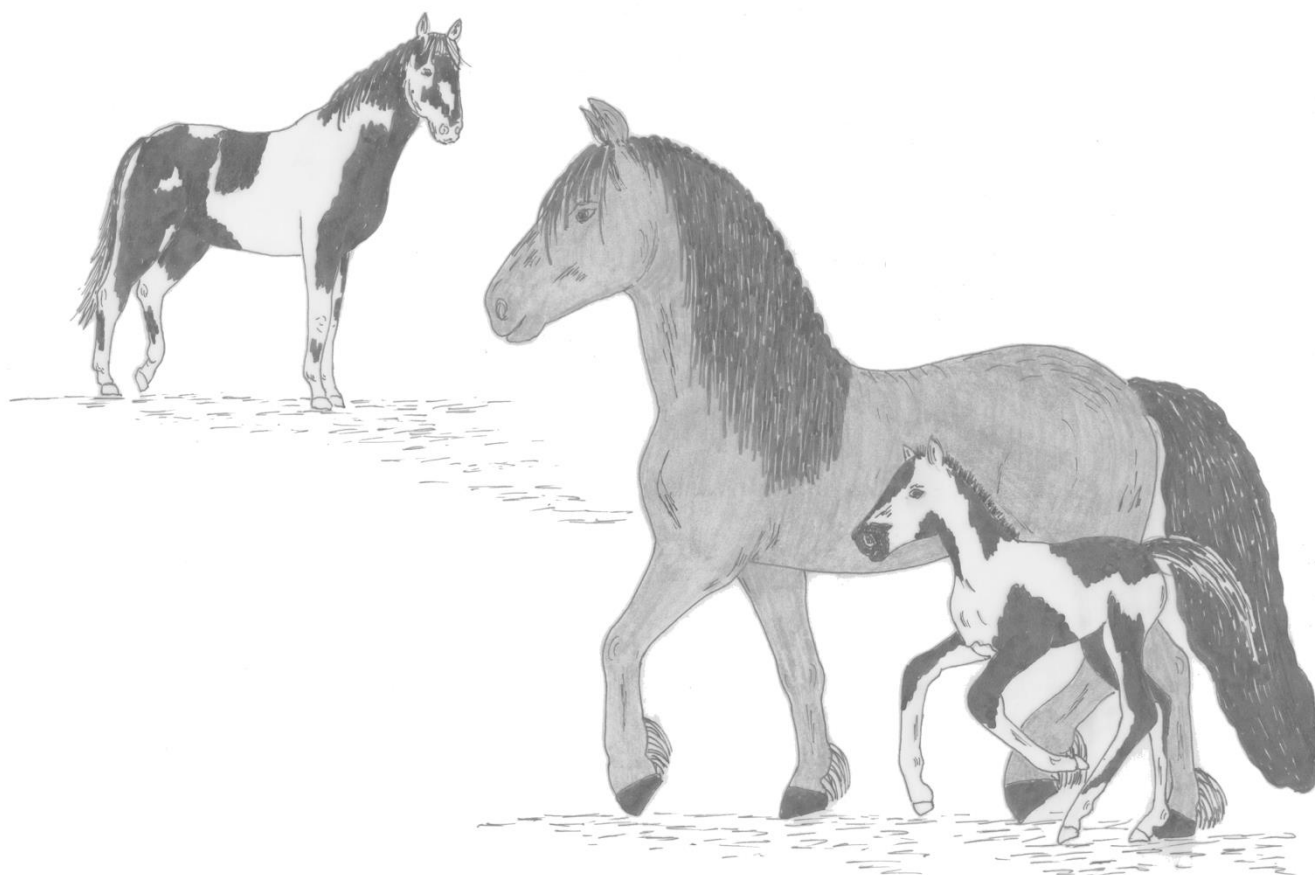




VETERINÁRNÍ A FARMACEUTICKÁ UNIVERZITA BRNO
FAKULTA VETERINÁRNÍHO LÉKAŘSTVÍ
KLINIKA CHOROB KONÍ



EMBRYOTRANSFER U KONÍ



Autorský kolektiv: Petra Andrlová, Michaela Kabešová, Miroslava Mráčková

rok 2020

OBSAH

1. ÚVOD.....	3
2. HISTORIE EMBRYOTRANSFERU.....	5
3. ANATOMIE A FYZIOLOGIE REPRODUKČNÍHO APARÁTU KLISNY.....	7
4. MANAGEMENT PŘÍJEMKYŇ.....	12
5. PŘÍPRAVA DÁRKYNĚ.....	14
6. SUPEROVULACE.....	17
7. PŘIPOUŠTĚNÍ / INSEMINACE.....	19
8. ODBĚR EMBRYA, FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ ZISK EMBRYA.....	21
9. VYHLEDÁNÍ, POSOUZENÍ EMBRYA A MIKROMANIPULACE.....	27
10. TRANSFER EMBRYA.....	31
11. VYŠETŘENÍ GRAVIDITY PO EMBRYOTRANSFERU.....	32
12. DALŠÍ METODY ASISTOVANÉ REPRODUKCE.....	34
13. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	35
14. DOPORUČENÁ LITERATURA.....	36

Tento výukový materiál vznikl za podpory projektu IVA 2020 VFU v rámci projektu 2020FVL/1670/20 za účelem inovace výuky v předmětech Porodnictví a gynekologie, Porodnictví, gynekologie a andrologie, Andrologie, Asistovaná reprodukce a Choroby koní. Jeho cílem je poskytnout studentům souhrn informací o technice embryotransferu u koní.

1. ÚVOD

Termín ‚embryo transfer‘ přeložený doslova, spočívá ve vypláchnutí embrya z reprodukčního traktu (dělohy) jedné klisny (**dárkyně**) a vložení do dělohy druhé klisny (**příjemkyně**). Nicméně celý proces je mnohem komplexnější, zahrnuje synchronizaci dárkyně a příjemkyně, získání embrya, uchování a manipulaci s embryi in vitro.

Hlavním cílem embryotransferu obecně je produkce mláďat od geneticky cenných rodičů, přenos a konzervace embryí ohrožených druhů v rámci genových rezerv.

Embryotransfer u koní má určitá specifika, která souvisejí s anatomickými a fyziologickými vlastnostmi klisen, která zahrnují:

- vliv ročního období
- nemožnost superovulace dárkyň
- obtížnou synchronizaci příjemkyň
- obtížnou kryokonzervaci embryí.

Hlavní výhody embryotransferu u koní:

- I. využití u klisen zařazených do sportu
 - Možnost získávání embryí ze sportujících klisen během celé sportovní sezony, která se vzájemně kryje s letním připouštěcím obdobím.
- II. získání více hříbat od jedné klisny v průběhu jednoho roku
- III. zkrácení generačního intervalu
 - Zkrácení generačního intervalu znamená využití již 2–3letých klisen jako dárkyň embryí, tzn. klisen, které nejsou ještě schopny donosit a porodit hříbě. Následně tedy dochází ke zkrácení generačního intervalu o dobu danou rozdílem pohlavní a tělesné dospělosti.
- IV. řešení neplodnosti
 - Možnost reprodukce klisen, které mají problémy s donošením hříběte. Řešení tzv. sekundární neplodnosti, např. děložních cyst, chronických endometritid, aj.
- V. eliminace zdravotních rizik spojených s březostí a porodem
- VI. možnost kryokonzervace embryí, transfer na delší vzdálenosti
- VII. získání embryí od chráněných *equidů* a transfer do domestikovaných klisen

Úspěšnost přenosu embryí může být vypočítána následujícím vzorcem:

$$\text{ET Pregnancy Rate per Cycle} = \text{Embryo Collection Rate (\%)} \times \text{Transfer Pregnancy Rate (\%)}$$

Vzhledem k tomu, že možnosti superovulace u klisen jsou minimální, obvykle je možné od klisny po oplodnění získat 1 embryo za jeden říjový cyklus. Ve skutečnosti, obvyklá úspěšnost po výplachu embrya (**Embryo Collection Rate**) je 50-65 % za cyklus, v závislosti na plodnosti dárkyně a hřebce, typu použitého semene, a dalších faktorech. Zabřeznutí příjemkyň (**Transfer Pregnancy Rate**) se udává mezi 70-90 %, v závislosti na technice výplachu a přenosu, kvalitě embrya, aj. faktorech.

$$\text{ET Pregnancy Rate per Cycle} = (50-65 \%) \times (70-90 \%) = 35-59 \%$$

Ve výpočtu je také třeba započítat pravděpodobnost ztráty březosti mezi dnem detekce (den 12-16) a dnem porodu. Tento údaj je srovnatelný s ranou embryonální odúmrťí u klisen, které nosí vlastní hříbě, a činí cca 8-10 %.

Majitelé koní by měli být informováni o faktorech, které ovlivňují přenos embryí a jeho úspěšnost, aby jim byla poskytnuta reálná očekávání pro následnou březost příjemkyně a narození živého hříběte. Tato očekávání jsou velmi individuální, závisí především na individualitě klisny (dárkyně) a hřebce, zapojených do ET.

2. HISTORIE EMBRYOTRANSFERU

Přinášíme stručné shrnutí historie embryotransferu, v případě hlubšího zájmu doporučujeme:

W. R. (Twink) Allen, Sandra Wilsher: Historical Aspects of Equine Embryo Transfer, Journal of Equine Veterinary Science 89 (2020) 102987

Keith J. Betteridge: A history of farm animal embryo transfer and some associated techniques, Animal Reproduction Science 79 (2003) 203–244

Historicky první embryotransfer byl provedený na králících před více než sto lety (Walter Heape, 1890). Jeho úspěšné použití u potravinových zvířat přišlo ale mnohem později. Až v roce 1934 Warwick a Berry úspěšně přenesli embryo ovce, v roce 1951 bylo narozeno první tele (Willett et al.). Jeho použití bylo na vzestupu především v chovech skotu, kde se stále využívá k rychlému dosažení chovatelských cílů. Až v roce 1978 došlo k prvnímu úspěšnému přenosu embryí u člověka, po kterém následovaly ET u psů i koček (1978-1979).

První úspěšný embryotransfer u koní byl proveden až v roce 1972, kdy lékaři Allen a Rowson použili zkušenosti z předchozích ET provedených u skotu a ovcí a chirurgickou cestou získali embrya z mezidruhového křížení koně a osla, která následně přenesli do příjemkyně opačného druhu, tzn. embryo muly do oslice, embryo mezka do klisny.

Zhruba ve stejné době proběhl embryotransfer konzervativní metodou, který byl proveden japonskou skupinou vědců. Ačkoliv první pokusy byly neúspěšné, brzy dosáhli uspokojivé 40% úspěšnosti zabřezávání po přenosu 15 šesti-denních morul/časných blastocyst do synchronizovaných příjemkyní. V té době se snažili vyhnout pasáži embryí skrz krček děložní, transfer byl tedy prováděn za použití dlouhé jehly, kterou byl punktován fornix vagíny a embryo následně přeneseno přímo do dělohy skrz stěnu děložní. První hříbě získané embryotransferem bylo narozeno až v roce 1974.

Zajímavost: První úspěšný embryotransfer u koní byl proveden v době, kdy u skotu již byla embrya produkována komerčně.

V rozvoji ET v chovech koní bránily dvě skutečnosti. Prvním problémem bylo, že plemenné knihy a jim příslušící organizace zakazovaly použití metod asistované reprodukce a druhým, který bohužel trvá dodnes, je skutečnost, že stále neexistuje efektivní metoda indukující superovulaci u klisen.

Použití embryotransferu v chovech koní zaznamenalo velký nárůst v roce 2003, kdy americká asociace pro chov koní plemene Quater horse (AQHA) snížila restrikce na počet hříbat, které mohou být narozené od jedné klisny za rok. Jejím příkladem následovala americká asociace pro chov koní plemene Paint horse (The American Paint Horse Association) a arabského plnokrevníka (The Arabian Horse Registry of America). The American Saddlebred Association limitovala počet narozených hříbat od jedné matky na 4 hříbata za rok. Naproti tomu Jockey Club, odpovědný za registraci anglického plnokrevníka stále nepovoluje použití žádných metod asistované reprodukce.

Zajímavost: Nejvíce přenesených koňských embryí na světě bylo u argentinských polo poníků. Celkem 7939 březostí bylo získáno z 13942 přenosů v letech 1997 až 2010.

V současné době je embryotransfer často využívanou metodou v chovu koní. Nicméně jeho rozšíření je v porovnání s embryotransferem u skotu stále limitované technickými problémy a anatomickými zvláštnostmi klisen.

3. ANATOMIE A FYZIOLOGIE REPRODUKČNÍHO APARÁTU KLISNY

Pro úspěšné provedení embryotransferu je nezbytně důležité porozumět základní reprodukční anatomii a fyziologii klisny.

Vaječník klisny je upevněn k přednímu okraji širokého děložního vazů, pomocí závěsu zvaného mesovarium, přibližně 8-10 cm od dorzální stěny břicha. Velikost vaječníku se pohybuje okolo 8-12 cm. Téměř celý vaječník je obalen vazivou *tunica albuginea*, výjimku tvoří tzv. *fossa ovarialis*, kde dochází k ovulaci. *Fossa ovarialis* je kryta vrstvou zárodečného epitelu.

U samic jsou pohlavní buňky založeny již v prenatalně. Po dosažení pohlavní dospělosti dochází k postupnému zrání oocytů. Během sezóny obsahují vaječníky klisny folikuly a luteální struktury v různých stupních vývoje a regrese. Dominantní folikul se denně zvětšuje přibližně o 3-5 mm. Velikost preovulačního folikulu závisí na plemeni klisny, teplokrevné klisny ovulují, když průměr folikulu dosáhne 45–55 mm. Při ovulaci ve *fossa ovarialis* folikul praská a uvolní oocyt a tekutinu. V místě prasklého folikulu se začne tvořit luteální tkáň a tvoří se žluté tělísko produkující progesteron. Po ovulaci je oocyt zachycen fimbrií a putuje do vejcovodu, kde je v ampule oplozen. Oplozené vajíčko dále putuje do dělohy.

Děloha klisny má krátké tělo a dva děložní rohy střední délky. Děloha je zavěšena v kaudální části břicha klisny na širokém vazů, zvaném mezometrium.

Sliznice dělohy – *endometrium* vystýlá dělohu ze strany lumina. Tloušťka endometria závisí na stádiu cyklu, ve kterém se klisna nachází. V této vrstvě se nacházejí žlázy, které produkují látky označované jako *histiotrof* neboli děložní mléko, které slouží k výživě zárodku v rané fázi březosti. K endometriu se při březosti prostřednictvím struktur mikrokotyledonů připojuje placenta. Další strukturou dělohy je svalová vrstva zvaná myometrium, ta se skládá z vnější podélné a vnitřní cirkulární vrstvy. Mezi těmito svalovými vrstvami je tzv. *stratum vasculare* ve kterém se nachází bohatě větvené cévy. Povrch dělohy je kryt serózou.

Krček je tlustostěnný tubulární sval umístěný mezi tělem dělohy a pochvou. U klisny je krček dlouhý 7,5 až 10 cm. Ostium externum děložního čípku vyčnívá asi 1-2 cm do pochvy. Sliznice je zřasena četným malými záhyby, které jsou spojené se záhyby endometria.

Tonizace krčku závisí na fázi estrálního cyklu klisny. Během říje je krček měkký, uvolněný, leží na dně pochvy a vlivem zvýšené hladiny estrogenu se otevírá. Otevření krčku umožňuje snadný průnik spermií do dělohy a lepší drenáž mrtvých spermií, zánětlivých buněk a tekutiny z dělohy ven.

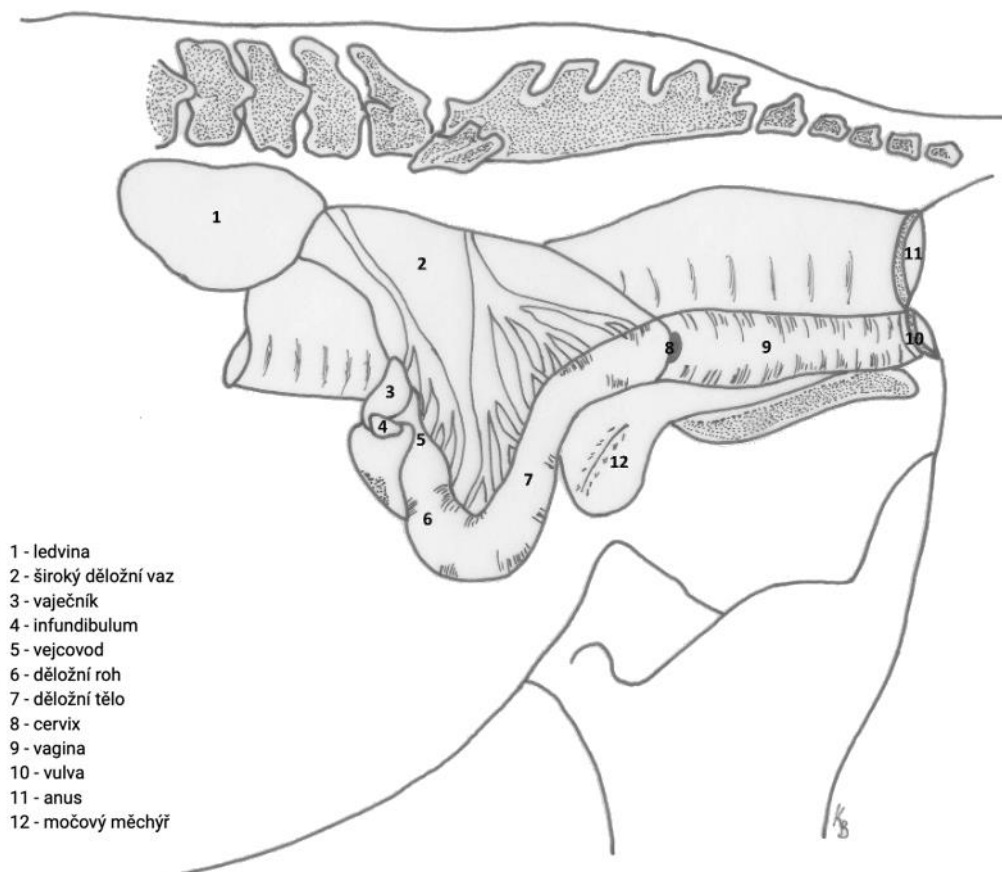
V diestru vlivem progesteronu dochází k uzavření a zvýšené tonizaci děložního krčku. *Cervix* funguje jako fyzická bariéra, která brání bakteriím a jiným mikroorganismům ve vstupu do dělohy. Krček u klisny není hmatný rektálně!

Vagina je svalová struktura, sahající od vestibulárně-vaginálního záhybu směrem kranálně k děložnímu čípku. U některých klisen se může ve vagina nacházet membranózní struktura hymen (panenská blána). Struktura hymen se může u jednotlivých klisen lišit – od tenkostěnného pásu po tlustostěnnou přepážku zcela uzavírající vnější otvor pochvy. Panenská blána je pozůstatkem tkáně, která někdy zůstává tam, kde se paramesonefrické kanály připojily k urogenitálnímu sinu v embryonálním vývoji.

Vestibulum je část vagíny mezi vulvou a vestibulárně-vaginálním záhybem. *Ostium urethrae externum* je umístěno na ventrální ploše vestibula pod transverzálním záhybem a je vstupem do močového měchýře.

Vulva je kaudální zakončení reprodukčního aparátu. Z každé strany je ohraničena stydkým pyskem, dorsálně a ventrálně se nachází komisura. Ve ventrální komisuře se nachází klitoris, který je analogem penisu. U klisen se vyskytuje tzv. *sinus clitoridis*, který se nachází dorzálně od klitorisu a mívá tři výduť, mediální výduť je přítomna u všech klisen. Tato výduť bývá považována jako jeden z rezervoárů původců infekční metritidy klisen.

Vulva a její okolní oblast je označena jako perineální oblast. Posouzení perineální oblasti je nedílnou součástí základního gynekologického vyšetření klisny, jelikož vulva slouží jako první bariéra kontaminace reprodukčního traktu. Posouzení perineální oblasti zahrnuje posouzení konfigurace vulvy (adspekce) a palpaci stydkých kostí (*ossis ischii*). Vulva klisny by měla být ve svislé poloze. Přibližně 2/3 délky vulvy by měly být umístěné pod kostěným podkladem pánve. Stydké pysky by se měly dotýkat. Po oddálení vulválních rtů a vizualizaci vestibulo-vaginálního záhybu by neměl vzduch vstupovat do pochvy. Se špatnou perineální konformací se často můžeme setkat u starších a hubených klisen, kdy je horní třetina vulvy vtažena ke konečníku a tím nakloněna horizontálně. U takových klisen následně dochází k nasávání vzduchu, vzniká *pneumovagina* až *pneumouterus*, a je u nich také vyšší riziko infekce. Nejčastěji se vyskytující poruchy perineální konformace mohou být napraveny provedením vulvoplastiky dle Caslicka, alternativní chirurgické postupy zahrnují operaci dle Poureta, vestibuloplastika dle Slushera či Gadd technika.



Obrázek 1: Anatomie reprodukčního aparátu klisny

Klisna je **polyestrické zvíře s pohlavní sezónností**. Pohlavní cyklus probíhá v závislosti na délce světelného dne od jara do podzimu. Klisna dosahuje pohlavní dospělosti mezi 12. až 18. měsícem stáří. Do chovu se klisny zařazují až po dosažení chovatelské dospělosti, což je okolo třetího až čtvrtého roku.

Reprodukční aktivitu klisen můžeme rozdělit do 4 období:

1. Jarní přechodné období

Toto období probíhá u klisen v našich podmínkách přibližně koncem února až začátkem března a trvá v závislosti na stabilizaci teplého počasí, přibližně do poloviny dubna. V tomto období jsou na vaječnicích klisny přítomny folikuly v různém stádiu vývoje. Tyto folikuly dorůstají do velikostí 3-3,5 cm, poté se zmenšují a zanikají. Může se stát, že se se zvětšujícími folikuly a tím pádem zvýšenou hladinou estrogenů spustí u některých klisen říjové chování, k ovulaci a tedy i potenciálnímu zabřeznutí nedochází. Jarní přechodné období končí první ovulací a následným vznikem CL.

2. Letní připouštěcí sezona

Připouštěcí období trvá přibližně od poloviny dubna do poloviny září. Na vaječnicích klisny se v této části roku tvoří jeden dominantní folikul, který poté praská a klisna ovuluje. Někdy se může stát, že se vytvoří dva dominantní folikuly a klisna může počít dvojčata, která jsou u koní nežádoucí. V tomto období klisna vykazuje pravidelně typické říjové projevy.

3. Podzimní přechodné období

Podzimní přechodné období u klisen nastává s postupujícím zkracováním světelného dne. Folikuly dorůstají, ale již nedosahují dostatečné velikosti, neovulují a atrezují.

4. Zimní anestrus

K tomuto období dochází na konci listopadu a obvykle trvá do konce února. Vaječnky klisny jsou malé, bez známek pohlavní aktivity. Folikuly na vaječnicích dosahují velikosti okolo 1,5 cm.

VIDEO 1

TRANSREKTÁLNÍ ULTRASONOGRAFICKÉ VYŠETŘENÍ KLISNY



Pohlavní cyklus klisny trvá přibližně 21 dní (20 – 23 dní) a lze ho rozdělit na 2 základní fáze:

1. Folikulární fáze (estrus)

Délka estru je individuální, ale obvykle trvá 5-7 dní. V této fázi dochází k růstu a zrání folikulů na vaječnicích a je zakončena ovulací dominantního folikulu.

Příznaky říje můžeme rozdělit na vnější a vnitřní.

a) Vnější příznaky říje:

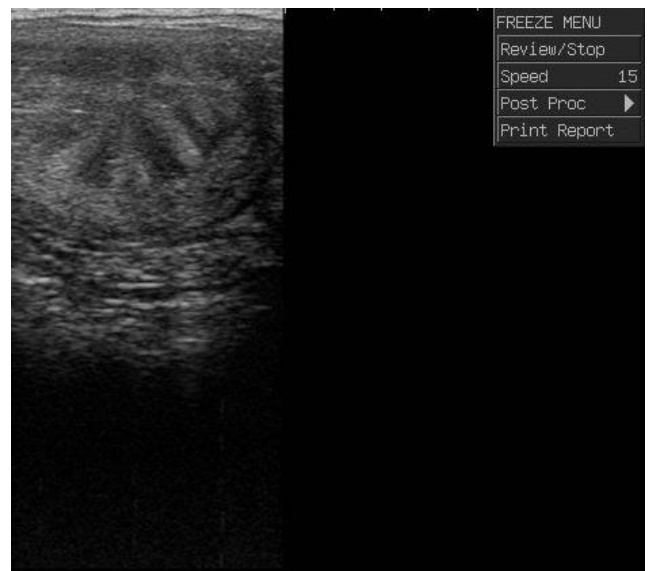
- změny chování klisen - některé klisny jsou neklidné, vzrušivé a lekavé, druhá část klisen je naopak v říji klidnější.
- Typickým příznakem říje u klisen je tzv. blýskání, jde o rytmické pohyby stydkých pysků. Stydké pysky jsou zduřelé a sliznice pochvy zarudlá. Dalším příznakem je i časté močení, odtahování ocasu na stranu a výtok čirého hlenu z pochvy.

b) Vnitřní příznaky říje:

- snížený tonus dělohy
- uvolněný a na dně pochvy ležící děložní krček
- edematizace dělohy a vznik řas loukořovitého uspořádání. Těsně před ovulací edém mírně ustupuje a může nám napovědět, že brzy dojde k ovulaci.
- Na obou vaječnicích dochází k růstu několika folikulů do velikosti 2-3 cm, poté na jednom z vaječníků dochází k vyselektování tzv. dominantního folikulu, který zabezpečuje estrogenizaci klisny. Tento folikul má zpočátku kulovitý charakter, ale v průběhu růstu se mění a získává oválný tvar, jelikož je nutné, aby se „protlačil“ do *fossa ovarialis*, kde praská. Konzistence takového folikulu je měkká, těsně před ovulací se ale vnitřní tlak ve folikulu zvyšuje. Folikul obvykle při velikosti 4-6 cm praská a klisna ovuluje.



Obrázek 3: Preovulační folikul 51,9 x 48,6 mm



Obrázek 2: Loukořovitá struktura děložních řas

2. Luteální fáze (diestrus)

Diestrus trvá 15-16 dní. V místě prasklého folikulu se formuje luteální tkáň, produkující progesteron. Progesteron má za úkol připravit klisnu na případnou březost. Největšího rozvoje dosahuje žluté tělísko 4. - 5. den po ovulaci. Žluté tělísko může u klisen nabývat dvou fyziologických podob – útvar s centrální dutinou a bez dutiny. Na vaječnicích jsou v diestru přítomné i drobné folikuly (1-1,5 cm), po ovulaci může proběhnout tzv. sekundární velká folikulární vlna, která může být v polovině diestru zakončena ovulací, klisna je však pod vlivem progesteronu.

V diestru klisna nejvíce zájem o hřebce. Stydká štěrbinu je pevně uzavřená a svraštělá, sliznice pochvy je bledá až světle růžová, suchá, lepivá. Děložní krček je tuhý a uzavřený.



Obrázek 4: Corpus luteum

Jaký má vliv délka světelného dne na ovlivnění cyklu u klisen?

V zimním období probíhají tzv. malé folikulární vlny – fotoreceptory v oku klisny zaznamenávají délku světelného dne a tuto informaci předávají epifyze. Epifyza je endokrinní žláza produkující melatonin. V době, kdy je tma, dochází ke zvýšené sekreci melatoninu, to ovlivňuje hypothalamus a pulzativní charakter uvolňování GnRH. Malé folikulární vlny probíhají, pokud dochází k uvolnění GnRH pouze v jednom či dvou pulzech denně. Na vaječnicích klisny dochází v tomto období k růstu a zániku malých folikulů. Při prodloužení světelného dne dochází ke snížené sekreci melatoninu a zvyšuje se tedy i počet pulzů GnRH denně. Při 3 – 4 pulzních vlnách je stimulována sekrece FSH, který je produkován předním lalokem hypofýzy. Vlivem FSH dochází k intenzivnějšímu folikulárnímu růstu formou velkých folikulárních vln.

4. MANAGEMENT PŘÍJEMKYŇ

1. Výběr příjemkyň:

- zdravé klisny
- dobré BCS – velmi hubené klisny inklinují ke špatné konfiguraci perinea
- hmotnost (podle velikosti dárkyně, 500 kg)
- věk (3-12 let)
- žádné abnormality na pohlavním aparátu (evaluace perinea, případná Cashlickova sutura)
- normální estrální cyklus
- dobrý vývin mléčné žlázy

VIDEO 2

PŘÍPRAVA DÁRKYNĚ A PŘÍJEMKYŇ



2. Sezónní příprava:

Před sezonou – zvážit provedení mikrobiologického vyš. (sterilně, stěry v estru! – min. 35mm folikul, edém dělohy – výsledek jinak může být falešně negativní).

Ideální je mít připraveno několik příjemkyň začátkem února, kdy začíná připouštěcí sezona. Nejlepší cestou k zajištění prvních ovulací již začátkem roku, je umělé osvětlení (viz Kapitola 5. Příprava dárkyně). Stejně důležité je udržovat klisny v pohodě a nevystavovat je zbytečnému stresu.

3. Hormonální stimulace příjemkyní:

S příchodem připouštěcí sezony je třeba si u každé příjemkyň přesně zaznamenat den, kdy klisna ovuluje. Každá klisna se v průběhu estru opakovaně vyšetřuje (ideálně každý den) transrektální ultrasonografií a výsledky se pečlivě zaznamenávají do protokolu každé klisny. Den ovulace se označuje jako **den 0**, den po ovulaci se značí **+1**, atd. Ideální synchronizace dárkyně a příjemkyň nastává tehdy, když je příjemkyň v den příjmu embrya +4 až +8 dní po ovulaci.

Tento interval je ideální, protože pouze v tomto intervalu je děloha příjemkyň připravená na příjem embrya a má dostatečnou hladinu progesteronu. Nicméně stupeň synchronizace mezi dárkyní a příjemkyní není tak striktní, jako u ostatních velkých domestikovaných zvířat. Studie od Squires et al.

(1985) nenalezla žádný rozdíl mezi tím, jestli příjemkyně zovulovala -1 až +3 dny po dárkyni. K hormonální stimulaci příjemkyně je používán **PGF₂α** , **progesteron** nebo **hCG**.

Stejně důležité, jako USG kontrola před ovulací je kontrola po ovulaci ideálně hned druhý den po ovulaci – CL, tekutina v děloze (endometritis), atd. Případná aplikace oxytocinu je možná (Florida – 20 IU i.v. q více než 4 hod).

Hormonální stimulace příjemkyň:

- **PGF₂α**
- **progesteron**
- **indukce ovulace – hCG, GnRH**

Realita: Příjemkyně jsou kontrolovány transrektální USG v průběhu celého procesu přípravy, i po ovulaci! Ideální synchronizace dárkyně a příjemkyň je -1 až +3 dny.

5. PŘÍPRAVA DÁRKYNĚ

Souhrn přípravy dárkyně

- 1) Monitoring estrálního cyklu klisny, pravidelná transrektální USG vyšetření a příprava na odběr jediného embrya. U klisen lze využít hormonální stimulace růstu folikulů.
- 2) Inseminace klisny
- 3) Odběr embrya – transcervikálně, katetr se umístí do těla děložního a provede se výplach celé dělohy (1 – 4 l média)

1. Výběr

Nejvhodnějšími dárkyněmi jsou klinicky a reprodukčně zdravé klisny s dobrou tělesnou kondicí. Dobrý celkový zdravotní stav je základem k úspěšnému získání embrya.

Dárkyně jsou často hodnotné klisny, které nemohou porodit vlastní hříbě, případně jsou v plné sportovní zátěži.

Úspěšnost zisku embrya bývá nižší u klisen mladších 2 let, klisen starších 15 let z důvodu snižování kvality oocytů či klisen, které již v minulosti měly problém s neplodností. Embryonální mortalita je vyšší u příjemkyň, které obdrží embryo od starších dárkyň.

Správná a důkladná příprava dárkyně je klíčem k zisku životaschopného embrya. Přestože není nemožné získat embryo od dárkyně s endometritidou, výplach s embryem je velmi zakalený a jeho šance na přežití jsou rapidně snižované.

Doporučuje se, aby dárkyni bylo minimálně jednou umožněno donosit a odchovat hříbě do té doby, než dovrší 8 – 10 let věku. Při opakovaném provádění embryotransferů je doporučeno umožnit dárkyni donošení vlastního hříběte jednou za 3 – 4 roky. Cílem je optimalizace reprodukčního zdraví dárkyně. U klisen, kterým nikdy nebylo umožněno donosit hříbě, se mohou vyskytnout problémy s funkcí děložního krčku a sklon k následným chronickým endometritidám.

Zajímavost: V dnešní době se stále častěji setkáváme s prováděním několika embryotransferů od jedné dárkyně v průběhu jednoho roku. V těchto případech je třeba mít na paměti, že vědecké i klinické studie již prokázaly, že opakované inseminace a výplachy embryí vedou ke zvýšeným výskytům akutních bakteriálních endometritid, které mají tendenci přecházet do chronicity. Není tedy výjimkou, že u takových klisen se provádí opakované bakteriologické kultivace děložních stěrů v průběhu připouštěcí sezony. Nicméně, mělo by se bránit nadužívání intrauterinních antibiotik, protože to může vést k nadměrnému růstu kvasinek nebo plísní. Jedna z nejúčinnějších cest, jak udržet dělohu dárkyně v dobrém stavu, je použití uterinních výplachů.

2. Sezónní příprava

Pro vyvolání první ovulace by dárkyně měly být vystaveny umělé fotoperiodě. Je třeba zajistit, aby délka svícení byla 16 hodin, zbylých 8 hodin je tma. Přibližně po 60 dnech stimulace proběhne první ovulace.

Realita: Přibližně v polovině listopadu – začátkem prosince se začíná klisnám přisvěcovat a první ovulace se očekává začátkem února. V umělé fotoperiodě je třeba pokračovat tak dlouho, než si její úlohu přebere denní svít, tj. cca do konce března – začátku dubna. Svítit se začíná ráno před svítáním a světla se vypínají kolem 23:00.

3. Reprodukční vyšetření dárkyně

Dárkyni je ideální vyšetřit z reprodukčního hlediska již na konci předchozí reprodukční sezony, aby bylo možné identifikovat a řešit případné problémy. Další vyšetření se provádí na začátku připouštěcí sezony. Cílem vyšetření je identifikovat případné problémy, zjistit v jakém stadiu estrálního cyklu se nachází, monitorovat stav dělohy a vaječnicků.

Vyšetření by mělo zahrnovat:

- Celkové klinické vyšetření
- Vyšetření perinea
- Transrektální palpaci a USG vyšetření
- Mikrobiologické a cytologické vyšetření obsahu dělohy

Doplňková vyšetření:

- Vaginoskopie (spekulum)
- Biopsie endometria

4. Řízení reprodukčního cyklu dárkyně

Příprava dárkyně spočívá v pravidelném monitoringu estrálního cyklu klisny, pravidelných transrektálních ultrazvukových vyšetření a přípravě na odběr jediného embrya. Kontrolována je nejen pro čas ovulace, stejně důležitý je i monitoring dělohy.

Realita: Klisna je vyšetřována každý den, než folikul dosáhne velikosti cca 35mm. Kontrolována je i edematizace dělohy, měla by být bez obsahu.

V případě přirozeného připouštění/použití chlazené ID, je inseminace naplánována většinou před ovulací, v praxi to znamená, že klisna je vyšetřována 1x denně a připuštěna/inseminována i 24 hodin před ovulací. V případě použití mrazené ID je vhodné inseminovat těsně po ovulaci, v praxi to znamená klisnu vyšetřovat každých 6-8 hodin a inseminovat v momentě, kdy dominantní folikul zmizí.

Ultrazvukové vyšetření se provádí i po ovulaci, k určení přesného času ovulace, počtu zovulovaných folikulů, ale hlavně kvůli zhodnocení stavu dělohy. Ta musí být pečlivě zkontrolována pro případnou detekci akumulace obsahu, který by měl být eliminován (výplachy, oxytocin, atd.).

K indukci ovulace můžeme klisně podat humánní choriový gonadotropin (hCG) či deslorelin acetát.

- hCG – 2500 IU, i. v.
- deslorelin acetát 1,0 – 1,8 mg, i. m.

Podáním této dávky klisně s folikulem větším než 35 mm vyvoláme ovulaci přibližně do 36 až 40 hodin. Použití hormonálních přípravků u klisen je vždy potřeba zvážit, po častějším (2-3x v sezoně) použití hCG si klisna vytváří rezistenci a na další aplikace již nezareaguje.

5. Reprodukční komplikace u dárkyní

Nejčastějším problémem, který se vyskytuje u dárkyň embryí, jsou endometritidy (často PMIE – persistent mating induced endometritis). Akumulace náplně v děloze po inseminaci je patologická a je třeba ji řešit. Proto je nezbytné pamatovat na transrektální USG vyšetření dárkyně, ideálně druhý den po inseminaci. S PMIE se často setkáváme u klisen starších 15 let.

Ve většině případů je endometritida spojená se sekundární reakcí na antigenní stimulaci od spermatozoí, nikoliv bakteriálního původu. Terapie spočívá v uterinní laváži sterilním fyziologickým nebo Ringerovým roztokem (1 – 3 litry, množství závisí na charakteru výplašku) v kombinaci s použitím oxytocinu (10 – 20 IU intramuskulárně nebo intravenózně). Prevencí vzniku PMIE je snížení množství použitých ID (ideální načasování inseminace), případně profylaktické provedení laváže 4 – 6 hodin po inseminaci a aplikace oxytocinu.

Dále se setkáváme s komplikacemi jako: infekčními endometritidami (*Streptococcus equi* subspecies *zoepidemicus*, *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* a *Pseudomonas aeruginosa*, případně zástupce z rodu *Fungi: Candida albicans* a *Aspergillus fumigatus*), hemoragickými folikuly, perzistentními CL, perovariálními cystami, atd.



Obrázek 5: Obsah v děloze

6. SUPEROVULACE

Vyvolání superovulace

Vyvolání superovulace u klisen je v porovnání s ostatními druhy zvířat velice obtížné. Do souhrnu přípravků, které byly používány k vyvolání superovulace u klisen patří:

- equinní choriový gonadotropin (eCG), gonadotropin releasing hormone (GnRH), porcinní FSH, kombinace porcinního FSH + LH, EPE (extrakt z koňských hypofýz), purifikovaný equinní FSH (eFSH) a rekombinantní equinní FSH (reFSH).

Přestože použitím porcinního FSH, kombinace porcinního FSH +LH nebo eCG jsou dosahovány excelentní výsledky u ostatních druhů zvířat, jejich aplikace u klisen přinesla velmi slabé výsledky. Důvodem toho, že klisny nejsou responsivní na eCG, je pravděpodobně fakt, že tento hormon se u klisny váže s LH receptory, zatímco u druhů ostatních zvířat se váže na FSH i LH receptory a má dvojitý účinek. Ačkoli se ukázalo, že klisny jsou poměrně responsivní na porcinní FSH, opakované podání vysokých dávek může způsobit mírný nárůst v počtu dvojitých ovulací. Nicméně tento slabý nárůst je zanedbatelný v porovnání s finančními náklady na aplikaci tohoto hormonu.

Klisny jsou navíc aktivně imunizované proti inhibinu nebo aplikaci inhibinového antiséra za účelem vyvolání multipních ovulací

Úspěchy byly zaznamenány v použití velkých dávek extraktu z koňských hypofýz (EPE, equine pituitary extract). Studie od Squires and McKinnon, 1986, popisuje použití vysokých dávek EPE každý den v průběhu diestru. V této studii byly získány 2 embrya od klisny, s porovnáním s 0,65 embrya od klisny z kontrolní skupiny. Další studie popisují při použití EPE efekt u 75 % klisen, s nálezem 3 – 4 ovulací.

Možné schéma aplikace EPE:

- ovulace
- za 5 – 6 dní iniciální dávka EPE
- následující den EPE + PGF2 α (luteolýza)
- aplikace EPE každý následující den až do nálezů min. 2 folikulů > 35 mm (5 – 8 dní)
- indukce ovulace (hCG)

V dnešní době existují pouze dva možné scénáře k vyvolání superovulace u klisen, a to je administrace eFSH (Bioniche Animal Health, Bogart, Georgia) nebo reFSH (AspenBio Pharma Inc., Castle Rock, Colorado). Nicméně ani jeden z těchto preparátů není komerčně dostupný na trhu k použití u koní.

Možné schéma aplikace eFSH nebo reFSH:

- ovulace
- čekání na endogenní produkci FSH
- aplikace FSH při nálezů několika folikulů větších než 15 – 20 mm v průměru
- opakovaná aplikace každých 12 hod
- aplikace PGF2 α druhý den po aplikaci FSH
- pokračování s apl. FSH q 12 hod, než folikuly dorostou > 30 – 35 mm
- „coast period“ = 30 – 36 hod bez dalších aplikací
- indukce ovulace (hCG)

Faktory ovlivňující účinnost responsivitu na aplikaci FSH:

- ✓ velikost a množství folikulů při zahájení aplikace FSH – nejlepší výsledky jsou dosahovány u klisen s velkým množstvím folikulů velikosti 15 – 20 mm. U klisen s folikulem větším než 25 mm většinou dochází k jedné ovulaci.
- ✓ frekvence aplikace FSH – aplikace 2 x denně zvyšuje pravděpodobnost multipních ovulací
- ✓ „coast period“ - prevence overstimulace folikulů, snížení množství potřebných dávek FSH

Komplikace spojené s použitím FSH:

- ✓ selhání ovulace u všech dominantních folikulů po aplikaci hCG
- ✓ formace anovulatočních folikulů
- ✓ vývoj a ovulace jednoho folikulu
- ✓ možná nižší přežitelnost embryí

7. PŘIPOUŠTĚNÍ / INSEMINACE

Ve chvíli, kdy klisna vykazuje vnější říjové příznaky, je vhodné provést ultrasonografické vyšetření dělohy a ovarií a podle toho načasovat přirozené připouštění/inseminaci. V ideálním případě bychom na USG měli nalézt na vaječnicích preovulační folikul (> 35 mm) a CL (tzn., že klisna je v letním připouštěcím období a již tento rok ovulovala). Stejně důležité je zkontrolovat dělohu, která by měla být bez náplně a s přítomností řas (loukoťovitá struktura).

1. Přirozené připouštění

Tento způsob se v dnešní době u sportovních koní, u nichž je embryotransfer nejčastěji prováděn, z důvodu bezpečnosti klisny i hřebce příliš nevyužívá. Podle způsobu provedení rozeznáváme několik typů. První je harémové připouštění, kdy je hřebec přes připouštěcí období začleněn ve stádě společně s klisnami.

Další z možností je připouštění volné, kdy jsou klisna a hřebec vypuštěni do ohraničeného prostoru a pouze pozorováni. Nejčastější metodou přirozeného připouštění, využívaného zejména u plnokrevných koní, je připouštění z ruky. Nejprve se klisna přivede k připouštěcí stěně, na druhé straně stěny stojí hřebec. Pokud klisna při očichání hřebcem jeví příznaky říje, přistoupí se k samotnému připouštění.

2. Inseminace

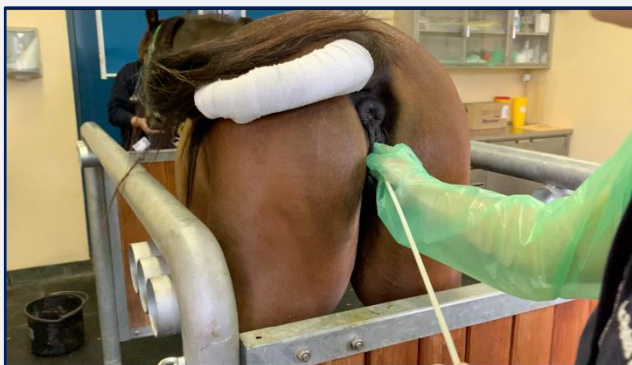
Výhodou umělé inseminace je ověření kvality inseminační dávky. Další výhodou je, že klisna nemusí být převážena za hřebcem a odpadají s tím spojená rizika. Využít můžeme 3 typů inseminačních dávek – čerstvou, chlazenou a mrazenou ID.

Inseminace čerstvou/chlazenou dávkou

V případě použití čerstvé ID je třeba ihned přejít k inseminaci, jelikož rychle klesá kvalita ejakulátu. Při rychlé inseminaci klisny čerstvou ID může životnost spermií být až 72 hod, v případě použití chlazené ID je životnost spermií většinou udávána do 48 hodin. Inseminace čerstvou/chlazenou ID je plánována před ovulací, přičemž druhý den po inseminaci je vhodné klisnu ultrasonograficky přešetřit, zpřesnit čas ovulace, případně objednat další ID k reinseminaci a zkontrolovat výskyt patologické náplně v děloze (PMIE).

VIDEO 3

INSEMINACE CHLAZENOU INSEMINAČNÍ DÁVKOU



Postup inseminace chlazenou ID:

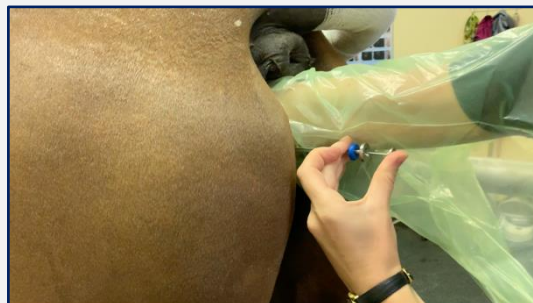
1. Provedeme rektální USG vyšetření (kontrola preovulačního folikulu a zřasené dělohy).
2. Ocas klisny ovážeme obinadlem a pomocí druhého obinadla ho přivážeme ke krku (případně necháme podržet majitele/pomocníka).
3. Provedeme důkladnou očistu perinea. Vulvu a okolní oblast pečlivě vyčistíme mýdlem a následně otřeme sušením s dezinfekcí. Volíme *desinfekcia* na bázi jódu, jelikož nejsou spermicidní.
4. Inseminační pipetu předplníme dávkou (eliminace vzduchu v pipetě).
5. Pipetu zavedeme přes děložní krček do dělohy a aplikujeme inseminační dávku. Pipetu následně propláchneme Hartmannovým roztokem, aby nám zbytek ID nezůstal v pipetě.
6. Vysuneme ins. pipetu a provedeme masáž děložního krčku.

Inseminace mrazenou inseminační dávkou

Výhodou mrazené ID je možnost přepravy mezi kontinenty či využití dávky již mrtvých hřebců. Mezi nevýhody se řadí snížená pohyblivost spermií, složitější manipulace a uchovávání v tekutém dusíku. Dále se využití mrazené dávky nedoporučuje u subfertilních klisen či klisen s opakovanými problémy se zabřezáváním. Mezi další ztěžující faktory patří nutnost přesného načasování inseminace z důvodu krátké doby přežitelnosti spermií. Rektální USG vyšetření klisny, která má být inseminována mrazenou ID, se provádí každých 6-8 hodin. K inseminaci se většinou přistupuje ihned po ovulaci (do 6 – 8 hod), někteří lékaři doporučují inseminační dávku rozdělit, první polovinu aplikovat před a druhou krátce po inseminaci.

VIDEO 4

INSEMINACE MRAZENOU INSEMINAČNÍ DÁVKOU



Postup inseminace mrazenou ID:

1. Provedeme rektální USG vyšetření (kontrola preovulačního folikulu a zřasené dělohy).
2. Ocas klisny ovážeme obinadlem a pomocí druhého obinadla ho přivážeme ke krku (případně necháme podržet majitele/pomocníka).
3. Provedeme důkladnou očistu perinea.
4. Rozmrazíme inseminační pejetu – vodní lázeň 37 – 38°C po dobu 20 až 30 sekund a poté ji důkladně osušíme.
5. Odstříháme konec, kde není vatička! (tento krok je velmi důležitý, v opačném případě z pejety nebudeme schopní dostat inseminační dávku).
6. Pejetu nasadíme na inseminační stylet a zaaretujeme.
7. Inseminační pipetu následně přes děložní krček vsuneme do dělohy, případně až do děložního rohu s preovulačním folikulem a inseminujeme.
8. Vysuneme pipetu a provedeme masáž děložního krčku.

8. ODBĚR EMBRYA, FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ ZISK EMBRYA

Výplach embrya se provádí nejčastěji **6,5 - 8 dní** po ovulaci klisny. Odběr je plánovaný na základě data ovulace a dalších faktorů, jako jsou věk dárkyně, typ použitého spermatu a zkušenosti s předchozím odběrem embryí.

V současné době jsou embrya získávána neinvazivní cestou, transuterinní cervikální laváží, tzn. výplachem dělohy a děložních rohů za použití Foleyho katetru.

Devíti-denní embrya se ukázala jako méně vhodná, pravděpodobně kvůli své velikosti (viditelná pouhým okem ve výplašku), jsou pravděpodobněji zničitelná v průběhu procesu a nejsou mrazitelná. Při kryoprezervaci provádíme výplach dřív, nejčastěji sedmý den po ovulaci, ale provádí se i dřív. U starších klisen a při inseminaci mraženým spermatem se výplach provádí o 12-24 hodin později. V průměru je embryo úspěšně získáno z 50-65 % pokusů.

Dárkyním by ihned po odběru měl být aplikován prostaglandin, aby došlo k luteolýze. Den po výplachu by měla být klisna sonograficky vyšetřena, aby se včas mohly řešit případné komplikace.

Faktory ovlivňující výsledek odběru a přežitelnost embrya:

1. Reprodukční zdraví dárkyně
 - přípouštěním indukovaná endometritida (PMIE) – výrazně nižší pravděpodobnost zisku E
 - U starších klisen a klisen, které zovulovaly z malých folikulů je vhodné zvážit perorální suplementaci progesteronem (Altrenogest, 0,044 mg/kg/den q 24 hod).
2. Věk dárkyně (2 – 15 let)
 - starší klisny s horší plodností – méně embryí, defektní oocyty
3. Typ použitého semene, plodnost hřebce
 - mrazená x chlazená ID x čerstvé semeno
4. Načasování inseminace/připuštění a ovulace
5. Den výplachu embrya
 - 6. den – menší E, lepší mrazitelnost
 - 7. – 8. den – obvykle prováděný odběr
 - 9. den – vhodné u starších klisen (retardovaný vstup vejcovodem)
6. Technika výplachu

Vývoj equinních embryí:

Raná koňská embrya rostou rychle a ta větší mohou být vidět ve výplašku pouhým okem. Jejich velikost je 0,1 – 4,5 mm v průměru (6-9 dní stáří po ovulaci). Velká embrya (>1,5-2,0 mm) se pojí s problémy spojenými s jejich velikostí, jsou křehčí a často je i těžší najít dostatečně velký aparát na jejich přenos, aby při přenosu neutrpěla poškození.

Na druhou stranu, pokud je výplach dělohy dárkyně proveden příliš brzy, embryo se stále ještě může nacházet ve vejcovodu a jeho zisk je nemožný. Volba správného dne je tedy klíčová, obvykle se výplach embrya provádí 7. den po ovulaci, kdy embryo měří v průměru 400–500 µm. Ale ani to není zárukou úspěchu. Doba sestupu embrya se udává mezi 144 hod (6 dní) až 156 hod (6,5 dní) po ovulaci. Vyšetření tvořícího se CL je tedy dobrým ukazatelem na výpočet výplachu embrya.

Průběh získávání embrya (transcervikální uterinní laváž)

Standardním postupem je nechirurgická metoda **transcervikální uterinní laváže**. Tento zákrok trvá obvykle 15 – 20 minut, podle zvolené techniky a počtu prováděných výplachů. Zákrok musí být prováděn v čistém a bezpečném prostředí. Ideální je použití fixační klece. Většinu klisen není třeba sedovat. Sedace je doporučena u mladých, vzrušivých či agresivních klisen. Pokud je nutné sedovat, je vhodné zvolit mírnou sedaci, aby klisna stále byla schopná stát na obou pánevních končetinách.

Před výplachem je vhodné zopakovat transrektální ultrasonografické vyšetření, k zjištění prezenze jednoho/více CL (podle toho poté očekáváme více embryí ve výplašku) a kontrole dělohy. Děloha by měla být bez obsahu, v případě přítomnosti echogenní tekutiny je pravděpodobnost zisku životaschopného embrya velmi nízká.

Před výplachem je dobré zkontrolovat, že je vyprázdněný také močový měchýř. Nadměrná distenze močového měchýře může způsobit posun dělohy a následně, pokud dělohu plníme výplachovým médiem, ta svou vahou padá na jednu stranu močového měchýře a nejsme schopni řádně vypláchnout jeden z děložních rohů.

Ocas klisny je následně vyvázán obinadlem a zvednut (*foto*). Poté je provedena důkladná očista perinea, vulvy a vestibula k zajištění prevence kontaminace dělohy. Je nutné dbát na použití dezinfekce, která je bezpečná pro embryo (většinou se používá dezinfekce na bázi jodu – např. Betadine).

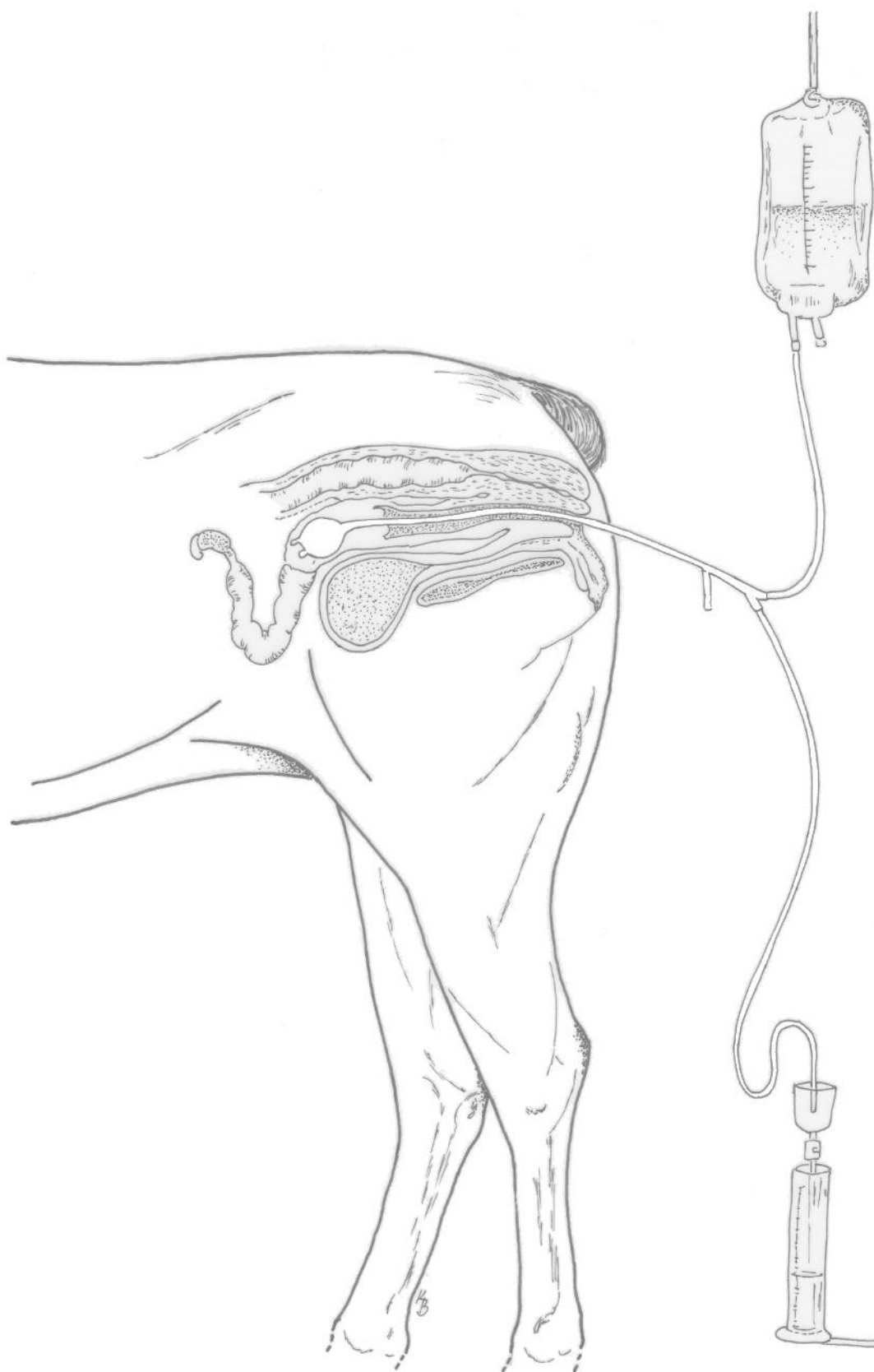


Obrázek 7: Vyvázání ocasu

Výplachové medium by mělo být zahřáto na pokojovou teplotu, aby byl snížen risk teplotního šoku embrya. Katetr, všechny spojovací hadičky i filtr jsou předplněny výplachovým médiem, aby bylo zabráněno přítomnosti bublin ve výplachovém systému. Rozlišujeme dva typy systému napojení embryonálního filtru – otevřený a uzavřený. V uzavřeném systému je jedna z hadiček Y-systému napojená přímo na embryonální filtr, zatímco v otevřeném systému je hadička pouze vložena, bez upevnění.

Foleyho katetr je opatrně vsunut přes děložní krček do těla děložního, manžeta balonku nafouknuta pomocí stříkačky, u většiny klisen přibližně 40-60 ml vzduchu. Katetr je potom jemně zatažen kaudálně, aby bezpečně uzavřel vnitřní část krčku. Jakmile je katetr bezpečně fixován v děloze, děloha je naplněna výplachovým médiem za pomoci gravitace.

Možné chyby: Při nedostatečném nafouknutí manžety, případně jejím nafouknutím v lumen krčku, může katetr vyklouznout. Při nadměrném nafouknutí balonku je obtížnější manipulovat s katetrem v děloze při výplachu. Další chybou může být zavedení katetru příliš hluboko do těla děložního. V takovém případě může dojít k výplachu pouze jednoho rohu děložního.



Obrázek 8: Systém zapojení hadiček, otevřený systém napojení embryonálního filtru

Existuje spousta technik, jak provést výplach embrya. Výběr techniky záleží na výběru dárkyně a zkušenostech osoby provádějící výplach. Nejčastěji bývá používána minimálně třikrát opakovaná laváž dělohy 0,5 – 2 litry výplachového media (tzn., že celkově je použito mezi 3 – 4 l výplachového media). Předpokladem úspěchu je naplnění všech částí děložního lumen, včetně záhybů endometria a obou děložních rohů. Toho se lehce dosahuje u mladých klisen, ale může být obtížnější u starších, příp. laktujících klisen. Množství média potřebného na jednu laváž dělohy závisí na její velikosti, paritě klisen a osobní preferenci. Mladé klisny většinou začnou být diskomfortní při množství kolem 400-500 ml, naopak starší klisny, multipary, mohou udržet až 1-2 litry roztoku. Zda je naplnění dělohy dostatečné je možné zkontrolovat transrektální palpací. U některých klisen lze k lepší distribuci media v děloze použít perrektální masáž dělohy, kdy je cílem vmasírovat medium do obou děložních rohů. V tomto případě je vhodné klisnu premedikovat spasmolytiky (např. Buscopan). Děložní výplašek je následně za pomoci gravitace systémem Y-hadiček ven přes embryonální filtr.



Obrázek 9: Výplach embrya, uzavřený systém napojení embryonálního filtru

Množství výplachové tekutiny je vhodné shromažďovat v odměrném válci, který nám dává přesný přehled o množství získané tekutiny výplaškem. Měli bychom získat >95% tekutiny, kterou jsme použili. Je třeba počítat s množstvím zbývající tekutiny v systému hadiček. Ke kontrole přítomnosti tekutiny v děloze může být provedena transrektální ultrasonografie. Pokud je nutné podpořit kontraktilitu dělohy, lze u některých klisen aplikovat ke konci výplachu oxytocin (20 IU, intravenózně).

Embryo lze vyhledávat v průběhu výplachu nebo po dokončení všech laváží. Pokud je embryo ve stadiu blastocysty, lze ho identifikovat pouhým okem.

Realita: V praxi je často po provedení laváže Foleyho katetr dočasně ponechán na místě, zatímco filtr je zkontrolován pro přítomnost embrya. Pokud embryo není nalezeno, je přistoupeno k druhé laváži dělohy. Pokud ani tak není embryo nalezeno, lze výplach zopakovat ještě tentýž den (např. odpoledne) nebo den následující.

Jakmile je výplach ukončen, balonek na Foleyho katetru je vypuštěn a vyndán z reprodukčního traktu klisny. Všechna zbývající tekutina, která se nachází v systému hadiček, je vypuštěna ven skrz embryonální filtr.

Po úspěšném výplachu embrya se doporučuje klisně aplikovat prostaglandiny (Cloprostenol, 250 μ g, intramuskulárně). To způsobí zkrácení luteální fáze, rychlý návrat klisny do estru a pomůže rychlejší evakuaci možného obsahu v děloze, tzn. minimalizaci případné endometritidy. K aplikaci prostaglandinů ovšem nepřistupujte v případě, že výplach embrya byl neúspěšný a majitel klisny si přeje počkat na diagnostiku gravidity u dárkyně (za dalších cca 7 dní po výplachu).

VIDEO 5

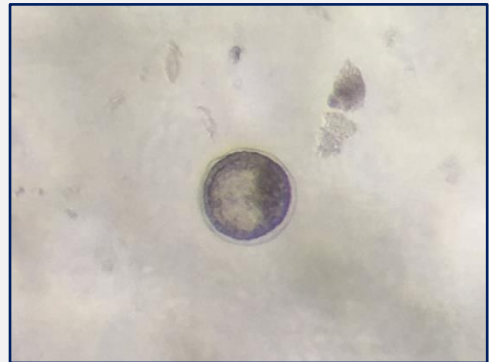
VÝPLACH EMBRYA



10. VYHLEDÁNÍ, POSOUZENÍ EMBRYA A MIKROMANIPULACE

VIDEO 6

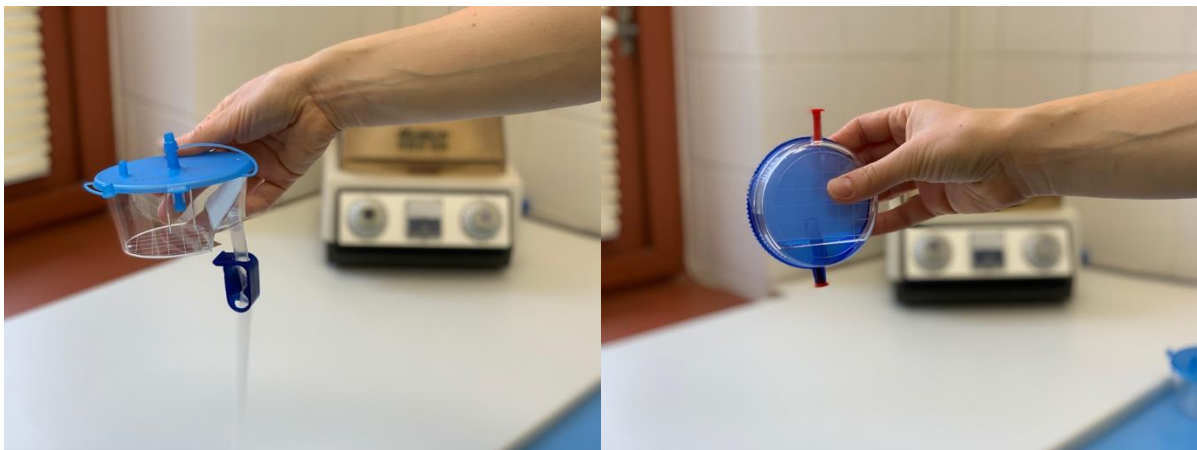
VYHLEDÁNÍ EMBRYA A MIKROMANIPULACE



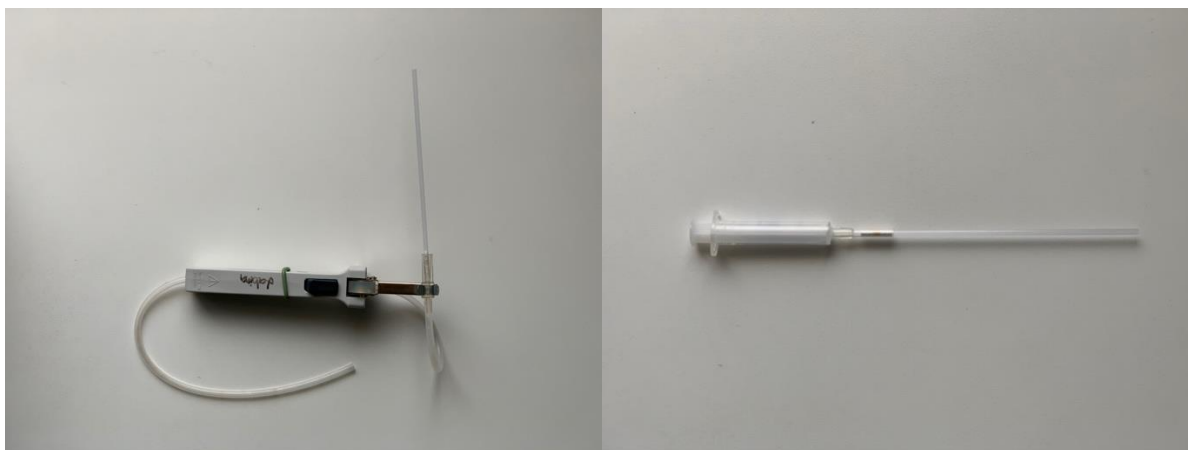
Doporučené vybavení:

- stereomikroskop
- vyhledávací miska na embryo
- pejeta (0,25ml nebo 0,5ml)

Embryo je vyhledáváno ideálně pomocí stereomikroskopu v průběhu výplachu nebo po finálním dokončení všech laváží. Některé filtry mají již zabudovanou mřížku na vyhledávání. U jiných je třeba výplašek přesunout do vyhledávací misky. Než začneme vyhledávat, je nutné opláchnout síto filtru cca 20 – 30 ml výplachového media pro případ, že by embryo bylo zachyceno na něm. Poté vložíme filtr/vyhledávací misku pod mikroskop a systematicky prohledáme. Embryo a celulární debris většinou klesají na dno misky, ale může se stát, že embryo zůstane „plavat“ na hladině, proto je nezbytné důkladně proostrit celý preparát.



Obrázek 10: Embryonální filtry



Obrázek 11: Mikropipeta a stříkačka s pejetou



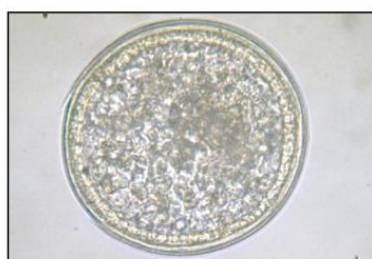
Obrázek 12: Stereomikroskop

Nalezené embryo je následně posouzeno. Je hodnocena jeho kvalita (stupeň 1 – 4, excelentní – degenerované/mrtvé), velikost (150 – 2500 μm), stadium embryonálního vývoje (morula, časná blastocysta, blastocysta a expandovaná blastocysta) a další možné abnormality embrya. Stadium embryonálního vývoje by mělo korelovat se stářím embrya. Je nutné odlišit embryo od neoplozeného oocyty (UFO – unfertilized oocyte) a neembryonálních struktur (celulární debris, močové krystaly, organický materiál, atd.).

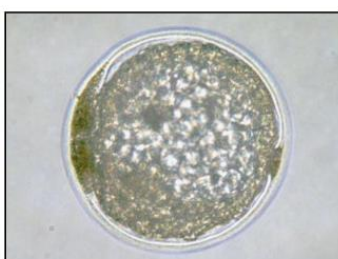
EVALUATION OF EQUINE EMBRYOS

EMBRYO QUALITY or GRADE (4-Point Scale)

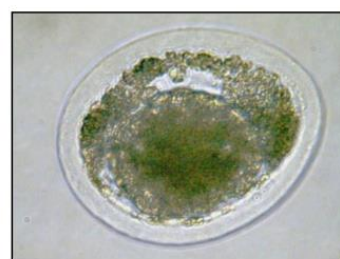
Grade	Comment	Description
1	Excellent	No abnormalities observed; spherical in shape; cells of uniform size, color and texture; size and developmental stage appropriate for age post-ovulation
2	Good	Minor imperfections, such as a few extruded blastomeres or debris; slight irregularities in shape, size, color, or texture; limited separation between trophoblast layer and zona pellucida or capsule
3	Fair to Poor	Moderate level of imperfections, such as a larger percentage of extruded or degenerated blastomeres or debris; partial collapse of blastocoele; or moderate shrinkage of trophoblast from zona pellucida or capsule
4	Degenerate or Dead	Severe problems easily identified, such as a high percentage of extruded blastomeres, complete collapse of blastocoele, rupture of zona pellucida and/or capsule, or complete degeneration and embryonic death
UFO	UFO	Unfertilized oocyte



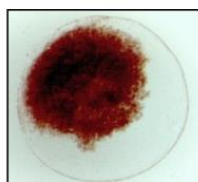
Grade 1 Blastocyst



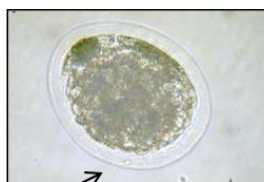
Grade 2 Blastocyst



Grade 3 Morula



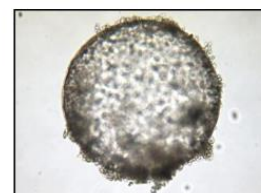
Grade 4



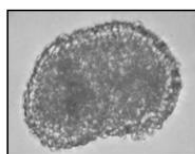
Grade 2 Morula (sperm in zona pellucida)



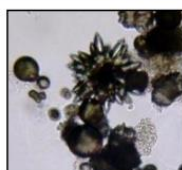
Grade 1 Early Blastocyst (cells attached)



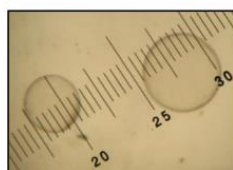
Blastocyst (debris attached)



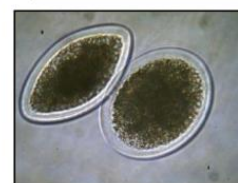
Non-Embryo (cell mass)



Non-Embryo (urine crystal and debris)



Size Determination (µm)



Unfertilized Oocyte



© 2012

Equine Reproduction Laboratory
Colorado State University



Obrázek 13: Evaluace koňských embryí

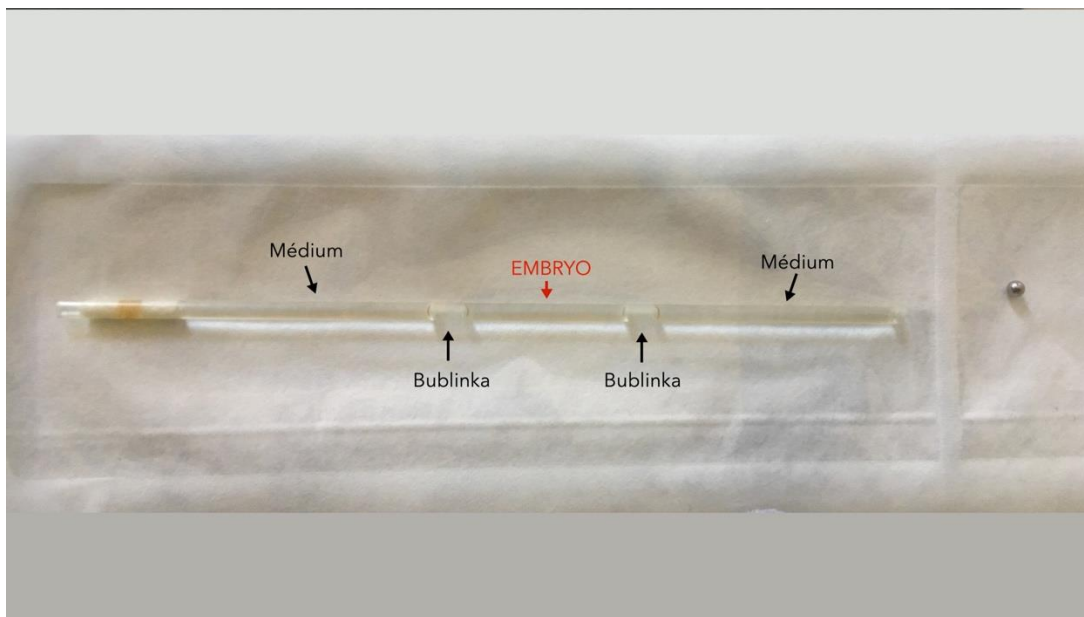
Zdroj: https://www.academia.edu/19659987/EVALUATION_OF_EQUINE_EMBRYOS

V případě hlubšího zájmu o studium hodnocení kvality embrya doporučujeme:

MCCUE, Patrick M. a Edward L. SQUIRES, 2015. Equine Embryo Transfer: Evaluation of equine embryos. *Equine Embryotransfer*. Jackson: Teton NewMedia, 67 - 81. ISBN ISBN 978-1-4987-3476-9.

Nalezené embryo je následně přemístěno do pejety (0,25 ml pejeta pro embrya velikosti 150 – 1000 μm , 0,5 ml pejeta pro embrya > 1000 μm). K natažení je možné použít 2 ml stříkačku nebo inseminační pipetu. Embryo je přemístěno z originálního filtru s minimálním množstvím výplachového media a embryo je následně několikrát promyto za účelem odstranění potencionálních kontaminantů (bakterie, celulární debris). Doporučuje se přemístění embrya minimálně 3 – 10 x v jednotlivých petriho miskách s promývacím mediem (obvykle komerčně dostupné).

Pokud je embryo do 2 – 4 hod přemístěno do příjemkyně, není třeba ho mrazit. Doporučuje se uchovat v „holding“ mediu při 20 -22°C a přemístit do příjemkyně, jakmile je to možné. Pokud je interval od výplachu po transfer delší, doporučuje se embryo přepravovat v chladicím systému při 5 – 8°C (např. Equitainer).



Obrázek 14: Pejeta s nataženým embryem uprostřed



Obrázek 15: Sedmi-denní embryo

11. TRANSFER EMBRYA

Jedna z největších výhod ET u koní je jednoznačně možnost transportu embryí v transportních boxech zchlazených na 5 °C bez významného ovlivnění kvality embrya. K odběru embrya dochází často v domácích podmínkách dárkyně, vypláchnuté embryo je následně zchlazeno a přepraveno do inseminačního centra, kde je přeneseno do příjemkyně.

Naopak výzkum v mrazení equinních embryí je pomalejší. V současné době je možné mrazit jen malá, šesti denní embrya. Výsledky pokusů mrazit 7 - 8denní embrya byly neuspokojivé a budou vyžadovat další výzkum.

Transfer embrya může být proveden konzervativní cestou, transcervikálně, nebo chirurgicky přes tzv. flank incizi.

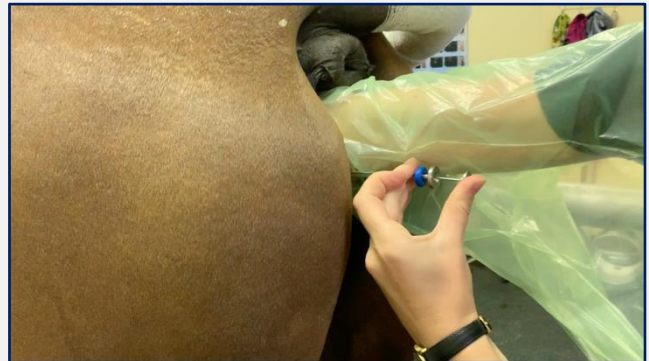
Výsledky zabřezávání jsou závislé na kvalitě embrya, zkušenostech technika/veterinárního lékaře, provádějícího transfer. Stejně jako u skotu platí, že embrya přenesená transcervikální cestou jsou viabilnější. Zkušený technik/veterinární lékař může dosahovat zabřezávání až 50-70 %.

Přenos:

- Čerstvá embrya
- Chlazená embrya (5°C) za 12-30 h po odběru
- Mražená embrya (experimenty)

Viz VIDEO 4

**INSEMINACE MRAZENOU INSEMINAČNÍ
DÁVKOU**



12. VYŠETŘENÍ GRAVIDITY PO EMBRYOTRANSFERU

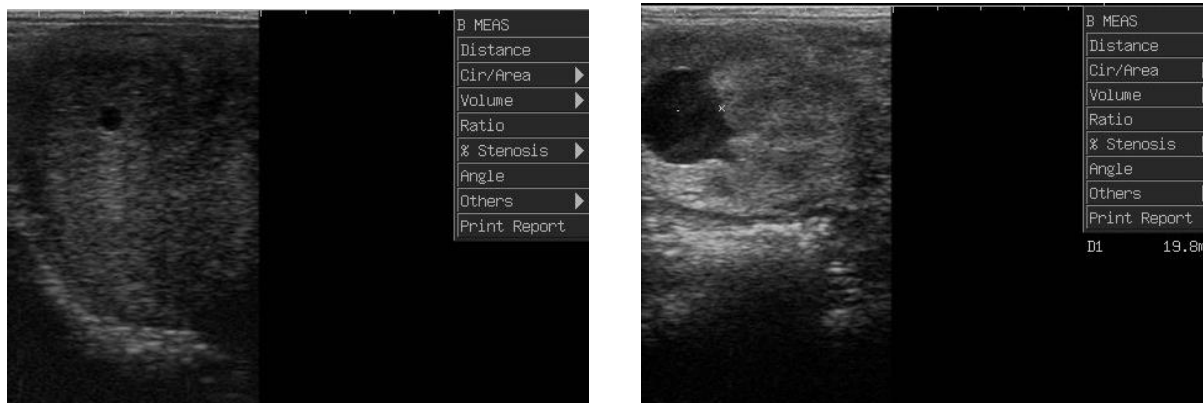
Faktory ovlivňující zabřezávání:

- metoda transferu
- synchronizace dárkyně a příjemkyně
- kvalita E
- management příjemkyně

První diagnostika gravidity u příjemkyně je provedena většinou 4 – 7 dní po ET, což odpovídá stáří embrya 11 – 14 dní. Nejpozději se provádí 16. den. Výhodou rané diagnostiky (tzn. 4 dny po transferu) je, že dárkyně akorát přichází do estru. V případě absence embryonálního váčku lze tedy dárkyni začít připravovat na další cyklus embryotransferu.

Druhá diagnostika gravidity je prováděna rutinně kolem 35. dne.

Embryonální mortalita (gravidita den 12, den 35, den 50) je vyšší u starších dárců.



Obrázek 16: gravidita den 12 a den 16



Obrázek 17: gravidita den 27

Management příjemkyně po transferu:

- minimalizace stresu
- (suplementace progesteronem)

Většina příjemkyň po transferu nepotřebuje exogenní suplementaci progesteronem. Rozhodnutí, zda-li klisnu suplementovat je individuální, odvíjí se od klinických zkušeností, individuality příjemkyně a hodnoty embrya. Suplementovat lze:

- Altrenogest (0,044 mg/kg, PO q 24 hod), short-acting progesteron (200 mg, IM q 24 hod) nebo long-acting progesteron (1500 mg, IM q 7 dnech)

Suplementace progesteronem může být ukončena v jakékoli fázi rané březosti, pokud endogenní hodnoty progesteronu jsou dostatečné k udržení březosti ($\geq 4,0$ ng/ml). Vysazuje se většinou po 45 – 70 dnech gravidity, kdy je ultrasonografickým vyšetřením potvrzena přítomnost sekundárních CL a přítomnost plodu v děloze. Případně lze progesteron vysadit po 100 – 120 dnech gestace, kdy již *equinní* placenta produkuje dostatečné množství progestinů k udržení gravidity.

Zajímavost: Klisnám po ovariectomii je vhodné aplikovat progesteron do 120 dne gravidity.

13. DALŠÍ METODY ASISTOVANÉ REPRODUKCE

Přinášíme pouze stručný přehled, pro více informací doporučujeme:

HINRICHS, Katrin a Young-Ho CHOI, 2005. Assisted Reproductive Techniques in the Horse. *Clinical Techniques in Equine Practice*. (4), 210-218. Dostupné z: doi:10.1053/j.ctep.2005.07.002

Embryo může být produkováno *in vitro*, za použití ICSI (intra-cytoplasmatic sperm injection) nebo nukleárním transferem somatických buněk. Konvenční *in vitro fertilizace* (IVF) je u koní hodně problematická, zatím byly hlášeny jen 2 narozená hříbata z *in vivo* maturovaných oocytů ve Francii v roce 1991.

Oocyte transfer

Tradiční embryotransfer u koní dříve zahrnoval chirurgický přenos oocytu a do příjemkyně, která byla inseminována, a její vlastní oocyt byl odstraněn. Celý proces fertilizace, raného embryonálního vývoje a následného vývoje plodu probíhal tedy již v příjemkyni. Tato metoda je využívána především u klisen, u kterých je získání embrya z konvenční laváže dělohy nemožný, nebo v emergentních situacích, kdy je možné po euthanazii získat několik oocytů, které je následně možné přenést do oviduktu příjemkyně.

Intra-cytoplasmatic sperm injection (ICSI)

Intracytoplasmatický přenos spermií je pokročilou metodou asistované reprodukce, která zahrnuje přenos jednoho spermatozoa do cytoplasmy oocytu, který byl získán z ovariálního folikulu a následně maturován *in vitro*. Tato metoda je využívána u starších klisen s reprodukčními abnormalitami, v případě, že máme limitovaný počet spermatozoí nebo v případě oocytů získaných postmortálně u klisen v emergentních situacích.

Použitím této metody eliminujeme nutnost maturace nezralých oocytů, která je u koní neúspěšná. Spermatozoon je přenesen přímo do cytoplasmy oocytu, tím odpadá nutnost vázat se a penetrovat přes *zonu pellucidu* koňského oocytu, což je právě ta část IVF, která je u koní problematická.

Ovum-pick up

Tato metoda zahrnuje transvaginální aspiraci nezralých oocytů pod ultrasonografickou kontrolou.

Gamete intrafallopian transfer (GIFT)

Tato technika zahrnuje transfer oocytu i spermií do oviduktu. Je prováděna metodou tzv. flank laparotomie na stojící klisně. Její potencionální výhodou je, že vyžaduje malé množství méně kvalitních spermií a snižuje riziko následných endometritid. Tato metoda měla úspěch pouze v případě použití chlazených inseminačních dávek a u koní se momentálně nevyužívá.

14. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

CL	<i>corpus luteum</i>
eCG	equinní choriový gonadotropin
EPE	equine pituitary extract, extrakt koňských hypofýz
ET	embryotransfer
FSH	folikulostimulační hormon
GnRH	gonadorelin (gonadotropin releasing hormon)
hCG	humánní choriový gonadotropin
ID	inseminační dávka
IM	intramuskulární podání
PO	perorální podání
PGF ₂ α	prostaglandin F ₂ α

15. DOPORUČENÁ LITERATURA

Knihy:

BLANCHARD, Terry L., Dickson D. VARNER, James SCHUMACHER, Charles C. LOVE, Steven P. BRINSKO a Sherri L. RIGBY, 2003. *Manual of Equine Reproduction*. 2nd Edition. USA: Mosby. ISBN 978-0-323-01713-8.

BRINSKO, Steven P., Terry L. BLANCHARD, Dickson D. VARNER, James SCHUMACHER, Charles C. LOVE, Katrin HINRICHS a David HARTMAN, 2010. *Equine Reproduction*. 3rd Edition. Missouri: Mosby Elsevier. ISBN 978-0-323-06482-8.

DASCANIO, John J. a Patrick M. MCCUE, 2014. *Equine Reproductive Procedures*. UK: Wiley Blackwell. ISBN 978-0-470-96039-4.

DOLEŽEL, Radovan a Eduard KUDLÁČ, 1997. *Veterinární gynekologie*. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita Brno. ISBN 80-85114-04-6.

KNOTTENBELT, Derek C., Michelle LE BLANC, Cheryl LOPATE a Reg R. PASCOE, 2003. *Equine Stud Farm Medicine and Surgery*. London: Elsevier Science. ISBN 07020 2130 X.

KÖNIG, H. E. a H. G. LIEBICH, 2002. *Anatomie domácích savců 2 / Anatomia domácich cicavcov 2*. SK: Hajko a Hajková. ISBN 9788088700579.

LEY, William B., 2004. *Broodmare Reproduction for the Equine Practitioner*. Utah, USA: Teton NewMedia. ISBN 1-591610-11-7.

MCCUE, Patrick M. a Edward L. SQUIRES, 2015. *Equine Embryo Transfer*. Jackson: Teton NewMedia. ISBN 978-1-4987-3476-9.

MCKINNON, Angus O., Edward L. SQUIRES, Wendy E. VAALA a Dickson D. VARNER, 2011. *Equine Reproduction*. Second edition. United Kingdom: Blackwell Publishing. ISBN 978-0-8138-1971-6.

NOAKES, David E., Timothy J. PARKINSON a Gary C. W. ENGLAND, 2014. *Arthur's Veterinary Reproduction and Obstetrics*. 8th Edition. London: Saunders. ISBN 9780702025563.

YOUNGQUIST, Robert S. a Walter R. THRELFALL, 2006. *Current Therapy in Large Animal Theriogenology*. 2nd Edition. Missouri: Saunders Elsevier. ISBN 978-0-7216-9323-1.

Články:

ALLEN, W.R. (Twink) a Sandra WILSHER, 2020. Historical Aspects of Equine Embryo Transfer. *Journal of Equine Veterinary Science*. (89), 1-12. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1016/j.jevs.2020.102987>

HINRICHS, Katrin a Young-Ho CHOI, 2005. Assisted Reproductive Techniques in the Horse. *Clinical Techniques in Equine Practice*. (4), 210-218. Dostupné z: doi:[doi:10.1053/j.ctep.2005.07.002](https://doi.org/10.1053/j.ctep.2005.07.002)

KRAEMER, Duane C., 2013. A History of Equine Embryo Transfer and Related Technologies. *Journal of Equine Veterinary Science*. (33), 305-308. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1016/j.jevs.2013.03.007>

MCCUE, Patrick, 2017. Equine embryo transfer: clinical perspectives. *Clinical Theriogenology: Proceedings of the Society for Theriogenology Annual Conference*. (Volume 9 Number 3), 369 - 375.

MULLER, Josef a Jindrich MULLER, 2016. Report of frozen equine embryo transfer in the Czech Republic. *Journal of Equine Veterinary Science*. (41), 6.

SQUIRES, E. L., P. M. MCCUE a D. VANDERWALL, 1998. The Current Status of Equine Embryo Transfer. *Theriogenology*. USA: Elsevier Science, (51), 91-104.