

Kriokonserwacja nasienia tryków i kozłów – obecne technologie i możliwości praktycznego wykorzystania

Piotr Gogol, Mirosław Cegła

Instytut Zootechniki – Państwowy Instytut Badawczy w Krakowie, Zakład Biotechnologii Rozrodu i Kriokonserwacji

Kriokonserwacja nasienia tryków i kozłów cieszy się dużym zainteresowaniem szczególnie w krajach europejskich, gdzie dąży się do poprawy produktywności owiec i kóz poprzez doskonalenie genetyczne wybranych populacji zwierząt. Zastosowanie w inseminacji nasienia mrożonego eliminuje bariery geograficzne, wspiera zachowanie zagrożonych ras i chroni różnorodność biologiczną [1]. Potrzeba wykonywania sztucznego unasienniania w dłuższych okresach czasu i w różnych porach roku stymuluje badania nad kriokonserwacją nasienia tych gatunków zwierząt. Jednak pomimo wieloletnich badań w tej dziedzinie nadal stwierdza się, że proces zamrażania i rozmrażania nasienia tryków i kozłów powoduje uszkodzenia biochemiczne i strukturalne plemników, co prowadzi do znacznego obniżenia ich przeżywalności, zaburzenia funkcjonowania *in vitro* i *in vivo*, a w konsekwencji do spadku zdolności zapładniającej nasienia. Wykazano, że stosunkowo wysoki odsetek (40-60%) plemników tryka zachowuje ruchliwość po zamrożeniu i rozmrożeniu nasienia, jednak tylko około 20-30% w pełni zachowuje funkcje biologiczne [11]. Powszechnie stosowaną praktyką, w celu poprawy jakości nasienia po rozmrożeniu, jest selekcja ejakulatów przeznaczonych do kriokonserwacji. Zmienność i podatność nasienia na kriokonserwację zależy bowiem w dużej mierze od doboru samca. Taki dobór samców może być realizowany, gdy mamy do czynienia z dużą populacją osobników. Gdy jednak dotyczy to małych populacji, np. gatunków zagrożonych lub zwierząt hodowlanych objętych programem zachowania bioróżnorodności, takie rozwiązanie nie może być brane pod uwagę. Dlatego też należy stosować alternatywne strategie w przypadkach, gdy ważne jest zachowanie zmienności genetycznej. Badania wskazują, że nie ma jednego optymalnego protokołu zamrażania nasienia dla wszystkich samców. W przypadku niektórych osobników niska jakość nasienia poddanego kriokonserwacji z użyciem wybranego rozcieńczalnika i protokołu ulega poprawie po zastosowaniu innego rozcieńczalnika i/lub niewielkiej korekcie protokołu. Dlatego też istnieje potrzeba stosowania zindywidualizowanych protokołów mrożenia nasienia w od-

niesieniu zarówno do tryków, jak i kozłów, a nie takich samych dla całej populacji.

W przypadku przeżuwaczy opracowano i przetestowano z różnym powodzeniem szereg rozcieńczalników do mrożenia nasienia, zawierających cukry, elektrolity, bufory, żółtko jaja, mleko, lecytynę sojową, krioprotektanty. Pierwszymi rozcieńczalnikami stosowanymi do kriokonserwacji nasienia tryków były rozcieńczalniki cytrynianowo-węglowodanowe, z powodzeniem stosowane wcześniej do mrożenia nasienia buhaja. Oprócz cytrynianu i cukru w skład tych rozcieńczalników wchodziły najczęściej: żółtko jaja, glicerol i antybiotyki. W kriokonserwacji nasienia tryka szerokie zastosowanie znalazł rozcieńczalnik cytrynianowo-żółtkowo-fruktozowy. Podobnie jak przy konserwacji nasienia w stanie płynnym, zastosowanie znalazły również rozcieńczalniki przygotowywane w oparciu o pełne lub chude mleko w proszku. Ich skład był najczęściej uzupełniany glukozą lub innym cukrem i żółtkiem jaja [21]. W wielu krajach stosowana jest opracowana we Francji metoda mrożenia przy wykorzystaniu rozcieńczalnika laktozowego. W metodzie tej rozrzedzanie nasienia przebiega w 2 etapach. W pierwszym etapie, w temperaturze 30°C do nasienia dodawany jest rozcieńczalnik składający się w 80% z roztworu laktozy i w 20% z żółtka jaja, a w drugim etapie, w temperaturze 4-5°C dodawany jest 11% roztwór mleka w proszku z dodatkiem antybiotyków i sulfonamidów, zawierający 10% glicerolu. Koncentracja końcowa glicerolu wynosi 4%, a nasienie przy koncentracji plemników na poziomie $0,9 \times 10^9/\text{ml}$ jest poddawane dwugodzinnej ekwilibracji i zamrażane w słomkach w parach ciekłego azotu [4].

Ze względu na dobre właściwości buforujące i osmotyczne oraz niską toksyczność przy wysokich stężeniach, zastosowanie w mrożeniu nasienia tryka znalazły również rozcieńczalniki zawierające tris [15]. W badaniach porównawczych stwierdzono, że rozcieńczalnik zawierający tris korzystniej wpływa na jakość mrożonego nasienia tryków niż rozcieńczalnik cytrynianowo-żółtkowo-fruktozowy oraz laktozowy. Przeprowadzone testy *in vitro* wykazały, że rozcieńczalnik zawierający ten składnik najlepiej stabilizował system błon akrozo- mu i wstawki plemników, a także zapewniał najlepszą żywotność plemników.

Badania przydatności różnych krioprotektantów, jak np. glicerol, DMSO, glikol etylenowy, propandiol czy albumina, w mrożeniu nasienia tryka wykazały, że najlepsze właściwości osłaniające posiada glicerol [18]. Biorąc pod uwagę przeżywalność i zdolność zapładniającą plemników, za optymalne uznaje się 4% stężenie glicerolu. Glicerol może być dodawany do nasienia jednorazowo lub w dwóch oddzielnych dawkach. Różna może być także temperatura, w której jest on dodawany (30°C lub 2-5°C). W praktyce glicerol jest najczęściej dodawany w temperaturze 4°C. Czas ekwilibracji w tej temperaturze trwa zazwyczaj od 2 do 4 godzin, chociaż niekiedy bywa skracany do 20-30 minut. Szybkość schładzania nasienia w procesie zamrażania zależy w dużym stopniu od składu rozcieńczalnika, zawartości

glicerolu oraz stosowanej metody konfekcjonowania zamrożonego nasienia. W licznych badaniach nad szybkością zamrażania nasienia wykazano, że plemniki tryka lepiej przeżywiają, gdy proces schładzania przebiega szybko. Przy zamrażaniu nasienia w słomkach najlepsze wyniki uzyskano w zakresie 16-35°C/minutę.

Podobnie jak w przypadku nasienia tryka, najczęściej używanymi rozcieńczalnikami do mrożenia nasienia koźła są te na bazie żółtka jaja kurzego lub odtłuszczonego mleka w proszku. Zauważono jednak, że takie rozcieńczalniki mogą negatywnie oddziaływać na plemniki koźła. Po rozcieńczeniu nasienia obserwowano koagulację żółtka i obumieranie plemników. Ustalono, że żółtko jaja ulega koagulacji pod wpływem enzymu produkowanego w gruczołach opuszkowo-cewkowych koźła. Enzym ten nazwano EYCE (enzym koagulujący żółtko jaja) [14]. Zidentyfikowano również białko (SBUIII) pochodzące z gruczołu opuszkowo-cewkowego, które powoduje obniżenie przeżywalności plemników w schłodzonym lub kriokonserwowanym nasieniu koźła rozrzedzonym w rozcieńczalniku na bazie mleka. Obecność tego białka indukowała również reakcję akrosomową w rozcieńczalniku mlekowym w temperaturze 37°C [12]. Metodą pozwalającą uniknąć szkodliwego, wzajemnego oddziaływania pomiędzy osoczem nasienia a żółtkiem jaja lub mlekiem jest rozrzedzenie świeżego nasienia w zbuforowanym rozcieńczalniku (nie zawierającym żółtka i mleka), a następnie oddzielenie plemników od osocza poprzez wirowanie [7, 13, 19]. Zaobserwowano, że zmiany w metodyce mrożenia polegające na użyciu rozcieńczalnika bez żółtka jaja oraz usuwaniu osocza nasienia poprzez dwukrotne rozrzedzenie i wirowanie wpływa korzystnie na efektywność mrożenia.

Związkiem osłaniającym najczęściej stosowanym w rozcieńczalnikach do mrożenia nasienia koźła jest – podobnie jak u tryka – glicerol. Dodanie glicerolu odbywa się 1-, 2- lub 3-etapowo w temperaturze 37°C lub 5°C [8, 13, 20]. Stwierdzono, że po zastosowaniu glicerolu odsetek plemników ruchliwych po rozmrożeniu był wyższy w porównaniu do nasienia mrożonego z dodatkiem glikolu etylenowego lub DMSO [6]. Glicerol może wprawdzie powodować uszkodzenie plemników wskutek zmian osmotycznych zachodzących w komórce, jednak plemniki koźła są bardzo odporne na takie zmiany i ich tolerancja w tym zakresie jest bardzo duża.

Dotychczas podjęto wiele starań w celu optymalizacji rozcieńczalników oraz protokołów kriokonserwacji dla plemników tryka i koźła, jednak wyniki wciąż nie są satysfakcjonujące. W Zakładzie Biotechnologii i Kriokonserwacji IZ PIB podjęto również takie badania. Ich celem jest poprawa efektywności kriokonserwacji nasienia tryków i koźłów poprzez modyfikacje składu stosowanych już rozcieńczalników, wprowadzenie do składu rozcieńczalnika nowych substancji o charakterze osłaniającym oraz modyfikacje protokołów mrożenia. Badania mogą się przyczynić do opracowania strategii pozwalających na efektywną kriokonserwację nasienia o obniżonej jakości od samców ras objętych progra-

mem zachowania bioróżnorodności zwierząt hodowlanych *ex situ*. Jednym z podjętych zagadnień była ocena przydatności alternatywnych rozcieńczalników zawierających substancje osłaniające pochodzenia roślinnego. Nasienie tryków zamrażano w rozcieńczalniku mlekowym i rozcieńczalniku na bazie tris, których skład został zmodyfikowany. Modyfikacja polegała na zastąpieniu żółtka jaja kurzego lecytyną sojową – substancją osłaniającą pochodzenia roślinnego. Rozcieńczalniki na bazie soi były już wykorzystywane do mrożenia nasienia tryków i koźłów, a uzyskiwane wyniki jakości nasienia po rozmrożeniu i płodności były porównywalne [9, 10, 16] lub lepsze [2, 3, 17] niż przy zastosowaniu rozcieńczalników żółtkowych. Ponadto, w przypadku nasienia koźłów użycie rozcieńczalnika na bazie soi pozwoliło na zrezygnowanie z wirowania nasienia celem usunięcia osocza. Wyeliminowano w ten sposób przypadki obserwowane po zastosowaniu rozcieńczalnika żółtkowego, kiedy po dodaniu rozcieńczalnika następował gwałtowny spadek ruchliwości plemników jeszcze przed mrożeniem. Jest to efekt braku niekorzystnej interakcji pomiędzy lecytyną sojową a enzymami obecnymi w osoczu nasienia koźłów.

W doświadczeniu przeprowadzonym w Instytucie Zootechniki – PIB zamrożono łącznie 20 ejakulatów od 4 tryków rasy wrzosówka. Po rozmrożeniu oceniano aktywność ruchową plemników przy wykorzystaniu komputerowego systemu analizy nasienia typu CASA, integralność błon komórkowych metodą cytometryczną po barwieniu jodkiem propydydy i SYBR oraz strukturę chromatyny plemnikowej metodą SCSA (*Sperm Chromatin Structure Assay*) [5]. Zastąpienie żółtka jaja lecytyną sojową w rozcieńczalniku mlekowym użytym do mrożenia nasienia spowodowało poprawę odsetka plemników ruchliwych, parametru VCL (prędkość plemników po torze rzeczywistym) i odsetka plemników z nieuszkodzoną błoną komórkową po rozmrożeniu. W przypadku rozcieńczalnika na bazie tris zastosowana modyfikacja spowodowała istotny spadek odsetka plemników ruchliwych po rozmrożeniu. Najwyższą jakością charakteryzowało się nasienie zamrożone w rozcieńczalniku mlekowym z lecytyną sojową oraz w rozcieńczalniku na bazie tris z dodatkiem żółtka (tab.). W celu oceny zdolności zapładniającej plemników zamrożonych w dwóch wyżej wymienionych rozcieńczalnikach po przeprowadzeniu synchronizacji rui zainseminowano 28 owiec. Na 14 samic zainseminowanych nasieniem zamrożonym w rozcieńczalniku mlekowym z lecytyną sojową wykociło się 6 (42,9%), a na 14 samic zainseminowanych nasieniem zamrożonym w rozcieńczalniku na bazie tris z dodatkiem żółtka jaja wykociły się 4 (28,6%) – tabela.

W przypadku nasienia koźła dodatek lecytyny sojowej do rozcieńczalnika mlekowego spowodował obniżenie efektywności zamrażania nasienia. Stwierdzono zmniejszenie udziału plemników ruchliwych po rozmrożeniu o 19,3 punktów procentowych. Z kolei modyfikacja rozcieńczalnika mlekowego polegająca na dodaniu substancji o działaniu antyoksydacyjnym – BHT, nie spowodowała poprawy efektywności kriokonserwacji nasienia. Udział plemników ruchliwych po rozmrożeniu nie

Tabela

Parametry jakościowe oraz zdolność zapładniająca nasienia tryka kriokonserwowanego w rozcieńczalniku mlekowym oraz w rozcieńczalniku na bazie tris o zmodyfikowanym składzie

Rozcieńczalnik	Plemniki ruchliwe (%)	VCL* (µm/s)	Plemniki „żywe” (%)	Odsetek samic wykończonych
Mlekowy z żółtkiem	52,4 ^a	75,0 ^a	23,9 ^a	–
Mlekowy z lecytyną sojową	59,4 ^a	95,8 ^b	27,3 ^a	42,9 ^a (6/14)
Tris z żółtkiem	55,9 ^a	78,6 ^a	28,6 ^a	28,6 ^a (4/14)
Tris z lecytyną sojową	41,9 ^b	77,6 ^a	27,2 ^a	–

*VCL – prędkość po torze rzeczywistym
a, b – różnice statystycznie istotne ($P \leq 0,05$)

różnił się istotnie w grupie z dodatkiem i bez dodatku BHT i wynosił odpowiednio 50,2 i 57,2%.

Na podstawie dotychczas przeprowadzonych badań można stwierdzić, że najwyższą jakością charakteryzowało się nasienie tryków kriokonserwowane w rozcieńczalniku mlekowym z lecytyną sojową. W przypadku kozłów nasienie zamrożone w rozcieńczalniku mlekowym oraz rozcieńczalniku na bazie tris z dodatkiem lecytyny sojowej charakteryzowało się podobną jakością. Zastosowane modyfikacje kriokonserwacji nasienia kozłów (dodatek lecytyny sojowej, dodatek substancji o działaniu antyoksydacyjnym – BHT) nie spowodowały poprawy jakości nasienia po rozmrożeniu.

Dalsze rozpowszechnianie w rozrodzie owiec i kóz nasienia kriokonserwowanego, a także konieczność gromadzenia materiału genetycznego w programach zachowania bioróżnorodności wymaga kontynuowania badań nad optymalizacją składu rozcieńczalników i technologii kriokonserwacji, w celu uzyskania bardziej satysfakcjonujących efektów.

Badania wykonano w ramach projektu „Kierunki wykorzystania oraz ochrona zasobów genetycznych zwierząt gospodarskich w ramach zrównoważonego rozwoju” współfinansowany przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju w ramach Strategicznego programu badań naukowych i prac rozwojowych „Środowisko naturalne, rolnictwo i leśnictwo” – BIOSTRATEG.

Literatura: 1. **Andrabi S.M.H., Maxwell W.M.C.**, 2007 – A review on reproductive biotechnologies for conservation of endangered mammalian species. *Animal Reproduction Science* 99, 223-243. 2. **Chelucci S., Pasciu V., Succu S., Addis D., Leoni G.G., Manca M.E., Naitana S., Berlinguer F.**, 2015 – Soybean lecithin-based extender preserves spermatozoa membrane integrity and fertilizing potential during goat semen cryopreservation. *Theriogenology* 83, 1064-1074. 3. **Emamverdi M., Zhandi M., Zare Shahneh A., Sharafi M., Akbari-Sharif A.**, 2013 – Optimization of ram semen cryopreservation using a chemically defined soybean lecithin-based extender. *Reproduction in Domestic Animals* 48, 899-904. 4. **Fiser P.S., Ainsworth I., Fairfull R.W.**, 1987 – Evaluation of new diluent and different processing procedures for cryopreservation of ram semen. *Theriogenology* 28, 599-607. 5. **Gogol P., Bryła M., Trzcińska M., Bochenek M.**, 2019 – Quality parameters

and fertility of ram semen cryopreserved in egg yolk and soybean lecithin supplemented extenders. *Polish Journal of Veterinary Sciences* 22, 177-179. 6. **Kundu C.N., Chakraborty J., Dutta P., Bhattacharyya D., Ghosh A., Majumder G.C.**, 2000 – Development of a simple sperm cryopreservation model using a chemically defined medium and goat cauda epididymal spermatozoa. *Cryobiology* 40, 117-125. 7. **Leboeuf B., Manfredi E., Boue P., Piacere A., Brice G., Baril G., Broqua C., Humblot P., Terqui M.**, 1998 – Artificial insemination of dairy goats in France. *Livestock Production Science* 55, 193-202. 8. **Leboeuf B., Restall B., Salamon S.**, 2000 – Production and storage of goat semen for artificial insemination. *Animal Reproduction Science*

62, 113-141. 9. **Masoudi R., Sharafi M., Zareh Shahneh A., Towhidi A., Kohram H., Esmaili V., Shahverdi A., Davachi N.D.**, 2016 – Fertility and flow cytometry study of frozen-thawed sperm in cryopreservation medium supplemented with soybean lecithin. *Cryobiology* 73, 69-72. 10. **Mata-Campuzano M., Álvarez-Rodríguez M., Álvarez M., Tamayo-Canul J., Anel L., Paz P. de, Martínez-Pastor F.**, 2015 – Post-thawing quality and incubation resilience of cryopreserved ram spermatozoa are affected by antioxidant supplementation and choice of extender. *Theriogenology* 83, 520-528. 11. **Medeiros C.M., Forell F., Oliveira A.T., Rodrigues J.L.**, 2002 – Current status of sperm cryopreservation: why isn't better. *Theriogenology* 57, 327-344. 12. **Pellicer-Rubio M.T., Magallon T., Combarrous Y.**, 1997 – Deterioration of goat sperm viability in milk extenders is due to a bulbourethral 60-kilodalton glycoprotein with triglyceride lipase activity. *Biology of Reproduction* 57, 1023-1031. 13. **Ritar A.J., Salamon S.**, 1982 – Effects of seminal plasma and of its removal and egg yolk in the diluent on the survival of fresh and frozen-thawed spermatozoa of the Angora goat. *Australian Journal of Biological Sciences* 35, 305-312. 14. **Roy A.**, 1957 – Egg yolk coagulating enzyme in the semen and Cowper's gland of the goat. *Nature* 179, 318-319. 15. **Salamon S., Maxwell W.M.**, 2000 – Storage of ram semen. *Animal Reproduction Science* 62, 77-111. 16. **Salmani H., Nabi M.M., Vaseghi-Dodarana H., Rahman M.B., Mohammadi-Sangcheshmehd A., Shakeri M., Towhidi A., Shahneha A.Z., Zhandi M.**, 2013 – Effect of glutathione in soybean lecithin-based semen extender on goat semen quality after freeze-thawing. *Small Ruminant Research* 112, 123-127. 17. **Sariözkan S., Bucak M.N., Tuncer P.B., Taşdemir U., Kinet H., Ulutaş P.A.**, 2010 – Effects of different extenders and centrifugation/washing on postthaw microscopic-oxidative stress parameters and fertilizing ability of Angora buck sperm. *Theriogenology* 73, 316-323. 18. **Silva E.C.B., Cajueiro J.F.P., Silva S.V., Vidal A.H., Soares P.C., Guerra M.M.P.**, 2012 – *In vitro* evaluation of ram sperm frozen with glycerol, ethylene glycol or acetamide. *Animal Reproduction Science* 132, 155-158. 19. **Singh M.P., Sinha A.K., Singh B.K.**, 1995 – Effect of cryoprotectants on certain seminal attributes and on the fertility of buck spermatozoa. *Theriogenology* 43, 1047-1053. 20. **Tuli R.K., Holtz W.**, 1994 – Effect of glycerolization procedure and removal of seminal plasma on post-thaw survival and GOT-release from Boer goat spermatozoa. *Theriogenology* 42, 547-555. 21. **Zamfirescu S., Vicovan A., Barbulescu I.**, 1980 – Results of artificial insemination in sheep using frozen semen. *Revista de Cresterea Animalelor* 30, 11-15.

Summary

The use of frozen semen in artificial insemination eliminates geographical barriers, supports the conservation of endangered breeds, and protects biodiversity. Numerous efforts have been made to optimize extenders and cryopreservation protocols for ram and goat spermatozoa, but the results are still not satisfactory. At the Department of Biotechnology and Cryopreservation of the National Research Institute of Animal Production, research was carried out to improve the efficiency of cryopreservation of ram and goat semen by modifying the composition of extenders already in use, introducing new cryoprotectants to the extender, and modifying freezing protocols. One of the issues raised was assessment of the suitability of alternative extenders containing protective components of plant origin. The semen of rams and goats was frozen in a milk extender and a tris-based extender, whose composition was modified by replacing chicken egg yolk with soy lecithin, a protective substance of plant origin. The research carried out to date indicates that ram semen cryopreserved in a milk extender with soy lecithin had the highest quality. In the case of goats, semen frozen in a milk extender and a tris-based extender with the addition of soy lecithin was of similar quality. Further dissemination of the use of cryopreserved semen in sheep and goat reproduction, as well as the need to collect genetic material for biodiversity conservation programmes, requires further research on optimization of the composition of extenders and cryopreservation technologies in order to obtain even more satisfying results.

KEY WORDS: ram, goat, semen cryopreservation, sperm quality, fertility

Ocena stanu technicznego siodła oraz poziomu ich dopasowania u koni rekreacyjnych

Maria Soroko¹, Patrycja Dobroń¹,
Wanda Górniak², Maciej Dobrowolski¹

Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, Wydział Biologii i Hodowli Zwierząt

¹Institut Hodowli Zwierząt, Zakład Hodowli Koni i Jeździectwa

²Katedra Higieny Środowiska i Dobrostanu Zwierząt

Dopasowanie siodła polega na odpowiednim doborze, tak aby jego konstrukcja pozwalała na równomiernie rozłożenie ciężaru jeźdźcy na grzbiecie konia, z całkowitym wyłączeniem kontaktu z wyrostkami kolczystymi kręgów piersiowych kręgosłupa przez kanał siodła. Ponadto, prawidłowo leżące siodło musi zapewnić swobodny i elastyczny ruch konia, co zapobiega m.in. wystąpieniu kulawizn, a także pozwala jeźdźcy rozluźnić się i pozostać w równowadze. Siodło powinno pozostać w tym samym miejscu we wszystkich chodach i ćwiczeniach. Prawidłowo dopasowane siodło zapewnia

komfort zarówno dla konia, jak i jeźdźcy podczas treningu [4].

Brak dopasowania siodła skutkuje podrażnieniem zakończeń nerwów grzbietowych i urazami mięśni przykręgosłupowych, co prowadzi do stanów zapalnych mięśni grzbietu, a ostatecznie do schorzenia kręgosłupa ujawniającego się często jako *kissing spine syndrome* [2]. Inne objawy to rany i obtarcia w okolicy kłębu, nadmierne wytarcie włosów na grzbiecie oraz ogniskowe obrzęki pod siodłem. Widocznym ich efektem jest biała sierść pojawiająca się w miejscach ucisku siodła [4].

Konie z bolesnością grzbietu bardzo często wykazują niesprzyjające zachowania, zarówno podczas treningu, jak i przy siodłaniu czy czyszczeniu. Z badań Wolińskiej i wsp. [15] wynika, że 39% koni rekreacyjnych wykazywało negatywne zachowania, takie jak odwracanie się zadem lub próba ugryzienia, już od momentu wejścia człowieka do boksu. Przy kolejnych czynnościach, takich jak czyszczenie, wsiadanie, trening rekreacyjny, występowanie niepożądanych wzorców zachowań lub wręcz agresji u koni wzrastało do odpowiednio 63%, 73%, 70%. Przejawianie takich zachowań przez konie rekreacyjne sugeruje najczęściej duży dyskomfort zwierzęcia, które poprzez doświadczenie utworzyło negatywne skojarzenia dotyczące człowieka. Wy tłumaczeniem takich zachowań może być ból, który koń odczuwa na przykład podczas czyszczenia obolałych miejsc, nieumiejętnego wsiadania jeźdźcy czy podczas treningu w niedopasowanym siodle.

Dysfunkcje grzbietu mogą być również związane ze słabo wyszkolonym jeźdźcą, charakteryzującym się