spermatozoizi, pătrund și anumite cantități de plasmă spermatică. Enzimele sale proteolitice, hidrolizează scheletul proteic al mucusului cervical (mai ales în extremitatea sa vaginală), realizînd canale de trecere pentru migrarea spermatozoizilor. Este posibil ca prin aceste canale să se deplaseze pasiv și spermatozoizii morți. Probabil, eliberarea spermatozoizilor din criptele cervicale este dată de capacitatea lor de a hidroliza rețeaua mucusului cu ajutorul proteazelor existente pe membrana plasmatică.

Chiar dacă spermatozoizii, în cervix, par să se miște dezordonat, ei urmăresc căile de minimă rezistență. Cînd înaintarea unui spermatozoid este oprită, de regulă acesta se îndreaptă spre o altă cale mai liberă. Penetrarea mucusului cervical de către spermatozoizi se realizează prin săparea unei rețele de canalicule cu o arborizație imensă.

Transportul spermatozoizilor în uter. Contracțiile vaginale din timpul coapulației și cele ale miometrului au un rol major în transportul spermatozoizilor spre și dinspre uter. Ajunși în uter, un număr important de spermatozoizi invadează glandele endometriale. Prezența spermatozoizilor în uter declanșează răspunsul leucocitar al endometrului, prin care, în urma fagocitozei, numărul acestora este redus și sunt distruși spermatozoizii morți. Infiltrarea leucocitelor la nivelul lumenului uterin și activitatea acestora de fagocitare a spermatozoizilor are o semnificație fiziologică deosebită. Este nu numai un proces de evitare a polispermiei, dar și un mecanism eficient de eliberare a cavității uterine de spermatozoizi, după ce fecundația a avut loc. Contracțiile miometrului și mișcărilor spermatozoizilor sunt forțele care fac posibilă deplasarea acestora din uter în oviduct (Sokolovskaia I.și col).

Transportul spermatozoizilor în oviduct. Acest compartiment al căilor genitale femele este deosebit, deoarece transportă simultan, în direcții opuse, spermatozoizii și ovocitele (Milovanov V.).

Mecanismele de realizare a transportului spermatozoizilor în oviduct sunt următoarele: peristaltismul și antiperistaltismul musculaturii oviduc-

tului, contracțiile complexe ale mucoasei și mezosalpinxului, curenții și contracurenții din lichidul oviductal; (produși de bătaile cililor mucoasei precum și de închiderea – deschiderea ritmică a porțiunii intramurale), mișcările proprii. Contracțiile oviductelor modifică la un moment dat configurația și raporturile dintre compartimentele oviductelor astfel încât, fluidele și spermatozoizii din acestea sunt transportați, treptat, dintr-un compartiment în altul spre fimbrie (Mivlea V.li col).

Frecvența și amplitudinea contracțiilor musculaturii circulare și longitudinale din pereții oviductelor este controlată de hormonii ovarieni, de activitate adrenergică și noradrenergică și prin acțiunea prostaglandinelor din plasma seminală. Amplitudinea contracțiilor variază în funcție de segmentul oviductal. Astfel, în istm contracțiile sunt secvențiale, riguroase și aproape continue, pe când în ampulă, valuri peristaltice puternice mișcă periodic anterior, porțiunea mijlocie a oviductului. Transportul spermei spre ampulă în momentul deschiderii joncțiunii istm-ampulă se realizează probabil, atât prin contracțiile musculaturii oviductale cât și datorită mișcărilor proprii spermatozoizilor (SGluhovschi N.).

Controlul transportului spermei în căile genitale femele este, mai ales, de natură endocrină (Miclea V. li col.). Hormonii ovarieni determină structura și activitatea secretorie a vaginului, cervixului, uterului și oviductului. Ei coordonează activitatea contractilă a musculaturii utero-tubare, determină caracteristicile cantitative și calitative a secrețiilor cervicale, uterine și tubare. Schimbările calitative ale secrețiilor căilor genitale se referă mai ales la conținutul acestora în proteine și electroliți, modificarea activității enzimatică, tensiunii superficiale și a conductibilității.

Creșterea nivelului de estrogeni în faza preovulatorie a ciclului sexual determină producerea de cantități masive de secreții cervicale cu un conținut apos. Progesteronul din timpul fazei luteale a ciclului sexual, sau din timpul gestației, dă consistență secreției cervicale din cauza creșterii ponderii fracțiunii vâscoase, aceasta devenind impenetrabilă pentru spermatozoizi. Probabil, modificările ciclice ale caracteristicilor mucusului cervical, reprezintă mecanismul de protecție al femelei împotriva expunerii inoportune la proteinele străine din spermă, transportul spermei în căile genitale femele este de asemenea dirijat de ocitocină, sistemul nervos simpatic și parasimpatic.

Capacitarea spermatozoizilor este recunoscută ca un proces de trecere a spermatozoizilor printr-un complex de reacții biochimice și fizio-

logice. Stadiul de început al capacitării constă în înlăturarea și alterarea componentelor spermatice dobândite în tubii seminiferi, epididim, vase deferente și plasma seminală, care au fost adsorbite de membrana spermatozoizilor. În timpul trecerii din testicul către epididim, spermatozoizii se transformă într-o celulă matură, care este depozitată în coada epididimului pînă la eliberarea în ejaculat sau urină (Miclea V., Vintilă I.).

Unul dintre cele mai importante aspecte ale măturării din epididim este schimbarea proprietăților suprafeței exterioare a membranei plasmatică (Miclea V.). Înainte de a dobîndi proprietatea de a penetra ovula, spermatozoizii depășesc, în tractul reproductiv femel, o serie de bariere. Pregătirea lor pentru aceste încercări se face în epididim, prin protejarea membranei plasmatică cu un înveliș glicoproteic. Învelișul glicoproteic se completează la amestecarea spermatozoizilor cu plasma seminală. O parte importantă a procesului de capacitate este tocmai îndepărtată treptat a acestui înveliș, mai ales din regiunea acrozomului. Îndepărtarea sau alterarea glicoproteinelor ce acoperă suprafața spermatozoizilor, eliberează receptorii care, se vor putea cupla cu receptorii ovocitari, declanșându-se apoi o serie de reacții specifice.

S-au demonstrat în cadrul proceselor de capacitate, fenomene reversibile. Chang J, în 1950 a demonstrat că reintroducerea spermatozoizilor în plasma seminală determină pierderea capacității lor fecundate, procesul fiind reversibil și denumit decapacitate. La taurine, capacitatea și decapacitatea reversibilă a spermatozoizilor a fost posibilă numai dacă 50% din mediu de cultură este format din plasma seminală. Rubinstein N. și Breithart S. sugerează că spermata este factorul major de decapacitate, avînd un rol important în prevenirea capacitării și declanșării premature a reacției acrozomale. Trecerea spermatozoizilor prin compartimentele căilor genitale femele, atît de diferite biochimice și biofizic, alături de separarea lor de plasmă, are ca rezultat îndepărtarea învelișului proteic – deci capacitatea – și declanșarea *reacției acrozomale*, în urma atașării la zona pelucida.

Viteza de înaintare și bătăile cozii se reduce pe măsură ce spermatozoizii înaintează prin diferite segmente ale tractului genital femel. *Hiperactivarea* are loc în primul rînd în oviduct, în apropierea momentului ovulației, pentru ca spermatozoizii să poată ajunge la locul fertilizării.

Hiperactivarea spermatozoizilor. Miclea V, și col. implică o transformare radicală a mobilității, în sensul că bătăile cozii devin viguroase și asi-

metrice. Mișcarea hiperactivă este caracterizată și de creșterea flexibilității cozii, iar ca urmare sinuozitățile descrise de acestea, devin mai ample, apărând frecvente schimbări ale direcției de înaintare. Hiperactivarea conferă spermatozoidelor o serie de noi avantaje cum ar fi: abilitatea de a rămâne liberi în lumenul oviductului (nu se atașează de epiteliul mucoasei), creșterea manevrabilității în lumenul oviductal atât de neregulat, a capacității de mișcare prin lichidul din oviduct, devenit mai vâscos în urma ovulației.

În mod normal, spermatozoidii sunt reținuți în oviduct prin proprietățile sale biofizice și biochimice, care facilitează stocarea și îngreunează înaintarea. Proprietățile biofizice ale istmului se referă la: îngustarea lumenului, creșterea vâscozității fluidului, reducerea temperaturii locale după ovulație, orientarea bățăilor cililor și a contracțiilor miometrului spre uter. Posibilitatea spermatozoidelor de a rămâne liberi în oviduct datorată hiperactivării, este esențială pentru migrarea spre ampulă. De Mott și Suarez arată că la șoarece, spermatozoidii lipsiți de mucoasa istmului majoritatea timpului, deplasarea spre locul fertilizării fiind intermitentă. După ce spermatozoidii se desprind de mucoasă înaintează pe o distanță scurtă reatașându-se. Autorii concluzionează că desprinderea de peretele oviductului se realizează datorită bățăilor hiperactivate ale cozii. Pollard I. arată că la taur, hiperactivarea spermatozoidelor în oviduct, mediază eliberarea lor de pe epiteliul mucoasei, migrarea din istm la ampulă, reținerea acestora la locul fecundării și creșterea capacității fertilizante. Deși hiperactivarea implică o schimbare radicală a modului de mișcare, ea pare să fie nu atât un proces de maturare cât o revenire a spermatozoidelor la potențialul cinetic avut în epididim.

Proprietățile biochimice ale lichidului oviductal, modulate de hormonii ovarieni, privesc existența uneia sau a două substanțe, cu efect inhibitor asupra mișcării asemănătoare celor din epididim. Alături de substanțele inhibitoare, celulele secretoare produc substanțe care stimulează mișcarea, cum ar fi piruvații.

Transportul spermei și fertilitatea

Miclea V, și col, demonstrează că eliberarea spermatozoidelor din rezervoare este corelată cu fagocitarea lor în uter și pierderile abdominale de la nivelul discontinuității anatomice fimbrie-bursă ovariană. În oviduct, procentul de spermatozoidi morfologic normali este deosebit de ridicat,

mult mai favorabil fecundației decît în uter sau ejaculat. Rezultă că filtrarea spermatozoizilor morți, anormali morfologic și funcționali, de-a lungul tractului genital, asigură realizarea fecundării ovulei și potențial fiziologic ridicat pentru zigot. S-a remarcat, la toate speciile de fermă, că ejaculatele cu procent ridicat al spermatozoizilor anormali sunt asociate cu o rată ridicată a avorturilor.

Păstrarea viabilității și rata transportului spermatozoizilor în căile genitale femele se reduce la orice dereglare a ciclului sexual (Gluhovschi N.). Administrarea progesteronului și a prostaglandinei $F_2\alpha$ pentru reglarea ciclului sexual (provoacă lezionarea corpului galben) reduce numărul spermatozoizilor din oviduct și provoacă scăderea procentului de fecunditate. Acești hormoni își manifestă acțiunea preponderent în treimea vaginală a cervixului, inhibînd parțial mecanismele de transport a spermatozoizilor. Folosirea prostaglandinei E_1 în amestec cu $F_2\alpha$ și a 17β estradiolului, a îmbunătățit durata viabilității, viteza de transport și numărul de spermatozoizi din jurul ovulei în treimea anterioară a oviductului. Se desprinde concluzia că dereglările naturale a ciclului sexual și intervențiile pentru corectarea lor, pot induce, dependent de substanțele utilizate, scăderea fecundității în ciclurile următoare.

Viabilitatea spermatozoizilor în căile genitale femele este limitată (Milovanov V.și col). O parte din componentele plasmei seminale stimulează mobilitatea, iar altele o inhibă. Păstrarea mobilității spermatozoizilor nu înseamnă și menținerea capacității lor fecundante, aceasta pierzîndu-se mult înaintea mobilității. După ejaculare, materialul seminal se amestecă cu secrețiile extremității cervicale a vaginului, rezultînd un pH care favorizează menținerea viabilității spermatozoizilor. În timpul migrării spre oviduct, spermatozoizii sunt separați de plasma seminală și amestecați cu fluidele căilor genitale, gradul de diluție cel mai ridicat întîlnindu-se în oviduct. S-a demonstrat că aprecierea timpului de păstrare a viabilității acestora în oviduct este dificil de estimat deoarece rezervele de spermatozoizi se înprospătează continuu (Miclea V.). Cei ajunși mai devreme migrează spre ampulă sau ajung în cavitatea peritoneală, locul lor fiind luat de spermatozoizi eliberați din rezervoarele genitale. Diluarea spermatozoizilor în fluidele lumenale îi expune și la variația de pH a diferitelor compartimente. S-a demonstrat că, în vagin pH-ul este acid (4,0), mucusul cervical are pH bazic (9,84), iar uterul, de asemenea, ușor bazic (7,8), fluidele ovi-

ductale avînd pH-ul cuprins între 7,1-7,3 în faza foliculinică și 7,5-7,8 în faza luteală a ciclului sexual. Rezultă că, spermatozoizii au capacitatea de a-și păstra mișcarea și puterea fecundantă într-o gamă relativ largă a valorilor pH-ului. Aciditatea și alcalinitatea excesivă a lichidelor lumenale, imobilizează spermatozoizii pe cînd, alcalinitatea moderată o stimulează. Trecerea spermatozoizilor prin medii cu pH diferit are acțiune favorabilă nu numai asupra mobilității ci și pentru realizarea procesului de capacitare. Durata păstrării capacității fecundante a spermatozoizilor în căile genitale femele, variază în funcție de o mulțime de factori. În medie, se consideră că spermatozoizii de taur își păstrează puterea fertilizantă 25-48 ore, dar procentul de fecunditate este scăzut. Spermatozoizii nu își alterează major capacitatea fecundantă cel mult 24ore, chiar dacă pot trăi pînă la 72 ore.

Condițiile de supravețuire și păstrare a fecundității spermatozoizilor sunt mai favorabile în timpul căldurilor impunînduse ca însămițarea să preceadă ovulația. În vagin spermatozoizii trăiesc maxim 4-5 ore. Căile genitale, în segmentele lor superioare, oferă condiții mai favorabile spermatozoizilor. Stările patologice ale organelor genitale precum și alte tulburări generale a funcțiilor organismului femel, influențează negativ viabilitatea spermatozoizilor.

Captarea și transportul ovocitei în oviduct. S-a demonstrat (Vintilă I., Miclea V.) că la ovulație, din foliculul dehiscent, este expulzată ovocita și o parte din lichidul folicular. Aceasta, înconjurată de o masă consistentă și lipicioasă, formată de celulele cumulus ooforus, se îndepărtează de ovar fiind captată de fimbrie, sau rămîne atașată în zona stigmei. Ovocitele ce nu au reușit să se îndepărteze de ovar din cauza presiunii mai mici a lichidului folicular, pot fi eliberate și preluate de fimbrie cu ajutorul chinocililor, sau rămîn atașate, suferind în continuare procese degenerative. Transportul ovocitei din fimbrie spre ostiumul oviductal și în primii milimetri ai ampulei, este realizat de mișcarea chinocililor. În preajma momentului ovulației fimbria, puternic vascularizată, este adusă în contact cu suprafața ovarului de către activitatea stratului muscular a mezotubariumului și mezosalpinxului.

Vintilă I. și col. au demonstrat că acest mecanism este reprezentat de contracțiile mai viguroase, și independente ale mezosalpinxului și mezotubariumului superior, în apropierea momentului ovulației. Ele curbează în semilună oviductul și fac să alunece fimbria pe suprafața ovarului care

se rotește. Faldurile mucoasei fimbrii se contractă ritmic, masînd ovarul, contribuind astfel la captarea și transportul ovocitei spre ampulă.

Ovarul execută, de asemenea, mișcări potrivite ce se desfășoară concomitent cu cele ale ovocitului, pentru a facilita captarea ovocitei. Astfel, se rotește încet în jurul axei longitudinale, prin intermediul ligamentului ovarian și a stratului muscular din bursa ovariană. Porționarea fimbrii pe deschiderea și rotirea acestuia, elimină discontinuitatea ovar-oviduct și îmbunătățește posibilitatea de captare a ovocitei. Pentru a putea prelua după ovulație ovocita tînără crescută în volum datorită afluxului mărit de sînge, care ajunge într-o structură erectilă ce formează pereții celor două compartimente ale oviductului. Musculatura netedă existentă permite desfășurarea unor mișcări contractile specifice. Coordonarea circulației sangvine și a contracțiilor musculaturii din preajma și la momentul ovulației, se realizează preponderent prin mecanisme hormonale ce privesc raportul estrogeni-progesteron.

Captarea ovocitelor este mult mai eficientă în timpul estrului. La unele specii (mai ales cele cu ovulație provocată) mecanismele neuro-hormonale de captare ale ovocitei sunt stimulate de contracțiile oviductale (fimbrie) din timpul copulației.

Durata transportului ovocitei și a embrionilor în oviduct, este caracteristică fiecărei specii ale animalelor de fermă. La vacă este de 90 ore. Este deosebit de important ca embrionii aflați în primele stadii de dezvoltare să ajungă în coarnele uterine într-o perioadă a fazei luteice a ciclului sexual, favorabilă realizării proceselor fiziologice necesare nidației (Vintilă I.).

Ovocitele nefecundate au probabil, un alt ritm al trecerii spre coarnele uterine. Astfel, ovulele nefecundate rămîn în oviduct.

Viteza de transport este mai ridicată în infundibilum și ampulă, decît în istm. Întîrzierile în transportul de la nivelul istmului, sunt coordonate cu schimbările uterine ce crează condițiile reclamate de embrionii aflați într-un stadiu specific de dezvoltare.

S-a demonstrat că mecanismul transportului prin oviduct este realizat de contracțiile musculaturii și a ligamentelor oviductului, mișcările cililor și a faldurilor mucoasei, cantitatea și proprietățile biofizice ale lichidelor lumenale.

Contracțiile ligamentelor oviductului schimbă continuu poziția anumitor segmente. Musculatura din pereții oviductului are unde contractile peristaltice și antiperistaltice, care modifică lumenul și raporturile între

anumite porțiuni ale sale, desigur cele două grupe de contracții sunt corelate și coordonate neuro-endocrin, contribuind la realizarea unui anumit model de transport. Tipul de contracții, ca frecvență și amplitudine, variază în compartimentele oviductului. În istm, contracțiile peristalticeși antiperistaltice cuprind un anumit segment, sunt viguroase și aproape continue. În ampulă, contracțiile sunt ample, puternice și secvențiale. S-a remarcat (Vintilă I.) că există o anumită corespondență între contracții și depozitele musculare de glicogen. În stratul muscular circular este mai mult glicogen decât în cel longitudinal, acesta fiind mai contractil. Cantitatea de glicogen este scăzută în diestru, ridicată la ovulație și deosebit de mare la parturiție, posibilitățile contractile a miometrului evoluând asemănător.

Mișcările cililor și a faldurilor mucoasei formează curenți și contracurenți în fluidul din oviduct, ceea ce imprimă ovocitei, alături de mișcarea de înaintare și una de rotire, importanță pentru supraviețuire și evoluția acesteia, după fecundație.

Proprietățile biofizice ale fluidului din oviduct se schimbă consecutiv scăderii estrogenilor și sporiri progesteronului. Reducându-se componenta lichidă și crescând substanța uscată, caracteristicile hidrodinamice fiind modificate. Probabil aceasta este una din cauzele creșterii duratei transportului embrionilor în istm (Vintilă I. și col.).

Abundența inervației adrenergice a musculaturii oviductelor, alături de răspunsul la medicamentele cu acțiune adrenergică, arată că sistemul nervos simpatic este implicat în transportul ovocitelor. S-a descoperit că există o cantitate mai mare de noradrenalină în istm decât în ampulă. Contractia stratului circular al musculaturii istmului, mediată de noradrenalină, este un alt mecanism prin care se întârzie transportul embrionilor în istm.

Acțiunea adrenalinei și nonadrenalinei este modulată de steroizi ovarieni, demonstrând corelația strânsă existentă între cele două sisteme de coordonare. Reținerea embrionilor de către sistemul sfincter al joncțiunii istm-ampulă, coordonată de asemenea hormonal, induce un anumit ritm de trecere a embrionilor în uter, caracteristic fiecărei specii.

Păstrarea fecundității ovocitei este importantă pentru planificare însămintărilor. La toate speciile de fermă ovocita pierde fecundabilitatea înaintea viabilității. De regulă, la majoritatea femelelor, ovocita este aptă pentru a fi fecundată 12-24 ore; pierzându-și parțial această capacitate la nivelul istmului și complet în uter. Unele ovocite au putut fi fecundate

după perioada fertilă, iar embrionii nu au realizat implantarea, iar dacă s-au nidat aceștia au murit la scurt timp. Fecundarea ovocitelor îmbătrânite, este asociată cu polispermia și dezvoltarea embrionară anormală. Aceleași situații anormale s-au observat la fecundarea ovocitelor cu spermatozoizi îmbătrâniți (Sokolovskaia I.și col.,Milovanov V.).

În general, fertilizarea gameților îmbătrâniți poate să implice următoarelor situații: ovocit îmbătrânit cu spermatozoid proaspăt, ovocit îmbătrânit cu spermatozoid îmbătrânit sau, ovocit proaspăt cu spermatozoid îmbătrânit. Toate cele trei combinații conduc la scăderea ratei concepției la speciile de animale (Sokolovskaia I.).

Durata vieții fertile a celor doi gameți în tractul genital femel se reduce progresiv chiar și pe parcursul unei singure ore. Dinamica acestui proces depinde de o serie de factori printre care se cuvin menționate caracteristicile hormonale ale femeii. Este aproape imposibil să se determine valori exacte pentru fiecare specie, atât la ovule cât și în cazul spermatozoidilor, deoarece limitele variației individuale sunt destul de largi.

Dacă ovocitele nu sunt fecundate, suferă un proces de distrugere prin fragmentare celulară inegală, în multe cazuri ele asemănându-se cu ovocita fecundată. Toate ovulele nefecundate sau fragmentate, ajung în uter, unde sunt distruse prin fagocitare.

Se urmărește ca intervalul între două fătări succesive să fie de un an. Pentru ca intervalul dintre fătări să nu depășească un an, avînd în vedere că gestația durează în medie 285 zile, vacile trebuie să rămînă gestante în 80 zile de la fătare. Practic durata repausului de gestație, respect numărul de zile de la fătare la însămintarea fecundă, condiționează intervalul între fătări, care la rîndul său condiționează natalitatea și nivelul producției de lapte pe lactație și pe viața producțivă.

Ciclul sexual după fătare. Durata anaestrului postpartum este influențată de factorii genetici (specie,rasă, individ), furajare (mai ales conținutul rației în energie), durata alăptării, nivelul producției de lapte, frecvența mulsului. De asemenea, ritmul involuției uterine și al dezvoltării foliculilor ovarieni, cantitatea de gonadotropine hipofizare și sangvine, concentrația sangvină în hormoni steroizi și dinamica evoluției masei corporale, determină durata anestrului postpartum (Klinscii Iu. și col).

La vacă, după cum s-a menționat anterior, balanța energetică nutrițională din primele 20 zile de lactație este esențială pentru reluarea activi-

tății ovariene. Timpul necesar involuției uterine postpartum este de 4-6 săptămâni.

Secreția de progesteron din timpul gestației este ridicată. După parturiție, nivelul progesteronului scade drastic, făcând posibilă instalarea estrului și ovulația. Vacile au o ovulație la 2-3 săptămâni după fătare, dar căldurile sunt șterse, primul ciclu estral fertil aparând mai târziu. Rezultă că la toate femelele speciilor animalelor de fermă, anestrul de după fătare prezintă un stadiu estral infertil, slab exteriorizat.

Întărcarea determină întreruperea anestrului și apariția căldurilor. Primul ciclu de după întărcare este scurt, din cauza reducerii rapide a cantității de progesteron sangvin, grație imperfecțiunilor funcționale de la nivelul corpului galben. Astfel, suportul luteolitic nu este organizat corespunzător, celulele luteice nu au numărul de receptori LH necesari pentru o funcționare deplină, iar pe de altă parte, uterul începe secreția agentului luteolitic (Miclea V.).

Alăptarea noilor născuți prelungește anestrul de după fătare, dependent de gradul de stimulare mamară prin supt, întreținerea și furajarea femelei din perioada gestației-lactației, etc. În etapa de început a alăptării, când frecvența supturilor este mare, nivelul sangvin de prolactină este ridicat și într-un raport invers proporțional cu cel al FSH și LH.

La vaci, intervalul dintre fătare și primul estru cu ovulație, este lung dacă animalul are potențialul genetic ridicat pentru producția de lapte și dacă nivelul acestuia este valorificat prin îngrijire și hrănire. Deoarece la începutul lactației producția de lapte este ridicată, cantitatea de hrană ingerată nu satisface necesarul productiv, apelându-se la rezervele interne ale organismului. Rezultă că influența potențialului genetic asupra duratei anestrului este mai ridicată decât creșterea producției de lapte printr-o furajare stimulative. Cu toate acestea, practicarea unei furajări echilibrate și în concordanță cu cerințele organismului favorizează reducerea duratei anestrului de după fătare. Chiar dacă inițial suptul induce creșterea cantității de prolactină din sânge, s-a observat grabirea involuției uterine la vacile ce alăptează.

Durata anestrului după fătare mai este influențată de rasă și individ. S-a remarcat că la aceiași femelă, la fătări succesive se păstrează, o anumită constanță privind apariția primelor călduri (Păcală N. și col.).

Procentul de fecunditate este scăzut la primul estru postpartum, mai ales la femelele care alăptează. Vacile au fertilitatea maximă la 60-90 zile după fătare (Păcală N.).

14. MANIPULAREA MATERIALULUI SEMINAL CONGELAT

Decongelarea paietei cu material seminal

Însămînțarea femelelor cu spermă conservată prin congelare constituie un procedeu cu maximă eficacitate, în activitatea de ameliorare a efectivelor de animale. Metoda se aplică în majoritatea oficiilor de însămînțări artificiale, datorită avantajelor pe care le are. Depozitarea spermei conservate prin congelate se efectuează în containere Diuara și folosirea ei timp îndelungat (Darie G.și col)

Temperatura în containerul de păstrare a materialului seminal congelat este prezentat în foto 24.

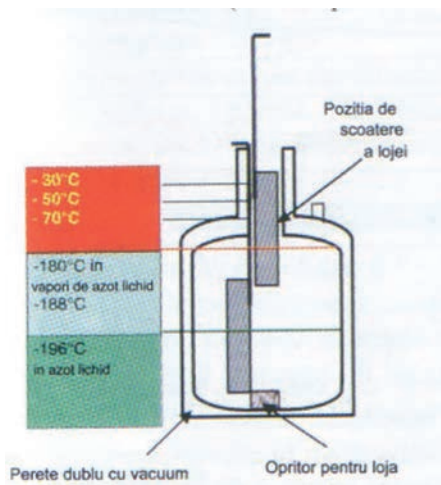


Foto 24. Scoaterea paietelor din container

S-a demonstrat că menținerea dozelor congelate la partea superioară a containerului (gîtul containerului) în timpul scoaterii din container trebuie să fie cît mai scurtă cu putință-maxim 15 sec.

În această fază paieta fină se încălzește după 15 sec. de la -196° C la -130° C.

Temperatura critică pentru sperma de taur congelată începe de la -130° C

Figura 17 prezintă evoluția procesului de încălzire a paietelor la gîtul containerului pe parcursul a 30 de secunde.

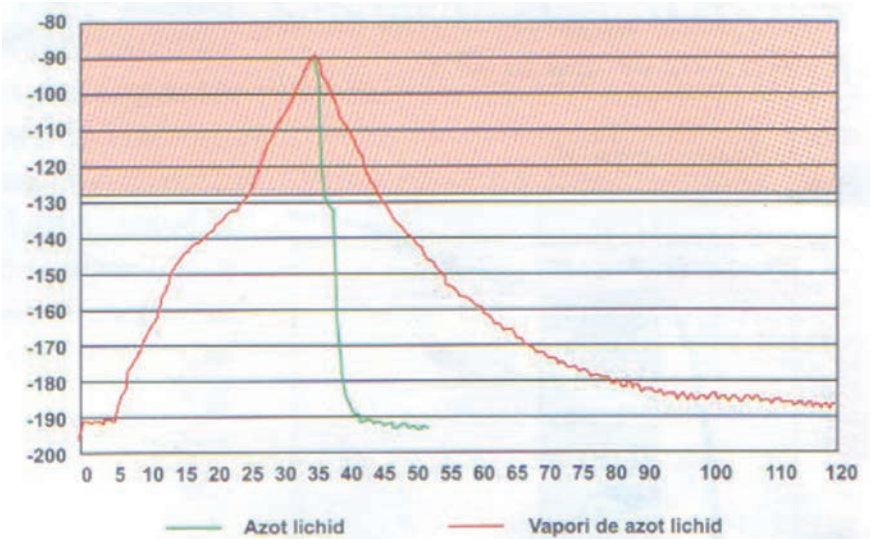


Figura 17. Încălzirea unei paiete în zona gîtului containerului în timp a 30 secunde

Tipuri de paiete folosite la păstrarea materialului seminal de tauri

Paiete medii:

Volum: =0,5 ml, lungime = 13,3 cm

Decongelare: 18 pînă la 20 sec. la o temp. de $38 \pm 1^\circ\text{C}$



Paiete fine:

Volum =0,25 ml, lungime = 13,3 cm Decongelare: 10 pînă la 12 sec.

la o temp.de $38 \pm 1^\circ\text{C}$



Metode pentru scoaterea paietelor din container

– Se face un tabel (o schemă) care se atașează pe capacul containerului pentru a nu căuta inutil dozele de material seminal congelat.

– Paietele nu au voie să rămînă niciodată în zona gîtului containerului mai mult de 15 sec.

– Paietele să fie scoase pînă la maximum 5 cm sub marginea gîtului containerului.

– Niciodată nu se scot complet paietele pentru a citi înscrisurile.

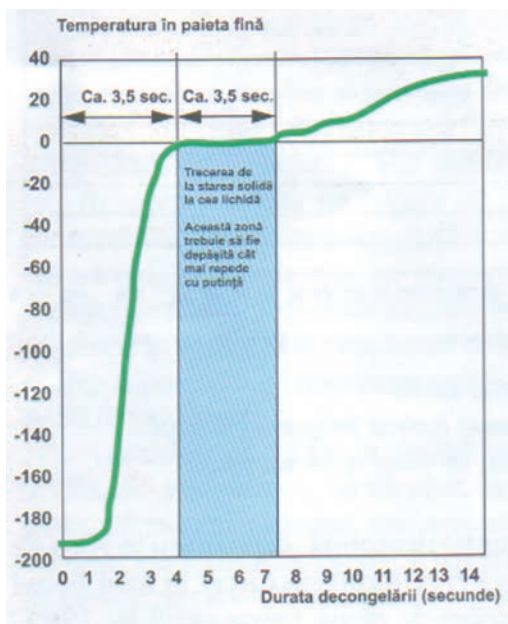
Dacă este necesară mutarea dozelor dintr-un container în altul atunci trebuie asigurată scufundarea paietelor într-un vas cu azot lichid.

Decongelarea paietelor în baia de apă

Decongelare rapidă și obținerea unei temperaturi a spermatozoidilor între 20 și 30°C.

- Sperma se decongelează în baia de apă la o temperatură de 38°C. Este cea mai sigură metoda. Trecerea de la starea solidă la cea lichidă necesită 3 sec.
- Metodele de decongelare care nu utilizează baia de apă (decongelarea în mîină sau decongelarea la temperatura mediului) necesită între 15 pînă la 20 sec. sau chiar mai mult pentru a trece în stare lichidă.

Timpul de decongelare



- Pentru paietele fine sunt necesare pentru decongelare 10 pînă la 12 secunde, la o temperatură de decongelare de $38 \pm 1^\circ\text{C}$.
- Pentru paietele medii timpul de decongelare este de la 18 pînă la 20 secunde, la o temperatură de decongelare de $38 \pm 1^\circ\text{C}$.
- În figura 18 este prezentată evoluția temperaturii unei paiete fine pe du rata procesului de decongelare în baie la 38°C.

Figura 18. Temperatura în paieta fină

Evoluția temperaturii unei paiete fine este prezentată în figura 19.

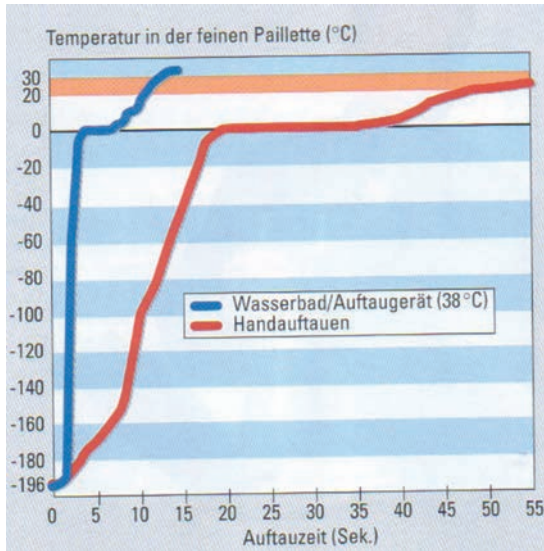


Figura 19. Evoluția temperaturii unei paiete fine

- Cele mai favorabile temperaturi se obțin atunci când paietele fine sunt decongelate în baia de apă conform standardului.
- Decongelarea în mână durează prea mult și temperatura dorită a materialului seminal de 20 până la 30°C se obține numai după 50 secunde.

Menținerea unei temperaturi constante a paietelor decongelate

Figura 20, arată cât de rapid se poate schimba temperatura unei paiete fine datorită unei temperaturi ale mediului extern de exemplu de 7°C și cât de ușor și prin mijloace relativ simple, se poate menține o temperatura stabilă a spermei decongelate.

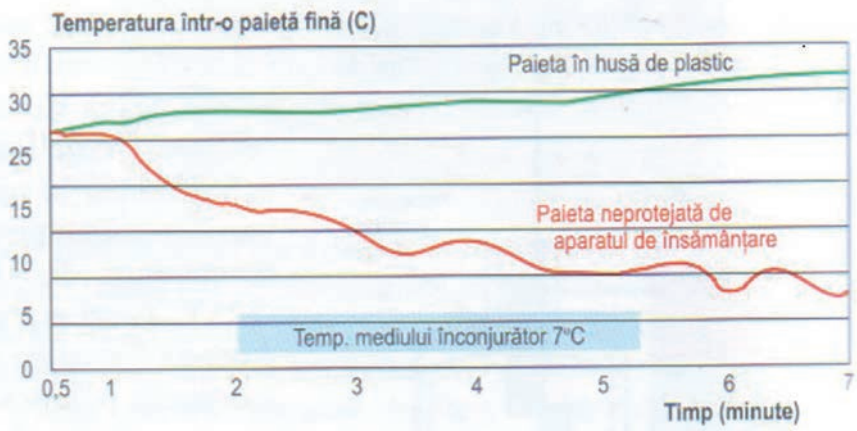


Figura 20. Schimbare rapidă a temperaturii unei paiete fine

Succesul însămînțării se poate realiza prin:

1. Pregătirea tuturor ustensilelor și a materialelor. Pregătirea din timp a metodei de decongelare și controlul temperaturii de decongelare (foto 25.)



Foto 25. Pregătirea ustensiilor

2. Stabilirea taurilor de la care se utilizează sperma și locul în care se găsesc paietele în container.
3. Preluarea corectă a paietelor din container și decongelarea lor (foto 26).



Foto 26. Preluarea corectă a paietelor din container

4. După decongelarea paietelor este necesară îndepărtarea aerului prin lovirea ușoară cu degetul a paietelor la partea sudată.
5. Paietele se șterg cu hîrtie sau cu un prosop curat pentru a preveni răci-rea lor sau contactul apei cu sperma (foto 27).



Foto 27. Ștergerea paietei

6. Paietele se taie cu o foarfecă sterilă (cca. 5 mm) (foto 28)



Foto 28. Tăierea paietei

7. Temperatura pistolului de însămînțare artificială trebuie să fie de 25°C. Când nu sunt alte metode de încălzire, acesta se poate încălzi la temperatura corpului (foto 29).



Foto 29. Pastrarea pistolului pînă la însămînțare

8. Paieta se introduce în pipetă fără a se atinge capătul tăiat al paietei.

9. Pipeta se ține într-o mănușă/husă de plastic curată.

10. Întotdeauna se decongelează și se utilizează la însămînțare numai o singură paietă/doză de spermă.

15. METODE DE INOCULARE A SPERMEI

După locul de depunere a spermei există două posibilități de inoculare în funcție de caz:

- * Inoculare de tip vaginal, care se aplică în unele situații la tineretul femel, deoarece la unele exemplare conductele cervicale sunt insuficient dezvoltate. În acest caz doza utilizată la inoculare trebuie să fie dublată.
- * Inoculare de tip cervical, care se aplică la vaci și junincile cu dezvoltare normală a organelor genitale.

Tehnica inoculării spermei

Tipul de efectuare a inoculării în funcție de durata perioadei de călduri trebuie să asigure întâlnirea dintre cele două celule sexuale în stadiul când acestea sunt fecundabile (în medie, ovulul 3-5 ore și spermatozoidul 12-24 ore). (foto 30).



Foto 30. Inocularea materialului seminal

În prezent, cea mai răspîndită metodă de inoculare a spermei la vacă este metoda bimanuală (foto 30).

Avantajele metodei bimanuale sau recto-vaginale sunt:

- metoda nu necesită nici un alt instrumentar sau material în afara pipetei de însămînțare și a pistolului, deci nu este necesar speculum și nici sursă de lumină artificială;
- metoda nu necesită stand special pentru conținția femelei, inocularea putîndu-se face chiar în grajd, unde se află vaca, evitîndu-se astfel stresul; dacă vacile sunt în tabăra de vară la pășune, se poate folosi un stand simplu confecționat din lemn;
- prin manipulările efectuate transrectal (vidarea rectului, masajul coarnelor uterine, reperarea și fixarea cervixului), se stimulează eliberarea oxitocinei, care favorizează mișcările miometrului necesare pentru ascensiunea spermatozoizilor.

Dezavantajele metodei constă în:

- necesitatea pregătirii tehnice deosebite pentru a fi executată corect, deoarece trebuie depistat transrectal cervixul prin lumenul căruia se introduce vârful pipetei de însămînțare;
- tehnicianul operator trebuie să aibă cunoștințele necesare despre topografia și fiziologia aparatului genital la vacă;
- prin manipularea brutală sau fără îndemînare a pipetei de însămînțare, se pot produce leziuni la nivelul cervixului sau chiar al uterului, în cazuri rare producîndu-se perforarea uterului;
- deoarece nu se mai folosește speculumul, nu mai există nici posibilitatea de a face un control vaginoscopic atent al fiecărei vaci înainte de însămînțare și astfel nu mai pot fi depistate unele cervicite sau infecții uterine ascunse, care pot constitui o cauză de sterilitate.

Aceste dezavantaje pot fi însă evitate prin:

- ◆ alegerea, instruirea și verificarea corespunzătoare a tehnicienilor operatori;
- ◆ efectuarea corectă a tehnicii de lucru, procedîndu-se cu o îndemînare care se cîștigă prin experiență proprie;
- ◆ efectuarea periodică de către medicul veterinar a controlului ginecologic al vacilor sterile.

Tehnica inoculării spermei prin metoda bimanuală presupune parcurgerea următoarelor operațiuni:

- vidarea rectului de fecale, de obicei cu mâna stîngă protejată de o mănușă;
- delimitarea și localizarea cervixului prin traversul peretelui rectal;
- introducerea și localizarea cervixului prin traversul peretelui rectal;
- introducerea pipetei (pistoletului) și dirijarea ei sub un unghi de 30-40 (de jos în sus) în cavitatea vaginală prin acționare cu mâna dreaptă;
- cu mâna stîngă se urmărește mișcarea de înaintare a pipetei (pistoletului) pînă la intrarea în canalul cervical, evitîndu-se pătrunderea vîrfului acestuia între faldurile mucoasei vaginale;
- concomitent, se apreciază dimensiunile coarnelor uterine și corpului uterin și dacă acestea ca așezare și consistență sunt normale, se introduce pipeta prin cervix, după ce în prealabil deschiderea vaginală a cervixului a fost localizată cu ajutorul degetului mic de la mâna stîngă;
- se fixează cervixul cu mâna stîngă urmărind cu degetele trecerea vîrfului pipetei (pistoletul) prin cavitatea vaginală, pînă ce pătrunde în corpul uterin pe o distanță de 2-3 cm;
- se inoculează sperma în corpul uterin în proporție de 3/4 din volumul dozei, apoi se retrage pipeta ușor și, pe măsura mișcării acestuia, se depune în cervix, restul de spermă rămasă în pipetă (1/4) din doză;
- după inocularea spermei se execută un masaj ușor al cervixului;
- se verifică pipeta pentru a constata dacă doza de spermă a fost depusă în totalitate, de asemenea, pentru a surprinde eventualele urme de sînge sau scurgeri purulente aderente pe suprafața instrumentului.

Echiparea pistolului tip „CASSOU”

- ◆ după expirarea, timpului optim de decongelare (la 37-38⁰ C), paieta se scoate din baie și se șterge pe toată lungimea ei cu tifon pentru a fi perfect uscată și se verifică datele privind codul și numărul de ordine al taurului;
- ◆ omogenizarea conținutului paietei prin 2-3 răsturnături succesive, prinsă fiind între degetul mare și cel arătător;
- ◆ încălzirea prin frecare a tecii metalice a pistolului cu mâna protejată cu tifon;
- ◆ constatarea prezenței bulei de aer la nivelul dopului standard, în cazul în care aceasta nu este formată, se procedează la refacerea bulei de aer prin ușoare loviri aplicate pe tubul paietei cu degetul arătător;

- ◆ secționarea perfect orizontală cu un foarfece drept și steril a dopului standard la mijlocul bulei de aer;
- ◆ introducerea paietei în poziție verticală, în camera pistolului, cu dopul standard în jos;
- ◆ aplicarea pipetei de material plastic peste paieta introdusă în pistol până la mularea perfectă peste extremitatea paietei;
- ◆ fixarea pipetei de corpul pistolului, la baza acestuia, cu ajutorul inelului de plastic;
- ◆ introducerea și glisarea cu atenție a tijei-piston în interiorul pistolului până în momentul când extremitatea pistolului a intrat în contact cu dopul standard al paietei;
- ◆ în scopul verificării etanșeității paietei cu vârful pipetei se apasă ușor pistonul până la apariția unei picături de material seminal.

Nerealizarea etanșeității paietă-pipetă facilitează refularea materialului seminal între acestea.

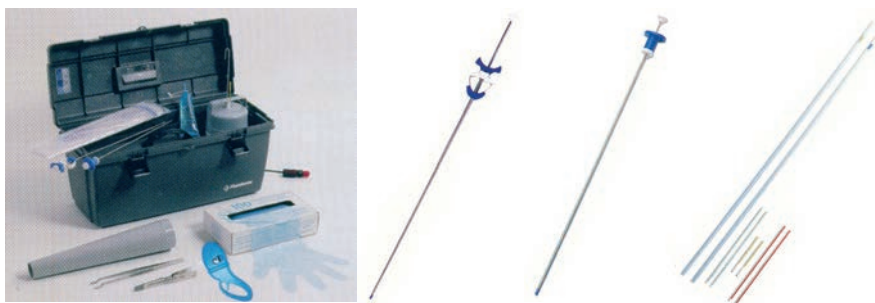


Foto 31. Set pentru însămînțarea artificială

16. TRANSFERUL DE EMBRIONI

Prima dată transferul de embrioni a fost efectuat de HEAPE în anul 1889. El a revenit în atenția oamenilor de știință după elaborarea și perfecționarea tehnicilor de sincronizare a căldurilor, de inducere a superovulației și de preparare a mediilor de cultură pentru embrioni. Numai după ce AVERY și colaboratorii și apoi SUGIE au reușit să recolteze embrioni în vîrstă de cca. 5-7 zile din uterul femelelor, pe cale chirurgicală metoda a devenit populară în rîndul specialiștilor practicieni. Executat corect, embriotransferul asigură obținerea de la o vacă de mare valoare genetică în medie de 4-5 ori mai mulți descendenți decît poate produce aceasta în mod natural. Un număr sporit de descendenți face posibilă micșorarea proporției de animale destinate să producă generația următoare, ceea ce are ca efect creșterea substanțială a efectului selecției.

Tehnica transferului de embrioni a fost perfecționată de Otel și colab, Federean și colab, Jlinca și colab, Silvas și colab. Vintilă și colab.

I. Vintilă și colaboratorii au experimentat tehnologia transferului de embrioni la vaci în condiții de fermă, îmbinînd tehnicile care se execută curent în centrele de embriotransfer în străinătate.

Embriotransferul la mamifere domestice este justificat economic, numai dacă de la o femelă donatoare se pot obține pînă la 10-20 produși mai mult decît prin metodele tradiționale. Principalele etape ale embrio-transferului la animalele domestice sunt: inducerea superovulației la femelele donatoare, recoltarea embrionilor din uter și aprecierea calității și transferului lor în mame "adoptive".

Literatura de specialitate arată că reușita inducerii superovulației depinde, în primul rînd, de starea biologică a femelelor și numai în al doilea rînd de calitatea hormonilor exogeni administrați.

În calitate de donatoare de embrioni se aleg femele secundipare, cu status reproductiv normal, care au fătat de cel mult 60 de zile și nu au avut monte repetate înainte a ultimei gestații.

Inducerea superovulației la femele prin administrarea a 2500-3000 U.I.P.M.S.G.) la vacă la 9-13 zile după manifestarea căldurilor, urmată la 28 ore de administrarea prostaglandinei F2 (60 estrophan) în două doze de 2 ml, respectiv 1 ml la interval de 34 ore, are ca urmare dezvoltarea și maturarea în următoarele 72 ore a 5-20 ovule (Vintilă I.și col.).

Pe timpul estrului se efectuează 3 însămînțări la interval de 12 ore, asigurându-se astfel fecundarea mării majorității a ovulelor care s-au desprins din foliculi.

Pentru stimularea ovulației și evitarea formării chiștilor ovarieni, în momentul apariției căldurilor, femelele donatoare li se administrează intravenos 5 ml. HCG (Dirigestan). După 7 zile de la declanșarea căldurilor, când majoritatea embrionilor au părăsit oviductul ajungînd în uter, se procedează la extragerea acestora pe cale nechirurgicală, prin spălarea repetată a coarnelor uterine cu un lichid fiziologic: Krebs Ringer Fosfat cu pH = 7,2 suplimentat cu 1% ser de vițel (inactivat la 56°C timp de 20 minute) și antibiotice. Pentru spălarea unui corn se folosesc în total 500 ml de mediu de cultură, iar la sfârșitul perfuziei în fiecare corn uterin se introduc 10-20 ml ser, pentru a facilita recuperarea din lumen a întregii cantități de lichid.

Tehnologia însămînțării artificiale

Vintilă I., demonstrează că este necesar circa 20 minute, timp în care embrionii ce se găsesc în lichid, se vor depune la fundul vasului. După această perioadă, lichidul supemanțant se îndepărtează din vasul de sticlă iar lichidul, rămas pe fundul vasului, în care se găsesc embrionii, se transvazează într-o cutie Petry sterilă, în vederea găsirii și aprecierii embrionilor.

Pe măsură ce embrionii au fost evidențiați cu ajutorul microscopului se extrag cu ajutorul unei micropipete Pasteur și se introduc într-o picătură de mediu Krebs Ringer Fosfat proaspăt, suplimentat cu 20% ser de vițel.

Pentru ca embriotransferul să reușească, femelele receptoare trebuie să aibă ciclul ovarian sincron cu cel al femelelor donatoare de embrioni.

Paralel cu introducerea superovulației la donatoare, se pregătesc corespunzători și vacile receptoare de embrioni.

Femelele primitoare trebuie să aibă căldurile sincrone față de donatoare. În vederea sincronizării precise a căldurilor, I. Vintilă și colaboratorii recomandă administrarea femelelor receptoare cu 12-18 ore înaintea donatoarelor a 3 ml. (0,75 mg.) prostaglandină F2 Alfa (în ziua a doua de la manifestarea căldurilor).

În momentul în care se recoltează embrionii de la vacile donatoare, cele receptoare sunt pregătite corespunzător pentru a primi embrionii.

Transferul embrionilor în coarnele uterine ale femelelor receptoare se efectuează cu un pistol special. Embrionii buni și foarte buni recoltați se aspiră în minipaiete de plastic, asemănătoare cu cele folosite la stocarea materialului seminal.

Cu ajutorul pistolului, embrionul din paiete se depune la nivelul mării curburi a cornului uterin, ipsilateral ovarului cu corp galben.

Pentru a evita sincronizarea artificială a femelelor primitoare cu cele donatoare, se poate recurge la congelarea embrionilor, utilizând ca agent crioprotector glicerina 1,4 M cu scăderea treptată a temperaturii de la -7°C la -28°C , cu $0,3^{\circ}\text{C}$ pe minut și de la -35°C , cu $0,1^{\circ}\text{C}$ pe minut și apoi proiectarea directă în azot lichid.

Embriotransferul la vaci se poate efectua deci cu eficiență maximă și în condițiile de fermă, dacă se folosește, pe lângă tehnica descrisă, și un laborator mobil.

Tehnicile de inducere a ovulației la donatoare de embrioni, de sincronizare a ciclului ovarian al donatoarelor, de recoltare a embrionilor și transferul lor în mamele adoptive se poate efectua cu succes în adăpostul de animale, ca dovadă numărul mare de viței obținuți prin transfer în diferite ferme (Păcală N.și col).

Sexarea embrionilor

Vintilă I. recomandă ca după recoltarea embrionilor, acestora li se poate stabili sexul fie utilizând metode citogenetice (cariotip) fie pe cale imunologică (identificarea antigenului H-Y sintetizat de o genă așezată pe cromozomul Y) sau pe calea activizării metabolice a enzimelor sintetizate de genele așezate pe cromozomul Y (glucoza 6-fosfat dehidrogenază, fosfoglicerat chinaza, galactozidaza și hipoxantium guanina, fosforibozil transferaza) cu ajutorul probelor de AND izolat din câteva blastomere ale embrionilor și testat în privința genelor, folosind metoda "DOT-BLOTTING".

Divizarea embrionilor

Morula sau blastocistul timpuriu poate fi secționat, sub lupă, cu ajutorul unui microbisturiu, în două jumătăți (Vintilă I.și col).

Fiecare jumătate de embrion introdus sau nu într-o zonă pelucidă goală provenită din ovule nefecundate și recoltate din ovare în abator poate da naștere unui embrion de sine stătător, din care vor rezulta doi indivizi identici din punct de vedere genetic.

Tehnologia de disociere a embrionilor cu 4-6 blastomere a fost realizată și în laboratorul de genetică animală al U.S.A.M.V.B. Timișoara (I. Vintilă și colab.).

Himere Tetra și Hexaparentale

Extragerea blastomerelor din anvelopa lor translucidă (zona pelucidă) cu ajutorul micromanipulatorului este o operațiune relativ ușoară.

Punerea în contact a blastomerelor extrase din doi embrioni aparținători la rase diferite sau chiar specii diferite și includerea lor într-un singur embrion de sinestătător. Transferarea lui într-o mamă adoptivă va da naștere unui individ care va avea două mame și doi tați. Țesuturile lui vor fi formate deopotrivă din celule provenite de la fiecare din cei patru părinți.

Animale transgenice

Izolarea și multiplicarea genei structurale a hormonului de creștere a deschis calea transferului acestuia la animale domestice și obținerea de animale transformate genetic, denumite animale transgenice.

Legarea la gena structurală care sintetizează hormonul de creștere a unor fragmente de AND care conțin promotorul genei metallothioninei 1 (M.T.) a făcut posibilă funcționarea genei într-o celulă străină (gazdă).

Vintilă I. și col. consideră că metoda obținerii de animale transgenice este cea mai promițătoare pentru ameliorarea animalelor domestice, dată fiind transmiterea la descendenți a genelor himere.

În viitorul apropiat se vor putea transfera genele care determină rezistența la unele boli, eficiența reproductivă (gena Borrula), compoziția laptelui, etc.

Clonarea animalelor domestic

Prin clonare se înțelege obținerea de indivizi identici între ei, pe de o parte și între ei și părinții lor, pe de altă parte. În acest context, obținerea multipleților identici prin disocierea zigoților constituie ceea ce se numește

donarea zigoților. Această metodă are la bază transferul nucleului recoltat din celule somatic (blastomere sau spermatogonii) într-o ovulă anucleată.

Fecundația „in vitro”

Vintilă I. și col. afirmă că fecundația *in vitro* este una din cele mai promițătoare biotehnici care va permite explora rea intensă a potențialului productiv al femelelor care au dovedit valoare de ameliorare cu totul excepțională.

Ovulele pot fi recoltate de la animalul viu sau după ce acesta a fost sacrificat după maturarea ovulelor, urmată de fecundația „in vitro” permite obținerea unui număr suficient de zigoți, chiar de la vițele în vîrsta de cîteva luni maturizate sexual în mod artificial.

Inducerea superovulației la vacile recordiste dar care nu mai pot procrea din diverse motive, urmată de sacrificarea lor, permite obținerea unui număr de ovule din foliculii ovarelor.

Dacă recoltarea și maturarea ovulelor se face corect, iar spermatozoizii pot fi capacitați cu o metodă specifică fecundarea “in vitro” este sigură.

Obținerea de gemeni neidentici

Este o metodă care poate duce la sporirea numărului de vițeii la suta de vaci. Ea constă din supraadăugarea unui embrion cornului contralateral al unor vaci care au fost însămintate obișnuit, cu exact atîtea zile în urmă cîte are embrionul respectiv.

Partogeneza provocată

La viermele de mătase, la curci și găini donarea adultului este posibilă prin inducerea artificială a partenogenezei.

Șocul termic de joasă sau de înaltă valoare, șocul electric, osmotic, amestecul de material seminal de la diferite specii, unele enzime, virusul Rous sau al variolei păsărilor sunt factori care pot induce intrarea ovulelor în replicare și chiar obținerea de indivizi partenogenetici normali. Reușita partogenezei provocate este legată de oprirea într-un fel sau altul a despărțirii ovocitei de unul din globulii polari, în acest fel sau altul al despărțirii ovocitei de unul din globulii polari. Partenogeneza artificială poate deveni o metodă de obținere rapidă a unui grad mare de homozigotie la animale.

Folosirea masculilor puternic homozigoteci în încrucișarea cu femele nehomozigote (top-cross) ar putea duce la obținerea unor hibrizi cu mare efect heterozis.

Consecințele biotehnologiei în ameliorare

Perfecționarea biotehnologiilor moderne și aplicarea lor pe scară largă în zootehnie vor avea consecințe deosebit de favorabile în ameliorarea genetică a populațiilor de animale domestice.

Transferul de zigoți, aplicat în mod organizat la populația activă, prin mărirea considerabilă a numărului de descendenți atrage după sine reducerea numărului de femele necesare reproducerii generației următoare. Cum proporția de rețineri în lotul de selecție este invers proporțională cu mărirea progresului genetic se înțelege că scăderea la jumătate a numărului de femele (monotocite) se repercutează în dublarea efectului selecției.

Reușita cultivării foliculilor „De Graff” și fecundația ”in vitro” permit obținerea de zigoți de la femele în vîrstă de cîteva luni (pubertate provocată hormonal) în număr foarte mare. Consecința unui asemenea fapt va consta din reducerea la minimum a intervalului dintre generații, ceea ce se va repercuta în sporirea efectului selecției pe unitatea de timp.

Bisecția embrionilor (donarea embrionilor) și obținerea de multipleți identici genetic, nu numai că dublează numărul de descendenți posibil de obținut de la o femelă prin transferul inegal, dar dă posibilitatea să se cuantifice influențele maternelle și postpartum care se află incluse în structura performanței proprii a indivizilor și să se evidențieze la ce caractere există interacțiune genotip-mediu, ceea ce va mări precizia stabilirii valorii de ameliorare a indivizilor și a coeficientului de eritabilitate a caracterelor.

Vintilă I. și colaboratorii demonstrează că informațiile primite de la descendenți gemeni identici mărește precizia estimării valorii de ameliorare cu 40% față de performanța proprie a părin telui, iar efectul de selecție transmis de la mamă la fiu sporește cu 20-40%, iar prin mamă-fiică cu 70%.

Obținerea gemenilor identici născuți în perioade de timp diferite (o jumătate de embrion însămințată în femele primitor iar jumătate este păstrată în azot lichid) duce la reducerea la jumătate a numărului de tauri în așteptare.

Gemenii identici, folosiți într-un fel, pot face lumină în determinismul genetic al rezistenței animalelor la boli și a unor însușiri etologice și mai

alesă și posibilitatea nutriționiștilor și farmacologilor să stabilească cu mai multă acuratețe influențele diferiților factori asupra performanțelor și sănătății indivizilor.

Reușita congelării zigoților în azot lichid permite crearea băncilor de zigoți (bănci de gene), care ne ajută nu numai la măsurarea progresului genetic realizat prin selecție și mai ales la salvarea unor rase de animale neglijate în prezent din cauza primitivismului lor productiv dar extrem de adaptate mediului local. Transferul de gene și mai ales de nucleu diploizi în pronucleul zigoților, respectiv în ovule nefecundate, va avea un impact dramatic în modificarea structurii genetice a populațiilor de animale domestice deoarece animalele “transformate” își transmit calitățile la descendenți, iar „donarea” animalelor de mare productivitate ar duce, de fapt, la o multiplicare considerabilă a unor astfel de genotipuri.

17. INDICII DE REPRODUCȚIE

Indicii de reproducție a femelelor la taurine se întocmește o dată pe an, în luna decembrie, pentru fiecare vacă, junincă sau vițea programată la reproducție, categoriile fiziologice pentru încadrarea vacilor și vițelilor fiind următoarele (după Aurelia Sălăjeanu)

1) La vițele

I.R. - însămintate recent

I.R.A. - însămintate după anestrus

J. - junincă (vițea gestantă)

M.R. - monte repetate

A.M. - anestrus după montă

2) La vaci

FR - fătate recent

I.R. - însămintate recent

I.R.A. - însămintate recent după fătare

G. - gestante

M.R. - monte repetate

A.M. - anestrus după montă

A.F. - anestrus după fătare

În categoria „însămînțate recent după anestrus” - I.R.A. - sunt cuprinse toate femelele care au mai puțin de 3 însămînțări și mai puțin de 3 luni de la ultima însămînțare care s-a produs după un anestrus de fătare sau de montă.

Categoria femelelor „însămînțate recent” - IR cuprinde toate femelele care au mai puțin de 3 luni de la ultima însămînțare și nu mai mult de 2 însămînțări.

Categoria „monte repetate” - MR - cuprinde vacile și vițecele cu 3 sau mai multe însămînțări.

În categoria „anestrus după fătare” - AF - sunt cuprinse vacile care nu au manifestat călduri sau nu au fost însămînțate timp de 60-62 zile de la fătare. Categoria „anestrus după montă” - AM - sunt cuprinse vacile care au fost declarate negestante, tot în această categorie intrînd și femelele în perioada după avort.

Indicii de reproducție la bovine, rata concepției (Rc%), reprezintă procentul de gestație după prima însămînțare și se exprimă după formula:

$$Rc\% = \frac{G_1}{IA_1} \times 100$$

în care:

G_1 - numărul de vaci diagnosticate după prima montă sau însămînțare

IA_1 - numărul total de vaci montate sau însămînțate prima dată.

Capacitatea fecundă a taurului numită și „testul fecundității” tarului, se exprimă prin formula:

$$CF\% = \frac{G_1}{IA_1 - EIA_1} \times 100$$

în care:

Pentru vaci, service - period se calculează conform formulei: SP = d.i.f. – d.f.

în care:

d.i.f. - data însămînțării sau monteii în care vaca a rămas gestanta;

d.f. - data fătării.

Pentru primipare, service - period, notat cu $S.P._1$, se stabilește după relația:

$$S.P._1 = V.P. - D.G.$$

în care:

V.P. - vârsta în luni la prima fătare;

D.G. - durata gestației în luni

Intervalul mediu dintre fătări „Calving-interval” se calculează doar la vacile care au fătat de cel puțin 2 ori, la fiecare în parte:

$$C.I. = S.P. + D.G.$$

în care:

S.P. = service period;

D.G. = durata gestației.

Pentru o ferma de vaci, se calculează un „interval mediu dintre fătări” după formula:

$$C.I. = \frac{S.P. + D.G.}{V}$$

în care:

S.P. - suma service - period la vacile luate în calcul (în zile)

D.G. - durata medie a gestației (285 zile)

IV. - număr total de vaci luate în calcul.

Indicele de natalitate (N %), reprezintă raportul dintre numărul de viței obținuți vii și numărul total de vaci montate sau însămintate într-o anumită perioadă.

$$N\% = \frac{V}{IA} \times 100$$

în care:

N - număr total de viței obținuți;

I.A. - număr total de vaci însămintate

Pentru a asigura progresul genetic, anual circa 20-25%, din vaci se înlocuiesc (la 20 vaci sînt necesare 5 juninci pentru înlocuire).

Se recomandă ca toate junincile să fete în fermă și să fie mulse 100 de zile, după care se ia decizia dacă se mențin (și se elimină vacile mai slab productive) sau se vînd..

18. GESTAȚIA

Reproducția și ameliorarea animalelor, deziderate acute ale zootehniei moderne, sînt strîns legate de modul de desfășurare a procesului de înmulțire și în primul rînd de procesul de fecunditate. La realizarea acestui process participă în egală măsură, atît masculul cît și femela, prin gameții pe care îi elaborează. Din literatura de specialitate este cunoscut că gestația este un proces fiziologic complex care începe din momentul fecundației și se termină odată cu expulzarea fătului complet dezvoltat. Miclea V. și colab.au demonstrat că în realizarea acesteia este implicat atît organismul matern cît și cel fetal. Organismul matern suferă modificări morfofiziologice importante aflate într-o corelație strînsă cu dinamica creșterii și dezvoltării fătului. Gestația reprezintă o perioadă reproductivă deosebit de importantă deoarece acum se pun bazele apariției unei noi ființe, iar organismul matern este solicitat intens pentru a satisface cerințele tot mai mari a produsului de concepție.

Diferite tipuri de gestație. Clasificarea gestației se poate realiza în funcție de modul de evoluție, gestația poate fi fiziologică și patologică. În gestația fiziologică nu apar abateri de la evoluția normală a organismului fetal și matern, iar legătura dintre ele asigură o corelație perfectă între cerințele fetale și posibilitățile materne. Gestația patologică implică abateri de la fiziologie determinînd, de cele mai multe ori, apariția avorturilor (Cernescu H și col., Gluhovschii N.).

Miclea V. și col. propun ca după numărul feteșilor să se deosebească gestația simplă, cînd femela are un singur produs și gestația multiplă în care se dezvoltă concomitent mai mulți produși. Dacă în uterul unei femele unipare se dezvoltă doi sau mai mulți produși gestația este gemelară, respectiv multigemelară.

Raportat la numărul de ovule din care provin feteșii gemeni pot fi monoovulari și biovulari. Gemenii monoovulari sunt numiți și gemeni adevărați. Ei au un singur corion, celelalte anexe fetale fiind separate, asemănîndu-se foarte mult între ei și avînd același sex. De regulă, aceștia rezultă din dedublarea butonului embrionar la începutul gastrulării.

Gemenii biovulari, provin din fecundarea a două ovule. Ei pot avea același sex sau sexe diferite, învelitorile fetale fiind, de asemenea, complet separate. Se pot dezvolta în același corn uterin sau în coarne uterine separate.

După locul unde se dezvoltă noul produs în organismul matern se distinge gestația topică (uterină) și gestația ectopică (extrauterină). La femele animalelor de fermă în gestația topică fetusul se găsește în coarnele uterine sau în coarnele uterine și parțial în uter. În gestația ectopică, produsul de concepție se dezvoltă o anumită perioadă de timp la nivelul oviductului, ovarului sau peritoneului. Finalul gestației extrauterine este moartea produsului de concepție, în diferite stadii de dezvoltare.

Etapele gestației

În timpul gestației, organismul microscopic unicelular reprezentat de zigot suferă transformări morfo-fiziologice importante, în urma cărora rezultă un organism complex. Pentru realizarea acestuia se parcurg două etape (stadii), respectiv stadiul embrionar și stadiul fetal.

Stadiul embrionar

Menționăm la capitolul în care s-a tratat fecundația, că imediat după amfimizie, cromozomii se dispun în plan ecuatorial începând diviziunea celulară, moment ce marchează debutul dezvoltării embrionare. Rezultă că zigotul este o formațiune cu viață foarte scurtă. Începutul stadiului embrionar este marcat de prima diviziune de multiplicare a zigotului, iar finalul este stabilit de formarea placentei definite. Desfășurarea stadiului embrionar are loc în oviduct și coarne uterine (Tănase D. și colab).

Dezvoltarea embrionului în oviduct este urmarea diviziunilor celulare succesive care se multiplică în progresie geometrică. Aceste diviziuni sunt mitotice, toate, inegale și asincrone (Vintilă I. și col.).

Miotică deoarece fiecare celulă fiică conține același număr de cromozomi ca și celula din care provine. Totală pentru că se divide atât nucleul cât și citoplasma. Inegală, ca urmare a dispunerii planurilor de diviziune meridiane și supraecuatoriale ce favorizează apariția celulelor fiice diferite ca dimensiune. Asincronă deoarece intervalul dintre două diviziuni succesive nu este egal.

Vintilă I. și col. au demonstrat că prima diviziune a zigotului este verticală și se realizează pe direcția axului care pornește de la polii animal (locul de expulzare a globulului polar) la polul vegetal (zona cu rezerve nutritive) rezultând două celule fiice, numite blastomere. Planul de segmen-

tare a celor două blastomere este de asemenea vertical și trece prin cei doi poli, rezultînd patru blastomere. A treia diviziune se face aproximativ sub același unghi. Alături de planurile de diviziune verticale, la mamifere apar și planuri supraecuatoriale care determină, prin succesiunea lor, așa cum s-a menționat deja, formarea micomerelor. Inițial diviziunea celulară are loc simultan în toate blastomerele, dar ulterior posibilitățile de sincronizare se diminuează mult, blastomerele divizîndu-se independent unele față de altele.

Blastomerele rezultate din primele diviziuni sunt celule stem, adică capabile să formeze fiecare cîte un embrion din care să rezulte noi-născuți viabili. După acest stadiu, caracteristic ca durată fiecărei specii, blastomerele se diferențiază funcțional dependent de poziția lor. La sfîrșitul acestei faze a dezvoltării embrionare rezultă o formațiune numită morulă, constituită din celulele mari și mici, fără spații între ele, învelite la exterior de zona pelucida. În timpul formării morulei, blastomerele devin din ce în ce mai mici pe seama scăderii cantității de citoplasmă, echipamentul cromozomial rămînînd neschimbat. Morula învelită în zona pelucida este doar cu puțin mai mare decît ovocita (Runceanu I. și col).

Trecerea embrionului din oviduct în uter are loc la vacă, cînd acesta are 8-16 celule, respectiv după 72-84 ore de la fecundare. Între dezvoltarea embrionului și condițiile pe care cornul uterin le asigură există o legătură strînsă. Această corelare este realizată de mecanismele de transport oviduc-tale, modelate de hormonii estrogeni și progestageni. De asemenea intervin și prostaglandinele din grupa F, care încetinesc tranzitul, pe cînd cele din grupa E accelerează tranzitul embrionilor prin oviduct (Gluhovschi N.).

Dezvoltarea embrionului în uter

Așa cum este prezentat de Miclea V, rezultă că embrionul aflat în faza de morulă timpurie, ajunge în coarnele uterine unde își definitivează prima fază de dezvoltare, trecînd în faza de blastulă. La un moment dat blastomerele încep să secrete un lichid, care rămîne în spațiile dintre ele. Trep-tat, prin migrări celulare, la un pol al blastulei se dispun un grup de celule ce formează butonul embrionar, iar sub zona pelucida sunt plasate un rînd de celule ce formează procorionul sau trofoblastul. Între butonul embri-onar și trofoblast se delimitează cavitatea blastocelică unde, este acumulat lichidul secretat în anterior. Formarea lecitocelului este posibilă și datorită

stabilirii a două tipuri de legături intercelulare, respectiv, joncțiuni strânse și joncțiuni „gap,, (punți). La joncțiunile strânse membranele a două blastomere învecinate se apropie mult unele de altele, fiind contopite punctiform din loc în loc. Joncțiunile „gap,, constau numai în apropierea membranelor celulare vecine. În general, joncțiunile strânse se stabilesc între celulele trofoblastului, deoarece ele constituie primul înveliș extern embrionar de după ruperea zonei pelucida.

Existența lor se face posibilă menținerea lichidului în cavitatea lecitocelică și desfășurarea schimburilor de substanțe cu mediul uterin. Joncțiunile „gap,, se stabilesc între celulele butonului embrionar și, fiind mai slabe permit desfășurarea migrației celulare necesară dezvoltării embrio-fetale.

Formațiunea cu zonă embrionară, zonă extraembrionară (trofoblast) și cavitate lecitocelică se numește blastulă.

După formarea blastulei, zona pelucida se rupe, procesul fiziologic fiind numit ecloziune. Anterior fragmentării, asupra zonei pelucida acționează factori enzimatici produși de mucoasa uterină și embrion. Creșterea blastulei, prin multiplicarea celulară și acumulare de lichid, preiază asupra zonei pelucida, slăbită enzimatic, producând eliberarea embrionului. Prostaglandinele grupului E facilitează ecloziunea, iar prostaglandinele antagoniste o frânează. Zona pelucida rămasă goală este neutralizată de endometru.

Stadiul fetal

După concluziile lui Gluhovschii N. această etapă a gestației începe de la instalarea circulației placentare definitive și ține pînă la parturiție. Este o perioadă în care produsul de concepție își definitivează structuralizarea, dar mai ales crește intens. Ca urmare, legăturile cu organismul matern sunt tot mai strânse, iar solicitările fetale deosebit de ridicate. Intensitatea de creștere a produsului de concepție este ridicată în stadiul embrionar, scăzînd în stadiul fetal. Exprimată în valori absolute (g), rata creșterii produsului de concepție este maximă în ultima parte a gestației. În prima săptămînă din luna a 4-a de gestație, viitorul vițel cîntărește 150 g, iar la sfîrșitul aceleași luni are 900 g. La încheierea lunii a 5-a ajunge la 1750 g, iar în luna a 6-a are 2-3 kg, greutatea fetusului în luna a 7-a este de 6-8 kg, ajunge la 13-15 kg în luna a 8-a și 20-25 kg la începutul lunii a 9-a. La fătare vițelul are în medie greutatea de 30-35 kg. Rezultă că vițelul crește cel mai mult în gre-

utate în ultimele două luni de gestație. Ca urmare, solicitările organismului matern în această perioadă sunt maxime, ceea ce impune luarea unor măsuri tehnologice adecvate atât acestui stadiu al gestației, cât și celui anterior, pentru a obține produși viguroși și viabili.

Rata creșterii diferitelor organe și componente anatomice ale fătului variază de la un stadiu la altul. Astfel, în dezvoltarea timpurie a fătului, regiunea cefalică crește rapid, și ca urmare, capul este mult mai mare comparativ celorlalte regiuni corporale. La fătare capul și membrele sunt cel mai bine dezvoltate. Unele organe fetale cresc mai intens la începutul gestației, iar altele mai târziu. Ordinea în care țesuturile fătului ating ritmul maxim al dezvoltării este următoarea: sistemul nervos central, țesutul osos, țesutul muscular și la urmă țesutul adipos.

Carențele nutriționale nu afectează egal organele și țesuturile fătului. Încetinirea creșterii acestora este dependentă de etapa gestației în care se manifestă carențele nutriționale. La feteșii rămași în urmă, privind greutatea corporală, inima și sistemul nervos central (aceste organe apar timpuriu) sunt puțin afectate, iar ficatul este afectat mai mult decât masa corporală.

Factorii care influențează rata creșterii feteșilor sunt: *genetici, de mediu și hormonal* (Gluhovschi N., Miclea V. și col.).

Factorii genetici cuprind: specia, rasa, individul. Vițeii rasei Holstein sunt cu 15% mai mari la fătare decât greutatea nou-născutul oricărei rase de taurine crescută pentru lapte. În general, influența maternă asupra ratei creșterii feteșilor este mai ridicată decât influența paternă.

Factorii de mediu sunt externi și interni. Dintre factorii externi Miclea V. menționează: dezvoltarea corporală a mamei, nutriția acesteia, factorii climatici. Factorii interni se referă la: mărimea fătului, mărimea placentei și realizarea circulației sangvine uterine caracteristică gestației.

Tănase D. și col. demonstrează că femelele cu greutate corporală mare, față produși care au crescut intens în timpul gestației. Femelele folosite la reproducție înainte de a ajunge la maturitatea dezvoltării corporale, folosesc o parte din nutrienții ingerați pentru propria dezvoltare, nou-născuții fiind mai mici.

La speciile a căror femele sunt pluripare, numărul peste medie a feteșilor, chiar dacă nu afectează dezvoltarea lor în prima parte a gestației o diminuează profund mai târziu. În a doua parte a gestației apar greutatea în asigurarea cu substanțe nutritive datorită nerealizării debitului sangvin necesar.

Femelele unipare, în caz de fătări gemelare, din cauza reducerii duratei gestației, produc nou născuți cu greutatea mai mică. La femelele pluripare numărul ridicat al produșilor nu scurtează durata gestației.

Gluhovschii N. a stabilit că temperatura ridicată din timpul gestației reduce intensitatea de creștere a fetoșilor, deoarece mamele își diminuează ingestia. Hormonii fetalii, insulina și somatotropina, stimulează, în vitro, creșterea celulelor fetale, dar efectul lor nu a fost stabilit cu certitudine în vivo. Insulina este importantă pentru creșterea fătului, disponibilizarea surselor de energie și dezvoltarea placentei. Prezența tiroidei este necesară susținerii dezvoltării fiziologice a fătului, la unele specii, iar la altele nu.

Modificările organismului matern în timpul gestației

După fecundație, în organismul matern au loc importante modificări morfo-fiziologice, situate în sfera genitală și la nivelul altor organe.

Miclea V. și col. a stabilit că modificările din sfera genitală se referă, în primul rând, la recunoașterea de către organismul femel a instalării gestației. Dacă în timpul ciclului sexual liza corpului galben ciclic este realizată de PGF₂ α , produsă de endometrul secretor, consecutiv instalării gestației această prostaglandină nu se mai sintetizează. Responsabile de încetarea sintezei PGF₂ α sunt secrețiile produsului de concepție care apar după ce ajunge în uter.

Dacă blastocistul nu este prezent în uter după ovulație, corpul galben începe să involueze.

Vulva și vaginul prezintă schimbări morfologice în ultima jumătate a gestației. Vulva se edematiază și vascularizează mai intens. Aceste transformări sunt mai vizibile la vacă față de iapă. La junci apar din luna a 5-a de gestație, iar vacile multigeste din luna a 7-a. Mucoasa vaginală, este palidă și acoperită cu o cantitate redusă de secreții.

Cervixul este închis de un dop de mucus, care se lichidează parțial numai la fătare, când are loc procesul de deschidere a gâtului uterin.

Uterul crește treptat în volum, coordonat cu dezvoltarea fătului și a anexelor sale.

Modificările acestuia se află sub dependență hormonală. La începutul gestației endometrul proliferază pînă când blastocistul se nidează. Tot în această perioadă glandele endometriale suferă o puternică ramificare și hiperplazie secretînd embriotroful.

Conform rezultatelor prezentate de Miclea V. și col. creșterea uterului

în volum începe după nidație și cuprinde: hipertofia fibrelor musculare, apariția fibrelor musculare de neoformație, îngroșarea stratului de țesut conectiv. Vasele sangvine de la nivelul peretelui uterin se înmulțesc și cresc în diametru, demonstrând sporirea afluxului de sânge. Toate aceste modificări ale uterului gestant sunt reversibile astfel încât, după parturiție uterul revine la dimensiunile și structura avută înaintea gestației.

Ovarul are caracteristic menținerea corpului galben, care blochează ciclul sexual, determinând starea de anaestru fiziologic. Cîteodată, unele vaci pot prezenta călduri în primele luni de gestație, ca o consecință a activității foliculare a ovarului.

La vacă, corpul galben de gestație își menține mărimea o anumită perioadă de timp după parturiție.

Glanda mamară are modificări variabile ca dinamică în funcție de specie și vârsta femelei. La primigeste glanda mamară începe să crească în volum încă din prima parte a gestației, pe seama dezvoltării țesutului conjunctiv. În ultima parte a gestației se organizează și multiplică acinii glandulari, apărînd înaintea fătării, secreția colostrală.

Hormonii, în timpul gestației, au rolul de a regla supraviețuirea embrionilor în primele etape ale dezvoltării, realizarea nidației, menținerea gestației, pregătirea parturiției, adaptarea organismului mamei la modificările interne, induse de existența și dezvoltarea fătului.

Runceanu I. și col. demonstrează că ovarele, uterul (placenta și endometrul) și hipofiza sunt considerate ca principale organe endocrine în gestație. Pe ovar corpul galben ciclic devine, după fecundație, corp galben de gestație (Miclea V. și col.). El se dezvoltă morfologic și își amplifică secreția. La majoritatea speciilor corpul galben atinge mărimea maximă după implantare, secretând spre exemplu, la oaie de 10 ori mai mult progesteron decât în faza luteală a ciclului sexual. Alături de corpul galben principal, la unele specii se formează, din foliculii neovulațiși a celor care au evoluat la începutul gestației, corpi galbeni accesorii. Factorul endocrin luteotrop, care stimulează creșterea și secreția corpului galben, este LH-ul, exceptînd rozătoarele unde aceasta este îndeplinită de prolactină. La unele specii hormonii luteotropi sunt produși de hipofiză și rămîn de neînlocuit pe întreaga durată a gestației. Alte specii au nevoie de hipofiză numai la începutul gestației, după care, luteotropinele placentare sunt suficiente pentru stimularea activității secretorii a corpului galben.

După formarea placentei, acesta secretă cantități importante de progesteron și estrogen. Valorile sangvine ale progesteronului rămân constante întreaga durată a gestației la vacă și oaie. Scăderea concentrației sangvine a progesteronului reprezintă semnalul apropierii momentului fătării.

Estrogenii înregistrează o creștere a valorilor sangvine spre sfârșitul gestației la aproape toate speciile de fermă. După fătare concentrația lor scade brusc, demonstrându-le originea placentară. Dinamica estrogenilor sangvini și urinari la femelele gestante este proprie fiecărei specii, comun fiind doar nivelul maxim din preajma fătării. Rolul lor este de a participa la realizarea mecanismelor care declanșează și susțin parturiția.

Miclea V. și col. au demonstrat că pe lângă transformările endocrine din sfera genitală, gestația determină activizarea multor glande cu secreție internă, în vederea realizării homeostaziei și susținerea dezvoltării noului produs, fapt care este considerat o modalitate de reactivare și perfecționare funcțională endocrină la femele.

Aparatul circulator este solicitat mai mult decât la femela negestantă, circulația sangvină uterină se intensifică. Dacă la femelele negestante, în general doar 2% din sângele pompat de inimă ajunge în circulația uterină, la femelele gestante această valoare atinge 20% intensificarea circulației sangvine uterine fiind corelată cu dinamica creșterii fătului și nu cu greutatea placentei.

Presiunea sangvină tinde să scadă în ultima parte a gestației, iar bătăile inimii se intensifică. Această situație arată o reducere a rezistenței vaselor sangvine periferice ce favorizează apariția edemelor de gestație. Volumul sîngelui crește cu 21% cordul se hipertrofiază, numărul de hematii pe unitatea de volum se reduce, iar viteza de coagulare sporește.

Drugiciu Gh. și col., Miclea V. și col., au demonstrat că sistemul nervos se află sub influența progesteronului, femela fiind mai puțin receptivă la diverși factori de disconfort. Reducerea excitabilității nervoase favorizează menținerea și susținerea gestației.

Din literatură de specialitate reiese că activitatea metabolică prezintă modificări importante în sensul predominanței anabolismului, ca urmare acțiunii progesteronului. Ca rezultat, femela se îngrasă în prima parte a gestației, când solicitările embriofetale sunt reduse. Cu toate că se menține capacitatea de sinteză și valorificare superioară a hranei și în a doua parte a gestației, femelele slăbesc datorită solicitărilor crescute din partea fătului.

Astfel, deși are loc creștere în greutatea femelei (pe baza masei corporale a fătului) unghiurile osoase devin mai ascuțite, femela apelînd la rezervele acumulate în prima parte a gestației pentru a susține ritmul de creștere a fătului. Așa se explică corelația dintre înelele de pe coarnele femelelor multigeste și numărul gestației acestora.

Particularitățile metabolismului și ale dezvoltării fătului impun o conduită nutrițională specifică și caracteristică fiecărei categorii de femele gestante, în scopul obținerii de produși viabili cu o dezvoltare ulterioară favorabilă.

Activitatea renală și hepatică se amplifică treptat, prelungindu-se și eliminîndu-se produșii rezultați în urma metabolismului organismului femel și al feteșilor.

Fiziologic, gestația este perioada cuprinsă între fecundație și parturiție. Deoarece fecundația are loc la puțin timp după montă și pentru că nu este un proces foarte evident în zootehnie, durata gestației reprezintă intervalul de timp dintre montă și parturiție.

Factorii care influențează durata gestației

Factorii materni se referă în principal la vârsta femelei, astfel încît, femelele primipare și cele bătrîne au durata gestației mai mare decît a celor aflate în vîrful activității reproductive.

Factorii fetalii cuprind: numărul feteșilor, sexul produsului, activitatea endocrină a fătului. Gestația multiplă la femelele unipare scurtează durata gestației, iar fătarea gemelară la vacă scurtează gestația cu 3-6 zile. Atunci cînd la unipare produsul este mascul gestația se prelungește. Vaca care fată masculi are gestația cu 1-2 zile mai lungă decît în cazul fătării unei femele. **Factorii genetici.** Din analiza datelor din literatură se observă că există diferențe mari de la o specie la alta, încît, rasele aparținătoare aceleiași specii pot avea durata gestației diferită. În general, rasele perfecționate au gestație mai scurtă decît cele primitive.

La transferul de embrioni s-a observat că durata gestației este determinată în cazult taurinelor, de genotipul embrionilor. Transferînd embrionii aparținînd unor rase cu gestație mai scurtă femelelor din alte rase cu gestația mai lungă fătarea a avut loc la sfîrșitul unei perioade de timp caracteristică genotipului embrionilor (Vintilă I. și col.).

Factorii de mediu sunt reprezentați de mezzo- și microclimat, respectiv furajarea femelelor gestante. Literatura de specialitate a remarcat că monetele fecunde din a doua jumătate a verii și de toamnă, prelungesc gestația iepelor, pe când cele de primăvară devreme o scurtează.

Îngrijirea și furajarea la nivelul cerințelor scurtează gestația la majoritatea speciilor animalelor de fermă. Carențele nutriționale în iod și vitamina A determină prelungirea gestației cu 1-14 zile, iar supunerea femelelor la efort fizic intens în ultima perioadă a gestației o scurtează cu până la 10 zile.

Deci, cu siguranță, variațiile duratei gestației între limitele fiziologice caracteristice sunt determinate genetic.

19. PARTURIȚIA

Parturiția, sau fătarea este actual fiziologic prin care, din uter este eliminat fătul și anexele fetale la încheierea perioadei de gestație, în urma întreruperii legăturii acestora cu organismul matern.

Gluhovschii N. concluzionează că după modul în care se desfășoară parturiția, se întilnește: fătare eutocică atunci când expulzarea fătului și a anexelor se face prin forțe proprii femelei; fătare distocică în care trebuie să intervină specialistul; fătare ușoară dacă decurge într-o perioadă scurtă de timp; fătare laborioasă desfășurată într-o perioadă lungă de timp, cu eforturi mari din partea femelei.

Semnele apropierii fătării (prodromale)

Cunoașterea apropierii momentului fătării este importantă în vederea asigurării asistenței femelei într-un moment foarte important, care poate afecta negativ activitatea reproductivă ulterioară, viața acesteia și a nou-născuților.

Literatura de specialitate demonstrează că semnele apropierii momentului fătării sunt reprezentate de modificările de la nivelul bazinului, vulvei, glandei mamare, precum și de comportamentul femelei. Intensitatea de manifestare a acestor semne prezintă particularități de specie, grupe de specii și individ.

La nivelul bazinului se realizează relaxarea ligamentelor sacro-iliace, a

articulațiilor, coborîrea sacrumului și a bazei cozii. Coada are o mobilitate excesivă, iar punerea în evidență a relaxării ligamentelor sacro-iliace se face prin palparea marginilor posterioare a acestora.

Vulva se edemațiază, ștergîndu-se complet pliurile existente pe suprafața ei (la vacă), iar cu una două zile înaintea fătării, la nivelul comisurii vulvare inferioare, apare un mucus filant gălbui opalescent, care reprezintă dopul de mucus cervical ce a început să se lichefieze și să se elimine.

Glanda mamară este mult mărită în volum, adeseori prezintă un edem evident, care se poate întinde subabdominal și parineal. La vacă, ugerul este turgescenț, cu mameloanele îndepărtate fiind numit „uger împrăștiat”. Înaintea fătării apare secreția colostrală, care poate fi evidențiată prin muls, sub forma unor picături, la nivelul deschiderii orificiului mamelonar sau ca niște jeturi. În prima situație, pînă la parturiție mai sunt cîteva zile iar în al doilea caz au mai rămas cîteva ore.

Miclea V. a stabilit că comportamentul femelei este caracterizat prin instalarea unei stări de agitație cu intensitatea manifestării în funcție de individ. Vacile, înaintea începerii fătării caută să se izoleze, iar scroafele încearcă să-și amenajeze cuibul de fătare.

Tănasi D. și col. menționează că existența particularităților legate de femelă, fac uneori aprecierea momentului fătării, pe baza semnelor prodromale, să aibă un caracter aproximativ. De aceea, cunoașterea lor în general, este absolut necesară, pentru ca fiecare crescător de animale să studieze comportamentul propriilor animale astfel încît, avînd în vedere și experiența acumulată, să poată ajuta femela în depășirea momentului dificil reprezentat de parturiție.

Menținerea fătului o perioadă atît de lungă în organismal femelei gestante presupune interacțiuni materno-fetale extreme de complexe. Gluhovschii N. demonstrează că încă nu se cunoaște cu precizie mecanismul prin care, un organism care posedă 50% din antigenele moștenite de la tată, să nu fie respins de organismal gazdă matern. Se apreciază că în acest sens intervin o serie de factori care frînează multiplicarea și reacțiile limfocitelor materne (GH.Răpoleanu). În acest proces este cuprinsă foița trofoblastică, cu celulele sale neantigenice, și factori depresori ai reacțiilor imune produși de mama și făt.

Declanșarea parturii

Miclea V, și col. apreciază că declanșarea parturii poate fi considerată ca urmare a dereglării mecanismului fiziologic de păstrare a toleranței imunologice prin intervenția factorilor neuro-hormonali, metabolici și fizici. Cu siguranță, după cum menționează autorii, rolul hotărâtor revine factorilor neuro-hormonali. Conform teoriei neuro-hormonale, în inițierea parturii sunt implicați cinci hormoni: progesteronul, estrogenii, ocitocina, prostaglandinele și relaxina.

Progesteronul joacă un rol deosebit de important în menținerea gestației datorită reducerii contractibilității miometrului. Așa cum s-a menționat deja, concentrația sangvină maternă a progesteronului scade pînă la declanșarea parturii la toate speciile de fermă, exceptînd cabalinele.

Mecanismul responsabil de reducerea cantității sangvine de progesteron este dependent de organul care îl secretă. Dacă este produs de corpul galben (vacă, scroafă, capră), involuția morfologică a acestuia diminuează nivelul secreției de progesteron în preajma declanșării parturii.

Tănase D. și col demonstrează că ocitocina este hormonal care acționează, mai ales, în stadiul de expulzare a fătului. Nu se cunoaște exact rolul său la inițierea parturii. Nivelul sangvin al ocitocinei nu se modifică mult la începutul fătării, dar realizează un maxim în timpul expulzării fătului, după care scade.

Literatura de specialitate demonstrează că prostaglandinele sunt produse de endometru. Creșterea concentrației sangvine în estrogeni și reducerea progesteronului stimulează sinteza $PGF2\alpha$. Rolul cel mai important al $PGF2\alpha$ este de a induce contractile uterine puternice din stadiul de expulzare a fătului, contribuind și la dilatarea cervixului. La vacă, $PGF2\alpha$ produce liza corpului galben, reducându-se astfel secreția de progesteron. De asemenea, induce secreția relaxinei de către corpul galben de gestație.

Relaxina participă la mecanismul parturii mobilizînd articulațiile bazinului și contribuind la dilatarea cervixului prin relaxarea structurilor sale.

În literatura de specialitate se demonstrează că alături de modificările hormonale menționate și sub influența lor, spre sfîrșitul gestației crește conținutul miometrului în ioni de calciu și potasiu, în concordanță cu reducerea concentrației ionilor de magneziu, ceea ce determină sporirea de

excitabilitate. De asemenea, în perioada de gestație se realizează treptat creșterea capacității contractile, prin sporirea cantității de creatinine, fosfagen, acționează și glycogen în fibrele miometrului. În ultimele zile de gestație crește cantitatea de acetil colină liberă. Se constată, de asemenea, sporirea excitabilității miometrului de diferiți stimuli hormonal, fizici, neurali și sensibilitate accentuate la mișcările fătului.

Ca rezultat a tuturor acestor mecanisme apare prima contracție a miometrului care, provoacă automat, pe cale neurală, o altă contracție, astfel fiind inițială parturiția.

Inducerea parturiției poate fi realizată administrându-se glicocorticoizi la vaci. PGF 2α declanșează artificial parturiția la vacă, capră și scroafă deoarece determină involuția corpului galben de gestație.

Forțele care concur la expulzarea fătului

Miclea V. și col., Gluhovschi N. au demonstrat că forțele care participă la desfășurarea fătării sunt: contractile uterine, tonusul uterin și pres abdominală. La acestea se adaugă mișcările de acomodare a fătului pe traiectul conductului pelvin. Intensitatea și modul de acțiune a fiecăreia dintre forțe variază în funcție de stadiile fătării.

Contractile uterine reprezintă principala forță a fătării și prezintă următoarele caracteristici: sunt involuntare, peristaltice, intermitente și progresive.

Involuntare pentru că se declanșează spontan, pe baza unor mecanisme neuro-hormonale, metabolice și fizice, proprii mamei și fătului. Centrul regulator al acestor contracții se află în măduva dorsală, dar există și centrii intrauterine autonomi.

Peristaltice deoarece pornesc de la vârful cornului uterin și sunt orientate spre cervix, producând scurtarea – concomitent cu o creștere corespunzătoare – diametrului transversal.

Existența unor contracții peristaltice ale miometrului determină deplasarea fătului spre cervix și cavitatea pelvină.

Intermitente, adică apar după o perioadă de liniște. Existența pauzelor dintre contractile uterine permite desfășurarea circulației sangvine materno-fetale în timpul fătării.

Din literatură de specialitate se cunoaște că la începutul parturiției contracțiile se succed la intervale de 15-20 minute și au o intensitate redusă.

Pe măsură ce fătul și anexele fetale se angajează în conductul pelvin devin mai dese, repetându-se la 1-2 minute, iar intensitatea lor crește. Intensitatea maximă a contracțiilor uterine se înregistrează în momentul expulzării fătului (45-80 mmHg), când și durata este cea mai lungă (1-2 minute).

Cercetările științifice prezentate în literatura de specialitate demonstrează că contracțiile uterine pot fi activate cu ocitocină, glucoză, acetilcolină, ergomet masarea regiunii abdominale, dilatarea forțată a cervixului, folosirea căldurii și frigului. Reducerea contracțiilor uterine se poate realiza administrându-se atropină și cloroform sau alte substanțe medicamentoase.

Tulburările contracțiilor uterine se manifestă sub forma exagerării, micșorării și lipsei forțelor de contracție. Exagerarea forțelor de contracție, numită hiperchinezie sau tetanie uterină, este produsă de anumite situații sau obstacole care împiedică expulzarea fătului. Micșorarea forțelor de contracție, numită și hipochinezie sau inerție uterină, se constată mai des la femelele exploatare și întreținute necorespunzător și are un determinism neuro-hormonal.

Achinezia este urmarea exagerării forțelor de contracție și epuizării elementelor de susținere a contracțiilor miometrului.

Miclea V. și col. afirmă că tonusul uterin participă la fătare prin menținerea fătului în poziția în care a fost deplasat de contracția uterină anterioară. În timpul parturii tonusul este mult mai ridicat (70 mmHg) decât tonusul uterin de gestație (30-40 mmHg).

Sucesiunea contracțiilor, urmate de tonus uterin, împinge fătul prin conductul pelvin, expulzându-l în mediul exterior.

Presa abdominală este constituită din contracția mușchilor abdominali asociați cu a mușchilor spinali și a diafragmei. Contracția acestor grupe musculare realizează o presiune de 70 mmHg, care se exercită asupra fătului prin intermediul viscerelor. Această forță participă la fătare numai în stadiul de expulzare, iar atunci când apare înainte de dilatarea completă a gâtului uterin poate duce la distocii fetale și chiar la ruperea pereților uterini.

Senzațiile de durere, la parturii, apar în timpul contracțiilor uterine și acelor abdominale, ca urmare a compresiunii exercitate asupra filetelor nervoase din uter și cavitatea pelvină. Eforturile cele mai mari și în consecință și durerile cele mai intense se înregistrează la angajarea, respectiv trecerea

capului, centurii scapulare și pelvine fetale prin conductul pelvin matern.

S-a demonstrat că realizarea eliminării fătului din cavitatea uterină se desfășoară în următoarele trei etape succesive: deschiderea gâtului uterin, angajarea și expulzarea fătului și expulzarea anexelor (învelitorilor) fetale (Miclea V.).

Fiecare dintre aceste stadii prezintă caracteristici comune tuturor femelelor animalelor de fermă, precum și particularități specifice.

Stadiul de deschidere a gâtului uterin ține de la declanșarea fătării pînă la realizarea canalului utero-vaginal, prin distensia completă a cervixului. Are o durată variabilă în funcție de specie, vîrstă și individ și este precedat de o hiperemie pasivă însoțită de procese infiltrative, care conduc la scăderea rigidității. În consecință, la palpație cervixul are o consistență moale, diferită de consistența dură din timpul gestației și a ciclului sexual (Gluhovschii N.).

Datele din literatură de specialitate dovedesc că concomitent, fibrele musculare uterine longitudinale încep să se contracte. Deoarece au inserția mobilă la nivelul fibrelor musculare cervicale circulare, iar cea fixă în coarnele uterine se dezvoltă o forță de tracțiune radiară care deschide treptat gâtul uterin. Dacă la fătările anterioare s-au produs fenomene nedorite, care au modificat integritatea morfofuncțională a fibrelor musculare circulare de la acest nivel, atunci deschiderea gâtului uterin este îngreunată sau chiar imposibilă.

S-a demonstrat că la formarea canalului utero-vaginal participă și pungile apelor, care presează asupra pereților gâtului uterin, după ce au pătruns treptat în deschiderea realizată de contracția fibrelor musculare uterine longitudinale.

Pungile apelor sunt: punga alantoidiană care conține lichid alantoidian și punga amniotică cu lichidul amniotic. La începutul deschiderii gâtului uterin acționează punga alantoidiană, care progresează treptat din canalul cervical în cel vaginal, unde se poate rupe.

Punga amniotică, împreună cu regiuni anatomice fetale anterioare sau posterioare, formează conul fetal. Acesta continuă și intensifică presiunea mecanică asupra gîntului uterin deschizîndu-l complet.

În timpul deschiderii gâtului uterin se desfășoară etapa de acomodare a fătului. Ea reprezintă trecerea fătului din poziția în care a stat în timpul vieții intrauterine (decubit lateral la vacă) la poziția dorso- sau lombosacrală favorabilă, expulzării. Practic, sub influența contracțiilor uterine fătul se

rotește. Dacă rotația se face incorect rezultă poziții distocice. Angajarea pungilor fetale și a conului fetal crează stimuli, care duc la cale neuro-reflexă la continuarea și intensificarea contracțiilor uterine.

Durata deschiderii gâtului uterin variază între 3-5 ore în dependență de specie și individ.. Femelele sunt obișnuite liniștite în această perioadă de timp, deoarece durerile nu sunt încă intense. Spre sfârșitul stadiului, unele femele încep să fie agitate. Se scoală și se culcă repetat, urinează frecvent întorc capul spre regiunea flancului.

Stadiul de angajare și expulzare a fătului începe prin formarea conului fetal. În cazul prezentării anterioare, membrele se întind în prelungirea corpului, capului se așează pe ele cu regiunea gâștelor, iar membrele posterioare sunt situate subabdominal. În cazul prezentării posterioare, membrele respective se întind în prelungirea corpului, iar membrele anterioare sunt flexate substernal. În fața ongloanelor se găsește o parte din pungele apelor care, împreună cu extermitatea anterioară a membrilor (plus capul la prezentarea anterioară) formează conul fetal.

Din literatura de specialitate se cunoaște că realizarea angajării fătului face să ajungă conul fetal în canalul cervical, contribuind la ștergerea completă a gâtului uterin.

Expulzarea propriu-zisă este marcată de momentul în care, centura scapulară sau pelvină se află la nivelul canalului cervical. Acum contracțiile uterine au o intensitate maximă, de până la 200mmHg. În această etapă se declanșează pe cale reflexă și presa abdominală. Sub acțiunea unor contracții uterine de maximă intensitate și aproape tetaniforme sunt depășite dificultățile de exterior.

Durerile fătării sunt maxime din momentul angajării fătului în conductul pelvin, având rolul de a solicita din partea femelei eforturi de expulzare tot mai intense și mai prelungite. După expulzarea fătului se liniștește, dar este într-o stare de oboseală avansată, uneori fiind complet extenuată. Durata stadiului este de până la 3-4 ore, în funcție de numărul produșilor. În acest stadiu pot apărea tulburări de cinetică uterină, care împiedică expulzarea fătului prin forțe proprii. Intervenția constă în efectuarea de tracțiuni obstetricale, adoptându-se o conduită specifică. Staționarea fătului în cavitatea pelvină poate fi asociată cu o compresie a cordonului ombilical care să întrerupă circulația sangvină de la acest nivel, ceea ce impune rezolvarea rapidă a tulburărilor de dinamică uterină.

Stadiul de expulzare a anexelor fetale este intervalul de timp dintre expulzarea fătului și eliminarea din cavitatea uterină a învelitorilor fetale. Desprinderea angrenajului placentar este un fenomen complex la realizarea căruia participă factori enzimatici vasculari și mecanici.

Miclea V. afirmă că spre sfârșitul gestației apar procese fiziologice care determină, pe lângă declanșarea parturii, și alterarea legăturilor placentare. După ruperea cordonului ombilical, vilozitățile coriale își reduc volumul, iar criptele uterine devenind mult prea mari. Sub influența contracțiilor originare vîrfului cornului uterin, începe desprinderea și răsfrîngerea spre interior a învelitorilor fetale. Prezența anexelor desprinse în cavitatea uterină contribuie la declanșarea altor zone și, în final, la eliminarea lor.

Timpul de expulzare a placentelor diferă de la o specie la alta prezentînd chiar și variațiile individuale.

De regulă, la vacă placenta se elimină în 2-12 ore. Neeliminarea învelitorilor fetale în intervalul fiziologic caracteristic se consideră retenție placentară, impunînduse extragerea lor manuală.

Adaptări post natale ale nou-născutului

Fetusul, care a depins în totalitate de placentă pentru realizarea respirației, nutriției și excreției, este obligat după parturiție să-și adapteze noile funcții, la cerințele vieții extrauterine.

S-a demonstrat că în timpul fătării fetusul a putut suferi o serie de agresiuni întîmplătoare, cum ar fi traumele mecanice și asfixie, care pot reduce sau compromite capacitatea sa de adaptare la noile condiții de viață.

La nivelul sistemului circulator, odată cu selecționarea cordonului ombilical, intră în funcție circulația sangvină pulmonară, închizîndu-se comunicarea acesteia cu aorta descendentă. De asemenea, scade rapid presiunea sîngelui din auriculul drept și crește în auriculul stîng (din cauza intrării în funcțiune a circulației pulmonare), determinînd închiderea găurii lui Botall în cîteva săptămîni de viață.

Plămîinii, suferă un proces de distensie; ei își măresc mult volumul primind structura caracteristică adultului, ceea ce favorizează realizarea schimbului respirator.

Tânase D. și col. au constatat că mecanismele de termoreglare, blocare intrauterin, intră în funcție, iar eficiența adaptărilor funcționale este depen-

dentă, în primul rînd, de nivelul maturității fiziologice a acestor mecanisme, rezervele de glicogen și prezența stratului adipos subcutanat.

Datele experimentale expuse în literatură de specialitate afirmă că unul dintre mecanismele de adaptare a nou-născuților la temperaturi joase este declanșat consecutiv creșterii secreției de cortizol la parturiție. Aceasta intensifică funcționarea tiroidei fetale care mărește nivelul tirodioninei din țesuturi și astfel, procesele oxidative celulare responsabile de producerea căldurii se intensifică, asigurîndu-se termoreglarea în prima oră de după fătare.

În perioada dintre naștere și primul supt, susținerea metabolismului nou-născuți se face pe baza rezervelor proprii de glicogen din ficat și mușchi. Scăderea rapidă a rezervei hepatice de glicogen arată că acesta este mobilizat pentru menținerea glicemiei. Echipamentul de anticorpi necesari menținerii hemeostazei este dobîndit de nou-născut prin supt, la majoritatea animalelor de fermă. Deoarece intestinul noului produs este permeabil pentru imunoglobuline numai 24-36 ore, acesta trebuie să sugă cît mai des în perioada respectivă (Cornescu H. și col., Bogdan A. și col.).

Îngrijirea nou-născutului trebuie să țină seama de toate adaptările amintite în sensul creerii condițiilor necesare realizării lor. Imediat după expulzare se curăță orificiile nazale și botul. În caz de moarte aparentă se va proceda la exercitarea reflexă a mucoasei nazale cu o pană sau pai, concomitent făcîndu-se respirația artificială. Cordonul ombilical se va bucura de o grijă deosebită. În cele mai multe cazuri acesta se rupe spontan, însă de regulă, fiind prea lung este tîrît prin așternut favorizîndu-se astfel apariția unor afecțiuni caracteristice. Iată de ce, chiar dacă se rupe spontan, cordonul ombilical este legat de 8-10 cm sub inelul ombilical, secționat la 2 cm sub legătură, iar capătul liber se introduce în tinctură de iod sau glicerină iodată.

În continuare sunt îndepărtate mucozitățile și fragmentele anexelor fetale și se șterge bine pielea pentru uscarea. Scopul acestei acțiuni este de a împiedica pierderile de căldură prin evaporarea lichidelor anexiale existente pe suprafața corpului și de a intensifica circulația periferică, favorizînd termoreglarea. La rumegătoare, această operație o face mama prin lins.

Administrarea primului supt este precedată de spălarea glandei mamare și înlăturarea primelor cantități de colostru – staționare de mai mult timp în căile gelactofore – prin mulgere. La toate speciile reflexul suptului

apare, dintr-o necesitate fiziologică ca cel mai activ reflex al nou-născutului. Lăcomia acestuia este firească, dar se cuvine a fi temporată deoarece capacitatea volumetrică și funcțională a tubului digestiv este redusă. În caz contrar apar tulburări digestive manifestate, mai ales, prin diaree. Folosirea la maximum a perioadei colostrale are o importanță majoră în această perioadă de adaptare a nou-născutului la condiții de mediu total diferite de cele din viața intrauterină. Pentru a fi eficienți este necesar să se țină seama că, întrecaracteristicile colostrului și perfecționările funcționale ale tubului digestiv, există o coordonare perfectă. Pe măsură ce ne îndepărtăm de momentul fătării, colostrul își reduce cantitatea de anticorpi și proteine ușor digeribile, dar aparatul digestiv devine tot mai performant din punct de vedere funcțional, ceea ce-i permite să utilizeze cantități tot mai ridicate de lapte, cu proprietăți nutritive mai scăzute. Se impune așadar, realizarea unui startcît mai bun în creșterea nou-născutului, prin utilizarea cît mai intensă a colostrului, în condițiile unor imperfecțiuni digestive specifice perioadei respective.

De regulă, nou-născuții scad în greutate cu circa 4% în primele 6-7 zile de viață datorită deshidratării și imperfecțiunilor funcționale, după care acumulările de masă corporală au loc într-un ritm accelerat.

Cînd femela nu are colostru, se administrează colostru de la alte femele sau înlocuitori preparați după diferite rețete, caracteristice speciilor animalelor de fermă.

După fătare, în perioada de alăptare, organismul femelei, mai ales ovarele și căile genitale suferă o serie de transformări fiziologice în vederea reglării activității reproductive.

Puerperiumul, sau perioada postpartum, este cuprinsă între fătare și momentul cînd organismul matern a revenit la statutul de femelă negestantă. Deoarece la vacă se urmărește reinstalarea gestației cît mai timpuriu posibil, o mai complicată definiție a perioadei puerperale ar fi reprezentată de intervalul de timp dintre parturiție și primul ciclu estral cu însămintare sau montă fecundă.

Miclea V. și col. clasifică procesele care au loc la nivelul aparatului genital, în: involuția uterină, eliminarea loșiilor, dispariția proceselor infiltrative și reluarea activității ovariene.

Involuția uterului reprezintă revenirea uterului la mărimea și activitatea avută înainte de instalarea gestației. Autorii demonstrează că procesul de

involuție uterină este determinat de contracțiile miometrului uterin, sterilizarea cavității uterine, refacerea endometrului și depinde de modificările hormonale și neuro-vegetative, care apar după eliminarea fătului și anexelor fetale.

După fătare la nivelul uterului încep procese de retracție vasculară, scurtarea și reducerea în volum a fibrelor musculare din miometru, degenerarea celulelor epiteliale endometriale. Ca urmare, volumul uterului se reduce treptat revenind la poziția topografică avută înainte instalării gestației. În primele zile după fătare pereții uterini se îngroașă de 4-5 ori la animalele mari, iar volumul se micșorează de 2-3 ori.

Toate aceste transformări sunt datorate unei secreții susținute de $PGF2\alpha$, care mărește contractibilitate uterului, cea ce induce apariția proceselor involutive. Secreția de $PGF2\alpha$ de după fătare este mai ridicată la speciile cu placentă cotiledonară decât la cele cu placentă difuză.

Concomitent cu involuția are loc închiderea gâtului uterin, regenerarea endometrului și sterilizarea cavității uterine. La fătare dilatarea cervixului permite pătrunderea în cavitatea uterină și multiplicarea rapidă a unui variat număr de agenți microbieni patogeni sau nepatogeni. Creșterea activității contractile concomitent cu începerea activității estrogenice ovariene declanșează mecanismul de infiltrare leucocitară uterină, care determină în final sterilizarea acestui compartiment al căilor genitale. Timpul necesar sterilizării uterului este influențat de gradul contaminării cu agenți microbieni la parturiție, retenția anexelor fetale și producția de estrogeni. În condiții necorespunzătoare de îngrijire, furajare, stabulație prelungită, exploatare nerațională, apar tulburări complexe care îngreunează acțiunea mecanismelor ce determină și coordonează involuția uterului.

Închiderea involuției uterine presupune existența contracțiilor uterine, refacerea completă a endometrului și a glandelor endometriale, capabile să secrete embriotrop în ciclul sexual ce se va relua. Refacerea glandelor uterine este unul din semnele care marchează finalizarea involuției. Regenerarea endometrului este mult mai rapidă la speciile cu placentă difuză comparativ celor cu placentă cotiledonară.

Din literatură se cunoaște că loșiile reprezintă lichidele care se scurg de la nivelul căilor genitale în perioada puerperală și sunt formate dintr-un amestec de lichide provenite din anexele fetale, sânge, mucus secretat de glandele uterine, fragmentate neeliminate ale anexelor fetale și detritus celular.

Imediat după fătare, în general, loșiile au culoarea roșie-brunie, după care încep să se decoloreze treptat devenind gălbui, iar în final sunt transparente, reduse cantitativ, cu aspect mucos. Abaterile de la evoluția menționată constituie un indiciu al instalării unui puerperium patologic.

De subliniat este faptul că loșiile, prin compoziția lor, constituie un mediu propice dezvoltării florei microbiene, iar neeliminarea sau prelungirea eliminării acestora este un factor ce favorizează apariția infecțiilor puerperale.

Gluhovschii N. afirmă că reluarea activității ovarului are loc în urma regresiei corpului galben de gestație și dezvoltării în paralel a foliculilor ovarieni. Cu cât activitatea ovarului începe mai repede cu atât involuția uterină, eliminarea loșiilor și degradarea lor, precum și refacerea morfofuncțională a endometrului au loc mai devreme. Estrogenii, produși de foliculi, în cooperare cu ocitocina, au rolul principal în realizarea unui puerperium fiziologic.

La vacă, modificările ovariene sunt detectabile la 5-7 zile post – partum prin creșterea foliculilor. În mod normal, la această specie (I. Boitor,) apar două ovulații în primele 30-35 zile post – partum. Perioada medie dintre fătare și prima ovulație este de 14 zile (influențează de starea de întreținere și producția de lapte poate ajunge la 35 de zile), dar numai 14-35% dintre vaci manifestă călduri. După 15 zile de la prima ovulație, iar în următoarele 21 zile se realizează a treia ovulație. Dinamica apariției căldurilor la vaci, din efectivul fătat este următoarea: 6% la 30 zile, 44% la 45 zile, 75% la 60 zile, 87% la 75 zile, 96% la 90 zile, 100% la 102 zile. Fecunditatea este de 4,5 % dacă căldurile apar în primele 21 zile după fătare, ajungând la 35% la 60 zile post-partum. Procentul de fecunditate este mai mare dacă ovulația are loc pe cornul uterin contralateral celui în care s-a derulat gestația.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

Acker J.P., McGam L.E. – Membrane damage occurs during the formation of intracellular ice, *Cryoletters*, 2001, 22(4), p.241-254.

Adams C.E. (1982) - Mammalian egg transfer. CRR Press. Inc.2000 Corporate.

Blud.N.W.Boca Raton USA.

Anzar M., He, Liwei, Buhz M.M., Kroetsch T.G., Pauls, K.P. – Sperm apoptosis in fresh and cryopreserved bull semen detected by flow cytometry and its relationship with fertility. *Biol. Reprod.* 2002,66, p.354-360.

Bavister B.D. (1991) - The mammalian preimplantation embryo, Plenum Press, New-York and London.

Bencsik I. (1998) - Multiplicarea organismelor genetice superioare prin embrio-transfer și biotehnologiile asociate Teză doctorat.

Betteridge K.J. (1977) - Embryo transfer in farm animals. A review of techniques and application. Canada Department of Agriculture, Monograph 16.

Bogdan A. T. șicol. – Tratat de reproducție și însămînțări artificiale la suine. București: Ed. – tehn-agr. 1999, 920p.

Bogdan A.T., Bistriceanu M., Majina C.,(1981) - Reproducția animalelor de fermă. Editura Scrisul Românesc, Craiova.

Bogdan A.T., Bogdan Dorina (1993) - Biotehnologii actuale și de perspectivă în reproducerea animalelor. *Simp.Naț.al Academiei Române*, București.

Bogdan, A.T., Bistriceanu, M., Majina, C., 1981 – Reproducția animalelor de fermă. Ed. Scrisul Românesc, Cluj-Napoca.

Bogdan, A.T., Târnoveanu, I., Salanțiu, Dorina, 1984 – Fertilitatea, natalitatea și prolificitatea în zootehnie. vol. I, Ed. Dacia, Cluj-Napoca.

Boitor, I. 1979 – Endocrinologia reproducției la animalele de fermă. Ed. Dacia, Cluj-Napoca.

Boitor, I., 1977 – Hormonii și funcțiile lor biochimice Ed. Ceres, București.
Boland Maurice,P., Pearse Kelly, George Ramsbottom (1994) - Factors affecting superovulation in cattle and sheep. In *Progress in embryo technology and genetic engineering in cattle and sheep breeding.* Krakow, Poland.

Bonca Gh. – Cercetări privind efectele etapelor de lucru asupra integrității spermatozoizilor în timpul conservării spermei prin congelare. *Proc. of the IVth Int. Simp. ACM-V, Timișoara*, 2000, p. 448-459.

Bowen R.A., Pineda M.H. (1989) - Embryo transfer in domestic animals, Cap. 19, in “*Veterinary Endocrinology and Reproduction*”, Ed. Lea and Febiger, Philadelphia, ediția IV, 526-555.

Breining E., 2005, *Theriogenology*, 63; 2126-2135

Busato A., S.Romagnoli, U. Kupfer, G.L.Rossi, G.E.Bestetti (1995) LH,FSH,PRL and ACTH cells in pituitary glands of cows with ovarian cysts.

Buhz M.M., Curtis E.F., Somnapan Kakuda N. – Compozition and behavior of hed membrane Lipids of fresh and cryopreserved boar semen, *Criobiology*, 1994, 31(3), p.224-238.

Cală, N. (2000) - *Biologia reproducerei animalelor*. Edit. Mirton, Timișoara. Cernescu H. Ardelean V. Bonca GH. – *Îndrumator de activități practice la patologia reproducerei și clinica obstetricală, fito USAB, Timișoara 1991.*

Cheng W.T.K., Moor R.M., Polge C. (1989) - In vitro fertilization of pig andsheep oocytes matured in vivo and in vitro. *Theriogenology* 25, 146.

Cheng W.T.K., Polge C Moor R.M.,. (1989) - In vitro fertilization of pig andsheep oocytes. *Theriogenology* 25: 146 (Abst).

Cîrlan, M., (1998) – *Elemente de genetică animală patologică*. Ed. Polirom, Iași.

Cîrlan, M., Creangă, Șt., 2001 – *Evoluția determinismului genetic al sexelor*. Ed Polirom, Iași.

Cotea, V. C., (2001) – *Biologie celulară, embriologie generală, histology generală*. Ed. Tehnopress, Iași.

Cristea I. - *Fiziologia animalelor domestice*, Editura Didactica pedagogica, București, 1978.

Cristian Dudouet (2004), *La production des bovines allaitants*. 2e edition. Edit-press S.A-46. 383 p.

Dalton, J.C. (1999) - Factors important to the efficiency of artificial insemination in single ovulating and superovulated cattle. *Disertation for degree of Doctor of philosophy*, Virginia State University, SUA.

Dinescu S. (2002) – *Creșterea vacilor pentru lapte - Tehnologii moderne*, Editura CERES București.

Dobrescu P. (1977) - Rezultate privind prelevarea, păstrarea și transferul zigotilor de scroafă. *Rev.Creșterea Anim.*, 5-6, 22-30.

Driancourt, M.A., 1991 – *Follicular dynamics in scheap and catle*. *Theriogenology* 35, 1, 55-59.

Drugociu, Gh., Seiciu, Fl., Boitor, I., Bilcea, P., 1977 – *Patologia reproducției și clinică obstetricală*. Ed. did. și ped., București.

Dumitrescu, D. Bogdan, M. Naforniță - *Reproducția animalelor domestice*, Editura didactica și pedagogică, 1976.

Edwin (1999) - *Embryo Freezing in a home-made freezer 5** Edition. America Association of Bovine Practitioners seminar. Harrogate genetics internațional, Inc.

Edyg E. M., O'Brien, Deborah – the spermatozoon, in the Physiology of Reproduction, Second Edition, E. Knobil and J.D. Neil Eds., Raven Press, FID., New York, 1994, p. 29-77.

England G. C. – Criopreservation of dog semen a review, J. Reprod. Fertil Suppl., 1993, 47, p.243-255.

Farstadt W. – Asisted reproductive tehnology in canid species, Terriogenology, 2009, 53, (1), p. 175-186.

Feredean T., Chiru D., (1977) – Transferul de embrioni la animalele de fermă. Ed.Ceres București.

Feredean, T., Mantea, A.C., 1984 – Prostaglandinele în reproducția animalelor. Ed. Ceres, București

Galii C., Moor R.M. (1991) – Gonadotrophin requirements for the in vitro maturation of sheep oocytes and their subsequent embryonic development. Theriogenology 35, 1083-1093.

Galii Cesare and Giovanna Lazzari (1994) – Large scale production of bovine embryos. In Progress in embryo technology and genetic engineering in cattle and shepp breeding.. Krakow, Poland.

Gandolfi F., Moor R.M. (1987) – Stimulation of early embryonic development in the sheep by co-culture with oviduct epithelial cells. J.Reprod. Fert. 81, 23-28.

Liciu GH. - Reproducția dirijată la taurine veriga de bază în ameliorare, Editura CERES București, 2000.

Ghișe Gh., Ilie Daniela, Sz.Bodo, M.Szabari, Elen Gocza, I.Vintilă (2004) - Producerea in vitro a embrionilor de bovine - Studiul efectului materialului seminal. Buletinul Societății Naționale de Biologie Celulară. A XXII-a Sesiune. Șt. anuală a Societății Naționale de Biologie Celulară 10-13 nr.32 - iunie 2004, Sighișoara.

Gluhovschi, N., 1970 – Ginecologie veterinară. Ed. Ceres, București.

Gluhovschi, N., Drugociu, Gh., Seiciu, Fl., Dumitrescu, I., 1972 – Biologia și patologia reproducției, vol. I și II. Ed. did. și ped., București.

Gluhovschi, N., 1978 – Sterilitatea andrologică la animale. Ed. Ceres, București.

Gordon I. (1944) - Laboratory production of cattle embiyos, CAB International, UK.

Greve T. (1992) - In vitro embryo technologies in cattle with particular reference to their use in cattle breeding. Reprod.Dom.Anim, 27 (1) 22-28.

Grozea A., Gh.Ghișe, A.Guler, I.Vintilă, (1998) - Fecundația in vitro la bovine. Influența metodei de pregătire a spermatozoizilor în vederea capacitării lor in vitro. Sesiunea Șt.Anuală, Fac.de Med.vet.5-6 noi.

Grozea A., Vintilă I., Ilie Daniela, Carabă V., Bura M., Bencsik I., Muscalu R. (2003) - Cercetări privind producerea de himere prin transplant de blastomere la peștele zebra (Danio rerio). *Lucr.Șt.Zoot.și Biotehnoogii*, vol XXXVI, Timișoara.

Guler A., A.Grozea, Gh.Ghișe, Gabi Dumitrescu I.Vintilă, N.Păcală (1997) - Cultura in vitro a embrionilor obținuți pe cale artificială. *Lucr. Șt. Zoot.și Biotehn. Timișoara*, vol. XXX.

Guler A., I.Vintilă, N.Păcală, N.Corin.Gh.Ghișe (1996) - Attempts of the in vitro maturation and fertilization of the sheep oocytes. *Lucr. Șt. Zoot.și Biotehn. Timișoara*, vol. XXIX.

Guler, A. Grozea, Gh. Ghișe, Gabi Dumitrescu, N. Păcală, I. Vintilă (1997) - Cultura in vitro a embrionilor obținuți pe cale artificială. *Lucr. Șt. Zootehnie și Biotehn.*, Timișoara, vol. XXX, 1997.

Halga, P., Margareta, Confederat, Bădeliță, C., Stan, Gh., 1999 – Alimentația și reproducția la erbivore domestice. Ed. Dosoței, Iași.

Hârceagă L.I. (1999) - Cercetări privind creșterea ratei de reușită a transferului de embrioni la bovine, pe cale nechirurgicală, Teză de doctorat, Universitatea de Științe Agricole și Medicină Veterinară, Cluj-Napoca.

Herman, H.A., Mitchell, J.R., Gordon, A.D. (1994) - The artificial insemination and embryo transfer of dairy and beef cattle. Interstate Publishers, INC. Danville, Illinois. SUA.

Igna V. – Însămânțarea artificială la *Canis Familiaris*, Teza de doctorant, USAM-VB, Timișoara, 2002.

Ladoși I. – Embriologie animală. Cluj Napoca: Ed. Victor Melente, 1999, 200p.

Ladoși, I. (1998), Cercetări asupra evaluării computerizate a calității biologice a ovocitelor și embrionilor la special suină. Teza de doctorat, USAMV București.

Ladoși, I., Bogdan, D., Bogdan, M etc. (1997) Ultramicroscopy studies of the quality of sow oocytes by computerized videomorphometry. *Maced. J.Reprod.*, 3 (1):43-48.

Ledda Sergio, Marilia Gallus and all (1994) - In vitro maturation and fertilization of sheep oocytes and embryo culture. In *Progress in embryo technology and genetic engineering in cattle and shepp breeding.*. Krakow, Poland.

Leibo S.P. (1981) - Preservation of ova and embryos by freezing, in: "New technologies in animal breeding", Academic Press Inc., 127-139

Linder G.M.,Wright R.H.(1983) Bovine embryo morphology and evaluation. *Theriogenology*, 20,4,407-416.

Leibo S.P. (1984) - A one-step method for direct non-surgical transfer of frozen-thawed bovine embryos, *Theriogenology*, 21, 767-139.

Loi Pasqualino, Keith H.S. and all (1994) - In vitro embryo manipulation and cloning in ruminants. In Progress in embryo technology and genetic engineering I in cattle and sheep breeding.. Krakow, Poland.

Marandici, Elena. (2008). Dinamica modificării cantității și calității spermei în funcție de vârstă, mediu ambient și impactul preparatelor microbiene la vieri. Teza de doctorat.

Maximilian C, Betvea M., și col., 2001. Genetica. Început fara sfârșit, Ed de vest, Timișoara.

Mallard, J., Mocquot, J.C. (1998) - Insemination artificielle et production latiere bovine: repercussion d'une biotechnologie sur une filiere de production. INRA Prod. Anim., 11, 33-39.

Mann J.R. (1988) - Full term development of mouse eggs fertilized by a spermatozoon microinjected under the zona pellucida. Biol. Reprod.38, 1077-1083.

Michescu M., I. Daniela, T. Vintilă, Gh.Ghișe, Cornelia Vintilă, I. Pădeanu, I. Vintilă (2003) - Attempts for molecular selection of bovine embryos used in milk production improvement. 54th Annual Meeting of EAAP 2003, Roma Italy.

Michescu Maria (2001) - încercări de selecție a animalelor domestice cu ajutorul moleculelor de ADN. Teză doctorat.

Michescu Maria, D.Dronca, N.Păcală, I.Vintilă (2002) - Molecular methods used in bovine preimplantational sex determination. Scientifical Papers Annual Meeting, Novi Sad, Iugoslavia.

Michescu Maria, F.Dale, I.Vintilă, N.Păcală (2000) - Identificarea și vizualizarea locusului receptorului de estrogeni (ESR) prin tehnica PCR. Lucr.Șt.Zoot.și Biotenologii ,vol XXXIII, Timișoara.

Michescu Maria, Gh.Ghișe, D.Popeți, I.Vintilă - încercări de sexare a embrionilor preimplantaționali. Buletinul SNBC, nr. 25, 1997.

Miclea V., I.Ladoși (1997) - Biologia reproducției animalelor de fermă. Ed. Baha'i, Cluj-Napoca.

Miclea, V. (2003) - Însămânțarea artificială la animalele de fermă. Edit. Argonaut, Cluj-Napoca.

Mircu C. - Elemente de reproducere la animale domestice, Ed. Brumar, Timișoara, 2001.

Nafornița M. - Tehnologia Insamanfarii artificiale, Editura Didactica și Pedagogica Вџцџревџ, 1985.

Nauc V.A. - Crioconservația spermî bȃcov proizvoditelei.//Crioconservația spermî seliscohozeistvennȃh jivotnȃh. L. Agropromizdat, 1989. p.65-102.

Năfornița M. (1981) - Curs de reproducția animalelor domestice. Lito LA Timișoara.

Newcomb R., Christie W.B., Rowson L.E.A. (1978) - Birth of calves after in vivo fertilization of oocytes removed from follicles and matured in vitro. Vet. Record 102,461-462.

Nicolau, Aurelia și colab., 1973. - Reproducerea artificială și dezvoltarea la pești. Ed. Acad. R.S.R., București.

O'Connor, L. M. (1993) - Heat detection and timing of insemination for cattle. S 282, Pennsylvania State University, SUA.

Paraipan, V., 1977 - Hormonoterapia în reproducția animalelor. Ed. Ceres, București.

Paraschivescu M., Dana Tibără (1988) - Implicațiile biotehnologiilor de reproducție în programarea progresului genetic: II. Transplantul de zigoți, Analele IBNA, Balotești, Vol.XIV, 57-68.

Parrish J.J., Parrish J.L., First N.L. (1984) - Effect of swimup separation and heparin pretreatment of frozen-thawed spermatozoa on in vitro fertilization of bovine oocytes. Biol.Reprod.32, Suppl.1, 112 (abst).

Păcală N. (1998) - Transferul de embrioni la mamifere, Ed.Helicon, Timișoara, 50-59.

Păcală N. (2000) - Biologia reproducerii animalelor. Editura Mirton Timișoara. Polge C. (1991) - Novelty in reproduction biotechnologies. 7* Scientific Meeting of European Embryo Transfer Society., 103-117.

Păcală N. I.Vintilă, N.Corin, I.Bencsik (1998) - Influența tipului de hormoni foliculo-stimulatori asupra reacției ovarelor la tratamentele de inducere a superovulației la vacile donatoare de embrioni. Lucr.șt.de Zoot.și Biot. Timișoara, vol. XXXI, 1998.

Păcală N., I.Vintilă, N. Corin (1996) - Factorii care influențează rezultatele superovulației la vacile donatoare de embrioni. Buletinul SNBC, București, nr.24, 1996.

Raicu P. - Biotehnoții moderne, Editura tehnica București, 1985.

Reman, GH., ROȘCA, O., BARA, M. (2003) - Biotehnoții de reproducție și Însămânțări artificiale în zootehnie - Bovine. Edit. Aius, Craiova.

Robertson Edwin (1999) - Non-Surgical embryo-transfer 5th Edition. American Association of Bovine Practitioners seminar. Harrogate genetics internațional, Inc. Robertson.

Robertson Ewin (1999) - Estrus synchronization programs that work. Harrogate genetics internațional, Harrogate, Tennessee.

Runceanu, L., Cotea, V.C., 2001 – Reproducție, obstetrică și ginecologie veterinară. Ed. "Ion Ionescu de la Brad", Iași

Saumade, J., 1991 – La folliculogenese chez les ruminants. Rec. Med. Vet., 167, 314.

Saumande J. (1995) - La production d'embryos chez les bovins: Quelles voies de recherche pour augmenter l'efficacité des traitements de superovulation?, INRA, prod. Anim., 8 (4), 275-283.

Seidel G.E. Jr. (1991) - Embryo-transfer: the next 100 years, Theriogenology 35, 171-180.

Selk, G. (2002) - Artificial Insemination for Beef Cattle. F-3164, Oklahoma State University, SUA.

Senger, P.L., 2003 - Pathways to pregnancy and parturition, second edition.

Washington State University Research & Technology Park Tâmaș, V.

Silvași E., Moldovan H., Suhăreanu M.(1979) - Transferul de embrioni la taurine în țara noastră. Rev.creșterea animalelor, 11, 10-14.

Silvași E., Moldovan H., Suhăreanu M.(1980) - Transferul de embrioni la taurine efectuat prin metode chirurgicale și nechirurgicale. Simp. "Probleme de ameliorare tehnologie de creștere și patologie la taurine și ovine". Inst. Agri. Cluj-Napoca, 125- 135.

Tănase, D., Manole, I., Nacu, Gh., 2000 - Biotehnici și biotehnologii de reproducție în zootehnie. Ed. " Ion Ionescu de la Brad", Iași.

Thibault, C., Levasseur, M.C., 1991 - La reproduction chez les mammifères et l'homme. Ed. Marketing, Paris.

Thibier, M., 1976 - Le cycle sexuel des Mammifères domestiques. Ed. Maloine S.A. Paris.

Vaissaire, J.P., 1977 - Sexualité et reproduction des mammifères domestiques et de laboratoire. Ed. Maloine S.A. Paris.

Vintilă I, N.Păcală, N.Corin, I.Bencsik (1994) - O cale de sporire a eficienței embryo-transferului. Lucr. Științifice Zootehnie Timișoara, vol. XXVII.

Vintilă I., D.Dronca (1995) - Programul MOET, o alternativă de selecție modernă a taurinelor în România. Lucr. Șt. Zoot.și Biotehn. Timișoara, vol. XXVIII.

Vintilă I., G.Hoduț (1987) - O metodă care permite obținerea „în serie” a genurilor identici la mamiferele domestice. Producția animală - zoot. și med.vet., nr.2, 1987.

Vintilă I., I. Bencsik, N. Corin, N. Păcală (1990) - Transferul de embrioni la vaci în condiții de fermă. Revista de Zootehnie și Med. Vet., nr. 10-12 1990.

Vintilă I., I. Bencsik, N. Corin, N. Păcală (1992) - Crioconservarea embrionilor.

Buletinul SNBC, București, nr.20, 1992.

Vintilă I., I. Bencsik, N. Corin, N. Păcală (1992) - Superovulația la vacă în funcție de hormonii utilizați. Lucr.Șt.Zoot., Timișoara, voi XXV.

Vintilă I., I. Bencsik, N. Corin, N. Păcală (1993) - Cercetarea fundamentală în zootehnie (orientări, strategii). Agricultura României în mileniul III. U.S.A.M.V.B. Timișoara, I.

Vintilă I., I. Bencsik, N. Corin, N. Păcală (1993) - Possibilities to increase the efficiency of embryo-transfer in cattle and sheep. Realizări și perspective în zootehnie, vol. XIX.

Vintilă I., I. Bencsik, N. Corin, N. Păcală (1994) - Posibilități de multiplicare peste limitele naturale ale genoamelor superioare la animalele domestice monotocice. Buletinul SNBC, București, nr. 22.

Vintilă I., I. Bencsik, N. Păcală (1996) - Laparoscopia - o metodă de monitorizare a dehiscentei foliculare la vacile superovulate. Lucr.șt.de Zoot.și Biot. Timișoara, vol. XXIX, 1996.

Vintilă I., Maria mihescu (1998) - Metoda amprentelor de ADN în zootehnia modernă. Buletinul SNBC, nr.26.

Vintilă I., N. Corin, N. Păcală (1993) - Utilizarea preparatelor luteolitice Flavoliz și Revolyse în sincronizarea estrului și ovulației la vaci. Lucr.șt.Zoot., Timișoara, vol. XXVI.

Vintilă I., N. Corin, N., Păcală I., Bencsik (1994) - O metodă de realizare a gemelării artificiale. Lucr. Șt. Zoot.și Biotehn. Timișoara, vol. XXVII.

Vintilă I., N. Corin, N., Păcală I., Bencsik (1995) - Utilizarea prostaglandinelor sintetice românești în sincronizarea estrului și ovulației la vacile cu ciclul estral necunoscut. Lucr. Șt. Zoot.și Biotehn. Timișoara, vol. XXVIII.

Vintilă I., N.Păcală, I.Bencsik, N.Corin, A.Guler (1995) - Fecundația ovocitelor și replicarea embrionilor de taurine în oviduct de iepuroaică (xenogeneza). Lucr. Șt. Zoot.și Biotehn. Timișoara, vol. XXVIII.

Vintilă I., P. Babusik, L. Kulickova, I. Bencsik, N. Păcală, N. Corin (1989) - Miei viabili obținuți din fragmente de embrioni. Nota I. Buletinul SNBC, București, nr. 17, 1989.

Vintilă I., Roxana Vintilă, Cornelia Vintilă (2002) - Xenotransplantation is now possible. Scientifical Papers, Faculty of Animal Science and Biotechnology, Timișoara.

Vintilă, I. Bencsik, N. Corin și alți 5 (1990) - Primii viței gemeni identici obținuți în țara noastră prin biseția embrionilor. Rev. de Zoot. și Med. Vet., nr. 3, 1990.

Vintilă, I. Bencsik, N. Corin și alții (1990) - Embriotransferul nechirurgical la vacă în condiții de fermă. Rev. de Zoot. și Med. Vet., nr. 12, 19.

Waisun,O.,Backker,T.G.(1978) Germinal and somatic cell interrelationships in gonadal sex differentiation. Anim.Biol.Anim.Biochim.Biophys, 18, 351.

Watson, P.F. and W.V. Holt (2001), *Cryobanking the Genetic Resource*. Taylor and Francis, London.

Wattiaux, M.A. (2003) - *Detection des chaleurs, saile naturelle et insemination artificielle a vaches*. Institut Babcock, Universite du Wisconsin a Madison, SUA.

Westendorf P., Richler N. Treu, 1975, *Deutsche Tierart Wschr.*, 82; 261-267.

Wilmut I., A.E.Schnieke, J.McWhir, A.J.Kind, K.H.S. Campbell (1977) - *Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells*. *Nature*, 385, 810-813.

Wilmut I., Sales D.I. (1981) - *Effect of an asynchronous environment on embryodevelopment in sheep*. *J.Reprod. Fertil.*, 61, 179-184.

Xu K.P., Loskutoff N.M., Betteridge K.J. (1991) - *Pregnancies resulting from bovine embryos derived from "in vitro" culture of zona free zygotes produced by in vitro maturation an fertilization of follicular oocytes*. *Theriogenology* 35, 296.

Yoshida M. (1987) - *In vitro fertilization of pig oocytes matured in vivo*. *Jap. J. Vet. Sci.*, 49: 711-718.

Yoshida M., Mizoguchi Y, Ishizaki K., Kojima T., (1993 a) - *Birth of piglets derived from in vitro Teriogenology* 39, 1303-1311.

Zamfirescu Stela, Ionescu A.(1990) - *Influența tehnicilor moderne de reproducție artificială asupra ameliorării genetice a raselor de ovine*. *Rev.Zoot. și Med. Vet.*, 10-12, 12-17.

Zăhan Marius (2017), *Conservarea resurselor genetice în zootehnie*. Ed.Accent, Cluj-Napoca.

Zinca, Victoria, Cîrlan, M., 2003 – *Citologia comparativă și citogenetica aparatului de reproducere femel la mamifere*. Ed. Alfa, Iași.

Zinca, Victoria., Cotea, C., 1972 – *Influența unor hormoni asupra mecanismului ovulației "in vitro"*. *Lucr. șt. Inst. Agr. Iași, II, Zoot. și Med. Vet.*, p 161-164.

Антонюк В.С. Биотехнические способы повышения эффективности оплодотворения сельскохозяйственных животных. Минск, Урожай, 198 с.

Дарий Г Е Адаптивный потенциал и воспроизводительная функция животных (1993) диссертация доктора биологических наук 328 с

Калашник, И.А. Стимулирующая терапия в ветеринарии. Киев: Урожай, 1990. с.7-69.

Меньшиков В.В. Лабораторные методы исследования в клинике. Справочник. Москва, «Медицина» 1986, с. 176, 215-218.

Милованов В. К. Биология воспроизведения и искусственное осеменение сельскохозяйственных животных. Москва: Изд-во с-х литературы, 1962. с. 499- 503.

Милованов В.К., Соколовская И.И. Теория холодового удара живчиков млекопитающих «Доклады ВАСХНИЛ», 1959, №8.

Медведев П.М., Фисанович Т.И. Роль криопротекторов как стабилизаторов воды в биологических средах «Успехи современной биологии», т.75,- вып.1, 1973.

Наук В.А., Дарий Г.Е. О целесообразности отказа от «эквilibрации» при замораживании семени быков, - «Животноводство», 1974, №10.

Осташко Ф.И. – Харьковская технология асептического взятия, криоконсервации, микрохирургии и трансплантации эмбрионов. Успехи современной криобиологии, 1992, с. 131-132.

Осташко Ф.И. Глубокое замораживание и длительное хранение спермы производителей. Киев «Урожай», 1978.

Платонов Е.М. Теоретические и практические основы замораживания семени производителей сельскохозяйственных животных. Автореферат кандидатской диссертации, ВИЖ, Дубровицы, Московской области, 1973.

Слюсарев А. А. Жукова С. В. Биология. Издательство Виша школа. 1987. 415 с.

