

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra veterinárních disciplín



**Transvaginální aspirace oocytů u klisen
Bakalářská práce**

Autor práce: Alexandra Berková

Vedoucí práce: Ing. Jiří Šichtař, Ph.D.

© 2016 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci "Transvaginální aspirace oocytů u klisen" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 15. 4. 2016

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala Ing. Jiřímu Šichtařovi Ph.D. za vedení bakalářské práce, poskytování informací a za čas, který mi věnoval.

Transvaginální aspirace oocytů u klisen

Souhrn

V dnešní době se v reprodukci klisen neustále zdokonalují techniky pro získání co nejvíce potomků z výborných zvířat. Specializované metody reprodukce jsou závislé na zisku oocytů od klisen. Tato práce je literární rešerše a shrnuje nejnovější poznatky o metodě transvaginální aspirace oocytů, neboli ovum pick up, což je jedna z možností sběru oocytů. K zisku oocytů je možné použít jatečné vaječníky, tudíž již mrtvé klisny, nebo různými způsoby živé klisny. Zatím nejúčinnější způsob je získání oocytů z jatečných vaječníků, ten se nyní využívá zejména k výzkumným účelům, jelikož poskytuje nejvíce oocytů. Oocyty se z vaječníku odebírají pitvou a rozřezáním tkáně vaječníku, seškrabováním granulózních buněk folikulu a aspirací. Aspirace může probíhat s, anebo bez proplachování folikulu. Snaha chovatelů je samozřejmě využívat živé klisny jako dárkyně oocytů, což umožňuje jejich opakované odebírání. Nejvíce invazivní metoda získávání oocytů je punkcí v boku klisny trokarem a poté aspirace folikulů jehlou, nebo laparoskopicky. Pomocí transvaginálního ultrazvuku se mohou získat od klisen oocyty bez větších poranění, vpich je proveden pouze stěnou pochvy a opakovat je lze už po 10 ti dnech, ideální je však interval 2 – 4 týdny, a to i několikrát za sebou aniž by docházelo k poruchám zdraví, nebo funkce pohlavních orgánů. Oocyty se odebírají v průběhu celého roku, nezávisle reprodukčním obdobím, nebo na fázi estrálního cyklu. Více či méně se vyskytují folikulární vlny u březích klisen a i ty se využívají jako dárkyně oocytů. Klisny se před aspirací nijak hormonálně nepřipravují, bezprostřední příprava klisny před aspirací spočívá v převedení do fixační klece, nebo znehybnění v boxe a aplikace sedativ a epidurální anestezie. Dále se klisně zaváže ocas, vyprázdní konečník a důkladně se omyje perineální oblast. Poté se pochvou vede ultrazvuková sonda s vodičem jehly, vodičem prochází jehla napojená na vývěvu, která zajišťuje podtlak a tím sání folikulu. Aspirací je možné získat oocyty ze dvou typů folikulů, z preovulačních a nezralých. Preovulační folikul se aspiruje 20 – 36 hodin po podání hCG, úspěšnost zisku oocytů z těchto folikulů je až 80 %. V nepřítomnosti preovulačního folikulu se aspirují všechny viditelné folikuly na vaječnicích. Výťažnost malých oocytů je mnohem nižší, ve srovnání s preovulačními folikuly a přesto většina oocytů, které je možné získat od klisny pochází z malých folikulů. Oocyty z malých folikulů se následně musí nechat 24 – 36 hodin maturovat v kultivačním mediu, než je možné je použít k ICSI, nebo transferu oocytů.

Klíčová slova: klisna, reprodukce, ultrasonografie, aspirace, oocyt

Transvaginal aspiration of oocytes in mares

Summary

In this day and age, methods used in mare reproduction are steadily being perfected to enable receiving as many descendants of optimal animals as possible. The specialized methods of reproduction depend on recovering oocytes from the mares. This work is a literature search and it resumes the newest pieces of knowledge about the method of transvaginal oocyte recover, also called “ovum pick up”, which is one of the possible ways of obtaining oocytes.

To receive the oocytes we may use slaughterhouse ovaries, therefore ones of a dead mare, or we may get them from a living one. So far the most efficient one is the slaughterhouse method; it is nowadays used mostly for research purposes, as it provides most oocytes. The oocytes are dissected from the ovary by cutting its tissue, scraping granulosa follicular cells and aspiration. Aspiration can proceed with, or without rinsing the follicle.

The breeders naturally strive to use living mares as oocytes donors, which enables repeated withdrawing. The most invasive way of receiving the oocytes is a trocar puncture through the mare's flank followed by aspiration of follicles either with a syringe or laparoscopically. Thanks to the transvaginal ultrasound the oocytes can be withdrawn without hurting the mare significantly; the puncture pierces only the vulva wall and the procedure can be repeated after only ten days, although the interval of two to four weeks is recommended, so that the mare's health or functioning of its genitals are not endangered.

Oocytes can be withdrawn during the whole year, independently of the reproduction period or phase of the estrous cycle. Follicular waves more or less often appear in pregnant mares, and those are used as oocyte donors.

Mares are in no way being hormonally prepared for the aspiration; none of the attempts to provoke superovulation or to increase the number of follicles on ovaries proved to be successful in providing more oocytes. The proximate preparation of the mare consists of bringing the mare into a fixation cage or its immobilization in a horsebox, applying sedatives and epidural anesthesia. Then its tail is bandaged, the rectum is cleaned out and the perineal area is washed. After this an ultrasound exploring coil with an awl is lead through its vulva; another awl is connected with a vacuum pump, which provides under pressure and sucking of the follicle.

Aspiration provides oocytes from two types of follicles: pre-ovulation and immature. Pre-ovulation follicle is aspired 20 - 36 hours after applying hCG, and obtaining oocytes from these follicles is successful in 80 % of the cases. In the absence of pre-ovulation follicles all the visible follicles on the ovaries are aspired. Recovery rate of the oocytes is much smaller in comparison with pre-ovulation follicles, and yet most of the oocytes that can be received from a mare come from the little follicles. Oocytes from the little follicles need to mature in a cultural medium for 24-26 hours before they can be used to ICSI or oocyte transfer.

Keywords: mare, reproduction, ultrasonography, aspiration, oocyte

Obsah

1	Úvod	8
2	Cíl práce	9
3	Literární rešerše	10
3.1	Anatomie pohlavních orgánů klisny	10
3.1.1	Vaječníky (ovarium)	10
3.1.2	Vejcovody (oviductus).....	11
3.1.3	Děloha (uterus)	11
3.1.4	Děložní krček (cervix)	12
3.1.5	Pochva (vagina).....	12
3.1.6	Poševní předsíň (vestibulum vaginae)	12
3.1.7	Vulva (vulva).....	13
3.2	Neurohumorální řízení	14
3.2.1	Epifýza	14
3.2.2	Hypotalamus	14
3.2.3	Hypofýza	15
3.2.4	Ovariální pohlavní hormony	16
3.2.5	Děloha	17
3.3	Gametogeneze	18
3.3.1	Oogeneze	18
3.3.2	Folikulogeneze	19
3.4	Pohlavní cyklus	20
3.4.1	Zimní anestrus.....	20
3.4.2	Jarní přechodné období	20
3.4.3	Připouštěcí období	21
3.4.4	Podzimní přechodné období.....	21
3.4.5	Estrální cyklus.....	21
3.4.6	Folikulární vlny	22
3.5	Odběr oocytů	25
3.5.1	Sběr oocytů z jatečných vaječnicků	25
3.5.2	Metody odběru oocytů z živých klisen	26
3.5.3	Vybavení a postup OPU	27
3.5.4	Vliv OPU na pohlavní cyklus.....	30
3.5.5	Aspirace preovulačních folikulů	31
3.5.6	Aspirace malých folikulů	32
3.5.7	Opakované aspirace.....	33
3.5.8	Vlivy na získání oocytů	34

3.5.9	Vyhledávání oocytů.....	36
3.6	Zrání a fertilizace oocytů	37
3.6.1	Zrání oocytů	37
3.6.2	Fertilizace oocytů	37
4	Závěr	38
5	Seznam literatury.....	39

1 Úvod

Asistovaná reprodukce prošla jako každá vědecká oblast určitým vývojem. Z historického hlediska se vývoj asistované reprodukce u koní datuje do konce devatenáctého století, kdy sir Walter Heape vytvořil první březost získanou umělým oplodněním (Heape, 1898), další technologie založené na in vivo a in vitro produkci embryí se objevily zvláště až v posledním desetiletí. Pokročilé technologie asistované reprodukce zahrnují řadu postupů, například in vitro produkce embryí (IVP), transfer oocytů a klonování, z nichž všechny mají konečný cíl napomáhat zabřeznutí neplodných klisen, využít sportující klisny během sezony a získat od takových zvířat potomky (Galli et al., 2007).

V různých fázích vývoje oblasti asistované reprodukce koní byly používány odlišné metody, s ohledem na odborné znalosti, poznatky z praxe a v nemalé míře také na dostupném vybavení v dané době. Pokrok v této oblasti byl zpočátku velmi pomalý. Jedním z důvodů byla omezená možnost získávání oocytů z jatečného materiálu pro vyvinutí například kultivačních systémů oocytů. Dalším a poměrně důležitým faktem zodpovědným za rozšíření sofistikovaných metod asistované reprodukce u koní bylo to, že v té době standardně používané metody in vitro fertilizace (IVF) a in vitro kultivace (IVC) používaných u jiných druhů zvířat u koní selhaly. V poslední době se však využití specializovaných metod asistované reprodukce u koní zvyšuje a to primárně z důvodu zvyšujícího se zájmu chovatelské a odborné veřejnosti.

2 Cíl práce

Cílem práce je vypracovat literární rešerši, shrnující nejnovější poznatky o metodě ovum pickup v reprodukci klisen.

3 Literární rešerše

3.1 Anatomie pohlavních orgánů klisny

Samičí pohlavní orgány jsou specializovaným ústrojím, které slouží k uskutečňování nejdůležitějších fází reprodukce a získání potomstva, jako základního předpokladu zachování druhu. Pohlavní orgány samice zajišťují produkci gamet (oocytů), pohlavních hormonů, přijímají samčí pohlavní buňky, umožňují jejich splynutí, zabezpečují vývoj nového jedince a následný porod. Orgány reprodukční soustavy se rozdělují na vnitřní (vaječníky, vejcovody, děloha, pochva) a vnější (poševní předsín, vulva a klitoris) (Kudláč, Elečko, 1977).

3.1.1 Vaječníky (ovarium)

Vaječník je párový pohlavní orgán, produkující pohlavní buňky a hormony. U klisen se nachází v kaudální části břišní dutiny, ventrálně pod čtvrtým a pátým bederním obratlem. Pravý vaječník bývá umístěn kraniálněji. Vaječníky klisny jsou fazolovitého tvaru, s nápadnou proláklínou na konkávním okraji, která se nazývá ovulační jamka, zde ovulují folikuly a vznikají žlutá tělíska. Na konvexním okraji je vstup pro krevní a nervové zásobení, tzv. hilus. Vaječníky jsou volně upevněné vaječnickovým závěsem (mesovarium), k děloze se upevňují širokými děložními vazy a vaječnickovým vazem ke kraniálnímu konci děložního rohu. Ovulační jamka je bez spojení a nepokrývá jí ani pobřišnice (Pilliner et Davies, 2013). Velikost vaječnicků značně kolísá v závislosti na folikulární činnosti a fázi reprodukčního cyklu, přibližná velikost během anestrie je 2-4 cm na délku a 2-3 cm na šířku, avšak během reprodukčního období mohou být 6-8 cm dlouhé a 3-4 cm široké. V tomto období jsou také měkčí. Dřeňová a cévní vrstva se na vaječnicku nachází na povrchu a korová vrstva, která obsahuje folikulární parenchym je uvnitř žlázy, což je abnormalita pouze u klisen, u ostatních hospodářských zvířat se vrstvy nacházejí opačně. Tyto dvě vrstvy se prolínají v přechodné vrstvě dřeňo-korové (Reef, 1998). Celý vaječník, kromě ovulační jamky je obalený v ochranném pouzdru, tunica albuginea (Davies Morel, 2015).

3.1.2 Vejcovody (oviductus)

Vejcovody jsou párové, tenké, trubicovité útvary, zajišťující transport oocyty k děloze a spermií opačným směrem. Pohyb uskutečňují kontrakce svalových vláken a řasinky, kterými je vystlána sliznice vejcovodu. Vejcovod rozdělujeme na 3 části: nálevka, ampule a isthmus. Nálevka je rozšířený konec, nejbližší vaječníku a otevírá se v blízkosti ovulační jamky. Na okraji nálevky se tvoří nepravidelné řasy, fimbrie, některé z nich mohou být připojeny k ovulační jamce (Ley, 2004). Pomocí fimbrií se zachycuje ovulovaný oocyt a pomocí řasinek se dále vede směrem do dělohy (Ginther, 1992). Ampule vejcovodu má značně klikatý průběh, je místem oplození a má schopnost zadržet neoplozený oocyt (Ley, 2004). Koncový úsek isthmus, přechází do děložních rohů ve formě papily (Brinsko et al., 2010). Celková délka vejcovodu se pohybuje v rozmezí 25-30 cm. Šířka se v různých částech liší, nejtenčí je v zúžení (isthmus) 2-5 mm a postupně se rozšiřuje na 5-10 mm ve střední části (ampulla). Stěny vaječníku jsou složeny ze třech vrstev. Vnější vrstva vazivová serózní, střední vrstva myometrium se skládá z podélné a kruhové svaloviny a vnitřní vrstva sliznice s řasinkami (Sisson, 1975).

3.1.3 Děloha (uterus)

Děloha je dutý, převážně svalový orgán, ve tvaru Y, nebo T, uložený v břišní a pánevní dutině. Slouží k uložení, výživě a zajištění vývoje mláďete. Děloha se skládá z těla, dvou děložních rohů a krčku. V porovnání s rohy má děloha klisny velké tělo. Široké vazy (mesometrium) připojují tělo a rohy děložní k břišní a pánevní stěně a probíhají v nich cévy a nervy (Kudláč, Elečko, 1977). Stěna dělohy je tvořena ze 3 částí. Vnější serózní vrstva perimetrium, na níž navazuje mesometrium a pobřišnice. Střední svalová vrstva myometrium má vnitřní část z kruhové svaloviny, střední z cévní vrstvy a vnější z podélné svaloviny, během březosti má schopnost velké roztažitelnosti. Vnitřní sekreční sliznice endometrium je uspořádána v podélné záhyby a odpovídá za vývoj plodu a spojení placenty. V endometriu jsou silně vyvinuté cévy a nervy a mnoho tubulózních žláz (Brinsko et al., 2010). Tělo dělohy je dorsoventrálně zploštělé, 18-20 cm dlouhé a v průměru měří 8-12 cm. Děložní rohy jsou uloženy v břišní dutině, dlouhé 20-25 cm a široké 4-6 cm, ale průměr se směrem k vejcovodům ztenčuje, na 1-2 cm. Velké zakřivení děložních rohů je směrem ventrálně, u nebřezích klisen mají symetrický tvar, užší ve špičce a ztlušávají se směrem ke spojení s tělem dělohy. Bifurkace dvou děložních rohů, je tvořena krátkou přepážkou. Lumen dělohy existuje

jen jako potenciální prostor, velikost závisí na věku, i počtu březostí (Ley, 2004). Podél širokého vazů se nacházejí 3 tepny a žíly na každé straně. Děložní větev vaginální tepny, kaudální děložní tepna (vychází z vnitřní kyčelní tepny), děložní tepna (z vnější kyčelní tepny), děložní větev vaječnickové tepny a odpovídající žíly (Brinsko et al., 2010).

3.1.4 Děložní krček (cervix)

Krček je silnostěnný svěrač, který tvoří kaudální vstup do dělohy. Krček je 6cm dlouhý a 4 cm tlustý, zasahuje 4 cm dlouhým čípkem do pochvy. Krčkem prochází kanálek, který se fyziologicky otevírá pouze v době říje, při porodu a krátkou dobu po porodu. Kraniální otvor kanálku do děložní dutiny se nazývá vnitřní branka a do dutiny poševní zevní branka (Kudláč, Elečko, 1977). Stěny krčku mají stavbu jako děložní stěna s tím, že podélné záhyby sliznice přecházejí v endometrium (Brinsko et al., 2010). Zevnitř je krček krytý epitelem se sekrečními buňkami vylučující hlen, který uzavírá krček tak, že je méně propustný pro bakterie. Na pohmat je značně tuhý, ovšem při estru svalový tonus povoluje (Davies Morel, 2015).

3.1.5 Pochva (vagina)

Pochva je velmi elastický a roztažitelný svalový orgán. Nachází se v pánevní dutině, z velké části v retroperitoneu, mezi krčkem dělohy a poševní předsíní (Brinsko et al., 2010). Pochva slouží pro příjem penisu a také jako ochranná bariéra dělohy. Obsahuje kyselé sekrety, které jsou baktericidní, ale také spermicidní (Davies Morel, 2015). Průměr pochvy se pohybuje přibližně 10-15 cm a délka 18-23 cm. Sliznice uvnitř pochvy tvoří podélné záhyby a je vystlaná vrstevnatým, dlaždicovým epitelem, bez žláz.

3.1.6 Poševní předsíň (vestibulum vaginae)

Poševní předsíň tvoří kaudální pokračování pochvy asi 10-12 cm dlouhé. Kraniálně je od pochvy oddělená záhybem tkáně, jehož součástí je hymen u klisen, které neměly pohlavní styk. Spojuje močovou a pohlavní soustavu, močová trubice ústí dorsoventrálně od tohoto záhybu a je kryta slizniční řasou (Kudláč, Elečko, 1977). Ve sliznici se nacházejí žlázy, které lubrikují zadní části pochvy.

3.1.7 Vulva (vulva)

Vulva otevírá vstup do pohlavního ústrojí a také zabraňuje vniknutí cizích předmětů a vzduchu do pohlavního traktu. Vulva je umístěna ventrálně od rekta, nad sedacím hrbolem pánevní kosti. Skládá se ze dvou stydkých pysků, dlouhých 12-15 cm, ty se stýkají spolu v horní a dolní spojce, mezi sebou svírají štěrbinu stydkou. Horní spojka je ostrá, dolní více zaoblená a obklopuje oblast klitorisu. Stydké pysky jsou pokryté slabou, pigmentovanou kůží s mazovými žlázami, pod pokožkou se nachází svěrač z kosterní svaloviny (Ley, 2004). Klitoris leží v malé prohlubenině (fossa clitoridis), ve ventrální spojce stydkých pysků, je velký zhruba 5 cm a je tvořen erektilní tkání, podobné jako u pyje samců, s četnými nervovými zakončeními (Kudláč, Elečko, 1977).

3.2 Neurohumorální řízení

Reprodukční funkce zabezpečuje neuroendokrinní komplex: hypotalamus, hypofýza a pohlavní žlázy. Mozek jako orgán analýzy a syntézy informací z vnitřních a vnějších vlivů, je předává pomocí impulsů do hypotalamo - hypofyzárního systému. Tam vznikají podněty ovlivňující vlastní pohlavní orgány. Z pohlavních orgánů dostává zpětnou vazbou odpovědi opět centrální nervový systém, takže je v neustálém vzájemném spojení. Zpětná vazba je základem většiny kontrolních mechanismů a poskytuje prostředky k dosažení rovnováhy. Vliv na příslušné buňky je řízen koncentrací hormonů, toho je dosaženo rychlostí jejich tvorby, transportu a vylučování (McKinnon et al., 2011). Zpětné vazby jsou především uskutečňovány ovariálními hormony, které krevní cestou působí povzbudivě, nebo tlumivě na produkci gonadotropních hormonů v hypofýze (Kudláč, Elečko, 1977).

Nadřazeným centrem reprodukce je limbický systém, který je tvořen mozkovou kůrou a podkorovými centry. Limbický systém sbírá informace prostřednictvím smyslových orgánů a současně neustále přijímá informace o vnitřním stavu celého organismu. Dále podněty analyzuje a předává do hypotalamu (Kudláč, Elečko, 1977).

3.2.1 Epifýza

Epifýza produkuje hormon melatonin, který významně ovlivňuje cirkadiální rytmus a sezónnost. Díky receptorům v očích informuje epifýza CNS o fotoperiodě (Samper, 2009). Melatonin se tvoří během scotofáze v noci a při vysoké koncentraci funguje jako inhibitor gonadotropních releasing hormonů. Prodlužování dne má za následek snižování koncentrace melatoninu, tudíž dojde k produkci GnRH z hypotalamu, který dále vyvolá sekreci luteinizačního hormonu a do menší míry i folikulostimulačního hormonu v předním laloku hypofýzy (Davies Morel, 2015).

3.2.2 Hypotalamus

Hypotalamus je část mezimozku, která se nachází ve třetí mozkové komoře, při odstupu stopky hypofýzy. Funguje jako prostředník mezi nervovým a endokrinním systémem. Vyvolává nervové impulsy, které dále předává buď přímo, nebo nepřímo na určené orgány.

V hypotalamu jsou určena dvě sexuální centra, odkud je řízena pohlavní činnost. Přední sexuální centrum zachycuje stimuly z vnějšího prostředí a po zpracování je posílá na zadní sexuální centrum. V zadním sexuálním centru se poté tvoří neurosekrety (releasing hormony). Tyto releasing hormony procházejí krevním řečištěm do hypofýzy a stimulují, nebo inhibují tvorbu a sekreci gonadotropinů. V hypotalamu se tvoří následující hormony: gonadotropní uvolňující hormon (GnRH), tyreotropní uvolňující hormon (TSH-RH), somatotropní uvolňující hormon (STH-RH), adrenokortikotropní uvolňující hormon (ACTH-RH). Neurosekreční buňky dále obsahují prekursory hormonů zadního laloku hypofýzy, oxytocinu a vasopresinu (Kudláč, Elečko, 1977). Releasing hormony jsou aktivovány až na začátku pubertálního procesu. Tvorba GnRH je možná tehdy, když dojde ke snížení koncentrace melatoninu v krvi. Vylučování GnRH probíhá v pulsech, jejich frekvence a intenzita kolísá během fáze cyklu a období roku. Zpětnou vazbou ovariální hormony ovlivňují produkci a sekreci GnRH v hypotalamu (McKinnon et al., 2011).

3.2.3 Hypofýza

Hypofýza je uložena na mozkové bázi, v prohlubenině spodiny lebeční. Hypofýza vykonává příkazy z hypotalamu, kterým je i řízena prostřednictvím releasing hormonů. Ty stimulují tvorbu a sekreci hormonů hypofýzy. Vývojově se rozděluje na adenohypofýzu a neurohypofýzu. Adenohypofýza má dvě části: pars distalis a pars tuberalis. Pars distalis tvoří dominantní podíl adenohypofýzy, skládá se ze dvou typů buněk. Chromofobní buňky jsou bez granul a špatně se barví. Snadno se barvící buňky obsahující granula, se nazývají chromofilní. Ty jsou zodpovědné za tvorbu hormonů. Chromofilní buňky se podle afinity k barvivům dělí dále na bazofilní a acidofilní (Kudláč, Elečko, 1977).

Neurohypofýza je složena ze sítí neuroglií, nacházejí se v ní četná nervová zakončení, cévy a shluky žláznatých buněk, je nervově spojena s hypotalamem. Touto cestou přicházejí hormony oxytocin a vasopresin, které se v neurohypofýze shromažďují a případně uvolňují (Kudláč, Elečko, 1977).

Chromofilní buňky adenohypofýzy produkují hormony: somatotropní, adrenokortikotropní, tyreotropní a gonadotropní. Poslední zmíněné gonadotropní hormony řídí činnost a vývoj pohlavních žláz, jsou to folikuly stimulující hormon (FSH), luteinizační hormon (LH) a luteotropní hormon (LTH). Odpovědí na impulsy gonadotropinů lze na pohlavních žlázách pozorovat morfologické a funkční změny (Kudláč, Elečko, 1977).

Folikuly stimulující hormon působí u samic na růst a vývoj folikulů na vaječnicích, receptory FSH se nachází přímo na granulózních buňkách folikulu. Luteinizační hormon navazuje na účinek FSH, preovulační nárůst LH způsobuje dozrávání a následnou ovulaci folikulu, kdy dojde k vyplavení oocyty. Dále působí na růst luteální tkáně a tvorbu žlutého tělíska. Luteotropní hormon je nutný k vyvolání a udržení laktace (Coumbe, 2012).

3.2.4 Ovariální pohlavní hormony

Estrogeny

Estrogeny existují v několika formách, z nichž nejúčinnější je estradiol - 17 β , avšak u březích klisen je nejdůležitější estron sulfát (Kudláč, Elečko, 1977). Místem tvorby jsou buňky theca interna rostoucích folikulů. Stimulují růst pohlavního ústrojí, vyvolávají psychické příznaky říje a vnímavost vůči hřebci, působí změny na orgánech během pohlavního cyklu, podněcuje růst a vývoj mléčné žlázy, zasahují do látkového metabolismu těla. Produkce estrogenu blokuje tvorbu FSH, na principu negativní zpětné vazby (Brinsko et al., 2010). Vrchol koncentrace estradiolu - 17 β nastává 24 – 48 hodin před ovulací (Davies Morel, 2015).

Progesteron

Progesteron je produkován luteální tkání žlutého tělíska, během březosti je po zániku žlutého tělíska produkován placentou. Tento hormon je nezbytný při přípravě dělohy pro vstup embrya, pro zachování březosti zvýšením aktivity sekrečních žláz v endometriu. Dále zajišťuje vznik mateřského pudu, tonus děložního krčku, větší viskozitu vaginálních sekretů i vývoj mléčné žlázy (Coumbe, 2012). Progesteron má inhibiční efekt na produkci LH. Maximální koncentrace progesteronu nastává 5. – 6. den po ovulaci (Davies Morel, 2015).

Relaxin

Relaxin je hormon, který se vytváří ve žlutém tělísku a placentou. Účinkem relaxinu je příprava porodních cest na porod (Kudláč, Elečko, 1977).

Inhibin

Inhibin produkuje především dominantní folikul, jeho produkce je zvýšena před ovulací. Inhibičně působí na sekreci FSH z adedhypofýzy, avšak sekreci LH neovlivňuje (Squires, 2010).

3.2.5 Děloha

Děloha produkuje dva reprodukční hormony, koňský choriový gonadotropin a prostaglandin $F2\alpha$.

Prostaglandin $F2\alpha$ je produkovaný endometriem dělohy a funguje jako luteolytikum. Produkce prostaglandinu $F2\alpha$ vede k zániku žlutého tělíska a tím dochází k poklesu koncentrace progesteronu a ruší se inhibiční efekt na LH (Higgins et Snyder, 2013). Snížená efektivnost transportu $PGF\ 2\alpha$ z odvodných děložních žil do vaječnickové tepny, je z důvodu vaječnickové tepny, která není tak blízce spojena s vaječnickovou žílou (Brinsko et al, 2010).

Koňský choriový gonadotropin (eCG, nebo PMSG) je tvořený od 35. do 100-140. dne gravidity v pohárcích endometria. Ty se formují invazí trofoblastu do endometria. eCG způsobuje tvorbu a udržení druhého žlutého tělíska, účinek je obdobný oběma gonadotropinům FSH a LH, spíše však s převahou FSH (Higgins et Snyder, 2013).

3.3 Gametogeneze

Základní vlastností živého organismu je schopnost rozmnožovat se. Pro pohlavní rozmnožování, charakteristické u vyšších živočichů, je nezbytné tvoření samčích a samičích gamet. Oogeneze označuje proces tvorby zralých a oplození schopných samičích gamet, oocytů (Kudláč, Elečko, 1977). Tento proces zahrnuje sérii morfogenetických změn, které probíhají v ovariálních folikulech. Aby byly gamety schopné oplození, musí obsahovat na rozdíl od somatických buněk pouze polovinu chromozomů, tedy jeden chromozóm z každého páru. V případě klisny má gameta 32 chromozomů (Hyttel et al., 2010).

3.3.1 Oogeneze

Během embryonálního vývoje ve fázi gastrulace, zůstává určitá skupina buněk pluripotentní. Tyto buňky se nazývají primordiální buňky. Následně během vývoje migrují do ještě nediferencovaných gonád a po celou dobu se mitoticky dělí. Po diferenciaci pohlavní žlázy z nich vznikají v případě samice oogonie. Dále se oogonie mnohonásobně mitoticky dělí, tudíž dochází ke zvýšení jejich počtu. Oogonie se dělí pouze do narození jedince a poté již nevznikají nové oocyty (Hyttel et al., 2010). Z poslední generace oogonií se vyvíjí primární oocyty. Oogonie které se diferencují na primární oocyty, vstupují do profáze meiózy I až do fáze diplotene, ve které jsou zastaveny (Hyttel et al., 2010). Sekrecí glykoproteinů a následnou kondenzací dochází k tvorbě vaječné blány (zona pellucida), mezi žloutkovou membránou oocytu a folikulárními buňkami (McGeady et al., 2013). Primární oocyty již podléhají meióze, ta začíná během intrauterinního vývoje, ale ustává až do puberty ve fázi diplotene a je obnovena krátce před ovulací, kdy reaguje na vzestup LH (Ley, 2004). Při prvním zracím dělení se primární oocyt rozdělí na dvě nestejně velké diploidní buňky. Do větší buňky přechází většina cytoplazmy a vytvoří se sekundární oocyt, menší buňka téměř bez organel se nazývá první pólové tělísko a zůstává přichycena vláknem ke žloutku sekundárního oocytu (Kudláč, Elečko, 1977). Velikost sekundárního oocytu bez zony pellucidy činí 125 μm v průměru a dále v něm probíhají změny vedoucí ke smršťování cytoplazmy a vzniku perivitelinního prostoru (Ley, 2004). Druhé zrací dělení probíhá až po ovulaci. Sekundární oocyt se opět rozdělí na dvě buňky, přičemž jedna je výrazně větší. Buňka s velkým množstvím cytoplazmy je zralé vajíčko, které je také největší buňkou v těle a druhá, menší buňka je druhé pólové tělísko. Během telofáze meiózy II se chromozomy rozdělí a každá buňka získá jednu chromatidu. Jádro vajíčka má již haploidní počet chromozomů.

Obě pólová tělíska zanikají a jejich funkce zatím nebyla zjištěna. Zralé vajíčko má kulovitý tvar o průměru 130-190 μ m (Hyttel et al., 2010).

3.3.2 Folikulogeneze

Souběžně s oogenezí probíhá folikulogeneze. Primordiální folikul vzniká obklopením primordiálních pohlavních buněk folikulárními buňkami. Z primordiálních buněk se dále vyvíjejí shluky oogonií. Některé oogonie se diferencují na primární oocyty a vstupují do profáze meiózy I až do fáze diplotene, ve které jsou zastaveny (Hyttel et al., 2010). Primordiální folikuly tvoří zásobu klidových folikulů, ze kterých se budou vybírat ty, kteří budou dále růst a ovulovat. Klisna jich má na počátku života kolem 40 000. Primordiální folikuly pokryté vrstvou plochých folikulárních buněk formují primární folikul (Ley, 2004). V závislosti na hladině gonadotropinů, folikulární růst pokračuje u těch folikulů, které jsou vybrány z primordiální zásoby. Většina folikulů, které vstupují do dalšího růstu, svůj vývoj nedokončí, degenerují prostřednictvím procesu atrezie a pouze menšina dokončí svůj růst až do jejich ovulace (Hyttel et al., 2010). Primární folikul je tvořen primárním oocytem a jednou vrstvou folikulárních buněk. Formují se již během intrauterinního vývoje, v té době slouží jako zdroj estrogenů pro vývoj pohlavního aparátu, ovšem nedochází k jejich dozrání, ale k degradaci (Kudláč, Elečko, 1977). Sekundární folikul vzniká množением folikulárních buněk, které se paprskovitě řadí kolem oocytu a vytváří několikvrstevný obal corona radiata. Stromální buňky obklopující folikulární buňky se diferencují do vnitřní theca interna a vnější theca externa. Theca interna je vrstva buněk produkující steroidy a společně s folikulárními buňkami syntetizují estrogenu. Theca externa je koncentrická vrstva buněk s podpůrnou funkcí. Během dalšího růstu se objeví uvnitř folikulu prostory, až se vytvoří jednotná dutina vyplněná folikulární tekutinou a vznikne terciární, neboli antrální folikul (Hyttel et al., 2010). Folikulární buňky mění svůj tvar na kvádrové a označují se jako granulózní (McGeady et al., 2013). S tím, jak se dutina zvětšuje, se oocyt přesouvá na výčnělek granulózních buněk cumulus oophorus. Antrální folikul tvoří zevně theca folliculi externa a vnitřní theca folliculi interna. Pod nimi se nachází několikvrstevná membrana granulosa, ze které vychází cumulus oophorus. Oocyt obklopuje průsvitný obal zona pellucida a paprskovitě uspořádané granulózní buňky corona radiata (Kudláč, Elečko, 1977). Pokud je vybrán, dominantní antrální folikul pokračuje v růstu a měří přes 30 mm. Finální zrání folikulu a oocytu stimuluje preovulační vlna LH. Stěna folikulu se připravuje na prasknutí, ustává sekrece estrogenu a začíná produkce progesteronu. V Graafově folikulu probíhá první zrací dělení primárního oocytu. Následně se sekundární oocyt spolu s pólovým tělískem a vrstvou granulózních buněk

oddělí od cumulus oophorus a uvolní se do folikulární tekutiny (Hyttel et al., 2010). Po ovulaci se vyplaví do vejcovodu jako cumulus-oocyt komplex o průměrné velikosti 250 µm (Ley, 2004).

3.4 Pohlavní cyklus

Klisna je sezónně polyestrické zvíře. Pohlavní cyklus je primárně řízen délkou světelného dne, ale roli hraje také například výživa, tělesná kondice, okolní teplota, nebo přítomnost hřebce. Během roku se u klisen střídá zimní anestrus, jarní a podzimní přechodné období a období sexuální aktivity, které je patrné v jarních a letních měsících. Během připouštěcího období se opakují říjové cykly. Tato sezónnost vede v přírodě k ohřebení na jaře, kdy jsou přírodní podmínky příznivé pro přežití hříběte. Ovšem malé procento klisen mají pravidelné cykly během celého roku, týká se to hlavně populace klisen v blízkosti rovníku (Davies Morel, 2015). U samic začíná estrální cyklus v pubertě, u klisen to bývá ve 12-24 měsících života. Puberta je definována jako první ovulace v životě samice (Samper, 2009).

3.4.1 Zimní anestrus

Během zimního anestru je klisna v klidové fázi reprodukčního cyklu, kdy nevykazuje příznaky říje. Krátký světelný den zvyšuje tvorbu melatoninu, inhibičního hormonu GnRH. Hypotalamo-hypofyzárně-ovariální osa je takřka neaktivní. Nepřítomnost GnRH vede k zastavení produkce FSH a tím nastává útlum folikulogeneze na vaječnicích. Nastává pokles hodnot gonadotropních a ovariálních hormonů. Vaječníky jsou malé, folikuly dosahují velikosti do 15 mm (Brinsko et al., 2010).

3.4.2 Jarní přechodné období

Prodlužující se den má za následek snižování produkce melatoninu, to vede ke zvyšování koncentrace GnRH, a tudíž i sekreci FSH a LH. Gonadotropiny obnovují na vaječnicích růst folikulů, v anovulačních hlavních a vedlejších vlnách. Estrální cykly bývají nepravidelné, nebo velmi dlouhé. Říjové chování není tolik výrazné a jde obtížně rozpoznat (Samper, 2009). Během tohoto období nejsou hladiny FSH a estrogenů dostatečně vysoké pro spuštění LH. Tudíž folikuly neovulují, pouze atretizují a dosahují velikosti do 35 mm. Žluté tělísko není nikdy přítomné. S postupem jarního období se pohlavní cyklus dále stabilizuje, příznaky říje se zvýrazňují a dochází k ovulacím. Jarní přechodné období je ukončeno ovulací a vznikem žlutého tělíska (Ley, 2004).

3.4.3 Připouštěcí období

Připouštěcí období je u nebřezích klisen charakteristické pravidelnými reprodukčními cykly a ovulací dominantního folikulu. Na severní polokouli, se u klisny objevuje okolo března až dubna první ovulace a následně se většinou vyskytují ovulace pravidelně až do časného podzimu (Munroe et Weese, 2011).

3.4.4 Podzimní přechodné období

Zkrácení délky světelného dne způsobuje snížení sekrece GnRH, gonadotropinů, steroidních ovariálních hormonů a následně postupný pokles růstu folikulů, bez jejich ovulace. Podzimní přechodné období začíná poslední ovulací a vznikem žlutého tělíska a na severní polokouli končí v půlce prosince (Samper, 2009).

3.4.5 Estrální cyklus

Estrální cyklus se dělí do dvou fází estrus a diestrus, což odpovídá folikulární a luteální fázi. Běžná délka estrálního cyklu činí 21 dní, rozmezí se udává 18-24 dní. Začíná v den ovulace (den 0) a končí den před následující ovulací (Ley, 2004). Variace v délce cyklu probíhají ve většině případů jen během folikulární fáze. Obecně se dá říci, že na jaře bývá perioda delší a na podzim kratší (Davies Morel, 2015).

3.4.5.1 Estrus

Délka estrální fáze je velmi proměnlivá, udává se 5-9 dní. V pohlavním traktu se během cyklu odehrává řada změn, nastává příprava pro transport spermií do vejcovodu, ovulaci a oplození. Od 14. - 16. dne cyklu se začíná uvolňovat FSH, tím dochází ke stimulaci ovarií k růstu a dozrávání terciárních folikulů. Rostoucí folikuly produkují stále větší množství estrogenů, ten má zásadní vliv na zvýšený přívod krve k pohlavním orgánům, jejich zduření, proliferaci na sliznici vývodných pohlavních cest a specifické chování. S přicházející ovulací a tím i zvyšování koncentrace estrogenu je říjové chování intenzivnější, nejsilnější lze pozorovat při vrcholu koncentrace estrogenu 1-2 dny před ovulací (Brinsko et al., 2010). Klisna je vnímavá vůči hřebci, ochotná k páření, neklidná až podrážděná. Poté koncentrace FSH a estradiolu klesá a ubývá intenzita říjového projevu samice. Během estru je minimální tonus dělohy a děložního krčku, děložní krček se navíc otevírá a probíhá sekrece cervikálního hlenu. Klisna často močí a pulsně ukazuje klitoris, tzv. blýská (Kudláč, Elečko, 1977). Zvýšená hladina estrogenů z dozrávajícího folikulu přeruší zpětnou vazbou produkci FSH a začne produkce LH, který indukuje ovulaci. Ovulace je proces, který vede k prasknutí Graafova folikulu.

Velikost tohoto folikulu dosahuje 30-70mm, často 40-45 mm. K ovulaci dochází 24-36 hodin před koncem estru (Ley, 2004).

3.4.5.2 Diestrus

Diestrus trvá 14-16 dní, na rozdíl od estru je tato fáze často stálá. Po přerušení sekrece estrogeneru a vzestupu koncentrace progesteronu začínou probíhat změny na pohlavním ústrojí, mění se chování klisny, do 24 hodin by měly odeznít příznaky říje. Klisna vykazuje negativní odpověď na přítomnost samce, kope (Samper, 2009). Na vaječníku je dominantním útvarem žluté tělísko, které se tvoří ihned po ovulaci z buněk granulózy prasklého folikulu. Žluté tělísko vylučuje progesteron, jeho hlavní funkcí je příprava dělohy pro příjem oplozeného vajíčka a udržování březosti. Největší koncentrace progesteronu je dosažena 6 dní po ovulaci. Zvyšuje se tonus dělohy a děložního krčku, vaginální sliznice je bledá a suchá. Vysoká koncentrace progesteronu způsobuje inhibici produkce LH. Uvolňování FSH má za následek novou vlnu vývoje folikulů. Pokud nedošlo k oplození vajíčka, životnost žlutého tělíska je závislá na sekreci prostaglandinu F2 α z endometria, který vyvolává jeho regresi (luteolýza) během 13-16 dnů po ovulaci. Fáze diestru končí regresí žlutého tělíska. V případě, že došlo k oplození vajíčka, tvoří se březostní žluté tělísko, které přetrvává až 85 dní a pokračuje produkce progesteronu (Brinsko et al., 2010). Po regresí žlutého tělíska pokles ovariálních steroidních hormonů umožní návrat pomalé frekvence GnRH pulsů potřebných pro sekreci FSH, restartuje pohlavní cyklus a nábor dalších folikulů (McKinnon et al., 2011).

3.4.6 Folikulární vlny

Během estrálního cyklu, přechodného období a březosti probíhá vývoj folikulů ve vlnách. Tyto vlny jsou definovány jako synchronní vývoj kohorty folikulů a mohou se rozdělit na hlavní ovulační a hlavní a vedlejší anovulační. Tyto typy vln na začátku vykazují společnou růstovou fázi antrálních folikulů avšak liší se ve velikosti folikulů. Hlavní vlna se vyznačuje společným růstem několika folikulů (zpravidla 5 až 6) a poté disociací jednoho, příležitostně dvou vybraných folikulů, označované jako dominantní. Princip selekce upřednostněného budoucího dominantního folikulu není znám. Mechanismus zapojený do selekce zapříčiní zvýšení LH receptorů v theca interna a vybraný folikul brzy začne produkovat estrogeny, ostatní folikuly přesáhne až 50 - ti násobně více (Bergfelt et Ginther, 1993). Na konci společné růstové fáze pokračuje dominantní folikul v růstu a vývoji, zatímco podřízené folikuly podléhají regresí. K tomu dochází, když dominantní folikul dosáhne průměru 22,5 mm. Pokud dominantní folikul podléhá regresí, probíhá anovulační vlna. Pokud ovuluje,

probíhá vlna ovulační. Ovulace dominantního folikulu nastává při průměru nad 40 mm, velikost je relativní a závisí na plemeni, individualitě klisny, počtu preovulačních folikulů, nebo ročním období. Výrazně vyšší folikulární aktivita je v průběhu první poloviny ovulačního období (květen až červenec). Počet i velikost folikulů je větší než od srpna do října (Ginther, 1992). Dominantní folikul v hlavních anovulačních vlnách zpravidla nedosáhne průměru srovnatelného s maximálním průměrem folikulu během ovulačních vln. Pokud nenastává výběr dominantního folikulu, probíhá vlna vedlejší. V zájmu zachování kontinuity, trvale rostou na vaječnicích malé antrální folikuly, nezávisle na koncentracích hormonů a reprodukčním cyklu. Není jasné, zda tyto folikuly rostou a ustupují individuálně, nezávisle na sobě, nebo synchronně ve skupině folikulů (Bergfelt et Ginther, 1993).

Na rozdíl od ostatních domácích druhů zvířat se u klisen v průběhu cyklu může objevit jedna, ale i dvě hlavní folikulární vlny. Klisny se dvěma hlavními vlnami mívají zpravidla delší interovulační interval, a to zhruba 22 dní, než ty, které mají pouze jednu hlavní vlnu (18 dní). Vývoj hlavní ovulační folikulární vlny během luteální fáze je jedinečné pouze pro koňovité, neprobíhají ovšem u všech klisen ve stejném rozsahu. Výskyt počtu ovulačních vln je dán i geneticky plemennou příslušností. Klisny plemene quarter horse a pony mají obvykle jednu hlavní vlnu, dvě hlavní vlny jsou typické pro plnokrevníky a související sportovní plemena (Ginther, 2000).

Během raného diestru se u některých klisen objevuje hlavní folikulární vlna, ta se nazývá hlavní sekundární vlna. Dominantní folikul této rané vlny bývá anovulační, ale přesto může dojít při zvýšené koncentraci progesteronu k ovulaci. Pokud dojde při sekundární vlně k ovulaci dominantního folikulu, hovoříme o sekundární ovulaci. Hlavní primární vlna se vyskytuje při všech normálních estrálních cyklech. Začíná uprostřed diestru a dává vzniku ovulaci spojenou s říjí, tzv. primární ovulaci (Ginther, 1992).

Začátkem diestru je viditelná zvýšená folikulární aktivita bez vzniku velkých folikulů, největší počet folikulů o velikosti 2 - 5 mm je dosaženo 5. den po ovulaci. Od 10. dne po ovulaci začíná progresivní zvyšování počtu folikulů a růst jejich průměru. Během 7 dnů před ovulací, průměr největšího folikulu nadále roste tempem 3,5 mm/den a stává se ovulačním folikulem. Růst dominantního folikulu hraje roli v regresi podřízených folikulů a zabraňuje nástupu nové vlny (Aurich, 2011). Tento fakt potvrzuje studie vaječníků odebraných v různých dnech cyklu, kdy 14. den po ovulaci začíná vývoj hlavní vlny a 17. den nastává výběr dominantního folikulu, což koresponduje s následným oddělením dominantního folikulu od podřízených a tudíž zmenšování atretických folikulů viditelných v 21. den (Ginther, 1992).

Vznik folikulárních vln během estrálního cyklu je v časové souvislosti s nárůstem koncentrace FSH. K významnému zvýšení koncentrací FSH dochází 6 dnů před primární vlnou, nebo 4 dny před vznikem sekundární vlny. Maximální koncentrace FSH dosahuje, když největší folikul dosáhne velikosti asi 13 mm v průměru (Gastal et al., 1997). Následně FSH klesá na koncentraci, která nepodporuje výrazný další růst podřízených folikulů, ale je dostačující pro pokračování růstu dominantního folikulu. Současně po selekci dominantního folikulu stoupá koncentrace inhibinu, estradiolu a LH. Po deviaci dominantního folikulu je LH nutný pro jeho další růst (Ginther, 2000).

V průběhu roku se mění charakter vývoje folikulů, a tudíž se mění i skladba vznikajících folikulárních vln. Zatímco v období pohlavní aktivity se pravidelně opakují hlavní primární, případně sekundární vlny, s postupem času se intenzita hlavních vln snižuje. Během podzimního přechodného období dochází do 60 dnů po poslední ovulaci v roce ke snížení hlavních anovulačních vln a naopak k růstu vedlejších vln. To je způsobené snižováním koncentrace LH, ta již není dostatečná na výběr folikulu a dominanci hlavních vln. Později se objevují pouze vedlejší vlny, které přecházejí v zimní anestrus. Během anovulačního období jsou přítomny pouze malé folikuly ve vedlejších vlnách, největší folikul mívá v průměru asi 10 - 15mm. S prodlužujícím se dnem, se zvyšuje produkce GnRH a úměrně se zvyšují i koncentrace cirkulujících pohlavních hormonů. Začátek jarního přechodného období se vyznačuje vývojem 1 - 3 vedlejších a hlavních anovulačních folikulárních vln, než dojde k ovulaci. Nejdůležitějším faktorem pro zahájení ovulační aktivity je opakovaný výrazný nárůst LH (Donadeau a Ginther, 2002).

3.5 Odběr oocytů

Klisna je přirozenou cestou schopna porodit za jeden rok jedno hříbě, novými postupy v oblasti biotechnologií lze toto číslo zvýšit až několikanásobně a efektivněji tak využít biologického potenciálu dané klisny. Prvním krokem při produkci in vitro embryí je získat oocyty z vaječnicků klisen. Problematika této části spočívá v počtu získaných oocytů a v jejich dalším vývoji. Jedině plně zralé oocyty dále mohou podstoupit oplození pomocí ICSI, případně neoplozené vložit chirurgicky do vejcovodu klisny – příjemně.

3.5.1 Sběr oocytů z jatečných vaječnicků

Jedna z prvních metod vedoucí k získání oocytů je metoda, kdy se oocyty shromažďují post mortem z odstraněných vaječnicků. Tyto vaječnický musí být z klisny vyjmuty co nejdříve po porážce a pokud jsou použity do dvou hodin, měly by být během přepravy do laboratoře drženy při teplotě 37°C, při delší době transportu se uchovávají v pokojové teplotě (McKinnon et al., 2011). Schopnost produkovat embrya a životaschopné březosti ze získaných oocytů se s časem snižuje a dané vaječnický by měly být zpracovány přibližně do 6 hodin od smrti dárkyně (Ribeiro et al., 2008). Pro odebrání oocytů existuje několik způsobů: aspirace folikulu s, nebo bez jeho vyplachování, pitva folikulu se seškrabováním granulózních buněk a krájení vaječnicků (Landim-Alvarenga et al., 2008). Z důvodu většího počtu získaných oocytů, avšak nutnosti usmrtit klisnu mají tyto způsoby uplatnění hlavně pro výzkumné účely, než pro běžné použití. Pro odebrání oocytů se využívají folikuly všech velikostí, u získaných oocytů může být velká variabilita ve stádiu jejich vývoje, nebo atrezie (Carnevale et Sessions, 2012). Při aspiraci je opakovaně nasáván folikul za pomoci jehly a injekční stříkačky. Získaný oocyt je přitom zbaven většiny kumulárních buněk. Z důvodu těsného spojení oocytu se stěnou folikulu není aspirace folikulu příliš efektivní. Aspiraci se může získat až 2,7 oocytu z každého vaječnicku (Hinrichs, 1991), na rozdíl od následujícího postupu při kterém je možné získat až 4,1 oocytu z jednoho vaječnicku (Choi et al., 1993).

Oocyt lze odebrat otevřením folikulu a seškrábnutím vrstvy granulózních buněk. Folikuly se nachází na povrchu vaječnicku, nejprve se pomocí skalpelu rozřízne folikul. Folikulární tekutina se nechá odtéct, protože je nepravděpodobné, že by obsahovala oocyt, pokud nejsou oocyty pevně spojené s folikulem, jsou pravděpodobně degenerované (McKinnon et al., 2011). Stěna folikulu se kostní kyretou seškrábe a proudem média z injekční stříkačky se

nahromaděná tkáň vypláchne do Petriho misky (Hinrichs et DiGiorgio, 1991). Kumulo – oocytární komplexy se oddělí rozsáhlým oplachováním od granulózních buněk. Po otevření všech viditelných folikulů, se vaječníky řežou na plátky silné asi 3 mm, tím se otevřou i folikuly v parenchymu a opět se seškrábne vrstva granulózních buněk ze stěn folikulů. Oocyty se nachází v získaných buňkách, kde se vyhledávají pomocí mikroskopu při 10 – 40x zvětšení a klasifikují se buď jako kompaktní, nebo expandované podle charakteru granulózy. Tento způsob je časově i pracovně náročný, avšak počet získaných oocytů může být až o polovinu větší než při aspiraci (Hinrichs, 2010a).

3.5.2 Metody odběru oocytů z živých klisen

S vývojem veterinární techniky koncem minulého století, se naskytl možnost používat jako dárkyně oocytů živé klisny. Aspirací mohou být oocyty získány z preovulačního dominantního folikulu po stimulaci gonadotropinem, nebo ze všech nezralých folikulů přítomných na vaječníku v kterékoli fázi pohlavního cyklu. Nejdříve se různé postupy sběru oocytů aplikovaly na preovulačním folikulu, jako například laparoskopii v celkové anestezii, či aspirací dlouhou jehlou vedenou skrz bok klisny, v místě hladové jámy. Později se začaly pro sběr oocytů využívat i malé nezralé folikuly.

3.5.2.1 Sběr oocytů vedený přes bok klisny

Metoda, kdy jsou získávány oocyty punkcí v boku je spíše užitečná u klisen s infekčním vaginálním výtokem, nebo abnormální perineální konformací. Provedení nevyžaduje vybavenost speciálním vybavením, v místě vpichu je klisna znečistlivěná lokálním anestetikem. V přibližné poloze vaječníku je umístěn trokar s vnější kanylou, konečníkem je jednou rukou polohován vaječník na optimální místo tak, aby vrchol folikulu směřoval proti kanyle, zatímco další manipuluje jehlou, aby propíchl folikul (McKinnon et al., 2011). Podobný postup uvádí (Hinrichs, 1991) s úspěšností 73%, ta navíc provedla řez v pochvě, který operátorovi umožňuje zavést ruku do peritoneální dutiny a držet vaječník přímo proti kanyle. I přes to že je tato metoda spojena se sníženou pracností a tedy dobou práce, tyto přístupy jsou více invazivní a jejich účinnost je omezená. Nejpraktičtější, méně invazivní, efektivní, a opakovatelná dnes používaná technika, je ultrazvukově naváděná transvaginální aspirace folikulů, taktéž známá jako Ovum Pick – Up (Galli et al., 2013).

3.5.2.2 Sběr oocytů metodou Ovum Pick Up

Ovum Pick Up (OPU) je metoda, při které se oocyty odebírají přímo z vaječnicků klisny - dárkyně s použitím transvaginálního ultrazvuku. Ultrazvukem řízená aspirace byla původně vyvinutá v humánní medicíně v souvislosti s in vitro fertilizací (Dellenbach a kol., 1984, Feichtinger a Kemeter, 1986), následně byla tato technika zdokonalována tak, aby ji bylo možné na konci 80. let minulého století aplikovat u skotu (Pieterse et al., 1988) a počátkem 90. let k reprodukci u koní. (Brück et al., 1992). OPU je oproti předchozím postupům méně účinná, mimo to je složité porovnávat výsledky mezi různými pracovníky (14 – 79%), protože závisí na mnoha faktorech. Na úspěšnosti samotných aspirací má vliv technologie, kvalita použitého materiálu, vyplachování folikulu, seškrab folikulární stěny a významně na zkušenosti techniků (Landim-Alvarenga et al., 2008).

Oocyty jsou získány jako kumulo oocytární komplexy a měří často přes 1 mm v průměru. Buňky kumulu jsou pevně spjaté se stěnou folikulu a jsou velmi blízko u sebe. S tím, jak folikul roste, kumulus expanduje a přichycení ke stěně folikulu je slabší a slabší. Volné spojení kumulu a folikulu zjednodušuje jeho aspiraci, avšak je obtížnější vytvořit turbulence uvnitř folikulu k vytlačení oocytu. Při zvětšujícím se průměru nezralých folikulů, je prokázáno, že se snižuje zisk oocytů, a to nezávisle na fázi estrálního cyklu. Z těchto důvodů, má tendenci mít největší výtěžnost aspirace nezralých folikulů v jejich těsně spojeném kumulo oocytárním komplexu (Kanitz et al., 2003).

3.5.3 Vybavení a postup OPU

Vzhledem k tomu, že jsou oocyty citlivé na teplotní změny více než embrya, je třeba zamezit jakékoli náhlé změně teploty. Je důležité, aby všechny nástroje a zařízení měly tělesnou teplotu a při nižších venkovních teplotách je nutné zajistit vhodné prostředí pro manipulaci s oocyty, ideálně 37°C.

Pochopitelně veškeré nástroje, které přijdou do kontaktu s pohlavním ústrojím klisny, nebo s oocyty musí být sterilní, aby se zabránilo případným nežádoucím komplikacím (McKinnon et al., 2011).

Pro vykonávání OPU je zapotřebí ultrazvukový přístroj, ultrazvuková sonda, kryt sondy s pouzdrém, kterým je vedena jehla, vakuová pumpa, nebo stříkačka. Volba sondy spolu s pouzdrém závisí na dárcovské klisně, sondy uložené v pouzdře by mohly být příliš velké pro pochvy mladých zvířat (Galli et al., 2001).

Během aspirace folikulů je průběh zobrazen ultrazvukem, literatura uvádí množství různých přístrojů, avšak je doporučeno použít ultrazvuk přenosný. Transvaginální sonda může být lineární, zakřivená, nebo sektorová o frekvenci 5 – 7 MHz. V podstatě jsou používány endovaginální sondy původně určené pro ženy, které jsou modifikovány pro použití u klisen. Sonda je vybavena vodičem jehly, což je ocelová, nebo plastová trubka dlouhá zhruba 50 cm (Galli et al., 2001). Touto trubicí prochází jehla velikosti 12 – 18 G, výběr velikosti jehly závisí na typu aspirovaných folikulů, při estru se na dominantní folikul volí jehla s větším průměrem a během diestru, při aspiraci více než jednoho folikulu se používá jehla s menším průměrem. Není to jen proto, že tyto folikuly mají menší průměr, ale také na provedení většího počtu vpichů a při použití silnější jehly je frekventovanější krvácení z vaginální stěny (Mari et al., 2005). Použitá jehla může být jednoduchá, nebo dvouplášťová, z pokusu Goudet et al. (1997) vyplývá nejvyšší výtěžnost z preovulačních folikulů při vyplachování s dvouplášťovou jehlou (84 %), oproti použití jednoduché jehly (52 %). Systém s jednoduchou jehlou poskytne pouze omezený proplach kompletním plněním a vyprázdněním (Goudet et al., 1997), zatímco dvouplášťová jehla má tu výhodu, že umožňuje současné vyplachování a nasávání uvnitř folikulu, turbulence vytvořené kontinuálním tokem do folikulu pomáhá s odchlípením oocyty z folikulu, jelikož je pevně přisedlý k jeho stěně (Cook et al., 1992). Jehla i s jejím vodičem je po každé dárkyni vyměněna z hygienického hlediska a kontroly kvality, výměnou se zabrání kontaminace mezi dárkyněmi a proto poskytuje vyšší bezpečnost. K jehle je napojena vývěva vyvolávající průtok 20 – 25 ml/min a podtlak přibližně 115 mm Hg, s těmito hodnotami je docíleno maximální výtěžnosti při co nejmenším poškození COC. Vyšší tlak zvyšuje celkový počet získaných oocytů, ale zvyšuje také procento poškozených oocytů. Hodnoty průtoků jsou pouze orientační, protože velký rozdíl může udělat rozchod jehly a délka napojeného zařízení (Galli et al., 2014). Velikost podtlaku při aspiraci folikulů nehraje zásadní roli, při použitém tlaku 150 a 300 mm Hg se neobjevil rozdíl v zisku oocytů, 28,8 % vs. 26,6 % (Kanitz et al., 2003). Nasávání je možné také manuálním tlakem s 50 ml plastovou stříkačkou (Hinrichs, 2010a), ve srovnání s použitím vývěvy je zaznamenána výrazně vyšší výtěžnost oocytů (Vogelsang et al., 1988). Získaná folikulární tekutina prochází přes standardní filtr na embrya (Brück et al., 1997). V závislosti na počtu aspirovaných oocytů trvá OPU přibližně 15 -60 minut. Hlavním omezením této techniky jsou náklady a údržba všech zařízení, jakož i školení kvalifikovaného technika.

Příprava klisny před aspirací v zásadě nevyžaduje žádnou hormonální stimulaci. Před zahájením aspirace se klisna zavede do fixační klece, nebo se znehybní v boxu a je nutné

minimalizovat její pohyb a rektální kontrakce, proto se aplikují sedativa a epidurální anestezie. Dále je klisně zavázán ocas, vyprázdněn konečník a důkladně očištěna a vydesinfikována perineální oblast. Na vnější povrch pláště pokrývající sondu je nanesen sterilní gel, kvůli zlepšení kontaktu s poševní stěnou. Bez toho, aniž by se do pochvy dostal vzduch, se sonda zavede do pochvy laterálně od děložního čípku a ipsilaterálně k folikulu, zatím co je vaječník manipulovaný per rectum, tak aby byl vrchol folikulu umístěn vedle jehly (McKinnon et al, 2011). Folikuly jsou zobrazeny jako černé (hypoechoenní) kruhové útvary na obrazovce ultrazvuku a zaznamená se jejich velikost. V pochvě se vodičem jehly protáhne jehla, sání se zajistí jejím napojením na vývěvu, nebo pouze na stříkačku (McKinnon et al., 2011). Když se ultrasonografický obraz folikulu zarovná s punkční linií na monitoru, aspirační jehla postupuje přes vaginální stěnu do folikulární dutiny. Obsah folikulu se odsaje a následně se folikulární dutina 6 – 10 krát propláchne médiem. Oocyty se většinou nachází ve vyplachovacím mediu, než ve folikulární tekutině (Cook et al., 1992). Je dokázáno, že při vyplachování folikulu médiem je významně vyšší zisk oocytů (až 4 krát), než při pouhém odsátí folikulární tekutiny (Mari et al., 2005). Technik folikul masíruje proti jehle, za účelem odstranění většiny buněk folikulární stěny. Proplachování se sleduje ultrazvukem a folikulární dutina se znovu naplňuje médiem na přibližně stejný průměr, jako před odsátím folikulární tekutiny. Zhruba 30 ml žluté folikulární tekutiny se shromáždí z jednoho preovulačního folikulu a následně se každý folikul promývá 50 – 150 ml media. Často se stává, že během folikulárního výplachu obsahuje medium krev, jelikož je punkcí, nebo masírováním narušena vaskulární síť folikulu. Ke sběru oocytů existuje mnoho dostupných vyplachovacích medií, od různých firem a je možné si medium připravit vlastní. Jednotlivé hlavní složky jsou: Dulbeccův fyziologický roztok, fosfátový pufr, doplněný heparinem, bovinním sérovým albuminem, nebo obyčejné vyplachovací medium pro embryo transfer, roztoky jsou sterilní a obsahují zdroj bílkovin a antibiotika (McKinnon et al., 2011). Před použitím se medium nahřeje na teplotu 38 °C. Po dokončení aspirace se zachycené medium s folikulární tekutinou z filtru převede do Petriho misky, filtr se ještě médiem opláchne, protože oocyty na něm mohou ulpívat. Tekutina se prozkoumá pod mikroskopem a vyhledají se oocyty (Bruck et al., 1997).

Je nesmírně důležité správné umístění folikulu, aby se zabránilo propíchnutí vazy vaječníků, vejcovodu, nebo nějakých vnitřností z trávicího traktu a předcházet tak budoucím komplikacím zvířat (Rodriguez, 2014). Po aspiraci se jako preventivní opatření doporučuje aplikovat protizánětlivé a antibiotické přípravky a léky. Tato technika je zcela bezpečná, i

když existuje riziko komplikací, jako je vnitřní krvácení, zánět pobřišnice nebo abscesy vaječniku. Výskyt těchto případů je zanedbatelný, ale ani závažné komplikace nemohou být zcela vyloučeny (Vanderwall et Woods, 2002). Nejspíše jediná zpráva o vážné komplikaci vzniklá z OPU je od Vanderwall et Woods (2002), jejichž klisna krvácela do dutiny břišní a byla utracena. Podle pitvy se jako zdroj krvácení uvedla zřejmě poraněná levá děložní tepna.

3.5.4 Vliv OPU na pohlavní cyklus

Po aspiraci preovulačního folikulu se v rozpětí 5 - 8 dnů vytvoří normální žluté tělísko, v závislosti na velikosti aspirovaného folikulu (Hinrichs et al., 1991), které obvykle dobře reaguje na podání prostaglandinů. Koncentrace prostaglandinu jsou od 5. dne po aspiraci až do 8. dne zvýšeny. Klisny, u kterých byly aspirované folikuly 5 – 25 mm velké, neměly zvýšenou koncentraci progesteronu v krvi, ale na ultrazvuku byly vidět důkazy luteální tkáně. To znamená, že přítomnost luteální tkáně není nutně ve vztahu ke koncentraci progesteronu (Hayna et al., 2005). Klisna po aspiraci znovu začne její říjový cyklus a může vyvinout nový dominantní folikul připravený k aspiraci opět za 5 - 8 dnů po podání prostaglandinu. (Rodriguez, 2014). Po aspiraci dochází k říji obvykle za 15 – 22 dní, výjimečně se u některých klisen interovulační interval protáhne až na 28 – 32 dní (Mari et al., 2005). Po aspiraci preovulačního folikulu se u některých klisen vyskytují i sekundární ovulace do 10. dne po aspiraci. Častější výskyt sekundárních ovulací je podle Hinrichs et al., (1991) způsoben tím, že folikulární tekutina obsahuje inhibin, lutein, testosteron a faktory přímo potlačující růst sekundárních folikulů. Navíc dochází po aspiraci ke zvýšené koncentraci FSH, což by mohlo zvýšit tvorbu LH receptorů uvnitř folikulu, v nepřítomnosti folikulárních složek tekutiny, které tvorbu těchto receptorů inhibují. Existuje i názor, že luteinizaci inhibuje samotný oocyt. Punkce preovulačních folikulů je následovaná rychlým nárůstem progesteronu, vylučovaným CL (Goudet et al., 1997). Tvorba a funkce CL, není ovlivněna aspirací v žádné fázi vývoje folikulů. Mezi aspirovanými a kontrolními klisnami žádný rozdíl v délce trvání, nebo vrcholu sekrece progesteronu nalezen nebyl (Hinrichs et al., 1991). Rozdíly v koncentraci progesteronu naznačují, že je zapotřebí průměr folikulu nejméně 35 mm pro dosažení koncentrace progesteronu v séru, které je kompatibilní s tím ze žlutého tělíska vytvořeného přirozenou ovulací (Mozzaquatro et al., 2010). U klisen v přechodném období po aspiraci folikulů > 10 mm nastala luteinizace pouze u 38 % klisen, tyto klisny po podání PG F_{2α} v pokračovaly dále v ovariálním cyklu. Interovulační interval u všech aspirovaných klisen byl v rozsahu 15 – 30 dní (Alvarenga et al., 1999).

3.5.5 Aspirace preovulačních folikulů

V současné době existují v rámci metody OPU dva nechirurgické způsoby ke sběru oocytů z živých klisen. Jedním z nich mohou být oocyty získány z preovulačních dominantních folikulů po stimulaci gonadotropinem bezprostředně před ovulací, nebo lze oocyty získat ze všech nezralých folikulů viditelných na vaječniku, v jakékoli fázi cyklu (Hinrichs et Choi, 2005a).

Aspirací preovulačních folikulů je získání oocytů vcelku úspěšný, různí autoři publikují relativně vysoké hodnoty 65 % až 80 % (Hinrichs et al., 1990; Hinrichs et al., 1998; Carnevale et al., 2005). Typicky se aspiruje pouze jeden, maximálně dva dominantní folikuly během cyklu, které se nachází na vaječnicích. Sběr oocytů je načasovaný po podání prostředku vyvolávající ovulaci, mezi tyto látky patří lidský choriový gonadotropin (hCG), LH, nebo GnRH analog deslorelin. V případě že by klisně nebyl podán žádný z těchto přípravků, úspěšnost by se snížila zhruba na 43 % (Meintjes et al., 1995). Požadavek na provedení aspirace je přítomnost velkého dominantního folikulu těsně před ovulací, jehož velikost je minimálně 35 mm. Dalšími kritérii je děložní edém, uvolněný děložní a cervikální tonus a estrální chování předchozí den, pokud klisna splňuje všechny tyto znaky je vhodná pro podání přípravku indukující ovulaci. Aspirace se provádí nejčastěji za 20 – 36 hodin po podání hCG, nebo 16 – 0 hodin před očekávanou dobou ovulace. Při aspiraci folikulu dříve než po 20 hodinách od aplikace hCG, je oocyt stále ještě pevně přilnut k folikulární stěně. Jak se folikul blíží k ovulaci, buňky se uvolňují a oocyt se snadněji vyjme. Nicméně blížící se ovulace před odběrem oocytů znamená spíše riziko, je tu možnost protržení stěny folikulu v průběhu rektální manipulace vaječniku.

Oocyty jsou získány z folikulů ještě před jejich kompletním dozráním, proto potřebují krátkou kultivaci, než budou připraveni k oplození. In vivo dochází k dozrávání oocytu uvnitř dominantního folikulu 24 – 36 hodin před ovulací, po stimulu LH. Po ovulaci, nebo dokončení zrání má oocyt ovšem omezenou životnost a oplození musí nastat, zatímco je oocyt životaschopný (McKinnon et al., 2011). Rozsah zrání oocytů se odrazí v morfologii kumulárních a granulózních buněk. U nezralého folikulu jsou granulózní a kumulární buňky kompaktní, zrnitého vzhledu. Oocyty jsou 24 hodin po hCG v metafázi I, buňky kumulují typicky blednou a zvýrazňuje se corona radiata. Pokud jsou v mediu kultivovány dalších 12 – 16 hodin, přecházejí do metafáze II a vytlačí polární tělísko (Carnevale et Sessions, 2012). Jak se oocyt blíží ovulaci, buňky kumulují a corony radiaty se stávají mukoidní a oddělují se.

Oocyty získané po 30 hodinách od podání hCG, nebo již ovulované se kultivují po dobu 1 – 3 hodin. Kultivační medium pro oocyty odebrané více než 20 hodin po indukci ovulace, nemusí obsahovat hormony, jelikož ke stimulu zrání došlo in vivo. Vývojová kompetence oocytů je podobná při aspiraci 20 – 24 hodin po hCG a kultivaci 12 – 16 hodin, ve srovnání s aspirací 30 – 35 hodin po hCG a kultivaci 1 – 3 hodiny (Coutinho da Silva et al., 2002). Obvykle používané kultivační medium je M199 s přídavkem 10 % fetálního telecího séra, 0,2 mM pyruvátu, a 50 g / ml gentamicinu o teplotě 38,5 °C (Carnevale, 2004).

3.5.6 Aspirace malých folikulů

Druhý způsob je aspirace nezralých oocytů. V tomto procesu je možné odsát všechny folikuly přítomné na vaječníku, neohledě na jejich velikost. Aspirace se provádí během celého roku, jak v připouštěcím období, tak i mimo reprodukční období v zimním anestru. Folikuly, které se nacházejí na vaječnicích, jsou v různém stupni vývoje a atresie, z těchto folikulů jsou oocyty získané ve stadiu profáze I meiózy. Postup a materiál pro OPU je totožný s aspirací preovulačních folikulů, pouze u typu aspirační jehly se názory rozcházejí. Cook et al. (1993) uvádí, že použití dvouplášťové jehly nepřináší zvýšení efektivity ve sběru oocytů a stačí aspirovat pouze pomocí jednoduché jehly. Oproti tomu jsou zprávy o vyšší výtěžnosti oocytů proplachováním folikulu přes dvouplášťovou jehlu od Bøgh et al. (2002), Colleoni et al. (2007), Jacobson et al. (2010). Získání oocytů z nezralých folikulů vyžaduje více intenzivní vyplachování a seškrabování stěny folikulu masírováním, než u folikulů preovulačních. Pokud se srovnají reporty od různých vědců, shodují se, že aspirace nezralých folikulů vede k celkově většímu počtu oocytů, i přes to, že Bruck et al. (1992), Cook et al. (1993), Duchamp et al. (1995), Kanitz et al. (1995), Mari et al. (2005) uvádějí úspěšnost <30 %. Přibližně 2/3 březostí pocházejí z oocytů aspirovaných z nezralých folikulů. Je to z důvodu většího množství oocytů, které lze získat z četnějších folikulů několikrát během jednoho cyklu, ve srovnání pouze s jedním možným preovulačním folikulem během cyklu, avšak lze říci, že oocyty z dominantních folikulů bývají vyšší kvality. V konečném měřítku ale závisí na vývojové kompetenci oocytu k vytvoření embrya, které nejsou spolehlivě popsány a stále existuje velmi málo údajů. Horší výsledky jednotlivých aspirací jsou z důvodu silnějšího uchycení oocytu ke stěně folikulu. Tím pádem je z malých folikulů jednodušší získat oocyt, než z větších. Rozdíl je přičítán menší ploše povrchu folikulu, ke které je oocyt přisedlý a tudíž je zvýšená pravděpodobnost vytlačení oocytu při aspiraci (Bøgh et al., 2002), malý folikul je ale těžší aspirovat právě kvůli jeho velikosti a závisí na zručnosti technika, zda oocyt úspěšně získá. S rostoucím průměrem folikulů, se snižuje množství získaných oocytů

(viz. Tabulka 1), nezávisle na estrálním cyklu. Nezralé oocyty poté musí být v laboratoři maturovány, a to zdaleka neposkytuje efektivní výnos, in vitro kultivace oocytů zpravidla dává 60% zralých oocytů (Hinrichs, 2010a) a větší oocyty z folikulů menších než 10 mm mají nižší schopnost zrát in vitro (Landim – Alvarenga et al., 2008).

	Follicular diameter (mm)			
	< 10	10-20	21-30	> 30
No. punctured follicles (n)	72	219	29	12
No. recovered oocytes (n)	28	62	2	1
Recovery rate (%)	38.9 ^a	28.3 ^a	6.9 ^b	8.3 ^b

Tabulka 1: vazba velikosti folikulů na výtěžnosti oocytů (Kanitz et al., 2003).

3.5.7 Opakované aspirace

Pozornost musí být věnována délce doby mezi aspiracemi u klisny. Aspirace je možné provádět až několikrát během jednoho pohlavního cyklu, interval mezi nimi zkoumá množství klinik zabývajících se OPU a snaží se nalézt nejvhodnější dobu pro opakování aspirací s cílem zjistit nejlepší poměr mezi počtem folikulů a počtem získaných oocytů. Průměrný interval je obvykle 2 - 4 týdny, může být ale i po 10 dnech, v souladu s individualitou klisny (Galli et al., 2013). V tomto rozpětí je počet folikulů a získaných oocytů stálý a nedochází k jejich poklesu. V případě, že se postupy provádějí správně, je opakované provádění procesů OPU bezpečné a lze ho dělat po dobu 5 - 6 po sobě následujících cyklů a každých 10 - 15 dnů, aniž by současně docházelo k vedlejším dopadům na zdraví, nebo reprodukci klisny (Purcell et al., 2007). Jacobson et al. (2010) uvedl, že klisny podstoupily aspirace během celého rozmnožovacího období každých 14 dní, v průběhu času nedošlo ke změnám na počtu folikulů (7,3 – 10,3), ani na počtu získaných oocytů (48 – 54 %) Z dlouhodobého pohledu je aspirace opakovatelná i řadu let. Klisny, u kterých docházelo k aspiracím po dobu až 8 let, nevykazovaly známky narušeného ovariálního cyklu (Bøgh et al., 2003). Aspirace folikulů každý týden je příliš krátký interval a výsledky zaznamenávají menší počet přítomných folikulů na vaječnicích. Častější aspirace vedou k lineárnímu poklesu v počtu dostupných folikulů a také k reaspiraci již dříve aspirovaných a znovu naplněných folikulů (McKinnon et al., 2011). Duchamp et al. (1995) uvádí, že aspirace folikulů každých 7 dní, po dobu 11 týdnů byly spojeny se snižováním počtu folikulů, průměrný počet folikulů na vaječniku se snížil z

8,7 po první aspiraci na 4,7 folikulů při konečné aspiraci. Kanitz et al. (2003) zkoumal různé aspekty účinnosti zisku oocytů a mimo jiné i dopad opakované aspirace na populaci folikulů. Lineární regresní analýza ukázala, že počet folikulů o velikosti v průměru <10 mm nebyl významně ovlivněn opakovanými aspiracemi. Na rozdíl od toho, počet folikulů v průměru od 10 do 20 mm se s dalšími aspiracemi snížil zhruba o 1,5 folikulu. Folikuly o průměru >30 mm byly také ovlivněny opakovaným odsátím, v průměru se snížil počet o 0,8 až 0,1 folikulu. Kromě toho je zrací schopnost oocytů získaných aspirací 8 dnů po předchozím OPU nízká, pravděpodobně tím, že v této době jsou folikuly příliš juvenilní (Bøgh et al., 2002). Došlo se k závěru, že opakované aspirace jsou užitečné pro vyvolání standardizovanější skupiny folikulů a jednotnější kvality COC, která má vyrovnanější výsledky v následné maturaci in vitro. Ani z hlediska morfologie a funkce nenarušuje opakovaná aspirace vaječníky, je zachována folikulogeneze, ovulace a tvorba žlutého tělíska. Nicméně propíchnutí vaječníku způsobuje fibrózu stromatu a zahrnuje riziko vyvolání abscesu v rámci tkáně vaječníku, který by mohl reprodukční schopnost poškodit (Bøgh, 2002). Následující provedení inseminace u klisen po OPU vedla k 70 % zabřeznutí, což naznačuje, že aspirace folikulů nemají negativní vliv na plodnost klisen (Mari et al., 2005).

3.5.8 Vlivy na získání oocytů

Doba aspirace v závislosti na fázi estrálního cyklu, průměrný počet získaných oocytů ovlivňuje (Tabulka 2). Ve srovnání, vyšel u klisen ve 12. dnu estrálního cyklu nižší výnos (12,4 %), než u klisen v anestru a u klisen v 5. dnu estrálního cyklu (40,4 % a 26,3 %) (Kanitz et al., 2003). Purcell (2007) ve svém výzkumu použil mimo jiné i klisny během přechodného období. Cílem jeho studie bylo porovnat účinnost získání oocytů u cyklujících klisen, klisen v přechodném období a březích klisen. U všech skupin se provedlo 8 kol aspirací velkých (> 20 mm) i malých (10 až 20 mm) folikulů, každých 10 - 11 dní. U poloviny klisen v přechodném období byl navíc podán 12,5 mg eFSH 4 dny před aspirací a polovině cyklujících klisen byl podán 12,5 mg eFSH 3 dny před aspirací. Ve výsledku bylo u klisen v přechodném období na vaječníku nejméně folikulů a to jak velkých, tak malých (1,64 a 5,61), na rozdíl od cyklujících klisen, kde byl jejich počet vyšší (2,25 a 5,86). Z hlediska zisku oocytů můžeme obecně říci, že u kontrolních klisen v přechodném období se aspirovalo nejméně oocytů z velkých folikulů (0,11 průměrně na jednu klisnu). Zatímco nejmenší počet získaných oocytů z malých folikulů byl uveden od cyklických klisen (1,07). Použití eFSH zaručil malou výhodu u skupiny cyklujících klisen v počtu získaných oocytů jak z malých, tak i z velkých folikulů (1,39 a 0,46).

Technikou transvaginální aspirace lze sbírat oocyty i od březích klisen. Aspirace u březích klisen nemá na životaschopnost jejich hříbat žádné dopady (Franz et al., 2001). Ginther (1992), a Ginther et Bergfelt (1992) popsali u klisen výskyt folikulárních vln v jejich časně březosti. Folikulární aktivita u březích klisen je variabilní a kolísá stejně tak jako velikost folikulů. U březích klisen lze zaznamenat hlavní i vedlejší folikulární vlny, které sahají od pravidelně se vyskytujících, až po sporadické. Oocyty se získávají mezi 20. až 150. dnem březosti. Úspěšnost je mnohdy vyšší než u cyklujících klisen. Existuje několik studií, která toto potvrzují. Meintjes et al., 1997 folikulární aspirace prováděl až do 150. dne březosti. Průměrný počet byl 7,6 aspirací na klisnu a průměrný počet získaných oocytů byl 18,9 na jednu klisnu. Došli k závěru, že v průměru 2,5 oocytů by mohlo být od březích klisen shromážděno každých 7 - 10 dní. Odhaduje se, že mezi 21. až 150. dnem březosti by mohlo být získáno 19 oocytů, v porovnání s 12 oocyty odebraných během 130 dní u cyklujících klisen bez hormonální léčby. Cochran et al. (1998) uvádí v průměru 13 folikulů za jednu aspiraci, 66 % výnos oocytů po dobu 20 aspirací, vykonávané v průběhu 14 až 70 dní březosti.

V neposlední řadě lze uvést vliv plemene na počtu aspirovatelných folikulů, jelikož teplokrevné klisny mohou vyvolat na vaječnicích více folikulů (Hinrichs, 2010b). Rozdíl je viditelný i v průběhu roku, během května až června bývá výtěžnost oocytů větší, než v říjnu a listopadu (57,3 % a 44,0 %) (Bruck et al., 1996).

Pro sběr většího počtu oocytů by bylo výhodné mít na vaječnicích více folikulů. Na každém vaječniku klisny se fyziologicky nachází průměrně 6 viditelných folikulů, to znamená značné omezení pro jejich získávání. Superstimulace je způsob jak dosáhnout zvýšeného počtu folikulů, bohužel použití obvyklých superovulačních prostředků nepřináší příliš pozitivní výsledky. Pokusy s použitím extraktu koňské hypofýzy (EPE), FSH přípravky, prasečí FSH, pasivní imunizace inhibinem nebyly účinné, komerčně dostupné, nebo nefungovaly. Pouze výsledky použití EPE jsou slibné, i když ani ty nejsou úplně jednoznačné, Lapin et Ginther (1977), Woods et Ginther (1985), Squires et al. (1986), Hofferer et al. (1991), Dippert et al. (1992) při použití EPE prokázali zvýšení počtu folikulů >25 mm. Souhrn studií provedených na Colorado State University ukázaly, že použití EPE indukuje vícenásobné ovulace, až 3,2 ovulací během cyklu u jedné klisny. Avšak Brück et al. (2000) nepozorovali zvýšení počtu získaných oocytů (40 a 48 %), ani velikost folikulů u klisen stimulovaných jednou denně 25 mg EPE. Také MacLellan et al. (2002) získal méně oocytů ze stimulovaných klisen dvakrát

denně EPE oproti kontrolní skupině (20 % a 69 %). Na prasečí FSH se zdají být koňské vaječníky necitlivé i ve vysokých dávkách. Při podávání FSH dvakrát denně se četnost ovulací nezvýšila (Irvine, 1981; Squires et al., 1986). Bohužel ani velmi vysoké dávky eCG neměly žádný vliv na folikulární vývoj nebo ovulaci (Squires et McCue, 2007). Purcell et al. (2007) zkoušel vyvolat superovulaci podáváním koňské FSH, ale více oocytů oproti kontrolní skupině nezaznamenal (21 % a 23 %). Cílem studie Bruck et al. (2000) bylo zjistit, zda podávání surových koňských gonadotropinů ovlivňuje vývoj folikulů a zisk oocytů. Po dobu 8 dnů se klisnám podávalo 25 mg koňských gonadotropinů. Po zhodnocení výsledků byl folikulární růst, stejně jako počet a velikost folikulů a získaných oocytů u obou skupin klisen podobný. Slibně se jeví produkt čistého eFSH na výsledky superovulace. Ošetření eFSH způsobuje zvýšený počet větších folikulů. Podávání eFSH klisnám v jarním přechodném období uspíší nástup první ovulace v roce a zvyšuje počet jejich ovulací (Peres, 2004).

Stage of oestrous cycle		day 5	day 12	acyclic
No. of mares	(n)	8	8	11
No. punctured follicles	(n)	99	97	136
No. recovered oocytes	(n)	26	12	55
Recovery rate	(%)	26.3 ^a	12.4 ^b	40.4 ^c

a:b, a:c, b:c $P < 0.05$

Tabulka 2: vliv estrálního cyklu na zisk oocytů (Kanitz et al., 2003)

3.5.9 Vyhledávání oocytů

Roztok vyplachovacího media a folikulární tekutiny, který se získá aspirací, se v laboratoři prohlíží pod mikroskopem. Oocyty jsou získány jako kumulo oocytární komplexy a měří často přes 1 mm v průměru. Hledaný oocyt měří v průměru 180 μm a na rozdíl od embrya není při vyhledávání oocytu pomůckou jeho kulatost, jelikož se mohou objevit nepravidelné tvary. Ve vyplachované tekutině se nachází granulózní buňky a při vyhledávání se mohou splést s COC, se kterými si jsou podobné. Při rozlišování se kumulární i granulózní buňky jeví jako průsvitná hmota, přesto mají odlišné znaky textury a barvy. Oocyt je šedý, nebo s různými odstíny, je vidět corona radiata jako prstenec buněk obklopující oocyt. Po identifikaci je COC promýván v mediu aby se odstranily připojené nečistoty a krev a oddělují se kumulární buňky (McKinnon et al., 2011).

3.6 Zrání a fertilizace oocytů

3.6.1 Zrání oocytů

Jak již bylo řečeno, pro další použití se musí tyto oocyty umístit ke kultivaci in vitro, aby dokončili svůj vývoj. Maturace znamená jak jaderné zrání (pokračování meiózy a postup do metafáze II), tak cytoplazmatické zrání (série změn, které připravují oocyt na vývoj embrya z cytoplazmy). In vivo je dozrávání oocytu spojeno s vývojem folikulu a změnami hladin hormonů. Koncentrace estradiolu zůstává ve folikulární tekutině na vysoké úrovni, ovulační LH vzestup trvá několik dní a maxima dosahuje jeden den po ovulaci. Nárůst koncentrace progesteronu se zvyšuje při blížící se ovulaci. Všechny tyto změny mohou být důležité pro kompletní zrání oocytů (Landim – Alvarenga et al., 2008). Typicky je složení kultivačního media s příměsí séra, folikulární tekutiny, gonadotropinů, nebo růstových hormonů (Willis et al., 1991, Dell’Aquila et al., 1997, Hinrichs et Schmidt, 2000). Maturace oocytů pro účely in vitro oplození nastává v defonovaném maturačním médiu. Nejčastěji využívaným je medium M199 s Earles solemi, fetálním bovinním sérem, bovinní FSH, v 5 % atmosféře CO₂, nebo medium DMEM / F12. Maturace probíhá při teplotě 38,2 °C, optimální délka zrání u expandovaných oocytů je 24 – 30 hodin a u kompaktních 30 – 36 hodin (Hinrichs et al., 2005b, Choi et al., 2007).

3.6.2 Fertilizace oocytů

V současné době neexistuje fungující protokol pro in vitro produkci embryí u koní tak, jak je tomu například u krav. Proto se u in vitro produkce koňských embryí využívá metoda ICSI (intra cytoplazmatická spermatická injekce) (Galli et al., 2014)). ICSI je technika, která umožňuje oplození oocytu in vitro jedinou spermií. Oplození tímto způsobem překonává konvenční IVF, jelikož ta není u koní příliš efektivní z důvodu silné zony pellucidy. Kromě toho je tu i výhoda využití hřebců se špatnou pohyblivostí spermií, nebo reprodukčními schopnostmi (Galli et al., 2013). U koňských oocytů se vniknutí imobilizované spermie do cytoplazmy oocytu provádí pomocí Piezo vrtáku. Použitý oocyt musí být zralý, s viditelným polárním tělískem. Po spermatické injekci se oocyty kultivují a 3. den se hodnotí štěpení buněk. Formování blastocysty se hodnotí 7. – 10. den a poté jsou připraveny k přenosu do dělohy, nebo ke zmrazení (McKinnon et al., 2011).

4 Závěr

Postupy in vitro produkce embryí ještě nejsou spolehlivě objasněny a neustále se hledají způsoby, jak by bylo možné je zařadit mezi běžné techniky reprodukce u klisen. Základním krokem k úspěšné in vitro produkci embryí je získání kvalitního oocyty. V získání oocytů se nejvíce uplatňuje metoda Transvaginální aspirace oocytů, tento způsob je opakovatelný, nejvíce šetrný ke zvířeti, použitelný u širokého spektra klisen, v průběhu estrálního cyklu, během březosti i anestru a oocyty lze aspirovat z preovulačních i malých folikulů. Při úmrtí klisny je každopádně na místě odebrat oocyty z vyjmutých vaječníků jak aspirací, rozřezáním, nebo pitvou a seškrábnutím granulózních buněk z folikulů. Z bakalářské práce vyplývá, že nejvyšší úspěšnost získávání oocytů je z malých folikulů i přes to, že procentuální úspěšnost aspirací preovulačních folikulů je vyšší. Jelikož je celkový počet aspirací preovulačních folikulů nižší v porovnání s aspiracemi malých folikulů, je nižší i získání oocytů za celé aspirační období. Navíc oocyty z malých folikulů musí dále podstoupit maturaci in vitro. Proto je výhodnější načasovat aspiraci tak, aby se na vaječnicích nacházela vyrovnaná skupina folikulů a absence dominantního folikulu. Počet získaných oocytů se dá experimentálně podpořit podáváním extraktu koňské hypofýzy, nebo equinního folikulostimulačního hormonu. Výhodné je získávat oocyty od březích klisen, u nich se dají provádět aspirace v průběhu 20. – 150. dne březosti a je možné získat více oocytů, než u klisen cyklujících i v přechodném období. Zralé oocyty lze přenést do vejcovodu příjemkyně, což poskytuje zhruba 50 % úspěšnost zabřeznutí, nebo in vitro oplodnit metodou ICSI a vpravit do dělohy příjemkyně 7 dní staré embryo. Embrya i oocyty získaná mimo připouštěcí období je možné zamrazit, nebo vitrifikovat.

5 Seznam literatury

- Alvarenga, M. A., McCue, P. M., Franz, L. C. 1999. Effect of follicular aspiration on ovarian function in transitional mares. *Theriogenology*. 51(1). 431.
- Aurich, C. 2011. Reproductive cycles of horses. *Animal Reproduction Science*. 124(3). 220-228.
- Bergfelt, D. R., Ginther, O. J. 1993. Relationships between FSH surges and follicular waves during the estrous cycle in mares. *Theriogenology*. 39(4). 781-796.
- Bogh, I. B., Bezard, J., Duchamp, G., Baltsen, M., Baltsen, M., Daels, R., Greve, T. 2002. Pure preovulatory follicular fluid promotes in vitro maturation of in vivo aspirated equine oocytes. *Theriogenology*. 57(7). 1765-1779.
- Bogh, I. B., Brink, P., Jensen, H. E., Lehn-Jensen, H., Greve, T. 2003. Ovarian function and morphology in the mare after multiple follicular punctures. *Equine Veterinary Journal*. 35(6). 575-579.
- Brinsko, S. P., Blanchard, T. L., Varner, D. D., Schumacher, J., Love, Ch. C., Hinrichs, K., Hartman, D. 2010. *Manual of Equine Reproduction*. 3th ed. Elsevier Health Sciences. London. p. 336. ISBN: 0323065139.
- Brück, I., Bezard, J., Baltsen, M., Synnestvedt, B., Couty, I., Greve, T., Duchamp, G. 2000. Effect of administering a crude equine gonadotrophin preparation to mares on follicular development, oocyte recovery rate and oocyte maturation in vivo. *Journal of Reproduction and Fertility*. 118 (2). 351-360.
- Brück, I., Grondahl, C., Host, T., Greve, T. 1996. In vitro maturation of equine oocytes: Effect of follicular size, cyclic stage and season. *Theriogenology*. 46(1). 75-84.
- Brück, I., Raun, K., Synnestvedt, B., Greve, T. 1992. Follicle aspiration in the mare using a transvaginal ultrasound-guided technique. *Equine Veterinary Journal*. 24(1). 58-59.
- Brück, I., Synnestvedt, B., Greve, T. 1997. Repeated transvaginal oocyte aspiration in unstimulated and FSH-treated mares. *Theriogenology*. 47(6). 1157-1167.
- Carnevale, E. M. 2004. Oocyte transfer and gamete intrafallopian transfer in the mare. *Animal Reproduction Science*. 82(3). 617-624.
- Carnevale, E. M., da Silva, M. A. C., Panzani, D., Stokes, J. E., Squires, E. L. 2005. Factors affecting the success of oocyte transfer in a clinical program for subfertile mares. *Theriogenology*. 64(3). 519-527.
- Carnevale, E. M., Sessions, D. R. 2012. In vitro production of equine embryos. *Journal of Equine Veterinary Science*. 32(7). 367-371.

- Cochran, R., Meintjes, M., Reggio, B., Hylan, D., Carter, J., Pinto, C., Paccamonti, D., Godke, R. A. 1998. Effects of follicular aspiration and flushing, and the genotype of the fetus on circulating progesterone levels during pregnancy in the mare. *Journal of Equine Veterinary Science*. 18(11). 736-740.
- Colleoni, S., Barbacini, S., Necchi, D., Duchi, R., Lazzari, G., Galli, C. 2007. Application of ovum pick-up, intracytoplasmic sperm injection and embryo culture in equine practice. In: Green, E. M. (ed.). *Proceedings of the 53rd Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners*. Orlando. 554-559. ISBN: 20083097761.
- Cook, N. L., Squires, E. L., Ray, B. S., Cook, V. M., Jasko, D. J. 1992. Transvaginal ultrasonically guided follicular aspiration of equine oocytes: Preliminary Results. *Journal of Equine Veterinary Science*. 12(4). 204-207.
- Cook, N. L., Squires, E. L., Ray, B. S., Jasko, D. J. 1993. Transvaginal ultrasound-guided follicular aspiration of equine oocytes. *Equine Veterinary Journal*. 25(15). 71-74.
- Coumbe, K. 2012. *Equine Veterinary Nursing*. 2nd ed. Wiley - Blackwell. Chichester. p. 496. ISBN: 1118336267.
- Coutinho da Silva, M. A., Carnevale, E. M., Maclellan, L. J., Seidel, G. E., Squires, E. L. 2002. Effect of time of oocyte collection and site of insemination on oocyte transfer in mares. *Journal of Animal Science*. 80(5). 1275-1279.
- Davies Morel, M. C. G. 2015. *Equine Reproductive Physiology, Breeding and Stud Management*. 4th ed. CABI. Oxfordshire. p. 434. ISBN: 1780644426.
- Dell'Aquila, M. E., Cho, Y. S., Minoia, P., Traina, V., Fusco, S., Lacalandra, G. M., Maritato, F. 1997. Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) versus conventional IVF on abattoir-derived and in vitro-matured equine oocytes. *Theriogenology*. 47(6). 1139-1156.
- Dellenbach, P., Nisand, I., Moreau, L., Feger, B., Plumere, C., Gerlinger, P., Rumpler, Y. 1984. The Lancet. Transvaginal, sonographically controlled ovarian follicle puncture for egg retrieval. 30. 1391-1467.
- Dippert, K. D., Hofferer, S., Palmer, E., Jasko, D. J., Squires, E. L. 1992. Initiation of superovulation in mares 5 or 12 days after ovulation using equine pituitary extract with or without GnRH analogue. *Theriogenology*. 38(4). 695-710.
- Donadeu, F. X., Ginther, O. J. 2002. Follicular waves and circulating concentrations of gonadotrophins, inhibin and oestradiol during the anovulatory season in mares. *Reproduction*. 124(6). 875-885.
- Duchamp, G., Bezard, J., Palmer, E. 1995. Oocyte yield and the consequences of puncture of all follicles larger than 8 millimeters in mares. *Society for the Study of Reproduction*. 233-241.

- Feichtinger, W., Kemeter, P. 1986. Transvaginal sector scan sonography for needle guided transvaginal follicle aspiration and other applications in gynecologic routine and research. *Fertility and Sterility*. 45(5). 722-725.
- Franz, L. C., Squires, E. L., O'Donovan, M. K., Scott, T. J., Carnevale, E. C. 2001. Collection and in vitro maturation of equine oocytes from estrus, diestrus and pregnant mares. *Journal of Equine Veterinary Science*. 21(1). 26-32.
- Galli, C., Colleoni, S., Duchi, R., Lagutina, I., Lazzari, G. 2013. Equine assisted reproduction and embryo technologies. *Animal Reproduction*. 10(3). 334-343.
- Galli, C., Colleoni, S., Duchi, R., Lagutina, I., Lazzari, G. 2007. Developmental competence of equine oocytes and embryos obtained by in vitro procedures ranging from in vitro maturation and ICSI to embryo culture, cryopreservation and somatic cell nuclear transfer. *Animal Reproduction Science*. 98(1). 39-55.
- Galli, C., Crotti, G., Notari, C., Turini, P., Duchi, R., Lazzari, G. 2001. Embryo production by ovum pick up from live donors. *Theriogenology*. 55(6). 1341-1357.
- Galli, C., Duchi, R., Colleoni, S., Lagutina, I., Lazzari, G. 2014. Ovum pick up, intracytoplasmic sperm injection and somatic cell nuclear transfer in cattle, buffalo and horses: from the research laboratory to clinical practice. *Theriogenology*. 81(1). 138-151.
- Gastal, E. L., Gastal, M. O., Bergfelt, D. R., Ginther, O. J. 1997. Role of diameter differences among follicles in selection of a future dominant follicle in mares. *Biology of Reproduction*. 57(6). 1320-1327.
- Ginther, O. J. 1992. *Reproductive Biology of the Mare: Basic and Applied Aspects*, Vol. 2. 2nd ed. Equiservices. Wisconsin. p. 642. ISBN: 0964007215.
- Ginther, O. J. 2000. Selection of the dominant follicle in cattle and horses. *Animal Reproduction Science*. 60. 61-79.
- Ginther, O. J., Bergfelt, D. R. 1992. Associations between FSH concentrations and major and minor follicular waves in pregnant mares. *Theriogenology*. 38(5). 807-821.
- Goudet, G., Bezard, J., Duchamp, G., Gerard, N., Palmer, E. 1997. Equine oocyte competence for nuclear and cytoplasmic in vitro maturation: Effect of follicle size and hormonal environment. *Biology of Reproduction*. 57(2). 232-245.
- Hayna, J. T., Madill, S., Troedsson, M. H. T. 2005. The effect of Transvaginal follicular aspiration on corpus luteum formation in mares. In: Alvarenga, M., Wade, J. F. (eds.). *Monograph Series No. 14: Proceedings of the 6th International Symposium on Equine Embryo Transfer*. R & W Communications. Newmarket. 90-91. ISSN: 1472-3158.
- Heape, W. 1898. On the artificial insemination of mares. *Veterinarian*. 71(202). 260-268.

- Higgins, A. J., Snyder, J. R. 2013. *The Equine Manual*. 2nd ed. Elsevier Health Sciences. p. 1460. ISBN: 0702059617.
- Hinrichs, K. 2010a. Application of Assisted Reproductive Technologies (ART) to Clinical Practice. In: Moyer, W. A. (ed). *Proceedings of the 56th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners*. American Association of Equine Practitioners. Baltimore. 195-206.
- Hinrichs, K. 2010b. In Vitro Production of Equine Embryos: State of the Art. *Reproduction in Domestic Animals*. 45(s2). 3-8.
- Hinrichs, K. 1991. The relationship of follicle atresia to follicle size, oocyte recovery rate on aspiration, and oocyte morphology in the mare. *Theriogenology*. 36(2). 157-168.
- Hinrichs, K., DiGiorgio, L. M. 1991. Embryonic development after intra-follicular transfer of horse oocytes. *Journal of Reproduction and Fertility*. 44. 369-374.
- Hinrichs, K., Choi, Y. H. 2005a. Assisted reproductive techniques in the horse. *Clinical Techniques in Equine Practice*. 4(3). 210-218.
- Hinrichs, K., Choi, Y. H., Love, L. B., Varner, D. D., Love, C. C., Walckenaer, B. E. 2005b. Chromatin Configuration Within the Germinal Vesicle of Horse Oocytes: Changes Post Mortem and Relationship to Meiotic and Developmental Competence. *Biology of Reproduction*. 72(5). 1142-1150.
- Hinrichs, K., Kenney, D. F., Kenney, R. M. 1990. Aspiration of oocytes from mature and immature preovulatory follicles in the mare. *Theriogenology*. 34(1). 107-112.
- Hinrichs, K., Matthews, G. L., Freeman, D. A., Torello, E. M. 1998. Oocyte transfer in mares. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 212(7). 982-986.
- Hinrichs, K., Rand, W. M., Palmer, E. 1991. Effect of aspiration of the preovulatory follicle on luteinization, corpus luteum function and peripheral plasma gonadotropin concentrations in the mare. *Biology of Reproduction*. 44(2). 292-298.
- Hinrichs, K., Schmidt, A. L. 2000. Meiotic Competence in Horse Oocytes: Interactions Among Chromatin Configuration, Follicle Size, Cumulus Morphology, and Season. *Biology of Reproduction*. 62(5). 1402-1408.
- Hofferer, S., Duchamp, G., Palmer, E. 1991. Ovarian response in mares to prolonged treatment with exogenous equine pituitary gonadotrophins. *Journal of Reproduction and Fertility*. 44. 341-349.
- Hyttel, P., Sinowatz, F., Vejlsted, M., Betteridge, K. 2010. *Essentials of Domestic Animal Embryology*. Elsevier Health Sciences. p. 472. ISBN: 0702042595.

- Choi, Y. H., Hochi, S., Braun, J., Sato, K., Oguri, N. 1993. In vitro maturation of equine oocytes collected by follicle aspiration and by the slicing of ovaries. *Theriogenology*. 40(5). 959-966.
- Choi, Y. H., Love, L. B., Varner, D. D., Hinrichs, K. 2007. Effect of holding technique and culture drop size in individual or group culture on blastocyst development after ICSI of equine oocytes with low meiotic competence. *Animal Reproduction Science*. 102(1-2). 38-47.
- Irvine, C. H. G. 1981. Endocrinology of the estrous cycle of the mare: applications to embryo transfer. *Theriogenology*. 15(1). 85-104.
- Jacobson, C. C., Choi, Y. H., Hayden, S. S., Hinrichs, K. 2010. Recovery of mare oocytes on a fixed biweekly schedule, and resulting blastocyst formation after intracytoplasmic sperm injection. *Theriogenology*. 73(8). 1116-1126.
- Kanitz, W., Becker, F., Alm, H., Torner, H., 1995. Ultrasound-guided follicular aspiration in mares. *Society for the Study of Reproduction*. 225-231.
- Kanitz, W., Becker, F., Alm, H., Torner, H., Nurnberg, G. 2003. Ovum pick up in horses: Results and consequences for follicular growth and oocyte quality. *Pferdeheilkunde*. 19(6). 670-674.
- Kudláč, E., Elečko, J. (eds.). 1977. *Veterinární porodnictví a gynekologie*. SZN. Praha. 789 s. ISBN: 0705387.
- Landim-Alvarenga, F. C., Fernandes, C. B., Devito, L. G., Derussi, A. A. P., Blanco, I. D. P., Alvarenga, M. A. 2008. New assisted reproductive technologies applied to the horse industry: successes and limitations. *Animal Reproduction*. 5(3/4). 67-82.
- Lapin, D. R., Ginther, O. J. 1977. Induction of Ovulation and Multiple Ovulations in Seasonally Anovulatory and Ovulatory Mares with an Equine Pituitary Extract. *Journal of Animal Science*. 44(5). 834-842.
- Ley, W. B. 2004. *Broodmare Reproduction for the Equine Practitioner*. Teton NewMedia. Jackson, Wyoming. p. 250. ISBN: 1591610117.
- Maclellan, L. J., Carnevale, E. M., Coutinho da Silva, M. A., Scoggin, C. F., Bruemmer, J. E., Squires, E. L. 2002. Pregnancies from vitrified equine oocytes collected from super-stimulated and non-stimulated mares. *Theriogenology*. 58(5). 911-919.
- Mari, G., Barbara, M., Eleonora, I., Stefano, B. 2005. Fertility in the mare after repeated transvaginal ultrasound-guided aspirations. *Animal Reproduction Science*. 88(3-4). 299-308.
- McGeady, T. A., Quinn, P. J., FitzPatrick, E. S., Ryan, M. T. 2013. *Veterinary Embryology*. 2nd ed. Blackwell Publishing. Oxford. p. 392. ISBN: 1118708164.

- McKinnon, A. O., Squires, E. L., Vaala, W. E., Varner, D. D. 2011. *Equine Reproduction*, Vol. 2. 2nd ed. Wiley - Blackwell. Chichester. p. 3132. ISBN: 9780813819716.
- Meintjes, M., Bellow, M. S., Paul, J. B., Broussard, J. R., Li, L. Y., Paccamonti, D., Eilts, B. E., Godke, R. A. 1995. Transvaginal ultrasound-guided oocyte retrieval from cyclic and pregnant horse and pony mares for in vitro fertilization. *Society for the Study of Reproduction*. 281-292.
- Meintjes, M., Graff, K. J., Paccamonti, D., Eilts, B. E., Paul, J. B., Thompson, D. L. Jr., Kearney, M. T., Godke, R. A. 1997. Effects of follicular aspiration and flushing, and the genotype of the fetus on circulating progesterone levels during pregnancy in the mare. *Equine Veterinary Journal*. 29(25). 25-32.
- Mozzaquatro, F. D., Verstegen, J. P., Douglas, R. H., Troedsson, M. H. T., DeLaCorte, F. D., Silva, C. A. M., Rubin, M. I. B. 2010. Luteal function induced by Transvaginal ultrasonic-guided follicular aspiration in mares. *Animal Reproduction Science*. 119(1-2). 56-62.
- Munroe, G. A., Weese, J. S. 2011. *Equine Clinical Medicine, Surgery and Reproduction*. CRC Press. p.1056. ISBN: 1840766085.
- Peres, K. R. 2004. Avaliação do uso do Hormônio Folículo Estimulante equino (eFSH) visando a antecipação da estação reprodutiva e a superovulação de éguas na fase de transição de primavera. *Disertační práce*. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista. 131.
- Pieterse, M. C., Kappen, K. A., Kruip, T. A., Taverne, M. A. M. 1988. Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning of the ovaries. *Theriogenology*. 30(4). 751-762.
- Pilliner, S., Davies, Z. 2013. *Equine Science*. 2nd ed. Blackwell Publishing. Oxford. p. 336. ISBN: 1118703103.
- Purcel, S. H., Sedel, G. E., McCue, P. M., Squires, E. L. 2007. Aspiration of oocytes from transitional, cycling, and pregnant mares. *Animal Reproduction Science*. 100(3). 291-300.
- Reef, V. B. 1998. *Equine Diagnostic Ultrasound*. W.B. Saunders. p. 560. ISBN: 0721650236.
- Ribeiro, B. I., Love, L. B., Choi, Y. H., Hinrichs, K. 2008. Transport of equine ovaries for assisted reproduction. *Animal Reproduction Science*. 108(1 - 2). 171-179.
- Rodriguez, J. S. 2014. Avances en reproduccion asistida en equinos. *Spermova*. 4(2). 168-171.
- Samper, J. C. 2009. *Equine breeding management and artificial insemination*. Elsevier Health Sciences. Missouri. p. 310. ISBN: 1416052348.

- Squires, E. J. 2010. *Applied Animal Endocrinology*. 2nd ed. CABI Publishing. Cambridge. p. 281. ISBN: 1845937554.
- Squires, E. L., Garcia, R. H., Ginther, O. J., Voss, J. L., Seidel, G. E. Jr. 1986. Comparison of equine pituitary extract and follicle stimulating hormone for superovulating mares. *Theriogenology*. 26(5). 661-670.
- Squires, E. L., McCue, P. M. 2007. Superovulation in mares. *Animal Reproduction Science*. 99(1). 1-8.
- Sisson, S., Grossman, J. D., Getty, R. 1975. *Sisson and Grossman's The anatomy of the domestic animals, Vol. 2*. 5th ed. Saunders. Philadelphia. p. 2095. ISBN: 0721641075.
- Vanderwall, D. K., Woods, G. L. 2002. Severe internal hemorrhage resulting from transvaginal ultrasound-guided follicle aspiration in a mare. *Journal of Equine Veterinary Science*. 22(2). 84-86.
- Vogelsang, M. M., Kreider, J. L., Bowen, M. J., Potter, G. D., Forrest, D. W., Kraemer, D. C. 1988. Methods for collecting follicular oocytes from mares. *Theriogenology*. 29(5). 1007-1018.
- Willis, P., Caudle, A. B., Fayrer-Hosken, A. 1991. Equine oocyte in vitro maturation: Influences of sera, time, and hormones. *Molecular Reproduction and Development*. 30(4). 360-368.
- Woods, G. L., Ginther, O. J. 1985. Follicular dynamics in mares treated with an equine pituitary extract. *Theriogenology*. 23(2). 297-308.