

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra veterinárních disciplín



**Česká zemědělská
univerzita v Praze**

Reprodukční výkonnost klisen

Diplomová práce

Bc. Anna Kalousová

Reprodukční biotechnologie

MVDr. Romana Krejčířová, PhD.

© 2021 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Reprodukční výkonnost klisen" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové 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 diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 25. 4. 2021

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala vedoucí práce MVDr. Romaně Krejčířové, za vedení a trpělivost. Za pomoc při sběru dat patří mé díky panu Ing. Radku Tolmanovi. Své rodině a přátelům bych chtěla poděkovat za nekonečnou podporu.

Reprodukční výkonnost klisen

Souhrn

Cílem práce bylo ověřit hypotézu, že na úspěšnost inseminace má vliv velikost ovulačního folikulu, stupeň estrogenizace dělohy, léčba klisny v průběhu říje a typ použité inseminační dávky (ID). Reprodukční záznamy klisen ($n = 312$) byly získány během dvou reprodukčních sezón (2015 a 2016) v rámci jednoho koňského reprodukčního centra.

Prokazatelně lepší výsledky měla inseminace pokud se délka estrálního cyklu pohybovala v rozmezí 18-20 dní a ovulační folikul měřil $4 \pm 0,2$ cm v porovnání s delším estrálním cyklem (≥ 22 dní) a větším ovulačním folikulem ($4,8 \pm 0,6$ cm). Celkově zabřezávaly klisny nejlépe po inseminaci chlazenými a čerstvými ID (52 % a 50 % dle uvedeného pořadí), dobrých výsledků bylo dosaženo i při použití mražených ID (42 %). Estrogenizace dělohy byla hodnocena třemi stupni, přičemž nejlepších výsledků bylo dosaženo při inseminaci na středním a maximálním stupni v hodnotící škále. Při použití chlazené ID zabřezl největší počet klisen s hodnocením dělohy na středním stupni a při inseminaci mraženou ID zabřezávaly nejlépe klisny s edematizací na maximálním stupni hodnocení. Výsledek inseminace byl také ovlivněn jejím načasováním. Klisny inseminované 6-12 hodin před ovulací zabřezávaly lépe než ty, které byly inseminovány v době ovulace. Nejvíce klisen zabřezlo v prvním inseminačním cyklu (60 %) u každého dalšího (2. a 3.) mělo zabřezávání klesající tendenci. Klisny také zabřezávaly výrazně lépe při použití 2 ID než pouze 1 ID v rámci jednoho říjového cyklu. Stimulace ovariálního cyklu (při použití hCG a nebo PGF $_{2\alpha}$) vedla k vyšším počtům zjištěných březostí. Úspěšnost zabřezávání ovlivňovala přítomnost náplně v děloze způsobená inseminací a typ její léčby. Klisny s náplní zabřezávaly hůře než ty bez náplně, a většího počtu březostí bylo dosaženo přeléčením antibiotiky než bez nich.

Výsledky této práce potvrzují stanovenou hypotézu a mohou pomoci inseminačním technikům a veterinárním lékařům v praxi k dosažení co nejlepších výsledků v reprodukci klisen lepším načasováním inseminace při zohlednění edematizace a hormonální stimulace a typem po-inseminační péče.

Klíčová slova: klisna, reprodukce, ovariální dynamika, inseminace, březost

Reproductive efficiency in mares

Summary

The aim of this study was to verify hypothesis that endometrial edema score, hormonal stimulation of estrus cycle, diameter of preovulatory follicle and type of insemination dose (ID) influence pregnancy rate in mares. Records for this study were available from 312 mares in two reproductive seasons (2015 and 2016) in commercial equine reproductive center.

Significantly better results were recorded if the estrous cycle was shorter and the ovulatory follicle was smaller (18-20 days and 4 ± 0.2 cm) than the estrus cycle and the ovulatory follicle was greater (≥ 22 days and 4.8 ± 0.6 cm). Overall, pregnancy rate after insemination with chilled and fresh IDs (52% and 50%, respectively), and good results were also obtained with frozen IDs (42%). Uterine edema was rated with three grade scoring system. Best results were achieved during insemination moderate and strong uterine edema. When using chilled ID, pregnancy rate was higher when uterine score was moderate. Insemination with frozen-thawed ID was most successful when strong uterine edema was present. Pregnancy rate was also affected by timing of insemination. Insemination 6-12 hours prior ovulation led to higher PR than in moment of ovulation. Most mares conceived in the first insemination cycle (60%) and each subsequent one (2nd and 3rd) had a declining trend. The mares also conceived significantly better using 2 IDs than only 1 ID in one oestrus cycle. Using hCG or PGF₂ α led to higher PR than non stimulated cycles. Uterine fluid accumulation and its subsequent treatment had significant influence on pregnancy rates in mares. Pregnancy rate was lower in mares with uterine fluid caused by insemination than in mares without uterine fluid. When antibiotics were added to treatment of uterine fluid PR was higher than in treatment without them.

The results of this work confirm the established hypothesis and can help insemination technicians and veterinarians in practice to achieve the best possible results in the reproduction of mares by better timing with consideration of uterine edema, hormonal stimulation of cycle and type of post-insemination care.

Keywords: mare, reproduction, ovarian dynamics, insemination, pregnancy

Obsah

1 Úvod	9
2 Vědecká hypotéza a cíle práce	10
3 Literární rešerše	11
3.1 Reprodukční orgány klisny	11
3.1.1 Vnější struktury pohlavní soustavy	11
3.1.2 Vnitřní struktury pohlavní soustavy.....	11
3.2 Neurohumorální řízení reprodukce	13
3.2.1 Sekrece a aktivita hormonů	13
3.2.2 Melatonin.....	13
3.2.3 Liberiny a statiny	14
3.2.4 Gonadotropiny.....	14
3.2.5 Estrogeny	14
3.2.6 Progesteron	15
3.2.7 Prostaglandin $F_{2\alpha}$	15
3.2.8 Prolaktin.....	15
3.2.9 Oxytocin	15
3.2.10 Hormonální řízení dynamiky ovariálních struktur	15
3.3 Fyziologie reprodukčního cyklu	16
3.3.1 Sezónnost reprodukce klisny	16
3.3.2 Zimní anestrus.....	17
3.3.3 Jarní přechodné období	17
3.3.4 Estrus.....	17
3.3.5 Ovulace	18
3.3.6 Diestrus	19
3.3.7 Podzimní přechodné období.....	19
3.4 Management reprodukce	20
3.4.1 Inseminace čerstvým spermatem.....	20
3.4.2 Inseminace čerstvým chlazeným spermatem	20
3.4.3 Inseminace mraženým spermatem	21
3.4.4 Náplň dělohy způsobená inseminací	22
3.5 Hormonální stimulace klisny	23
3.5.1 Progesteron	23
3.5.2 Prostaglandin $F_{2\alpha}$	23
3.5.3 Human Chorionic Gonadotrophin (hCG)	24
3.5.4 GnRH	25
3.5.5 Antagonisté dopaminu	25

3.5.6	Estradiol-17 β	26
3.5.7	Oxytocin.....	26
4	Metodika.....	27
4.1	Charakteristika reprodukčního centra	27
4.2	Vyšetřování klisen.....	27
4.3	Monitorované struktury reprodukčního traktu	27
4.4	Inseminace klisen a diagnostika březosti	27
4.5	Reprodukční záznamy klisen	28
4.6	Statistická analýza dat.....	29
5	Výsledky	30
5.1	Celková úspěšnost zabřezávání klisen	30
5.2	Vliv délky estrálního cyklu na velikost ovulačního folikulu a výsledek inseminace 31	
5.3	Úspěšnost zabřezávání s ohledem na typ použité ID	31
5.4	Vliv edematizace dělohy na výsledek inseminace	32
5.5	Vliv typu inseminační dávky a stupně edematizace dělohy na výsledek reprodukce 32	
5.6	Vliv načasování inseminace na zabřezávání	33
5.7	Počet inseminací a velikost ovulačních folikulů a jejich vliv na reprodukci..	33
5.8	Vliv počtu použitých inseminačních dávek na zabřezávání	34
5.9	Vliv aplikace hCG a PGF2 α na výsledek inseminace.....	35
5.10	Vliv výskytu děložní náplně a její léčby na reprodukci.....	35
6	Diskuze.....	37
7	Závěr	43
8	Literatura.....	44
9	Seznam použitých zkratk a symbolů.....	54
10	Samostatné přílohy.....	I

1 Úvod

Reprodukce klisny je v dnešní době velmi komplexní záležitostí. Dříve převážně praktikovaná přirozená plemenitba (PP) je v dnešní době ve vysoké míře nahrazena umělou inseminací (UI). Například u 3. nejpočetnějšího plemene chovaného v České republice, Slovenského teplokrevníka (CS), bylo v letech 2018 a 2019 pouze 28 % klisen zapuštěno PP a 72 % klisen pomocí UI (Kučerová 2020). Technika umělé inseminace však vyžaduje velké množství zkušeností a je časově poměrně náročná. Přináší ale značné množství výhod pro chovatele, jak na straně klisny, tak i hřebce.

Klisnu je nutné pečlivě sledovat a znát její reprodukční historii. V reprodukční sezoně je pak nutné klisnu důkladně vyšetřit a řádně sledovat cyklus. K tomu slouží značné množství přístrojů, technik a postupů. Mezi nejzákladnější z nich patří ultrazvukové vyšetření spolu s palpačním, které ukáže pomocí jednoduché a neinvazivní metody změny na vnitřních orgánech jako jsou vaječníky (přítomnost, velikost folikulů), děloha (stupeň edematizace, přítomnost nahromaděné tekutiny) a děložní hrdlo. Díky tomu lze pozorovat, zda je nález fyziologický, v jaké fázi cyklu se klisna právě nachází a dá se predikovat případná ovulace. Základním předpokladem je sledování říje a jejích projevů, které v první řadě ukážou, že klisna cykluje. V případě, kdy klisna projevuje říji lze správný čas zapuštění klisny odhadnout pomocí tzv. prubování (pozorování chování klisny v přítomnosti hřebce), které může napomoci k odhadu nejvhodnějšího momentu pro inseminaci.

Pro asistovanou reprodukci je správné načasování klíčové, kvůli snížené životnosti a fertilitě spermií v různých typech insemináčnických dávek (ID). Typy ID, které je možné použít jsou čerstvé, chlazené nebo mražené. V případě čerstvého spermatu je klisna bez reprodukčních obtíží inseminována z pravidla po sonografickém vyšetření a pozitivním výsledku prubování. Životnost spermií je u těchto dávek nejdelší. U chlazených dávek je viabilita spermií zkrácena o dobu transportu, a tak je vhodné inseminovat co možná nejbližší ovulaci (Newcombe a Cuervo-Arango 2015). Toho lze dosáhnout precizním a pravidelným sonografickým vyšetřováním případně vhodnou hormonální stimulací. Největší nároky jsou kladeny v managementu inseminace mraženým spermatem. Vybraná klisna pak může být kromě sonografického vyšetření také hormonálně stimulována, aby bylo dosaženo ideálního načasování inseminace vzhledem k ovulaci. Sperma po rozmražení nemá dlouhou životnost v reprodukčním traktu a jeho oplozovací schopnost je oproti předchozím typům dávek výrazně snižena.

2 Vědecká hypotéza a cíle práce

Cílem práce je ověřit hypotézu, že na úspěšnost inseminace má vliv velikost ovulačního folikulu, stupeň estrogenizace dělohy, léčba klisny v průběhu říje a typ použité inseminační dávky.

3 Literární rešerše

3.1 Reprodukční orgány klisny

Reprodukční soustava je dělena na vnější struktury (vulva, pochva, děložní čípek), které tvoří bariéru a chrání vnitřní část reprodukčního traktu (děložní krček, děloha, vejcovody, vaječníky) (Davies Morel 2015). Zvláště stojí orgány hrající roli v hormonální regulaci celé reprodukce (epifýza, hypofýza, hypotalamus) (Brinsko a kol. 2011).

3.1.1 Vnější struktury pohlavní soustavy

Vulva

Zevní části pohlavních orgánů samice jsou vulva a klitoris. Vulva je tvořena dvěma velkými stydkými pysky a dorzální a ventrální spojkou, které dohromady ohraničují stydkou štěrbinu. Stydké pysky jsou kryty kůží s mazovými a aromatickými žlázkami a jemnými chloupky. Kůže přechází ve sliznici ve stydké štěrbině (Červený 2011).

Na stydké pysky navazuje poševní předsíň. Z jejího dna vystupuje tělo poštváčku (klitoris). U říjících klisen vyčnívá klitoris z ventrální komisury při tzv. blýskání, kdy klisna střídavě rozvírá a zavírá stydkou štěrbinu. Dále na dně poševní předsíně ústí močová trubice. Také se zde nachází řady malých žláz produkujících sekret usnadňující kopulaci a zvlhčující porodní cesty. Poševní předsíň je u mladých klisen před prvním připuštěním uzavřena panenskou blanou (hymen). Později po ní zůstane vazivová jizva (Brinsko a kol. 2011)

Pochva

Pochva je vlastním pářícím orgánem samice. Je uložena v dutině pánevní. Jedná se o přibližně 20 cm dlouhou trubici s tenkou pružnou svalovou stěnou. Kraniálně je zakončena děložním krčkem. Stěna pochvy je tvořena hladkou svalovinou. Vnitřní vrstva stěny je pokryta bezžláznatou sliznicí, která má charakter podélných řas, které přechází na děložní čípek. Pochva chrání vnitřní struktury pohlavní soustavy sekretem kyselého charakteru, který působí baktericidně (Červený 2011).

Děložní čípek

Jedná se o zakončení děložního krčku, který je vstupní branou do dělohy. Sliznice čípku je paprskovitě zřasená a tvoří vystouplou růžici se vstupem do děložního krčku. Čípek klisny je velmi výrazný, při kopulaci hřebec přitiskne žalud pyje přímo na čípek a vstříkne sperma přímo do děložního krčku (Davies Morel 2015).

3.1.2 Vnitřní struktury pohlavní soustavy

Děložní krček

U klisny je 6-7 cm dlouhý hladkosvalový válcovitý útvar. Je velmi účinnou bariérou proti vstupu infekce z pochvy do dělohy. Sliznice kanálu děložního krčku vybíhá do vysokých podélných řas a celý je vyplněn hustým hlenem. Na vrcholu říje mírně ochabuje svalovina krčku

a mění se hustota hlenu, takže jím mohou projít spermie, případně inseminační pipeta. Děložní krček se plně otevírá pouze během porodu, kdy je součástí porodních cest (Brinsko a kol. 2011).

Děloha

Je dutina tvořená tělem děložním dlouhým přibližně 20 cm, a dvěma děložními rohy o délce asi 25 cm, které navazují na vejcovody. Velikost dělohy se také odvíjí od stáří a parity klisny, kdy starší a vícenásobné matky mívají dělohu větší. Děložní rohy a tělo jsou uloženy v dutině břišní, krček v dutině pánevní.

Stěna dělohy je tvořena ze tří vrstev. Vnější perimetrium, je tvořeno řídkým vazivem, navazující na pobřišnici širokými děložními vazy. Cévní zásobení dělohy je zajištěno třemi tepnami na každé straně: děložní větev vaginální tepny, děložní tepna a ovariální tepna. Ovariální tepna kopíruje ovariální žílu a děložní větev ovariální žíly (Brinsko a kol. 2011).

Střední vrstva, myometrium, je tvořena dvěma vrstvami hladkého svalstva oddělených řídkým vazivem protkaným bohatou sítí cév a nervů. Vnitřní vrstva hladkého svalstva je silnější s kruhovou orientací. Vnější vrstva hladké svaloviny má podélné uspořádání. Právě díky tomuto uspořádání myometria je děloha schopná tak významného roztažení během březosti a poskytuje značnou sílu pro děložní stahy během porodu (Davies Morel 2015).

Vnitřní vrstva dělohy, endometrium, je silná slizniční vrstva krytá cylindrickým epitelem. Je uspořádáno do 12-15 podélných řas. Na povrch děložní sliznice ústí četné rozvětvené tubulární žlázy. Děložní sliznice, včetně děložních žláz, prochází v průběhu říjového cyklu a stárnutí samice typickými změnami. V době říje vykazuje překrvení a zvýšenou sekreční aktivitu. Právě endometrium je zodpovědné za podporu vývoje plodu a za vývoj a napojení placenty (Davies Morel 2015; Červený 2011).

Vejcovody

Děložní roh přechází uterotubulárním spojením ve vejcovod. Vejcovod je párovou trubící spojující dělohu s vaječníky dlouhou až 30 cm. Průměr vejcovodu se rozšiřuje směrem k vaječníku. V oblasti tzv. isthmus, při vstupu do dělohy, má průměr pouhých 2-5 mm. Plynule se rozšiřuje až na 5-10 mm v ampuli vejcovodu (střední úsek). Vejcovod je zakončen nálevkou s fimbriemi poměrně těsně naléhajícími k vaječníku. Ty mají za úkol pomoci zachytit ovulované vajíčko. Vejcovod probíhá klikatě v závěsu vejcovodu okrajem děložního vazu. Sliznice tvoří vysoké řasy vyplňující téměř celý prostor vejcovodu. Je kryta cylindrickým epitelem s řasinkami, které zajišťují pohyb vajíčka a tekutiny směrem do dělohy. Epitel vystýlající vejcovody se mění v průběhu říjového cyklu (Brinsko a kol. 2011; Davies Morel 2015).

Vaječníky

Vaječník je párovým orgánem produkujícím samičí gamety (vajíčka), ale zároveň orgánem s endokrinními funkcemi. Má fazolovitý tvar s výraznou prohlubní tzv. ovulační jamkou. Vaječník klisny má odlišnou stavbu. Vrchní vrstvu tvoří tzv. dřev vaječníku, která je prostoupena cévami a nervy. Pod ní je kůra vaječníku, v níž jsou do vaziva zanořeny vaječnickové folikuly v různém stádiu vývoje. Kůra vystupuje k povrchu vaječníku pouze

v prohlubni ovulační jamky, kde také přiléhá nálevka vejcovodu. Celý vaječník, vyjma ovulační jamky, je obalen tenkou vrstvou bělavého kolagenního vaziva (Červený 2011).

Velikost vaječníku se může výrazně lišit v závislosti na věku, paritě a ročním období (Brinsko a kol. 2011). Mimo reprodukční období a u mladých klisen bývají vaječníky nejmenší - 2-4 cm dlouhé, 2-3 cm široké a jsou velmi tuhé. V připouštěcím období se pak mohou zvětšit na 6-8 cm v délce a 3-4 cm v šíři. Vaječníky starších klisen pak mohou měřit až 10 cm na délku (Davies Morel 2015).

3.2 Neurohumorální řízení reprodukce

Činnost organismu je řízena a koordinována nervovou soustavou spolu s endokrinním systémem. Ty se v řízení vzájemně doplňují. Jejich hlavní spolupráce spočívá v regulaci produkce hormonů hypotalamu, který ovlivňuje další struktury, dále také v kombinaci nervové a endokrinní odpovědi na různé stimuly a v neposlední řadě v kontrole endokrinní sekrece nervovou soustavou. Rychlost hormonální odezvy endokrinního systému je pomalejší, ale má delší dobu působení (Cibulka a kol. 2004).

Hormony jsou velmi různorodé chemické látky. Většina patří mezi polypeptidy a glykoproteiny. Počet aminokyselin v molekule je značně variabilní (3-200). Další skupinou jsou hormony steroidní odvozené od cholesterolu, aminy odvozené od aminokyselin a poslední skupinu tvoří hormony odvozené od nenasycených mastných kyselin (Goff 2015).

Uvolněné hormony cirkulují krví po těle. Odezvu vyvolají pouze u cílových buněk. Ty jsou vybaveny specifickými receptory, na které je schopen se daný hormon navázat. To vyvolá změnu v aktivitě buňky. Ta převážně spočívá v regulaci aktivity enzymů (Goff 2015).

Hormonální řízení reprodukce je hierarchicky uspořádáno v hypotalamo-hypofyzo-gonadální systém. Hypotalamus řídí svými působky hypofýzu, která následně ovlivňuje gonády a další orgány (Kittnar 2011).

3.2.1 Sekrece a aktivita hormonů

Sekrece hormonů je regulována humorálně a nervově na základě zpětné vazby, kdy odpověď organismu na hormon zpětně ovlivňuje jeho tvorbu. Zpětná vazba může být zprostředkována různými mechanismy např. hladinou daného hormonu v krvi, změnou koncentrace chemických sloučenin nebo iontů v extracelulární tekutině. Někdy mohou být uvolněny jako reakce na nervový podnět, jindy jsou řízeny hormony z jiné endokrinní žlázy.

Zpětná vazba může být pozitivní, kdy se produkce hormonu zvyšuje. Daleko častější je však zpětná vazba negativní, kdy se sekrece snižuje.

Prakticky všechny hormony jsou uvolňovány v pulzech. Změny charakteru pulzů odrážejí specifické fyziologické stavy (Morresey 2011a).

3.2.2 Melatonin

Epifyza neboli šišinka je součástí mezimozku. Je to endokrinní žláza produkující hormon melatonin. K sekreci melatoninu dochází za tmy, světlo inhibuje jeho syntézu a uvolňování.

Melatonin ovlivňuje sekreci hormonů z hypotalamu a ovlivňuje tak celý reprodukční systém. Jeho zvýšená hladina během zimních měsíců potlačuje pohlavní činnost. (Vácha a kol. 2004).

3.2.3 Liberiny a statiny

Hypothalamus je velmi malá část mozku, ale oblasti jeho působení jsou velmi rozmanité. Má za úkol regulaci tělesné teploty, příjmu potravy a tekutin, regulace sexuálního chování, emocí, reguluje cirkadiánní rytmy, je nadřazenou strukturou autonomního nervového systému a hormonální regulace. Je těsně propojen s hypofýzou (předním lalokem), kterou ovlivňuje produkovanými liberiny (RH) a statiny (IH) (Halász 2004; Cibulka a kol. 2004).

Pro řízení reprodukce je významný Gonadotropin releasing hormon (GnRH), který přímo působí na hypofýzu. Jeho pulzní uvolňování podporuje sekreci folikulostimulačního hormonu (FSH), která podporuje vývoj folikulů během folikulární fáze estrálního cyklu. Uvolňování při vyšší frekvenci ale nízké amplitudě pulzů vede k náhlému zvýšení hladiny luteinizačního hormonu (LH), což způsobí ovulaci a nástup luteální fáze. Bylo prokázáno, že naopak konstantní sekrece GnRH vede k potlačení sekrece LH a FSH z hypofýzy. K obnově dojde při opětovném pulzativním vylučování GnRH (Alexander a Irvine 2011a).

3.2.4 Gonadotropiny

Folikulostimulační hormon (FSH) a luteinizační hormon (LH) ovlivňují funkce vaječnicků. Jsou produkovány hypofýzou, která je umístěna těsně pod hypotalamem. Oba jsou řízeny jediným liberinem z hypotalamu – Gonadotropin uvolňujícím hormonem (GnRH). Různé sekrece FSH a LH je dosaženo různými frekvencemi a amplitudou pulsů GnRH. Uvolňování GnRH je řízeno na základě zpětné vazby hladinou pohlavních hormonů. Zvyšující se koncentrace estrogenů snižují vnímavost hypofýzy na GnRH a tím se zvyšuje uvolňování gonadotropinů. Progesteron naopak snižuje citlivost hypofýzy na GnRH a produkce gonadotropinů tak klesne (Alexander a Irvine 2011b).

Hlavní funkcí FSH u samic je stimulace růstu folikulů a tím růst a zrání vajíček (oogeneze) a produkce estrogenů.

LH se uplatňuje při ovulaci zralých folikulů a následném vývoji žlutého tělíska (tedy luteinizaci granulózy) (Goff 2015).

3.2.5 Estrogeny

Jsou skupinou steroidních hormonů odvozených od cholesterolu. Produkovány jsou převážně vaječnickými (konkrétně buňkami Graafova folikulu) (Vácha a kol. 2004), ale také placentou a žlutým tělískem v období březosti nebo kůrou nadledvin. Mezi nejvýznamnější hormony z této skupiny patří estradiol, estron a estriol. Účinky těchto hormonů spočívají ve stimulaci buněčné proliferace a růstu tkání spojených s reprodukcí. Působí na myometrium a zvyšují jeho citlivost na oxytocin. Stimulují růst žláz endometria a zvyšují jejich sekreční aktivitu. Během říje ovlivňují konzistenci cervikálního hlenu a změnu na poševním epitelu,

který pod jejich vlivem proliferuje a rohovatí. Estrogeny jsou odpovědné za sexuální chování a vývoj samičích sekundárních pohlavních znaků (Hafez a kol. 2000).

3.2.6 Progesteron

Je stavbou podobný estrogenům. Je produkován především žlutým tělískem na vaječníku, dále také placentou a kůrou nadledvin. Jeho úkolem je zajistit vhodné prostředí reprodukční soustavy pro přijetí oplozeného vajíčka a zajistit udržení březosti a brání zrání dalších folikulů. Hlavním cílovým orgánem pro působení progesteronu je děloha. Stimuluje růst žláz endometria a podporuje jejich aktivitu. Jejich výměšky poskytují výživu vyvíjejícímu se embryu před nidací. Také snižuje vnímavost myometria vůči oxytocinu a tím zabraňuje jeho stahům což přispívá k udržení březosti (Vanderwall 2011).

3.2.7 Prostaglandin F_{2α}

Prostaglandiny jsou strukturálně odvozeny od kyseliny arachidonové. Je jich značné množství a mají různý původ. Obecně působí jen velmi krátce a lokálně. PGF_{2α} je sekretován buňkami děložní sliznice a způsobuje prasknutí ovulačního folikulu a regresi žlutého tělíska (Stout 2011).

3.2.8 Prolaktin

Prolaktin nebo také LTH je produkován adenohipofýzou a podílí se na zahájení a udržení laktace po porodu. Sekrece prolaktinu je tlumena estrogeny a progesteronem. Hladina LTH koreluje s délkou dne. Koncentrace prolaktinu je vyšší během léta než v zimě. Podle všeho má také vliv na metabolismus ve smyslu zvýšení efektivity konverze krmiva v nepříznivém období (zima, nedostatek potravy) (Evans a kol. 1991). Zvýšená produkce prolaktinu je také během přípuštěcí sezony. Zvýšení hladiny prolaktinu je spojeno s první ovulací, a tedy ukončením jarního přechodného období (Morresey 2011).

3.2.9 Oxytocin

Produkce oxytocinu je situována v hypotalamu a neurohypofýze. V určitém množství je ale také produkován gonádami a placentou. Oxytocin má velmi široké spektrum působení. Typicky stimuluje hladkou svalovinu dělohy během porodu a uvolňování mléka během laktace. U klisen stejně jako u krav se podílí na maternálním rozpoznání březosti (Morresey 2011b).

3.2.10 Hormonální řízení dynamiky ovariálních struktur

Vývoj ovariálních folikulů je dynamický proces charakterizovaný výraznou proliferací a diferenciací folikulárních buněk majících optimální podmínky pro zrání oocytů. Folikulární vývoj má vlnový charakter a u klisen pozorujeme v průběhu jednoho cyklu zpravidla 1-2 majoritní folikulární vlny. Folikulární vlna je popisována jako synchronní růst skupiny folikulů (6-10) do chvíle, než jeden z nich (někdy dva, výjimečně více) nedosáhne určitého průměru

a stane se tzv. dominantním folikulem. Tento vybraný folikul dále roste (průměr >30 mm) dokud, v případě minoritní folikulární vlny, nedojde k jeho regresi nebo ovulaci, v případě majoritní folikulární vlny. Ostatní folikuly dané kohorty atretují (Ginther 1993). První růstová vlna se objevuje přibližně v době ovulace a druhá asi kolem 10. dne po ovulaci. To koreluje s dvoufázovým uvolněním FSH, který je zodpovědný za stimulaci vývoje folikulů (Raz a kol. 2012).

V případě majoritní folikulární vlny dochází přibližně 6 dní po jejím vzniku k odchylce související s rozdílnou rychlostí růstu preovulačního folikulu (22,5 mm) a zbylých folikulů (19 mm) (Donadeu a Ginther 2002). Preovulační folikul začíná produkovat inhibin, který snižuje sekreci FSH což znemožní růst zbylých folikulů. Dominantní folikul však nadále roste konstantní rychlostí 2-3 mm denně, dokud nedosáhne velikosti 40 mm kdy má zvýšenou citlivost pro LH (Ginther 2000). Produkce steroidních hormonů vaječníky je vázána na thecu folliculi a buňky granulózy. V antrálním folikulu se zvyšuje množství receptorů pro FSH i LH. Uvolňující se LH z hypofýzy se váže na receptory a zahájí tak přeměnu cholesterolu na estradiol. Produkce estradiolu má pozitivní zpětnou vazbu na LH a tvorbu dalších receptorů pro LH. V tu chvíli dosahuje oocyt závěrečné fáze zrání (Gastal 2009).

Oocyt dominantního folikulu znovu zahajuje meiózu přibližně ve chvíli, kdy dosáhne 80 % své finální velikosti. Klisny ovulují oocyt, stejně jako jiní savci, v metafázi II. Pod vlivem LH dochází ke zvýšení propustnosti kapilár vnitřní théky a ta začne být edematózní, tím se ve vaječnicku zvýší produkce prostaglandinů. Jejich úkolem je stimulace syntézy a aktivity kolagenázy, která naruší stěnu folikulu a dojde k jejímu prasknutí a uvolnění vajíčka.

Produkce LH neustále stoupá a vrcholu dosahuje přibližně 1-2 dny po ovulaci. V oblasti po ovulovaném folikulu se začne pod vlivem LH vytvářet CL. Buňky granulosa a théky začnou zvětšovat svůj objem a přeměňovat se tak v buňky luteinové. Vlivem koncentrace lipidových kapek dochází k charakteristicky nažloutlému zbarvení a mění se i organelová výbava, kdy změněné buňky vykazují steroidní aktivitu (Gérard a Robin 2019).

3.3 Fyziologie reprodukčního cyklu

Estrální cyklus je soubor změn na pohlavním aparátu provázený změnami projevů chování. Definován je jako období od ovulace do ovulace následující. Podléhá mnoha vlivům. Celý cyklus u klisen trvá průměrně 21-22 dny (až 25 dnů u klisen typu pony). Během cyklu popisujeme fáze folikulární (estrus) a luteální (diestrus) (Raz 2012). Délka diestru je relativně neměnná 14-15 dnů a není ovlivněna ročním obdobím na rozdíl od estru. Růst antrálních folikulů na vaječnicích má u klisen vlnový charakter, jehož podoba je ovlivněna faktory jako jsou fáze cyklu, roční období, věk, plemeno, výživa (Davies Morel 2003).

3.3.1 Sezónnost reprodukce klisny

Klisny patří do skupiny polyestrických zvířat s výraznou pohlavní sezónností. To znamená, že se reprodukční aktivita v závislosti na ročním období mění. Vše závisí na produkci melatoninu šišinkou, jehož vyšší koncentrace inhibuje vylučování GnRH z hypotalamu a tím

brzdí reprodukční pochody. Syntéza melatoninu se snižuje spolu s prodlužujícími se dny (tedy na jaře), a naopak koncem léta se zkracujícími se dny zvyšuje (v případě severní polokoule). Pokud klisna během sezóny nezabřežne přejde na podzim do období pohlavního klidu tzv. zimního anestrus a na jaře opět pod vlivem fotoperiody přejde do reprodukční sezony s pravidelným cyklem (Nagy a kol. 2000).

3.3.2 Zimní anestrus

Navození anestrus je způsobeno vnímáním zkracujících se dnů, výraznějšího působení melatoninu a tím sníženou produkcí GnRH (Freedman a kol. 1979). Od pozdního podzimu do časného jara je klisna v tzv. zimním anestrus, kdy je pozastavena cyklická činnost reprodukční soustavy. Na vaječnicích v tomto období nedozrávají žádné folikuly. Díky tomu nedochází ani k produkci estrogenu. Růst a regrese folikulů větších než 10 mm pokračuje nezávisle na uvolňování GnRH, v krvi totiž může cirkulovat určité množství FSH. Podle Donadeua a Ginthera (2003) zůstává zachován i vlnový charakter růstu folikulů. U některých klisen, v závislosti na managementu a tělesné kondici, může být zachována nejen cyklická aktivita, ale i typické chování doprovázející říjí. Folikuly mohou dosahovat i 25 mm, ale neovulují (Newcombe 2007).

3.3.3 Jarní přechodné období

Jarním přechodným obdobím označujeme dobu konce zimy a časného jara. Prodlužující se dny vyvolají hormonální změny. Sníží se produkce melatoninu, který řídí aktivitu hypotalamo-hypofyzo-gonadální osy, a tím dojde k navýšení produkce gonadotropin uvolňujícího hormonu (GnRH) v hypotalamu, který řídí produkci folikulostimulačního hormonu (FSH) a luteinizačního hormonu (LH) hypofýzy. Během jarního přechodného období dorůstají průměrně 3-4 velké folikuly (<30 mm), které ovšem neovulují. To bývá spojeno s hormonální nerovnováhou, kdy je už vysoká hladina FSH, ale zatím nízká hladina LH (Donadeu a Watson, 2007). Tyto dominantní folikuly přechodného období však tvoří výrazně nižší množství estradiolu a progesteronu než preovulační folikuly v připouštěcí sezóně. Z toho důvodu se v přechodném období projevují říje nepravidelně, bývají spíše kratší a typické říjové chování se plně neprojevuje. Přechodné období je ukončeno plnohodnotnou říjí a ovulací. Pomocným ukazatelem blížící se ovulace je vysoký stupeň edematizace dělohy. (Palmer 1978). Během přechodného období může edematizace endometria přetrvávat i několik dní až týdnů bez výraznějších změn. V mnoha případech může docházet i k mírnému hromadění tekutiny v děloze vlivem silného prokrvení.

Délka tohoto období je ovlivněna také dalšími faktory jako jsou teplota prostředí, výživový stav a kvalita potravy. Ustálení cyklu může trvat 2-3 měsíce, během nichž se zvyšuje počet a průměr (25-35 mm) folikulů přítomných na vaječnicích (Watson a kol. 2003).

3.3.4 Estrus

Estrus neboli říje je charakterizována jako období závěrečného růstu folikulu, kdy buňky granulózy preovulačního folikulu produkují největší množství estrogenu, což vede k typické

změně chování a projevům říje. Začíná přibližně v době, kdy dominantní folikul dosáhne 25 mm v průměru. Jeho růst se zastaví 1-2 dny před ovulací, tou dobou subordinátní folikuly také zastavují růst a regredují. Říje může mít velmi variabilní dobu trvání. V tomto období je klisna svolná k páření, dalšími indikátory mohou být časté močení, rytmické obnažování klitoris (blýskání) nebo často zvednutý ocas. Její reprodukční trakt je připraven přijmout spermie a dopravit je do vejcovodů k oplození vajíčka. Na vaječniku je přítomen preovulační folikul, který může být na pohmat měkký. K ovulaci dochází přibližně 3-6 dní po zahájení říje (McCue 2014).

Predikce ovulace může být zpřesněna typickým obrazem stupně zduření děložní sliznice. Nejčastěji je proto užívána stupnice subjektivního hodnocení 0-5 (0 – žádné zduření, 4 – maximální fyziologické zduření, 5 – abnormální nález) (McCue 2014c).

V děloze se vlivem zvýšené koncentrace estrogenů zvyšuje propustnost cév a může se tak tvořit náplň v těle z transudátu. Během říje je poměrně běžné určité množství nahromaděné tekutiny uvnitř dělohy. Pokud je toto množství větší, je vhodné udělat kultivaci a klisnu před připouštěním přeléčit. Reilas a kol. (1997) ve své studii uvádí, že hromadění tekutiny se objevuje v menší míře (přibližně o polovinu) u klisen mladších 7 let než u klisen starších. Uvádí také, že u více než poloviny klisen, měla nahromaděná tekutina pozitivní bakteriologický nález, přičemž se u jednotlivých klisen jednalo o 1 až 10 kultur, a ne všechny byly patogenní (Reilas a kol. 1997).

Během estru se zvyšuje kontraktilita myometria. Celá děloha je uvolněná, endometrium je silně edematózní. Děložní krček je zkrácený a široký, uvolněný, silně prokrvený (Brinsko a kol. 2011).

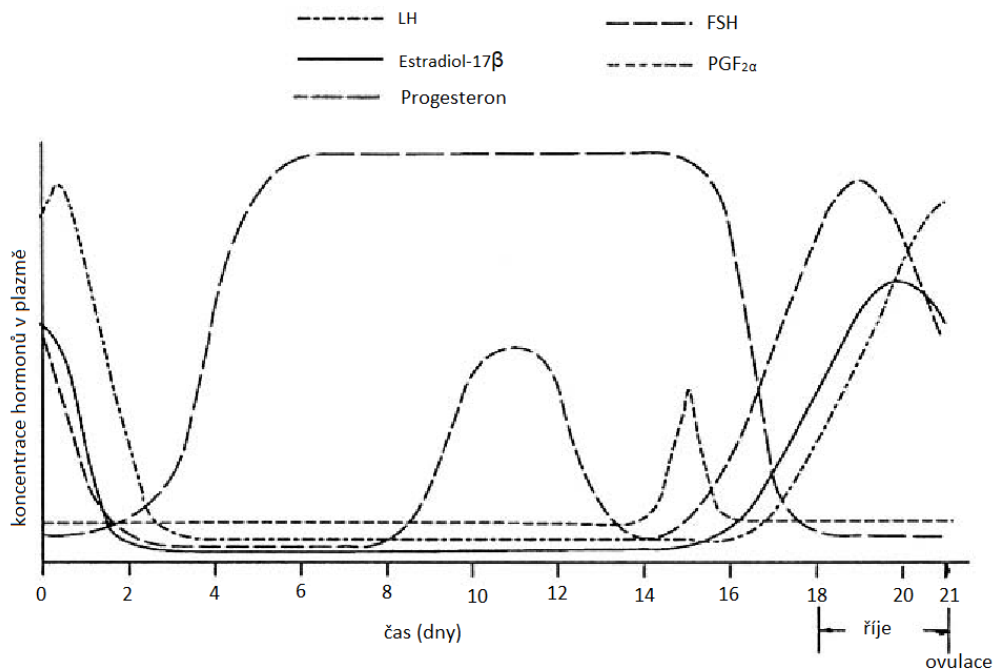
3.3.5 Ovulace

Před ovulací se zvyšuje frekvence sekrečních pulzů LH. Ten je zodpovědný za ovulaci a následný vznik corpus luteum (CL). Během ovulace praskne ovulační folikul (>30 mm). Velikost ovulačního folikulu se z pravidla pohybuje v rozpětí 40-45 mm (Bergfelt a Adams 2007). Studie uvádí rozpětí mezi 30-70 mm v závislosti na plemeni, fázi reprodukčního období nebo přítomnost většího počtu ovulačních folikulů. Folikuly v období jara mohou být o 5-8 mm větší než ve zbytku připouštěcí sezony a o 4-9 mm menší v případě vícenásobné ovulace (Shirazi a kol. 2002; Davies-Morel a kol. 2010). Vajíčko obalené kumulárními buňkami je zachyceno nálevkou vejcovodu a díky řasinkovému epitelu je spolu s tekutinou posouváno až k místu oplození. Jakmile dojde k ovulaci, koncentrace estrogenu klesne na bazální hodnotu a v tu chvíli mizí i typické říjové chování klisny. V den ovulace také mizí zduření endometria, stává se tak ale i den nebo dva před samotnou ovulací.

Buňky žlutého tělíska produkují progesteron, který působí negativní zpětnou vazbou na sekreci GnRH. V případě oplodnění zůstane CL zachováno. Pokud klisna nezabřezne, CL se kolem 15. dne vlivem PGF_{2α}, produkovaného endometriem, rozpadne a cyklus pokračuje (Davies Morel 2015).

3.3.6 Diestrus

Během diestrus klisna hřebce odmítá, je až nepřátelská. Na vaječniku lze po ovulovaném folikulu pozorovat CL. Na počátku diestrus dochází vlivem progesteronu k proliferaci epitelu a děloha se chystá k implantaci embrya. Děložní krček je v tuto dobu podlouhlý, tuhý a pevně uzavřen. Pokud nedojde k oplodnění endometrium vyšle signál v podobě produkce $\text{PGF}_{2\alpha}$, který zapříčiní rozpad CL. Folikulární vlna se objevuje pod vlivem FSH, v případě klisen s jedinou folikulární vlnou během cyklu, přibližně 10 dní po ovulaci (viz obrázek 1). V případě dvou folikulárních vln se první objevuje na konci říje nebo začátkem diestrus. Fáze diestrus končí regresí žlutého tělíska, zahájením dozrávání nového dominantního folikulu, tedy počátkem nové říje (Brinsko a kol. 2011).



Obrázek 1 Schéma relativní koncentrace hormonů v plazmě během estrálního cyklu klisny (Davies Morel 2015).

3.3.7 Podzimní přechodné období

Na podzim reprodukční aktivita ustává. Se zkracujícími se dny se zvyšuje produkce melatoninu čímž se snižuje produkce GnRH. Vlivem toho dochází oproti reprodukční sezóně k prodloužení a slábnutí říjí, popřípadě k tzv. tichým říjím. Může docházet k vývoji velkých folikulů (vlivem dostatečné hladiny FSH), které ale nejsou schopny z důvodu nedostatku LH ovulovat. V jiném případě může folikul ovulovat, ale nové folikuly už se na vaječniku nevyvíjejí. Kvůli snížené hladině $\text{PGF}_{2\alpha}$ na vaječniku zůstává CL déle a tím dochází k prodloužení luteální fáze cyklu (Sharp 2011). Regaluce sezónních změn není podle nedávných studií řízena pouze melatoninem nýbrž i neurotransmitery jako opoidy a katecholaminy (Nagy a kol. 2000).

3.4 Management reprodukce

Přirozená plemenitba ve své původní podobě hřebce, který „obhospodařuje“ své stádo chovných klisen, se v Evropě prakticky nevyužívá. U nás má přirozená plemenitba podobu pouštění tzv. z ruky, kdy je klisna i hřebec pod maximální kontrolou. Chovatel má úplný přehled o využití hřebce v dané sezóně, zapuštění klisny a v neposlední řadě dochází k minimalizaci rizika zranění zvířat. Hřebec však může během připouštěcí sezóny připustit jen velmi omezený počet klisen, které za ním musejí převážně cestovat. Pro majitele žádaného hřebce nebo sportovně využívaného je tato metoda nevýhodná. Proto je v dnešní době daleko častěji v reprodukci koní používána umělá inseminace. Klisny se inseminují spermatem čerstvě odebraným, chlazeným a mraženým. Výhodou je maximální využití hřebce v sezóně, a to i aktivně sportujícího, jehož gamety se dají uchovat mražením a není nutné je použít ihned, využití většího množství hřebců po celém světě. Na straně majitele klisny odpadá transport za hřebcem, který může být výrazným stresorem a ovlivnit tak výsledky reprodukční snahy (Berghold 2007). Dále jsou to snížení rizika zranění během aktu a v neposlední řadě se eliminuje přenos pohlavních chorob.

3.4.1 Inseminace čerstvým spermatem

Ejakulát je po odebrání pročištěn, adekvátně zředěn a dávka je tak připravena k okamžité aplikaci v místě odběru. Měla by být alespoň 30 minut inkubována, při teplotě 37 °C, aby mohla antibiotika v ředícím roztoku začít plně působit. Po celou dobu manipulace je nutné udržovat teplotu 35-38 °C jak spermatu, tak veškerého náčiní, které s ním přijde do styku, jinak by mohlo u spermií dojít k teplotnímu šoku a byla by snížena jejich oplozovací schopnost. Zředěné čerstvé sperma je schopné si svoji oplozovací schopnost udržet až 12 hodin při skladování v temnu a pokojové teplotě.

Inseminační dávka by měla obsahovat mezi 250-500 miliony spermií s progresivní motilitou a normální morfologií. Objem by se měl pohybovat mezi 5 a 60 ml.

Čerstvým spermatem je ideální inseminovat 24-36 hodin před ovulací (Ley, 2004). Squires a kol. (2006) však ve své studii zaznamenal větší úspěšnost při inseminaci v rozmezí 6-12 hodin po ovulaci přibližně o 20 %. Dávka je deponována sterilní pipetou skrz děložní krček do těla dělohy. Při použití kteréhokoliv komerčně dostupného ředidla má hřebčí sperma velmi dobrou přežitelnost v děloze klisny. Opakovaná inseminace, v případě že folikul neovuloval, je vhodná po 48 hodinách.

Úspěšnost inseminace čerstvým spermatem je relativně vysoká. Lewis a kol. (2015) uvádí ve své studii úspěšnost 63 % a Squires a kol. (2006) 60 %.

3.4.2 Inseminace čerstvým chlazeným spermatem

Odebrané sperma je vyšetřeno, přefiltrováno a upraveno ředidly, které mají za úkol chránit sperma mimo reprodukční trakt. Nejčastěji používaná ředidla jsou na bázi vaječného žloutku nebo sušeného mléka. Následně je sperma rozděleno na odpovídající objem při zachování množství spermií a postupně zchlazeno na teplotu 5-8 °C. Potom jsou dávky uloženy

do chladících boxů a expedovány. Použity by měly být do 12-48 hodin, výjimečně až 72 hodin u velmi plodných hřebců (Brinsko a kol. 2011).

Koncentrace spermií s progresivním pohybem v inseminační dávce by měla být 25-50 milionů v 1 mililitru. Celá dávka má objem mezi 10-20 ml.

Životnost chlazeného spermátu v reprodukčním traktu klisny je o něco kratší než čerstvého, vzhledem k době přepravy. Proto je vhodné klisnu inseminovat 12-24 hodin před ovulací. Inseminační dávku není nutné před aplikací ohřívat. Cílem je klisnu inseminovat pouze jednou (Ley 2004), Squiers a kol. (2006) však zaznamenal vyšší úspěšnost, když klisny alespoň jednou reinseminoval po 24 hodinách.

Oplozovací schopnost chlazeného spermátu je průměrně kolem 65 % (Morrell a kol. 2014), ale může docházet k výkyvům 43–71 % (Sieme a kol. 2003). Rozdíly mohou být značné v závislosti na klisně, technice inseminace a typu použitého ředidla (Dell'Aqua Jr. a kol. 2018).

3.4.3 Inseminace mraženým spermatem

Odebrané sperma je zředěno a centrifugováno pro oddělení spermií. Ke spermiím je následně přidána ředící složka s proteiny a kryoprotektivy. Poté jsou rozděleny do malých pejet o objemu 0,25 nebo 0,5 ml, které jsou následně zchlazeny až na -196 °C. Inseminační dávka je pak nadále uchovávána a přepravována v kontejneru s tekutým dusíkem který tuto teplotu zachová. Po rozmrazení ve vodní lázni o teplotě 37 °C a po osušení pejety je dávka připravena k okamžitému použití.

Inseminační dávka by měla obsahovat minimálně 30-35 % progresivně motilních spermií bez morfologických odchylek o celkovém počtu alespoň 600 milionů po rozmrazení. Norma ale není oficiálně stanovena.

Vhodnou adeptkou pro inseminaci mraženým spermatem je klisna mladší 10 let, s dobrou reprodukční historií. Měla by vykazovat kvalitní říji, mít dělohu znatelně edematózní a na vaječníku přítomný dominantní folikul >35 mm, ideálně bez tendence hromadit tekutinu v děloze. Niamh a kol. (2015) ve své studii uvádí, že klisny mladší 11 let, zabřezávají po použití mraženého spermátu lépe (53 %) než klisny starší. Ta samá studie uvádí, že úspěšnost při užití mraženého spermátu je vyšší (48,6 %), pokud klisna před inseminací nevykazuje nahromaděnou tekutinu v děloze. V takovém případě je úspěšnost 34,5 %.

Klisnu je před inseminací vhodné pravidelně vyšetřovat po 6-12 hodinách pro správný odhad momentu ovulace. Pro přesnější načasování je možné klisnu vhodně hormonálně stimulovat (Sanchez a kol. 2009). Inseminace by měla proběhnout pouze jednou během říje a to ideálně 6 hodin před ovulací anebo do 6 hodin po ovulaci. Spermie ošetřeny kryoprotektivy mají sníženou přežitelnost v reprodukčním traktu klisny.

Standardně probíhá inseminace do těla dělohy. U mraženého spermátu lze využít i další techniky inseminace jako inseminaci do rohu děložního pod kontrolou z rekta, hysteroskopicky nebo endoskopicky. Tato metoda je výhodná při celkovém počtu spermií nižším než 5 milionů. Rigby a kol. (2000) ve své studii uvádí, že více spermií (77,3 %) se dostalo do vejcovodu při inseminaci do rohu děložního než při inseminaci do těla dělohy (53,8 %).

Úspěšnost zabřezávání po inseminaci mraženým spermatem je průměrně kolem 50 % (Samper a kol. 2007).

3.4.4 Náplň dělohy způsobená inseminací

Tekutina v děloze po přípuštění (inseminaci) je fyziologická. Má za úkol vyčistit dělohu od zbytku spermatu, bakterií a jiných cizorodých látek. Hromadění tekutiny v děloze, které přetrvává delší dobu je jedním z důvodů snížené plodnosti klisen. Snižuje životaschopnost a pohyblivost spermií (Reilas a kol. 1997), tvoří nevhodné prostředí v děloze pro vyvíjející se zárodek, je ideálním kultivačním médiem pro případně zavlečené bakterie a v některých případech může být důvodem pro přetrvávající endometritidu a zapříčinit tak dřívější rozpad CL.

Pro klisny trpící opakovanými záněty dělohy nebo endometritidou vyvolanou připouštěním je vhodnou alternativou přirozené plemenitby inseminace čerstvým spermatem. Ať už je klisna zapouštěna přirozenou cestou nebo pomocí umělé inseminace, je semeno vždy deponováno do dělohy a s ním i komponenty inseminační dávky a případně i bakterie. To vše může vyvolat akutní zánět. Zánětlivou reakci v děloze spojenou s inseminací však způsobují samy spermie častěji než bakterie. Spermie se rychle transportují do vejcovodů, ale jen malý počet z nich dosáhne místa, kde dojde k oplodnění. Větší část z nich zůstává v děloze, kde vyvolají akutní zánětlivou reakci (Pycocok 2007). Tekutina je velmi často bez bakteriálního nálezu a bez nebo s jen velmi malým počtem leukocytů.

Predisponujícími faktory pro hromadění tekutiny v děloze jsou snížená schopnost kontraktility myometria dělohy, veliká, ochablá děloha, nedostatečná lymfatická aktivita a dysfunkční děložní krček. Standardně jsou klisny schopny vypudit obsah dělohy poměrně krátce po inseminaci, náchylnější klisny zadržují tekutinu i více než 12 hodin po páření nebo inseminaci (Barbacini a kol. 2003).

Je obecně známo, že inseminace mraženým spermatem vede k větší po-inseminační náplni dělohy než inseminace chlazeným či čerstvým spermatem, nebo přirozeným pářením. Roli zde hraje také věk a status klisny. Čím starší klisna je, tím pravděpodobněji má sklony k hromadění tekutiny v děloze. Podle studie Barbaciniho a kol. (2003) klisny do 16 let trpí těmito obtížemi jen ve přibližně 30 %, po 16 roce věku se však tento poměr obrací. Tekutinu v děloze vyvolanou připouštěním bylo možné pozorovat také u 20 % klisen se statusem panny (mladší klisny, které ještě nebyly zařazeny do reprodukce), u 18 % klisen s hříbaty, ale u dvojnásobného počtu (40 %) klisen tzv. neplodných (už hříbě měly, ale v předchozí připouštěcí sezoně nebyly do reprodukce zařazeny nebo potratily).

Přibližně 12-24 hodin po inseminaci, je vhodné ultrazvukem vyšetřit, zda není v děloze přítomné větší množství tekutiny. Větší množství hodnotí Pycocok (2007) ultrazvukovým vyšetřením jako 2 cm tekutiny v dutině dělohy. Výplach je možno provést 4 hodiny až 3 dny po ovulaci, tedy alespoň jeden den před sestoupením případně oplodněného vajíčka do dělohy. K tomu se užívá fyziologický roztok nebo Ringerův roztok s laktátem a kontraktilita dělohy je podpořena podáním oxytocinu intravenózně. Pokud je množství tekutiny menší, lze

stimulovat pouze kontraktilitu dělohy oxytocinem a to nejdříve 4 hodiny po inseminaci bez vlivu na schopnost zabřeznout (Brinsko a kol. 2011).

Během diestru je jakékoliv pozorované množství tekutiny v děloze signálem závažnějších problémů. Výjimkou je březost nebo diagnostikované cysty (endometriální/lymfatické).

3.5 Hormonální stimulace klisny

Hormonální terapie u klisen je primárně užívána pro navození a kontrolu počátku připouštěcího období, řízení přirozené plemenitby indukci říje a ovulace, pro úpravu a řízení cyklu během procedur asistované reprodukce, ale také při oddálení nebo potlačení říje a jejích projevů (Card 2009).

3.5.1 Progesteron

Má široké spektrum účinku. Lze použít progesteron rozpuštěný v oleji, který je aplikován intramuskulárně nebo jeho analog Altrenogest podávaný orálně (v různých komerčně dostupných preparátech) (Šichtař a Hošková 2013).

U sportujících klisen je využíván k potlačení projevů říje. Nejčastěji je k tomuto účelu užíván Altrenogest podávaný denně v krmné dávce. Nemá vliv na plodnost i když je podáván 30-60 dní v kuse. Je ale doporučeno ho po této době na čas vysadit. Progesteron aplikovaný injekčně má o 2-3 dny opožděný nástup účinku a vyžaduje též každodenní aplikaci (Hodgson a kol. 2005).

Používá se pro synchronizaci říje a v druhé polovině jarního přechodného období je možné progesteron použít pro urychlení nástupu připouštěcí sezony. Stimulace je vhodná u klisen, jejichž folikuly jsou větší než 25 mm v průměru. Klisny s menšími folikuly na stimulaci nereagují. Aplikován může být injekčně nebo jeho analog orálně po dobu 10-15 dnů (Tek 2019). Alternativou je aplikace vaginálního tělíska (CIDR-controlled intravaginal drug release device/ PRID-progesterone releasing intravaginal device) na dobu 12-14 dnů, které uvolňuje konstantní množství hormonu (Handler a kol. 2007).

Po užití progesteronového tělíska se počty březích klisen výrazně neliší od klisen v kontrolních skupinách. Jeho použití má však za následek razantní snížení režijních nákladů v reprodukci klisny (Vizueté a kol. 2013; Macan a kol. 2021).

Lze ho také použít pro synchronizaci říje, k oddálení poporodní říje a ovulace, podporu udržení březosti.

Progesteron tlumí činnost leukocytů v děloze a děložní clearance, což jsou velmi důležité děložní obranné mechanismy.

3.5.2 Prostaglandin F_{2α}

CL se stává vnímavým vůči prostaglandinu až 5-6 dnů po ovulaci. Přirozeně se však PGF_{2α} uvolňuje 12-14 dnů po ovulaci, pokud nedojde k zabřeznutí, a má luteolytický účinek a přirozeně tak snižuje hladinu progesteronu v krvi. Je možné ho tedy použít pro navození

luteolýzy s 80-90% spolehlivostí. Spontánní luteolýza trvá necelých 24 hodin (Ginther a kol. 2011).

Nejčastěji je využíván pro indukci ovulace u klisen v přechodném období a diestru, kdy spouští sekreci FSH a LH. Terapeuticky se užívá také pro synchronizaci říje nebo léčbu perzistujícího CL (Phetudomsinsuk 2017). Aplikace je možná týden po odeznění říje, ideálně týden po ovulaci. V závislosti na velikosti folikulů v době intervence by měla klisna přejít do říje a ovulovat za 2-10 dnů (Bergfelt a kol. 2006). Doba, za jakou bude klisna ovulovat se odvíjí od velikosti přítomných folikulů na vaječniku v době aplikace $\text{PGF}_2\alpha$. Cuervo-Arango a kol. (2015) ve své studii prokázal, že klisny, které po stimulaci prostaglandinem ovulovaly do 6 dnů, měly nejhorší výsledky zabřeznutí (26,6 %). Klisny ovulující mezi 6-8 dny zabřezly v 34,4 % a nakonec klisny ovulující 8. den a později zabřezly ve více než 55 %.

Při podávání po dobu 5-10 dní po ohřebení urychluje involuci dělohy a napomáhá jejímu čištění. Po podání březí klisně může zpustit porod nebo vyvolat abort v závislosti na délce březosti (McCue 2014b). Může být použit jako podpůrný přípravek při léčbě endometritidy. Má přímý inotropní účinek na endometrium nezávislý na vlivu prostaglandinu a napomáhá relaxaci děložního čípku a podporuje tak děložní clearance. Funguje také jako zprostředkovatel uvolnění oxytocinu (Staempfli 2011).

3.5.3 Human Chorionic Gonadotrophin (hCG)

HCG je u ženy produkován trofoblastem už 9. den od početí a má stimulovat CL k produkci progesteronu. Produkce dosahuje vrcholu v 10. týdnu gravidity, pak klesá (Kittnar 2011). Je vylučován močí. Biologická aktivita hCG je u klisny podobná působení LH, zahajuje ovulaci a vývoj CL. Poločas rozpadu se v těle pohybuje mezi 8 a 12 hodinami (Newcombe 2011).

Během připouštěcí sezony je velmi často ta samá klisna stimulována pomocí hCG i ve více než jednom cyklu, a to i přes to, že byly publikovány práce, které potvrzující vznik protilátek, které mohou snižovat účinnost stimulace hCG. Wilson a kol. (1990) uvádí, že v první sezóně se ovulace nedostavila v očekávaném intervalu u 50 % stimulovaných klisen už po 2 až 5 po sobě jdoucích cyklech. V následující reprodukční sezóně na aplikaci hCG nereagovalo 57,1 % stimulovaných klisen. V těchto případech se moment ovulace nelišil od kontrolní skupiny a plodnost nebyla nijak ovlivněna. Protilátky se vytvořily u všech stimulovaných klisen po první injekci. Podle Barbaciniho a kol. (2000) hraje roli v reakci na aplikaci hCG i reprodukční status klisny. Rutinně je užíván při inseminaci mraženým spermatem z důvodu zkrácené životnosti spermií a poměrně často i při inseminaci chlazeným spermatem (Bradecamp 2007).

Aplikace hormonu nemá význam u folikulů menších než 30 mm, které nemají dostatečné množství LH receptorů, na které se hCG váže (Cuervo-Arango a Clark 2010). Aplikován je klisně v druhé polovině říje, kdy má folikul alespoň 35 mm, je viditelná edematizace dělohy a relaxovaný děložní krček. Urychlí tak dozrávání folikulu a uspíší nástup ovulace. Tím dojde i k celkovému zkrácení říje. Lze ho aplikovat intravenózně i intramuskulárně v dávce 1500-3500 IU. Podle Chopina a kol. (2020) by měla ovulace následovat během 36-48 hodin u 82-89 % stimulovaných klisen. Rozpětí reakce je variabilní

kdy 12 % klisen ovuluje do 24 hodin, do 36 hodin 50 % a potom 12 % klisen do 48 hodin nebo později (Card 2009). Pokud je folikul v době podání větší, může dojít k ovulaci dříve. Velikost folikulu při ovulaci je ovlivněna velikostí dávky hCG. Čím větší je dávka hCG, tím méně folikul před ovulací roste (Tazawa a kol. 2017). Chopin a kol. (2020) také nezaznamenal rozdíl v účinnosti mezi hCG a jeho analogy. Stimulace lidským choriovým gonadotropinem vede podle Perkinse & Grimmetta (2011) ke zvýšenému počtu březostí, jiní autoři však k tomuto závěru nedošli (Barbacini a kol. 2000; Davies Morel a Newcobe 2008; Cuervo-Arango a Clark 2010; Immonen a Cuervo-Arango 2020).

Je možné použít hCG v kombinaci s dalšími hormony využívanými pro synchronizaci říje a zkrácení přechodného období (Brinsko a kol. 2011). Při použití během jarního přechodného období spolu s progesteronem ovulovaly klisny v 93 % během 48 hodin. Bez použití progesteronu docházelo k ovulaci v tom samém období do 48 hodin pouze u 58 % klisen (Cuervo-Arango a Clark 2010).

3.5.4 GnRH

Nativní forma GnRH má biologický poločas rozpadu v řádu několika minut. Proto jsou pro stimulaci používáni agonisté (např. deslorelin), kteří mají vyšší vazebnou afinitu k receptorům a biologický poločas rozpadu několik hodin. Velmi často se podávají jako subkutánní implantáty. Bezprostřední reakce po podání je stejná jako účinek nativního GnRH, tedy okamžitá syntéza a sekrece FSH a LH a navýšení počtu receptorů (Mardešić 2013).

Spouští folikulární vývoj, stimuluje uvolňování LH a FSH, a tak může indukovat ovulaci jako alternativa hCG (Phetudomsinsuk 2017). Klisny ošetřeny později během jarního přechodného období mající větší folikuly, reagují výraznějším folikulárním růstem, následnou ovulací a tvorbou normálního CL, a to v kratším intervalu než klisny v zimním anestru nebo na počátku jara. Ne všechny klisny s malými folikuly (<20 mm) reagují na stimulaci, některé klisny mohou následkem stimulace upadnout po ovulaci do anestru, pokud nezabřeznou, a některé stimulované klisny s malými folikuly mohou vykazovat vyšší potratovost v důsledku nižší hladiny progesteronu zapříčiněnou nedostatečnou stimulací LH (Brinsko a kol. 2011).

Analog GnRH lze použít pro indukci ovulace u říjící klisny, kdy je u klisny pozorovatelný folikul o průměru alespoň 30 mm. Více než 80 % takto ošetřených klisen ovuluje do 48 hodin. Kanitz a kol. (2007) neuvádí rozdíl v počtu březostí mezi stimulovanými a nestimulovanými klisnami. Newcombe a kol. (2000) oproti tomu zaznamenal vyšší míru zabřezávání o 10 %.

3.5.5 Antagonisté dopaminu

Dopamin inhibuje produkci gonadotropinů, proto je uvažováno o užití jeho antagonistů při ukončení hlubokého anestru u klisen, stimulaci folikulární aktivity a přiblížení první ovulace. Studie hovoří o použití Domperidonu nebo Sulpiridu (Mari a kol. 2009), existují i další. Obě látky vyžadují každodenní podávání a to orálně (Domperidon) nebo intramuskulárně (Sulpirid) po dobu 2-4 týdnů. Kůru je vhodné začít koncem prosince nebo začátkem ledna. Výsledky výše zmíněné studie uvádí, že Sulpirid byl v navození přechodného období a indukci první ovulace

po zimním anestru spolehlivější než Domperidon. Většina klisen, kterým byl aplikován Sulpirid ovulovala už během období stimulace nebo do 14 dnů po jejím ukončení. U klisen na Domperidonu ovulovalo pouze 20 % klisen v tomtéž období, zbylé nejdříve 30 dní po skončení aplikace.

3.5.6 Estradiol-17 β

Estradiol je možné použít v kombinaci s progesteronem rozpuštěným v oleji k potlačení růstu folikulů. Toho lze využít pro oddálení první poporodní říje, aby měla děloha dostatečný čas na involuci a regeneraci endometria. Estradiol je také aplikován pro synchronizaci ovulace, při léčbě endometritidy, kdy napomáhá uvolnění děložního krčku a podporuje krevní oběh v oblasti dělohy a stimuluje lokální imunitní reakci (Tibary 2011).

Estradiol lze také aplikovat před stimulací sulpiridem pro navození přechodného období po zimě. Díky tomu se zvýší hladina prolaktinu a reakce vaječnicků na sulpirid je lepší (Kelley a kol. 2006).

3.5.7 Oxytocin

Oxytocin stimuluje děložní kontrakce a přirozeně tak napomáhá zčištění dělohy po zapuštění. Stejně ho lze využít pro mechanické odstranění nahromaděné tekutiny v děloze nebo výplachu dělohy. Je používán rutinně při zjištění náplně dělohy po inseminaci do 2 cm (Barbacini a kol. 2003).

Použití oxytocinu je možné nejdříve po 4 hodinách od osemenění, dává se opakovaně po 4-6 hodinách následujících 24-48 hodin (Nie a kol. 2002). Spolu s oxytocinovou terapií bývá provedena i laváž dělohy, zvláště pokud je nález ≥ 2 cm tekutiny (Knutti a kol. 2000). Vhodná je aplikace intravenózně, tonus dělohy se začíná měnit už po 30 sekundách, vrchol je pak po 5-10 minutách od aplikace. Doba působení a jeho síla se odvíjí od podané dávky. První kontrakce od podání vzniká v rohu děložním a postupuje přes tělo až k děložnímu krčku. Tato kontrakce ve většině případů vypudí téměř všechny obsah dělohy. Aplikovaný oxytocin v dávce 5-20 IU vyvolá silné a krátké kontrakce trvající 30-45 minut. Čím menší je podaná dávka, tím kratší dobu působí. Dávka 30 UI a vyšší vyvolá tzv. tetanickou kontrakci, která brání čištění dělohy (Cadario a kol. 1999).

Pro prodloužení životnosti CL a předejití tak říjovému chování lze oxytocin využít taktéž při každodenní aplikaci 60 IU intramuskulárně po dobu 29 dnů. Klisna nevykazuje známky říje alespoň 55 dnů od začátku aplikace (Parkinson a kol. 2020).

4 Metodika

4.1 Charakteristika reprodukčního centra

Data pro vypracování diplomové práce byla získána z reprodukčního centra klisen, které disponuje osmnácti boxy a venkovním ustájením klisen. Pastviny se rozkládají na 40 ha a tato celková výměra je rozdělena na menší sekce, kde se obvykle nachází dvě až čtyři klisny, v pěti větších jednotkách je to pak až 8 klisen. Na pastvinách je v každé sekci k dispozici mobilní přístřešek a zastřešený krmelec s odpovídajícím množstvím krmných míst. Veškeré pastevní, boxové a vyšetřovací zázemí odpovídá normám EU. Klisny jsou krmeny granulemi pro danou kategorii koní, dokrmovány senem, k dispozici je také minerální liz a voda ad libitum.

Sběr dat probíhal v průběhu připouštěcích sezón v letech 2015 a 2016. V reprodukčním centru je každé klisně přidělena osobní karta s jednoznačnou identifikací a slouží také k zaznamenávání údajů o vyšetřeních a výsledků o reprodukci.

4.2 Vyšetřování klisen

Vyšetření reprodukčních orgánů klisen při přijetí nebo při rutinních prohlídkách bylo prováděno vždy stejným pracovníkem. Reprodukční soustava byla vyšetřena ultrasonograficky a palpačně. K dispozici byl ultrazvukový přístroj Tringa Linear (Esaote, Itálie) s rektální 7,5 MHz sondou. Přístroj je vybaven softwarem pro veškerá měření monitorovaných struktur. Vyšetřování probíhalo vždy ve stejném pořadí, první byl ultrasonograficky zhodnocen levý vaječník, poté pravý a následně děloha.

4.3 Monitorované struktury reprodukčního traktu

Ovariální folikuly byly měřeny dle následujícího postupu. Vaječník byl nasnímán tak, aby se na obrazovce ultrazvukového přístroje objevil folikul ve své největší projekci. Následně byl obraz zmrazen a měřítkem byly označeny dvě největší vzdálenosti (cm). Z těchto údajů se pak vypočítal aritmetický průměr (cm). Stupeň edematizace dělohy byl hodnocen na základě míry estrogenizace dělohy. Stupnice obsahovala tři body: X, XX a XXX. Pokud byl zapsán stupeň X, děloha vykazovala mírnou edematizaci. V případě stupně XX, bylo možné pozorovat jednotlivé endometriální řasy s prokazatelnou charakteristickou loukoťovou strukturou. Při stupni XXX byla děloha maximálně estrogenizovaná, endometriální řasy jasně viditelné a loukoťová struktura dělohy byla výrazná (Samper).

4.4 Inseminace klisen a diagnostika březosti

Inseminace klisen probíhala buď čerstvým, chlazeným nebo mraženým spermatem. Klisny, které byly k inseminaci určeny, byly vyšetřovány v průběhu průměrně 5denní říje každý druhý den a s blížící se ovulací se prohlídky zkrátily do 12hodinových (inseminace čerstvým a chlazeným spermatem) a 6hodinových (inseminace mraženým spermatem) intervalů.

Samotná inseminace byla načasována co nejlíže předpokládané ovulaci dominantního folikulu.

Při samotné inseminaci se klisna fixovala do vyšetřovací klece a byly jí důsledně omyty a dezinfikovány vnější genitálie a perineální prostor. Inseminační dávka se pomocí inseminační pipety aplikovala do děložního těla, v případě mraženého spermatu, které bylo k dispozici ve formě jedné pejety o objemu 0,5 ml pak došlo k inseminaci hluboko do děložního rohu. Po každé inseminaci byl druhý den ultrasonograficky kontrolován vaječník (zda proběhla či neproběhla ovulace) a děloha (vznik náplně). Klisny byly inseminovány v opakujících se říjových cyklech do té doby, než zabřezly nebo se je majitel rozhodl z reprodukčního centra odvézt.

Výsledek inseminace byl kontrolován 16. den po inseminaci ultrasonografickým přístrojem a klisna byla diagnostikována jako březí v případě nálezu konceptu odpovídajícího tvaru a velikosti.

4.5 Reprodukční záznamy klisen

V průběhu pobytu klisen v reprodukčním centru byly u každé z nich zaznamenávány veškeré provedené úkony do karty klisny. Pro účely diplomové práce pak byly použity za období 2015-2016 tyto údaje od 312 klisen: jméno klisny; jméno hřebce, od kterého pocházela inseminační dávka; typ inseminační dávky (Č – čerstvá, CH – chlazená, M – mražená); datum vyšetření; velikost a počet folikulů na levém vaječníku (ks, cm); popis stavu na levém vaječníku (ovulační nebo ovulující folikul, corpus luteum, atd.); velikost a počet folikulů na pravém vaječníku (ks, cm); popis stavu na pravém vaječníku (ovulační nebo ovulující folikul, corpus luteum, atd.); stav dělohy při vyšetření (X, XX nebo XXX; přítomnost náplně); léčba (hCG, PGF2alfa, ATB – antibiotika, výplach dělohy); délka estrálního cyklu (18-20 dní, 21 dní, ≥22 dní) výsledek inseminace (březí, jalová).

Klisny byly léčeny buď použitím preparátů pro úpravu dynamiky ovariálních struktur nebo antibiotiky, která se aplikovala při výplachu patologické náplně dělohy. Pro luteolýzu vyvolanou syntetickým analogem PGF2alfa byl použit Estrumate 250 µg/ml v dávce 1-2 ml i.m. pro toto (Intervet, NL). Ovulace dominantního folikulu byla indukována léčivem Pregnyl 5000 (N. V. Organon, NL), což je humánní choriový gonadotropin. I.V. bylo podáno buď 1500 IU nebo 2500 IU, ve výjimečných případech pak 5000 IU. V rámci diplomové práce jsou pro přípravek Estrumate 250 µg/ml a Pregnyl 5000 použity zkratky PGF2 alfa a hCG, dle uvedeného pořadí. Pokud byla klisna indikována k výplachu dělohy z důvodu vzniklé patologické náplně, byla zafixována ve vyšetřovací kleci a byly jí omyty a dezinfikovány vnější genitálie a perineální prostor. Poté byl zaveden do dělohy katetr, kterým byl aplikován zahřátý (37 °C) fyziologický roztok buď s, nebo bez antibiotik vhodných pro výplach dělohy klisny (penicilin, gentamycin, sulfonamidy). Naplněná děloha se per rectum promasírovala a roztok se nechal volně vytékat ven z dělohy. Po skončení výplachu byla děloha ultrasonograficky kontrolována, zda došlo k evakuaci celého objemu.

4.6 Statistická analýza dat

Data byla zpracována v programu Statistica (ver. 12, StatSoft, CZ). Při hodnocení procentuálního zastoupení klisen ve sledovaných kategoriích byl použit χ^2 test. V případě, že hodnota Pearsonova chí-kvadrátu byla $<0,05$, byl použit Test rozdílů, aby bylo možné určit mezi kterými proměnnými je statisticky průkazný rozdíl. Dále byla použita jednofaktorová analýza rozptylu (ANOVA), které předcházelo zhodnocení normálního rozdělení a homogenity rozptylů (ShapiroWilkův a Levenův test). Data byla hodnocena na hladině významnosti $P < 0,05$ a výsledky jsou uvedeny v procentech (%) nebo jako průměr \pm SD.

5 Výsledky

5.1 Celková úspěšnost zabřezávání klisen

Tabulka 1 uvádí reprodukční údaje klisen zahrnutých do sledování, které byly pořízeny v letech 2015 a 2016. Při hodnocení úspěšnosti zabřezávání nebyl mezi jednotlivými roky nalezen rozdíl v počtu březích klisen ($P > 0,05$). Průměrný počet jalových klisen byl za sledované období 52,5 % a březích 47,5 % a mezi jednotlivými roky činil rozdíl v procentuálním zastoupení březích klisen 7,5 %.

Tabulka 1. Celková úspěšnost zabřezávání klisen ve sledovaných obdobích bez ohledu na typ použité inseminační dávky.

Rok	% jalových	% březích
2015	56,2	43,8
2016	48,7	51,3
průměr	52,5	47,6

Při podrobnějším hodnocení reprodukční výkonnosti klisen v jednotlivých obdobích byl zpracován vliv typu použité inseminační dávky na procentuální zastoupení jalových a březích klisen (Tabulka 2). V roce 2015 nebyl nalezen statisticky průkazný rozdíl v zabřezávání klisen po použití mražené, chlazené a čerstvé inseminační dávky ($P = 0,12$), přičemž úspěšnost zabřezávání byla nejvyšší po použití chlazené inseminační dávky. V roce 2016 byla situace obdobná, úspěšnost zabřezávání nebyla ovlivněna typem použité inseminační dávky ($P = 0,29$). Celkově se v porovnání s rokem 2015 zabřezávání klisen zlepšilo a nejvíce klisen zabřezlo také po použití chlazené inseminační dávky.

Tabulka 2. Vliv použité inseminační dávky na počet jalových a březích klisen ve sledovaných obdobích.

Rok 2015	% jalových	% březích
Mražená	64,5	35,5
Chlazená	44,4	55,6
Čerstvá	58,3	41,7
Rok 2016		
Mražená	54,1	45,9
Chlazená	41,8	58,2
Čerstvá	46,2	53,9

5.2 Vliv délky estrálního cyklu na velikost ovulačního folikulu a výsledek inseminace

Délka estrálního cyklu předcházejícího inseminaci statisticky průkazně ovlivňovala velikost ovulačního folikulu i následnou úspěšnost zabřezávání (Tabulka 3). Klisny, u kterých trval estrální cyklus (hodnoceno od ovulace do následující ovulace) 18-21 dní měly statisticky průkazně menší ovulační folikuly v porovnání s klisnami, u kterých trval estrální cyklus 21 a ≥ 22 dní ($P < 0,05$). Výsledky zabřezávání v uvedených kategoriích délky estrálního cyklu byly statisticky rozdílné, nejlépe zabřezávaly klisny s 21denním cyklem, následoval 18-20denní cyklus a nejhorší zabřezávání bylo zaznamenáno u klisen s ≥ 22 denním estrálním cyklem. ($P < 0,05$).

Tabulka 3. Hodnocení délky estrálního cyklu předcházejícího inseminaci na velikost ovulačního folikulu a úspěšnost zabřezávání klisen.

Délka estrálního cyklu (dny)	Velikost folikulu (cm)	% březích
18-20	4,0 \pm 0,2*	30,2*
21	4,6 \pm 0,1**	54,2**
≥ 22	4,8 \pm 0,6**	15,6***

*, **, *** hodnoty ve sloupci označené různými indexy se mezi sebou liší na hladině významnosti $P < 0,05$

5.3 Úspěšnost zabřezávání s ohledem na typ použité ID

Výsledky v tabulce 3 uvádějí úspěšnost inseminace klisen v závislosti na použitém typu inseminační dávky (ID). V tomto případě byl nalezen statisticky průkazný rozdíl v úspěšnosti zabřezávání ($P = 0,04$) a konkrétně se jednalo o zvýšení úspěšnosti po použití chlazené ID o 15 %.

Tabulka 3. Úspěšnost zabřezávání klisen po inseminaci mraženou, chlazenou a čerstvou inseminační dávkou.

Typ ID	% jalových	% březích
Mražená	58,1*	41,9*
Chlazená	42,9**	57,1**
Čerstvá	50,0	50,0

*, ** hodnoty ve sloupci označené různými indexy se mezi sebou liší na hladině významnosti $P < 0,05$.

5.4 Vliv edematizace dělohy na výsledek inseminace

Tabulka 4 uvádí vztah mezi stupněm edematizace dělohy hodnoceném pomocí ultrasonografického zobrazení dělohy a úspěšností zabřezávání klisen. Pokud dosahovala edematizace stupně X, procentuální zabřezávání klisen bylo statisticky průkazně nižší v porovnání se stupni XX a XXX ($P = 0,02$). Pokud byla při vyšetření klisny hodnocena edematizace endometria stupněm XX a XXX bylo zjištěno, že klisny zabřezávaly na podobné úrovni.

Tabulka 4. Vliv edematizace dělohy na výsledek inseminace klisen.

Stupeň edematizace dělohy	% jalových	% březích
X	70,0**	30,0**
XX	41,2*	58,8*
XXX	35,0*	65,0*

*, ** hodnoty ve sloupci označené různými indexy se mezi sebou liší na hladině významnosti $P < 0,05$.

5.5 Vliv typu inseminační dávky a stupně edematizace dělohy na výsledek reprodukce

Výsledky z hodnocení vztahu stupně edematizace dělohy a inseminace chlazenou, nebo mraženou ID na úspěšnost reprodukce uvádí tabulka 5. Při použití chlazené i mražené inseminační dávky byla zjištěna statisticky průkazná závislost stupně edematizace dělohy na výsledek inseminace ($P < 0,05$). Klisny zabřezávaly statisticky průkazně lépe, pokud byla děloha klisny při inseminaci chlazenou ID pomocí ultrasonografického vyšetření zhodnocena stupněm XX a XXX v porovnání se stupněm X ($P = 0,02$). Pokud byl v době inseminace mraženou ID stupeň edematizace dělohy X, zabřezávaly klisny statisticky průkazně hůře v porovnání se stupněm XX a XXX ($P = 0,03$). Mezi stupni XX a XXX byla také zjištěn statisticky průkazný rozdíl ($P = 0,04$) přičemž nejlepších výsledků reprodukce při použití mražené ID byl zjištěn při stupni edematizace dělohy XXX.

Tabulka 5. Vliv typu inseminační dávky (chlazená vs. mražená) a stupně edematizace dělohy na výsledek inseminace.

Typ ID	Stupeň edematizace	% jalových	% březích
Chlazená	X	65,0**	35,0**
	XX	35,7*	64,3*
	XXX	38,5*	61,5*
Mražená	X	72,3*	27,7*

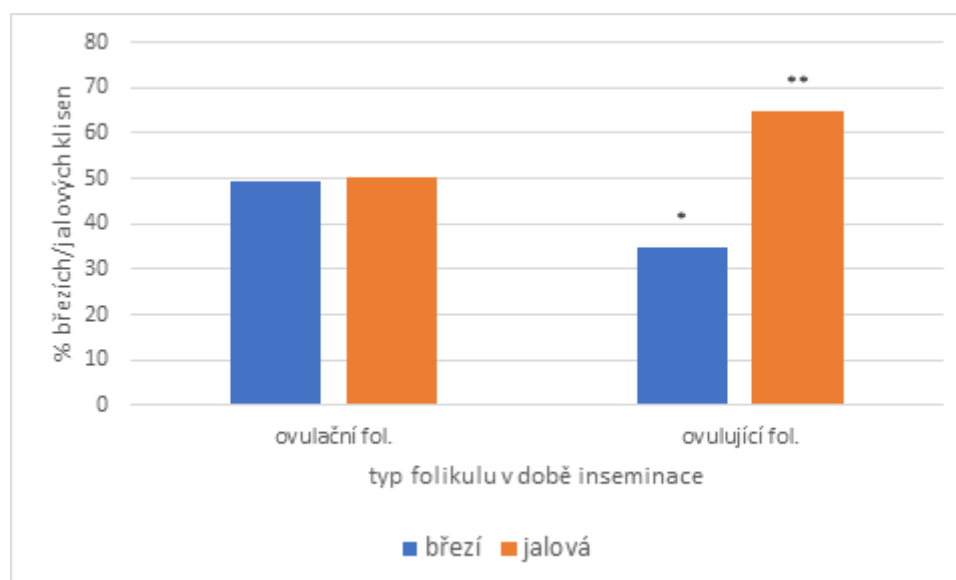
	XX	48,5**	51,5**
	XXX	37,5***	62,5***

*, **, *** hodnoty ve sloupci označené různými indexy se v rámci jednotlivých typů ID mezi sebou liší na hladině významnosti $P < 0,05$.

5.6 Vliv načasování inseminace na zabřezávání

Vliv inseminace před ovulací (ovulační folikul) a v době inseminace (ovulující folikul) na výsledek inseminace uvádí graf 1. Pokud byla inseminace provedena v době, kdy se na vaječnicku nacházel ovulační folikul (12 až 6 hodin před ovulací), zastoupení březích (49,6 %) a jalových (50,4 %) klisen se nelišilo ($P = 0,85$). V případě, že se na vaječnicku v době inseminace nacházel ovulující dominantní folikul, zůstalo po inseminaci 35 % březích a 65 % jalových klisen ($P = 0,03$).

Graf 1. Vliv typu dominantního folikulu přítomného na vaječnicku v době inseminace na výsledek reprodukce.



*, ** sloupce označené různými indexy se liší na hladině významnosti $P < 0,05$.

5.7 Počet inseminací a velikost ovulačních folikulů a jejich vliv na reprodukci

Výsledky z hodnocení vlivu pořadí inseminace klisny během připouštěcí sezóny na úspěšnost reprodukce a vztah pořadí inseminace a velikosti dominantního folikulu přítomného na ovariu v době inseminace uvádí tabulka 6. Ve sledovaném souboru klisen byl zjištěn statisticky průkazný vliv pořadí inseminace na zabřezávání klisen ($P < 0,05$). Klisny zabřezávaly signifikantně lépe po první inseminaci v porovnání s druhou a třetí inseminací ($P = 0,03$). Zabřezávání klisen po druhé a třetí inseminaci mělo tendenci ($P = 0,07$) ke statisticky

průkaznému rozdílu. Velikost ovulačního folikulu se mezi jednotlivými inseminacemi nelišila ($P > 0,05$).

Tabulka 6. Vliv pořadí inseminace klisny na zabřezávání klisen a na velikost dominantního folikulu přítomného na vaječníku v době inseminace.

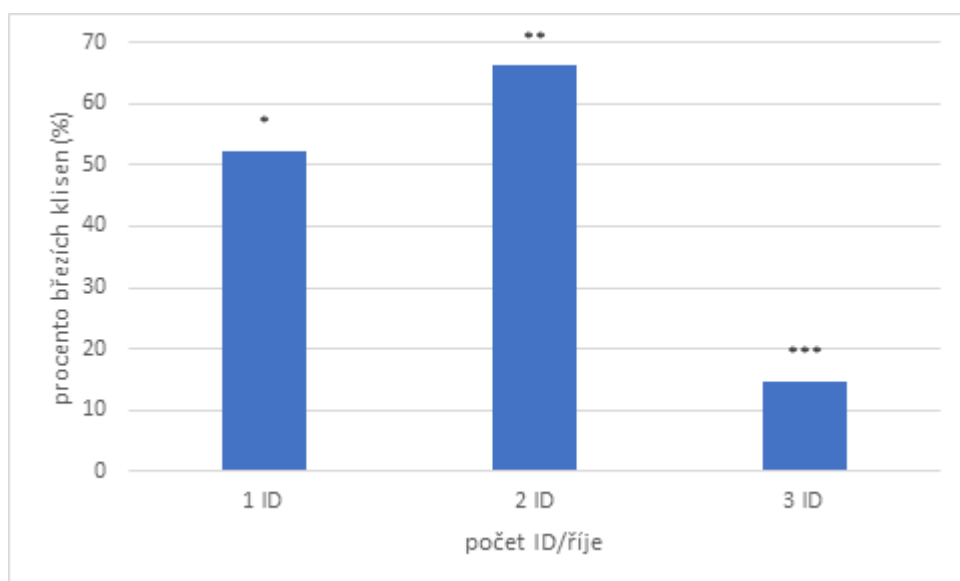
Pořadí insem.	% březích klisen	Velikost fol. (cm)
1.	58,8*	4,3 ± 0,1
2.	48,9**	4,7 ± 0,4
3.	35,7**	4,5 ± 0,3
průměr	47,8	4,5 ± 0,3

*, ** hodnoty ve sloupci označené různými indexy se mezi sebou liší na hladině významnosti $P < 0,05$.

5.8 Vliv počtu použitých inseminačních dávek na zabřezávání

Zhodnocení vlivu počtu použitých inseminačních dávek v průběhu jedné říje na výsledek reprodukce uvádí graf 2. Klisny byly ve sledovaném souboru inseminovány jednou, dvěma a třemi ID v 72 %, 23 % a 5 % případů, dle uvedeného pořadí. Při použití jedné a dvou ID na osemenění klisny v průběhu jedné říje zabřezly klisny s 52,3% úspěšností. Pokud byly použity během jedné říje dvě inseminační dávky, zabřezly klisny s 66,2% úspěšností. Nejnižší procento březích klisen (14,8 %) bylo zaznamenáno po použití tří inseminačních dávek během jedné říje. Mezi jednotlivými skupinami (1 ID vs 2 ID vs 3 ID) byl nalezen statisticky průkazný rozdíl v zabřezávání klisen ($P < 0,05$)

Graf 2. Vliv počtu použitých inseminačních dávek při inseminaci v průběhu jedné říje na výsledek inseminace.



*, **, *** sloupce označené různými indexy se liší na hladině významnosti $P < 0,05$.

5.9 Vliv aplikace hCG a PGF2 α na výsledek inseminace

Tabulka 7 uvádí výsledky reprodukce po použití hormonální stimulace ovariální aktivity na úspěšnost reprodukce klisen. Pokud byl před inseminací aplikován hCG, zabřezlo signifikantně více klisen v porovnání se situací, kdy hCG použit nebyl ($P < 0,05$). V případě, že byl klisnám aplikován PGF2alfa v diestru předcházející říji a posléze inseminaci, nebyl zjištěn statisticky průkazný vliv použití tohoto hormonu na úspěšnost zabřezávání ($P > 0,05$).

Tabulka 7. Vliv použití hCG a PGF2 alfa před inseminací na zabřezávání klisen.

Hormonální ošetření	% jalových	% březích
hCG	41,9*	58,1*
Bez hCG	53,8**	46,2**
PGF2 alfa	48,7	51,3
Bez PGF2 alfa	52,1	47,9

*, ** hodnoty ve sloupci označené různými indexy se mezi sebou liší na hladině významnosti $P < 0,05$.

5.10 Vliv výskytu děložní náplně a její léčby na reprodukci

V tabulce 8 jsou uvedeny výsledky zabřezávání v případě, kdy došlo/nedošlo k výskytu náplně dělohy po inseminaci, která předcházela hodnocené inseminaci, tj. inseminace v následující říji. Pokud se u klisen vyskytla po inseminaci náplň v děloze, zabřezávala tato zvířata v následující říji s úspěšností 27,4 %, což je statisticky průkazně horší výsledek než v případě, že se u nich náplň nevyskytla (64,3 %) ($P < 0,05$). Dále tabulka 8 uvádí vliv léčby výše uvedené náplně, předcházející hodnocené inseminaci, na výsledek inseminace. Jak je z výsledků patrné, výplach bez použití antibiotik vhodných k ošetření takové náplně vedl k signifikantně nižší úspěšnosti zabřezávání v porovnání s případy, kdy byla antibiotika použita ($P < 0,05$).

Tabulka 8. Vliv výskytu náplně dělohy a její léčby po říji, která předcházela říji, na které byla klisna inseminována.

Stav dělohy	% jalových	% březích
Bez náplně	35,7*	64,3*
S náplní	72,6**	27,4**
Výplach bez ATB	64,5*	35,5*
Výplach s ATB	52,9**	47,1**

*, ** hodnoty ve sloupci v jednotlivých kategoriích stavu dělohy (zvláště náplň a výplach) označené různými indexy se mezi sebou liší na hladině významnosti $P < 0,05$.

6 Diskuze

Díky zlepšujícímu se reprodukčnímu managementu v posledních letech se zvyšuje plodnost klisen chovaných v ČR. Stále větší množství chovatelů vyhledává pro svůj chov služby reprodukčních center. To lze pozorovat i ve výsledcích této práce, kdy celkový počet březích klisen na konci připouštěcí sezóny 2016 byl o 7,5 % vyšší než v sezóně předchozí. Přesto není rozdíl v hodnocení úspěšnosti reprodukce mezi jednotlivými roky statisticky průkazný. Celkový výsledek však může být ovlivněn odlišným počtem klisen ve sledovaných sezónách a jejich reprodukční charakteristikou. V průměru zabřezlo za obě sledované sezóny 47,6 % klisen, a to bez ohledu na zvolený typ inseminační dávky. To je srovnatelný výsledek s prací Christmann a kol. (2017), kteří ve své studii uvádí průměrně 41,7 % březích klisen bez ohledu na reprodukční metodu. Squires a kol (2006) prezentuje průměrně 52% úspěšnost zabřezávání.

Vliv typu použité inseminační dávky na výsledek inseminace nebyl statisticky průkazný ani v jedné ze sledovaných reprodukčních sezón. Lepší výsledky zabřezávání však byly zaznamenány u všech tří typů inseminačních dávek (mražené, chlazené i čerstvé) v sezóně 2016 oproti 2015. V rámci celé práce při inseminaci čerstvým spermatem, zabřezlo v našem případě rovných 50 % inseminovaných klisen. Je to však o 10 % méně, než uvádí Squires a kol. (2006) (60 %) nebo např. Lewis a kol. (2015), který zaznamenal nejlepší výsledky právě při použití čerstvého spermatu (63 %). Lewis (2015) a další (Davies Morel a kol. 2010; Kareskoski 2019) přisuzují horší výsledky zabřezávání vyššímu věku klisny, který úspěšnost snižuje u klisen starších 11 let až o 30 %. Faktor vyššího věku nebylo možné v této práci zohlednit.

Předložená práce zaznamenává významný vliv délky estrálního cyklu na velikost ovulačního folikulu. Čím delší cyklus byl, tím větších velikostí dorůstaly ovulační folikuly. Podobná data uvádí i Ginther a kol. (2009), kdy delší cyklus vedl k větším rozměrům ovulačního folikulu. Průměrně delší cyklus však vykazovaly pouze klisny starší 18 let. Na druhou stranu jiní autoři uvádí, že větší folikuly produkují mladší klisny a spíše na začátku reprodukční sezóny (Ginther a kol. 2004; Ginther a kol. 2009b; Davies Morel a kol. 2010). S tím se shoduje i Claes a kol. (2017), který ve své práci uvádí, že mladší klisny i přes průměrně kratší cyklus (až o 3 dny oproti starším klisnám) ovulovaly větší folikul. Délka cyklu se mezi skupinami klisen lišila pouze v délce říje, nikoli diestru. Zajímavé je, že se vzrůstající velikostí folikulu a prodlužující se délkou cyklu, klesal v našem případě počet březích klisen. Je známo, že při stimulaci cyklu pomocí hCG, je estrus zkrácen až o 48 hodin a klisny ovulují průměrně menší folikuly (Tazawa a kol. 2017). Díky zpřesnění okna pro inseminaci stimulací hCG pravděpodobně proběhly inseminace v ideální čas, a proto byly výsledky zabřezávání nejlepší. Naopak při nejdelším cyklu nemusely být klisny hormonálně stimulovány, tím pádem jejich ovulační folikuly dosahovaly většího průměru. Mohlo ale dojít ke špatnému načasování inseminace, což v případě těchto klisen vedlo ke zhoršenému zabřezávání. Faktor hormonální stimulace jsme však v případě této závislosti nesledovali. Podle výše uvedených studií, mohl být ovlivňujícím faktorem i věk zapouštěné klisny, kdy starší samice mohly vykazovat delší říji, větší ovulační folikul a horší březnutí nebo se jednalo o cykly na konci reprodukční sezóny, které bývají delší a klisny hůře zabřezávají.

Po inseminaci chlazenou inseminační dávkou zabřezávaly sledované klisny průkazně lépe (57 %) než po inseminaci mraženou a čerstvou ID (42 % a 50 %), podle uvedeného pořadí. Lewis a kol. (2015) kupříkladu uvádí 43 % březích, ale Heckenbichler a kol. (2011) dokonce 67 % u chlazených dávek. Ty se těší mezi chovateli a reprodukčními centry v České republice velké oblibě, z důvodu dobré dostupnosti, nejméně náročné manipulace, velkému výběru plemenů a relativně vysoké oplozovací schopnosti. Ta se však může mezi hřebci lišit v závislosti na jejich plodnosti, typu použitého ředidla (Heitland a kol. 2018). Navíc je nutné udržovat stálou teplotu během transportu. Kromě toho by měla být také minimalizována celková doba mezi odběrem semene a vpravením do reprodukčního traktu samice (Heckenbichler a kol. 2011).

Při inseminaci mraženým spermatem, bývají výsledky reprodukce převážně horší než u ostatních typů dávek. V této práci bylo dosaženo podobných výsledků, jako publikoval například Vidament (2005), který prezentuje úspěšnost zabřezávání mezi 45-48 %, při jedné inseminaci na cyklus. Na úspěchu se také podílí dostatečné množství spermií v inseminační dávce, progresivní pohyb spermií po rozmražení (neměl by být nižší než 30 %) (Vidament 2005) nebo věk klisen (mladší klisny 13 let zabřezávaly podle Immonena a Cuervo-Aranga (2020) až o 10 % lépe než starší). V rámci managementu inseminace mraženými inseminačními dávkami je načasování inseminace co nejbližší ovulaci velmi důležité z důvodu zkrácené životnosti spermií. Proto je dobré klisny vybrané pro inseminaci mraženou ID hormonálně stimulovat a pravidelně vyšetřovat. Zásadním důvodem pro snížené zabřezávání po inseminaci mraženou ID je mrazitelnost spermatu jednotlivých hřebců, která je pro jednotlivce velmi specifická v závislosti na tom, jak spermie daného hřebce reagují na extrémně nízkou teplotu a osmotický šok. Vlivem odstranění semenné plazmy před mražením přichází spermie o své přirozené prostředí a proteiny v něm obsažené, a tak dochází k výraznému snížení pohyblivosti a oplozovací schopnosti po rozmražení (Bubeníčková a kol. 2020). Bubeníčková a kol. (2020) ve své studii uvádí prokazatelné zlepšení pohyblivosti při mražení dávek s určitou koncentrací proteinů semenné plazmy. Ta je základním předpokladem pro lepší oplozovací schopnost spermií. V oboru mražení hřebčího spermatu je však stále mnoho neznámých a vyžaduje další zkoumání. Plemenných hřebců, produkujících sperma dobré a ucházející kvality po rozmražení je jen málo desítek procent. V současné době je selekčním kritériem u koní sportovní výkon, nikoli plodnost. Pro budoucnost chovu koní nejen v České republice, by bylo zařazení parametrů spermatu mezi chovné cíle velkým přínosem.

Estrogenizace dělohy, a tedy její edematizace, mají výrazný vliv na výsledek inseminace. Klisny v našem případě zabřezávaly prokazatelně lépe při vyšším stupni edematizace dělohy (XX a XXX). Cox a kol. (2009) uvádí vyrovnané výsledky zabřezávání mezi 70 a 80 % při hodnocení dělohy X a XX. Samper (2007) uvádí, že klisny zapouštěny s hodnocením dělohy 4 (hodnocení podle Sampera 2007) a abnormálním mají sníženou schopnost zabřeznout, a to až o 25 %. U ostatních stupňů hodnocení (1-3 podle Sampera 2007) nebyl v zabřezávání rozdíl. Sonografické hodnocení dělohy je nejspolehlivějším indikátorem říje u normálních klisen, i když nevykazují standardní reakci na prubování nebo není prubíř k dispozici. Děložní řasy se

stávají prvně viditelnými na konci diestru a promínají v průběhu estru vlivem stoupající hladiny estrogenu. Maximální edematizace dosahuje děloha přibližně 24 hodin před ovulací, poté začíná zduření ustupovat (McKinnon a Carnevale 1993). Je tak jedním z mnoha navzájem se doplňujících způsobů pro co nejlepší načasování inseminace. Cuervo-Arango a Newcombe (2008) zjistili vliv stimulace cyklu na edematizaci dělohy. Klisny stimulované hCG, GnRH a zvláště pomocí PGF₂α vykazovali zvýšenou edematizaci dělohy před ovulací.

Při použití chlazené ID pak nebyl rozdíl ve výsledku inseminace při hodnocení dělohy na stupni XX a XXX na rozdíl od mražené ID, kdy na zhodnoceném stupni XXX zabřezávaly klisny o 11 % lépe než na stupni XX. Griffin a Ginther (1991) inseminovali klisny v době před ovulací s hodnocením dělohy na stupni XXX s 85% úspěšností. Cuervo-Arango a Newcombe (2010) prezentují výsledky inseminace v závislosti na změnách endometria před a po osemenění klisny. Podle nich klisny při použití mražené ID zabřezávaly nejlépe, když se edematizace dělohy před a po inseminaci nezměnila nebo snížila (63 % a 50 %), dle uvedeného pořadí. Naopak když došlo k nárůstu edematizace, zabřezlo pouze 30 % sledovaných klisen. K podobným výsledkům došli i u přirozené plemenitby. Samper (1997) zaznamenal, že klisny, které byly připuštěny a ovulovaly bez poklesu edematizace vykazovaly akumulaci tekutiny v děloze. Samper (1997) mimo jiné spojuje větší edematizaci v ranné fázi březosti s vyšší embryonální mortalitou během prvních 30 dnů. Proto by měl být tento náález při prvním sonografickém potvrzení březosti 15. nebo 16. den po ovulaci varovným signálem.

Načasování inseminace je jedním z klíčových faktorů pro úspěšnou reprodukci klisny. Mnohé studie uvádí (Allen a kol. 2007; Nath a kol. 2010, Newcombe a Cuervo-Arango 2015) nejlepší výsledky inseminace při co nejkratším intervalu mezi inseminací-ovulací a ovulací-inseminací. My jsme sledovali typ dominantního folikulu v době inseminace. Jako ovulační folikul byl označen ten, který byl na vaječníku přítomný přibližně 12-6 hodin před ovulací a druhým typem byl folikul ovulující. Pokud proběhla inseminace 12-6 hodin před ovulací zabřezlo rovných 50 % klisen. Srovnatelný výsledek uvádí Sieme a kol. (2003), Newcombe a Cuervo-Arango (2015) nebo Hollinshead a Hanlon (2018). Ti však výsledek vztahují k použití pouze chlazené ID, v našem případě není typ použité dávky zohledněn. Pokud byly klisny inseminovány v době ovulace (ovulační folikul) bylo v našem případě procento březích klisen prokazatelně nižší (35 %). Tento výsledek je ovšem paradoxní, vzhledem k tomu, že inseminace v době ovulace je tím nejpříhodnějším načasováním (Ley 2004, Sanchez a kol. 2009). Ovulované vajíčko si podle některých studií zachovává životaschopnost až 12-18 hodin po ovulaci (Koskinen a kol. 1990; Newcombe a kol. 2011), v tom případě inseminace mraženou ID při ovulaci zajistí dostatečný čas pro kapacitaci spermií, ale ne tak dlouhý, aby spermie v reprodukční traktu samice pomřely nebo oocyt přezrál. Přesto i Woods a kol. (1990) zaznamenal nejnižší počet březostí při inseminaci v době ovulace. Carnevale a kol. 2000 pak uvádí úspěšnost zabřeznutí 57 %. Námi uvedené paradoxní výsledky mohou být způsobeny pravděpodobně problematickou reprodukcí klisen (je to jeden z nejčastějších důvodů zařazení klisny do reprodukčního centra) nebo například rozdílnou kvalitou použitých ID. Většina mražených dávek totiž nezaručuje odpovídající kvalitu po rozmražení. Jak už bylo řečeno,

řešením by mohla být tvrdší selekce hřebců používaných v rámci výroby mražených ID. Kromě toho, aby bylo možné tento paradoxní výsledek lépe interpretovat, bylo by nutné podrobněji klisny inseminované v ten neoptimalnější čas (v době ovulace), ovšem s horším zabřezáváním, detailněji sledovat.

To kolikrát bude klisna během sezóny znovu inseminována v případě neúspěchu, záleží na chovateli a jeho ochotě investovat do reprodukce dané klisny. Jsou však kategorie klisen (vysoký věk, zdravotní stav, reprodukční historie) u kterých nemá větší počet pokusů v rámci sezóny přílišný význam. Dalším významným faktorem je období, kdy klisna vstoupí do reprodukční sezóny. Studie ukazují, že klisny zabřezávají signifikantně lépe na jaře (50 %) než v létě (37 %) (Crespo a kol. 2020), podobné výsledky prezentuje i Lane a kol. (2016). Každý neúspěšný inseminační cyklus tedy posouvá další pokus do období s nižšími šancemi. V případě reprodukčního centra je celý proces navíc finančně poměrně náročnou procedurou. V našem případě zabřezl největší počet klisen při první inseminaci (59 %) další (2. a 3.) pak měly prokazatelně klesající tendenci v počtu březích klisen (49 % a 36 %). Ke stejnému výsledku došel i Crowe a kol. (2008) avšak s výrazněji klesající tendencí. Podle studie Kareskoski a kol. (2019) zabřezlo více klisen při dvou a více inseminovaných cyklech během jedné reprodukční sezóny než pouze při jednom inseminovaném cyklu. Naší snahou bylo zohlednit vliv velikosti dominantního folikulu pro pořadí dané inseminace, ale tento vliv nebyl průkazný. Pouze při druhé inseminaci byly dominantní folikuly o 2-4 mm nad průměrem, jinak byla velikost dominantních folikulů vyrovnaná. Ke stejnému výsledku došli Cuervo-Arango a Newcombe (2008). Podle nich se velikost preovulačních folikulů v po sobě jdoucích cyklech příliš nemění, a tak lze navíc odhadnout moment ovulace podle velikosti ovulačního folikulu z předchozího cyklu. Podle výsledků studie Akourki a kol. (2017) je velikost dominantního folikulu ovlivněna reprodukčním statutem klisny, plemennou příslušností, věkem nebo také počtem dominantních folikulů na vaječniku v jednom cyklu ale také hormonální stimulací (Cuervo-Arango a Newcombe 2008).

Statisticky významný vliv na úspěšnost zabřezávání jsme prokázali mezi použitím jedné a více inseminačních dávek v rámci jednoho cyklu. Největší počet klisen (66 %) zabřezl při použití 2 ID, při použití 1 ID zabřezávaly klisny s 52% úspěšností, naopak nepatrný počet (15 %) březích klisen zůstal po inseminaci 3 ID. Tyto výsledky se částečně shodují i s pracemi jiných autorů. Sieme a kol. (2003) publikovali vyšší úspěšnost při použití 2 ID než při použití pouze jedné ID, při 3., 4. a dalších použitých dávkách však byla tendence stále vzrůstající, na rozdíl od našich výsledků. Kareskoski a kol. (2019) uvádí, že každá další inseminace vedla k vyššímu počtu březostí než pouze jedna. Cuervo-Arango a kol. (2019) naopak ve své studii uvádí, že není významný rozdíl při použití jedné inseminační dávky po ovulaci nebo dvou (před a po ovulaci) při inseminaci mraženým spermatem (36 vs. 42 %). Tomu odporuje Crowe a kol. (2008), který prezentuje výrazně lepší výsledek při dvou inseminacích v pevně daném časovém rozpětí po stimulaci ovulace, a to při použití mraženého spermatu s 82% úspěšností. Squires a kol. (2006) uvádí statisticky průkazně lepší výsledky zabřezávání pouze u opakované inseminace chlazeným spermatem oproti jedné inseminaci, a to za předpokladu, že jedna

z inseminací byla provedena před ovulací a reinseminace po ovulaci v pevně daném časovém období, 24 a 40 hodin (tzv. Fixed-time inseminace), po aplikaci hCG. Větší počet inseminací během jedné říje samozřejmě zvyšuje statistickou pravděpodobnost zabřeznutí, ale s nimi roste i finanční náročnost, kdy zvláště mražené ID bývají výrazně dražší než chlazené a čerstvé ID. Opakovaná inseminace znamená větší objem cizorodé látky v děloze s čímž je spojené vyšší riziko vzniku po-inseminační metritidy (Gomes a kol. 2019) zvláště při násobném použití mražené ID (Güvenc a kol. 2005). Dobrý reprodukční management se vyznačuje co možná nejnižším počtem ID na říji. Pro chovatele to znamená nižší náklady nejen na pořízení inseminační dávky, ale také menší výdaje za medikamenty, kontrolní vyšetření klisny, případné léčebné úkony a ustájení v reprodukčním centru.

Pokud byl ovariální cyklus klisny ovlivněn prostaglandinem F2 alfa, nemělo to žádný dopad na míru zabřezávání. Tento výsledek se shoduje i s pracemi jiných autorů (Metcalfe a Thompson 2010; Cuervo-Arango a kol. 2015). Kuhl a kol. ale zmiňují, že úspěšnost zabřezávání v protokolu, kdy byl použit PGF2 alfa byla poloviční, pokud byl interval mezi injekcí a ovulací méně než 7 dní což potvrzuje i Cuervo-Arango a kol. (2015), který nejlepších výsledků dosahoval, pokud byl interval mezi podáním PGF2 alfa a ovulací alespoň 8 dní. Tento faktor ale nebyl součástí našeho hodnocení. Při indukci ovulace aplikací hCG zabřezlo v našem případě 58 % sledovaných klisen. To je o více než 10 % lepší výsledek, než uvádí Vanderwall a kol. (2001). Obecně lze ale říci, že aplikace hCG nemá na plodnost vliv, což dokazují práce Davies Morel a Newcobe 2008; Cuervo-Arango a Clark 2010; Immonen a Cuervo-Arango 2020. Proto lze usuzovat, že vyšší počet březích klisen po stimulaci hCG v našem případě mohl být způsoben lepším načasováním inseminace, než když nebyl hCG použit. Hormonální ovlivnění cyklu má za úkol zúžit časové rozpětí kdy by mělo dojít k ovulaci a zkrátit délku říje a celého cyklu. To je v managementu reprodukce koní zvláště ceněné, protože klisny mají oproti jiným druhům hospodářských zvířat říji delší, což se promítá do nákladů v rámci reprodukce. Rutinně je těchto metod využíváno během jarního přechodného období, a to především u plemene A1/1 i přes to, že je u nich výhradně využívána přirozená plemenitba, a je vyvíjen veliký tlak na co nejčasnější zabřeznutí. Během připouštěcí sezóny pak u ostatních plemen dovolují včasné objednání chlazené inseminační dávky pro ideální načasování inseminace, u mražené ID pak dovolují snížit počet prováděných předovulačních vyšetření pro co nejbližší inseminaci ovulaci. Jsou také používány během embryo transferu pro přesnou synchronizaci dárkyň a příjemkyň. Ve všech případech je jejich použitím dosaženo výrazného snížení nákladů na celý reprodukční cyklus klisny.

Jedním z faktorů ovlivňujících celkovou plodnost klisen je náplň dělohy způsobená inseminací. Celá řada autorů uvádí výrazně zhoršené výsledky reprodukce v případě, že náplň dělohy přetrvávala delší čas po inseminaci (cca 12 hodin) (Pycoc a Newcombe 1996; Barbacini a kol. 2003; Loomis a Squires 2005; Lewis a kol. 2015). Pokud byla tekutina v děloze již před inseminací, byla zpravidla sterilní, ale byla zaznamenána snížená míra březostí, pokud nebyla klisna přeléčena ještě před inseminací (Aurich a kol. 2010; Gores-Lindholm a kol. 2013). I my jsme zjistily horší výsledky zabřezávání při náplni dělohy, a to o téměř 35 % oproti cyklu bez náplně. Přetrvávající náplň může být způsobena pozdější inseminací-v době kdy děloha není tak silně estrogenizovaná a má zhoršenou clearance. Míra náplně je podle Lewis a kol. (2015)

spojena s typem použité ID, což je faktor, který jsme v naší studii neprověřovali. Pokud byla náplň dělohy menší než 2 cm, byla klisna pouze stimulována oxytocinem pro evakuaci tekutiny (Squires a kol 2006). V případě větší náplně aplikovali v rámci své studie Barbacini a kol. (2003) laváž fyziologickým roztokem. Tato metoda bývá používána častěji než intrauterinní aplikace antibiotik (Köhne a kol. 2020) navíc často v kombinaci s nesteroidními antiflogistiky se značnou úspěšností (Risco a kol. 2009; Aurich a kol. 2010; Gores-Lindholm a kol 2013). Nutnost aplikace antibiotik v případě náplně způsobené inseminací by měla být podložena kultivací vzorku z dělohy, aby se předešlo vzniku rezistence. Obecně však klisny z antibiotické léčby profitují a výsledky reprodukce jsou vyšší než bez antibiotické léčby (Pycock a Newcombe 1996). I my jsme prokázali signifikantně vyšší počet březostí v případě, že byly klisny po inseminaci přeléčeny antibiotiky. Jednoznačně lze doporučit rutinní kontrolu kvůli náplni dělohy způsobené inseminací a v případě nálezu postupovat od nejjednodušších po-inseminačních protokolů (aplikace oxytocinu, výplach, výplach s nesteroidními antiflogistiky, výplach s antibiotiky) a používat antibiotika pouze v opodstatněných případech, kvůli riziku vzniku rezistence.

7 Závěr

V této práci byly sledovány různé reprodukční ukazatele klisen inseminovaných v rámci koňského reprodukčního centra. Ověřovali jsme, zda má na úspěšnost inseminace vliv velikost ovulačního folikulu, stupeň estrogenizace dělohy, léčba klisny v průběhu říje a typ použité inseminační dávky.

- Prokázali jsme spojitost mezi velikostí ovulačního folikulu a délkou estrálního cyklu a jejich vliv na míru zabřezávání. Čím delší cyklus byl, tím větších rozměrů folikuly dorůstaly a klisny hůře zabřezávaly. Je pravděpodobná spojitost s hormonálním ovlivněním říjového cyklu, kdy při stimulaci pomocí hCG došlo ke krácení cyklu a vlivem lepšího načasování inseminace zabřezl prokazatelně větší počet klisen. To samé platilo pro stimulaci PGF2 alfa.
- Typ ID měl na výsledek inseminace prokazatelný vliv. Nejlepších výsledků bylo dosaženo při inseminaci chlazenými ID, naopak nejhorších mraženými ID. Inseminace mraženou ID je vhodná pro použití v reprodukčních centrech, která jsou schopná zajistit častější kontroly reprodukčního traktu klisny vzhledem k důležitosti správného načasování inseminace.
- Klisny zabřezávaly výrazně lépe při edematizaci dělohy na vyšším stupni hodnocení. To platilo zvláště při inseminaci chlazenou a mraženou ID.
- Nestandardního výsledku jsme dosáhli při hodnocení načasování inseminace podle typu folikulu. Menší počet klisen zabřezl v momentu ovulace, kdy byl na vaječníku přítomný ovulující folikul.
- Počet potvrzených březostí se s opakovanými inseminačními cykly v průběhu sezóny snižoval a velikost ovulačního folikulu nehrála ve výsledku inseminace prokazatelnou roli. Naopak reinseminace během jedné říje, vedla při použití 2 ID k výraznému navýšení březostí, než při použití pouze 1 ID.
- Na zhoršené výsledky zabřezávání měla vliv přítomná náplň způsobená inseminací. Pokud došlo k jejímu výplachu s přidáním ATB, byl výsledný počet březostí vyšší než při výplachu bez použití ATB.

8 Literatura

- Akourki A, Echegaray A, Falceto MV, Mitjana O. 2017. Factors influencing reproductive efficiency and pregnancy in Pura Raza Espanola mares. *Veterinární Medicína* **62**:186-191.
- Alexander SL a Irvine CHG. 2011a. GnRH. Pages 1608-1618 in McKinnon AO, Squires EL, Vaala WE, Varner DD editors. *Equine Reproduction 2nd Edition*. Wiley-Blackwell. Oxford.
- Alexander SL a Irvine CHG. 2011b. FSH and LH. Pages 1619-1630 in McKinnon AO, Squires EL, Vaala WE, Varner DD editors. *Equine Reproduction 2nd Edition*. Wiley-Blackwell. Oxford.
- Allen WR, Brown L, Wright M, Wilsher S. 2007. Reproductive efficiency of flatrace and national hunt Thoroughbred mares and stallions in England. *Equine Veterinary Journal*. **39**: 438-445.
- Aurich C, Rojer H, Walter I. 2010. Treatment of oestrus mares with the non-steroidal anti-inflammatory drug vedaprofen reduces the inflammatory response of the endometrium to insemination. *Animal Reproduction Science* **121**: 104-106.
- Barbacini S, Necchi D, Zavaglia G, Squires ED. 2003. Retrospective Study on the Incidence of Postinsemination Uterine Fluid in Mares Inseminated with Frozen/Thawed Semen. *Journal of Equine Veterinary Science* **23**: 493-496.
- Barbacini S, Zavaglia G, Gulden P, Marchi V, Necchi D. 2000. Retrospective study on the efficiency of hCG in an equine artificial insemination programme using frozen semen. *Equine Veterinary Education* **12**: 312-317.
- Bergfelt DR, Pierson RA, Ginther OJ. 2006. Regression and resurgence of the CL following PGF 2α treatment 3 days after ovulation in mares. *Theriogenology* **65**: 1605-1619.
- Bergfelt DR, Adams GP. 2007. Ovulation and corpus luteum development. Pages 1-13 in Samper JC, Pycock JF, McKinnon AO, editors. *Current Therapy in Equine Reproduction*. W.B. Saunders-Elsevier. Missouri.
- Berghold P, Möstl E, Aurich Ch. 2007. Effects of reproductive status and management on cortisol secretion and fertility of oestrous horse mares. *Animal Reproduction Science* **102**: 276-285.
- Bradecamp EA. 2007. Estrous Synchronization. Pages 22-25 in Samper JC, Pycock J, McKinnon AO editors. *Current Therapy in Equine Reproduction*. W.B. Saunders-Elsevier. Missouri.
- Brinsko SP, Blanchard TL, Varner DD, Schumacher J, Love ChC, Hinrichs K, Hartman D. 2011. *Manual of Equine Reproduction, 3rd Edition*. Mosby-Elsevier. St. Louis.
- Bubeníčková F, Maňásková-Postlerová P, Šimoník O, Sirohi J, Šichtař J. 2020. Effect of Seminal Plasma Protein Fractions on Stallion Sperm Cryopreservation. *International Journal of Molecular Science* **21** (e6415) DOI: 10.3390/ijms21176415.

- Cadario ME, Merritt AM, Archbald LF, Thatcher WW, LeBlanc MM. 1999. Changes in intrauterine pressure after oxytocin administration in reproductively normal mares and in those with a delay in uterine clearance. *Theriogenology* **51**: 1017-1025.
- Card C. 2009. Hormone Therapy in the Mare. Pages 89-97 in Samper JC editor. *Equine Breeding Management and Artificial Insemination*, 2nd Edition. W.B. Saunders-Elsevier. Missouri.
- Carnevale EM, Maclellan LJ, Coutinho da Silva, TJ Scott, Squires EL. 2000. Comparison of culture and insemination techniques for equine oocyte transfer. *Theriogenology* **54**: 981-987.
- Cibulka J, Fučíková A, Härtlová H, Jílek F, Lánská V, Sedmíková M. 2004. *Základy fyziologie hospodářských zvířat*. Česká zemědělská univerzita. Praha.
- Claes A, Ball B, Scoggin KE, Roser JF, Woodward EM, Davolli GM, Squires EL, Troedsson MHT. 2017. The influence of age, antral follicle count and diestrous ovulations on estrous cycle characteristics of mares. *Theriogenology* **97**: 34-40.
- Cox TJ, Squires EL, Carnevale EM. 2009. Effect of Follicle Size and Follicle-Stimulating Hormone on Ovulation Induction and Embryo Recovery in the Mare. *Journal of Equine Veterinary Science* **29**: 213-218.
- Crespo F, Quiñones-Pérez C, Oritz I, Diaz-Jimenez M, Consuerga C, Pereire B, Dorado J, Hidalgo M. 2020. Seasonal variations in sperm DNA fragmentation and pregnancy rates obtained after artificial insemination with cooled-stored stallion sperm throughout the breeding season (spring and summer). *Theriogenology* **148**: 89-94.
- Crowe CAM, Ravenhill PJ, Hepburn RJ, Shepherd CH. 2008. A retrospective study of artificial insemination of 251 mares using chilled and fixed time frozen-thawed semen. *Equine Veterinary Journal* **40**: 572-576.
- Cuervo-Arango J a Newcombe JR. 2008. Repeatability of preovulatory follicular diameter and uterine edema pattern in two consecutive cycles in the mare and how they are influenced by ovulation inductors. *Theriogenology* **69**: 681-687.
- Cuervo-Arango J a Clark A. 2010. The first ovulation of the breeding season in the mare: The effect of progesterone priming on pregnancy rate and breeding management (hCG response rate and number of services per cycle and mare). *Animal Reproduction Science* **118**: 265-269.
- Cuervo-Arango J a Newcombe JR. 2010. Effect of changes in endometrial edema score following mating on pregnancy rate in the mare. *Animal Reproduction Science* **121**:115-117.
- Cuervo-Arango J, Mateu-Sánchez S, Aguilar JJ, Nielsen JM, Etcharren V, Vettorazzi MI, Newcombe JR. 2015. The effect of the interval from PGF treatment to ovulation on embryo recovery and pregnancy rate in the mare. *Theriogenology* **83**: 1272-1278.
- Červený Č. 2011. *Vademecum anatomie domácích savců*. Brázda. Praha.

- Davise Morel MCG. 2003. *Equine Reproductive Physiology, Breeding, and Stud Management* 2nd Edition. CABI. New York.
- Davies Morel MCG. 2015. *Equine Reproductive Physiology, Breeding and Stud Management*, 4th Edition. CABI. Cambridge.
- Davies Morel MCG a Newcombe JR. 2008. The efficacy of different hCG dose rates and the effect of hCG treatment on ovarian activity: Ovulation, multiple ovulation, pregnancy, multiple pregnancy, synchrony of multiple ovulation; in mare. *Animal Reproductive Science* **109**: 189-199.
- Davies Morel MCG, Newcombe JR, Hayward K. 2010. Factors affecting preovulatory follicle diameter in the mare: The effect of mare age, saeson and presence of other ovulatory follicles (multiple ovulation). *Theriogenology* **74**: 1241-1247.
- Dell'Aqua Jr JA, Campos GA, Garcia VFC, Freitas-Dell'Aqua CP, Alvarenga MA, Papa FO, Canisso IF. 2018. Association of Sodium Caseinate and Cholesterol Improved Fertility of Chilled Stallion Semen. *Journal of Equine Veterinary Science* **66**: 51.
- Doležel R, Růžičková K, Macečková G. 2012. Growth of the dominant follicle and endometrial folding after administration of hCG in mares during oestrus. *Veterinarni Medicina* **57**: 36-41.
- Donadeu FX, Ginther OJ. 2003. Interactions of follicular factors and season in the regulation of circulating concentrations of gonadotrophins in mares. *Reproduction* **5**: 743-750.
- Donadeu FX, Ginther OJ. 2002. Changes in concentrations of follicular fluid factors during follicle selection in mares. *Biology of Reproduction* **66**: 1111-1118.
- Evans MJ, Alexander SL, Irvine CHG, Livesey JH, Donald RAS. 1991. In vitro and in vivo studies of equine prolactin secretion throughout the year. *Journal of Reproduction and Fertility* **44**: 27-35.
- Freedman LJ, Garcia MC, Ginther OJ. 1979. Influence of photoperiod and ovaries on seasonal reproductive aktivty in mares. *Biology of Reproduction* **20**: 569-574.
- Gastal EL. 2009. Recent advances and new concepts on follicle and endocrine dynamics during the equine periovulatory period. *Animal Reproduction* **6**: 144-158.
- Gérard N a Robin E. 2019. Cellular and molecular mechanism of the preovulatory follicle differentiation and ovulation: What do we know in the mare relative to other species. *Theriogenology* **130**: 163-176.
- Ginther OJ. 1993. Major and minor follicular waves during the equine estrous cycle. *Journal of Equine Veterinary Science* **13**: 18-25.
- Ginther OJ. 2000. Selection of the dominant follicle in cattle and horses. *Animal Reproduction Science* **2**: 61-79.

- Ginther OJ, Gastal EL, Gastal MO, Beg MA. 2004. Seasonal influence on equine follicle dynamics. *Animal Reproduction* **11**: 31-44.
- Ginther OJ, Gastal MO, Gastal EL, Jacob JC, Beg MA. 2009. Age-related dynamics of follicles and hormones during an induced ovulatory follicular wave in mares. *Theriogenology* **71**: 780-788.
- Ginther OJ, Gastal MO, Gastal EL, Jacob JC, Siddiqui MAR, Beg MA. 2009b. Effects of age on follicle and hormone dynamics during the oestrus cycle in mares. *Reproduction, Fertility and Development* **200**: 955-963.
- Ginther OJ, Hannan MA, Beg MA. 2011. Luteolysis and associated interrelationships among circulating PGF₂ α , progesterone, LH, and estradiol in mares. *Domestic Animal Endocrinology* **41**: 174-184.
- Goff JP. 2015. The Endocrine System. Pages 617-726 in Reece WO, Ericson HH, Goff JP, Uemura EE, editors *Dukes' Physiology of Domestic Animals*. John Wiley & Sons, Incorporated. Iowa.
- Gomes GM, Crespilho AM, Leao KM, Jacob JCF, Gomes LPM, Segabinazzi LG, Papa FO, Alvarenga MA. Can Sperm Selection, Inseminating Dose, and Artificial Insemination Technique Influence Endometrial Inflammatory Response in Mares?. *Journal of Equine Veterinary Science* **73**: 43-47.
- Gores-Lindholm AR, LeBlanc MM, Causey R, Hitchborn A, Fayer-Hosken RA, Kruger M, Vandeplass ML, Flores P, Ahlschwade S. 2013. Relationships between intrauterine infusion of N-acetylcysteine, equine endometrial pathology, neutrophil function, post-breeding therapy, and reproductive performance. *Theriogenology* **80**: 218-227.
- Griffin PG, Ginther OJ. 1991. Dynamics of uterine diameter and endometrial morphology during the estrous cycle and early pregnancy in mares. *Animal Reproduction Science* **25**: 133-142.
- Güvenc K, Reilas T, Katila T. 2005. Effect of insemination dose and site on uterine inflammatory response of mares. *Theriogenology* **63**: 2504-2512.
- Hafez ESE, Jainudeen MR, Rosnina Y. 2000. Hormones, Growth Factors and Reproduction. Pages 33-54 in Hafez B and Hafez ESE, editors *Reproduction in Farm Animals 7th Edition*. Lippincott Williams & Wilkins. Maryland.
- Halász B. 2004. Anatomy of Hypothalamus. Pages 707-715 in Martini L, editors. *Encyclopedia of Endocrine Diseases*. Elsevier. Boston.
- Handler J, Schönlieb S, Hoppen HO, Aurich C. 2007. Influence of reproductive stage at PRID insertion on synchronization of estrus and ovulation in mares. *Animal Reproduction Science* **97**: 382-393.
- Heckenbichler S, Deichsel K, Peters P, Aurich Ch. 2011. Quality and fertility of cooled-shipped stallion semen at the time of insemination. *Theriogenology* **75**: 849-856.

- Heitland AV, Jasko DJ, Graham JK, Squires EL, Amann RP, Pickett BW. 2018. Motility and Fertility of Stallion Spermatozoa Cooled and Frozen in a Modified Skim Milk Extender Containing Egg Yolk and Liposome. *Biology of Reproduction*
- Hodson D, Howe S, Jeffcott L, Reid S, Mellor D, Higgins A. 2005. Effect of prolonged use of altrenogest on behaviour in mares. *The Veterinary Journal* **169**: 113-115.
- Hollinshead FK, Hanlon DW. 2018. A Single Fixed-time Insemination Prior to Ovulation Results in Higher Pregnancy Rates Than Post-ovulation Insemination When Using Frozen-thawed Semen. *Journal of Equine Veterinary Science* **66**:198-199.
- Horspool LJ. 2015. *The Equine Edition of the Compendium of Animal Reproduction*. Intervet International B.V. Kenilworth.
- Chopin JB, Brookers VJ, Rodger J, Gunn A. 2020. Comparison of human chorionic gonadotropin (hCG), deslorelin, deslorelin combined with hCG, and histerelin to induce ovulation in the mare. *Journal of Equine Veterinary Science*. **89** (e103095) DOI: 10.1016/j.jevs.2020.103095
- Christmann A, Sieme H, Martinsson G, Distl O. 2017. Analysis of systematic effects on the reproductive performance in Hanoverian warmblood. *Zuchtungskunde* **89**: 254-267.
- Immonen I a Cuervo-Arango J. 2020. Effect of Timing Postovulatory Insemination Relative to Human Chorionic Gonadotropin/Buserelin Treatment With 1 Straw of Frozen-Thawed Semen on Mare Fertility. *Journal of Equine Veterinary Science* **87** (e102900) DOI: 10.1016/j.jevs.2019.102900.
- Kanitz W, Schneider F, Hoppen HO, Unger C, Nürnberg G, Becker F. Pregnancy rates, Lh and progesterone concentrations in mares treated with a GnRH agonist. *Animal Reproduction Science* **97**: 55-62.
- Kareskoski M, Venhoranata H, Virtala AM, Katila T. 2019. Analysis of factors affecting the pregnancy rate of mares after inseminations with cooled transported stallion semen. *Theriogenology* **127**: 7-14.
- Kelley KK, Thompson DL, Storer WA, Mitcham PB, Gilley RM, Burns PJ. 2006 Estradiol interactions with dopamine antagonists in mares: Prolactin secretion and reproductive traits. *Journal of Equine Veterinary Science* **26**: 517-528.
- Kittner O a kol. 2011. *Lékařská fyziologie*. Grada. Praha.
- Knutti B, Pycock JF, ven der Weijden GC, Küpfer U. 2000. The influence of early postbreeding uterine lavage on pregnancy rate in mares with intrauterine fluid accumulations after breeding. *Equine Veterinary Education* **12**: 267-270.
- Kotilainen T, Huhtinen M, Katila T. 1994. Sperm-induced leukocytosis in the equine uterus. *Theriogenology* **41**: 629-636.

- Köhne M, Kuhlmann M, Tönissen A, Martinsson G, Sieme H. 2020. Diagnostic and Treatment Practices of Equine Endometritis-A Questionnaire. *Frontiers in Veterinary Science* **7** (e00547) DOI: 10.3389/fvets.2020.00547.
- Kučerová M. 2020. Situační a výhledová zpráva Koně. Ministerstvo zemědělství. Praha.
- Kuhl J, Aurich J, Aurich Ch. 2017. Effects of the Prostaglandin F_{2α} Analogues Cloprostenol and Lutprostiol in Combination With hCG on Synchronization of Estrus and Ovulation in Mares. *Journal of Equine Veterinary Science* **57**: 67-70.
- Lane EA, Bijnen MLJ, Osborne M, More SJ, Henderson ISF, Duffy P, Crowe MA. 2016. Key Factors Affecting Reproductive Success of Thoroughbred Mares and Stallions on Commercial Stud Farm. *Reproduction in Domestic Animals* **51**: 181-187.
- Lewis N, Morganti M, Collingwood, Grove-White DH, McGregor Argo C. 2015. Utilization of One-Dose Postovulation Breeding With Frozen-Thawed Semen at a Commercial Artificial Insemination Center: Pregnancy Rates and Postbreeding Uterine Fluid Accumulation in Comparison to Insemination With Chilled or Fresh Semen. *Journal of Veterinary Science* **35**: 882-887.
- Ley WB. 2004. Broodmare Reproduction for Equine Practitioner. Teton NewMedia. Jackson.
- Loomis PR, Squires EL. 2005. Frozen semen management in equine breeding programs. *Theriogenology* **64**:480-491.
- Nagy P, Guillaume D, Daels P. 2000. Seasonality in mares. *Animal Reproduction Science* **60**: 245-262.
- Nath LC, Anderson GA, McKinnon AO. 2010. Reproductive efficiency of Thoroughbred and Standardbred horses in north-east Victoria. *Australian Veterinary Journal* **88**:169-175.
- Newcombe JR, Martinez TA, Peters AR. 2001. The effect of the gonadotropin-releasing hormone analog, buserelin, on pregnancy rates in horse and pony mares. *Theriogenology* **55**: 1619-1631.
- Newcombe JR. 2007. The Follicle: Practical Aspects of Follicle Control. Pages 14-21 in Samper JC, Pycock JF, McKinnon AO, editors. *Current Therapy in Equine Reproduction*. W.B. Saunders-Elsevier. Missouri.
- Newcombe JR. 2011. Human Chorionic Gonadotropin. Pages 1804-1810 in McKinnon AO, Squires EL, Vaala WE, Varner DD editors. *Equine Reproduction 2nd Edition*. Wiley-Blackwell. Oxford.
- Newcombe JR a Cuervo-Arango J. 2015. The Effect of Time of Breeding Relative to Ovulation on Pregnancy Rate When Using Cooled Transported Semen or Natural Mating in the Mare. *Journal of Equine Veterinary Science* **35**: 956-959.
- Macan RC, Camargo CE, Zielinski BL, Cardoso NGH, de Lara NSS, Bergstein-Galan TG, Weiss RR, Kozicki LE. 2021. Timed artificial insemination in crossbred mares: Reproductive efficiency and costs. *Reproduction in Domestic Animals* **56**: 459-466.

- Mardešić T. 2013. Základy diagnostiky a léčby anovulatorní sterility. Pages 21-28 in Mardešić T, editors. Diagnostika a léčba poruch plodnosti. Grada. Praha.
- Mari G, Morganti M, Merlo B, Castagnetti C, Parmeggiani F, Govoni N, Galeati G, Tamanini C. 2009. Administration of sulpiride or domperidone for advancing the first ovulation in deep anestrous mares. *Theriogenology* **71**: 959-965.
- Maurice Goodman H. 2009. Pituitary Gland. Pages 29-42 in Maurice Goodman H, editors. Basic Medical Endocrinology 4th Edition. Academic Press. Cambridge.
- McCue PM. 2014. Prediction of Ovulation. Pages 50-52 in Dascanio J and McCue PM, editors. Equine Reproductive Procedures. John Wiley & Sons. Oxford.
- McCue PM. 2014b. Hormone Therapy in Cycling Mares. Pages 149-154 in Dascanio J and McCue PM, editors. Equine Reproductive Procedures. John Wiley & Sons. Oxford.
- McCue PM. 2014c. Ultrasound Evaluation of the Non-Pregnant Mare. Pages 26-31 in Dascanio J and McCue PM, editors. Equine Reproductive Procedures. John Wiley & Sons. Oxford.
- McKinnon AO, Carnevale EM. 1993. Ultrasonography. Pages 211-220 in McKinnon AO, Voss JL editors. Equine Reproduction. Lea & Febinger. Philadelphia.
- Metcalf ES, Thompson MM. 2010. The Effect of PGF 2α -Induction of Estrus on Pregnancy Rates in Mares. *Journal of Equine Veterinary Science* **30**: 196-199.
- Morresey PR. 2011a. How hormones work. Pages 1601-1607 in McKinnon AO, Squires EL, Vaala WE, Varner DD editors. Equine Reproduction 2nd Edition. Wiley-Blackwell. Oxford.
- Morresey PR. 2011b. Oxytocin, inhibin, activin, relaxin and prolactin. Pages 1679-161688 in McKinnon AO, Squires EL, Vaala WE, Varner DD editors. Equine Reproduction 2nd Edition. Wiley-Blackwell. Oxford.
- Miller CD. 2008. Optimizing the use of frozen-thawed equine semen. *Theriogenology* **70**: 463-468.
- Morrell JM, Richter J, Martinsson G, Stuhmann, Hoogewijs M, Roels K, Dalin AM. 2014. Pregnancy rates after artificial insemination with cooled stallion spermatozoa either with or without Single Layer Centrifugation. *Theriogenology* **82**: 1102-1105.
- Palm F, Walter I, Budik S, Aurich CH, Kolodziejek J, Nowotny N. 2008. Influence of different semen extenders and seminal plasma on PMN migration and on expression of IL-1 β , IL-6, TNF- α and COX-2 mRNA in the equine endometrium. *Theriogenology* **70**: 843-851.
- Palmer E. 1978. Control of the oestrus cycle of the mare. *Journal of Reproduction and Fertility* **54**: 495-505.
- Parkinson KC, Vanderwall DK, Rigas J, Sweat A. 2020. Effect of Chronic Administration of Oxytocin on Corpus Luteum Function in Cycling Mares. *Journal of Equine Veterinary Science* **90**:

- Perkins NK & Grimmett JB. 2011. Pregnancy and twinning rates in Thoroughbred mares following the administration of human chorionic gonadotropin (hCG). *New Zealand Veterinary Journal* **49**: 94-100.
- Phetudomsinsuk K. 2017. Investigation into the effect of prostaglandin F2a, GnRH analogue and hCG on induction of ovulation in mares. *Thai Journal of Veterinary Medicine* **47**: 493-499.
- Pycock JF. 2007. Therapy for mares with Uterine Fluid. Pages 93-104 in Samper JC, Pycock JF, McKinnon AO, editors. *Current Therapy in Equine Reproduction*. W.B. Saunders-Elsevier. Missouri.
- Pycock JF a Newcombe J. 1996. Assessment of the effect of 3 treatments to remove intrauterine fluid on pregnancy rate in the mare. *The Veterinary record* **138**: 320-323.
- Raz T, Aharonson-Raz K. 2012. Ovarian Follicular Dynamics During the Estrous Cycle in the Mare. *Israel Journal of Veterinary Medicine* **67**: 11-18.
- Reilas T, Katila T, Mäkelä O, Huhtinen MK, Koskinen E. 1997. Intrauterine Fluid Accumulation in Oestrus Mares. *Acta veterinaria Scandinavica* **38**: 69-78.
- Rigby SL, Derczo S, Brinsko SP, Blanchard TL, Taylor T, Forrest D, Vaener DD. 2000. Oviductal sperm numbers following proximal uterine horn or uterine body insemination. *Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners* **46**:332-334.
- Risco AM, Reilas T, Muilu L, Kareskoski M, Katila T. 2009. Effect of oxytocin and flunixin melgumine on uterine response to insemination in mares. *Theriogenology* **72**: 1195-1201.
- Sanchez R, Gomez I, Samper JC. 2009. Artificial Insemination with Frozen Semen. Pages 175-183 in Samper JC editor. *Equine Breeding Management and Artificial Insemination*, 2nd Edition. W.B. Saunders-Elsevier. Missouri.
- Samper JC.1997. Ultrasonographic Appearance and the Pattern of Uterine Edema to Time Ovulation in Mare. AAEP Annual Convention, Orlando. Available from: <https://www.ivis.org/sites/default/files/library/aaep/1997/Samper.pdf> (Accessed April 2021).
- Samper JC. 2007. How to Interpret Endometrial Edema in Brood Mares. AAEP Annual Convention, Orlando. Available from: <https://www.ivis.org/library/aaep/aaep-annual-convention-orlando-2007/how-to-interpret-endometrial-edema-brood-mares> (Accessed April 2021).
- Samper JC, Estrada AJ, McKinnon AO. 2007. Insemination with Frozen Semen. Pages 285-288 in Samper JC, Pycock JF, McKinnon AO, editors. *Current Therapy in Equine Reproduction*. W.B. Saunders-Elsevier. Missouri.

- Sharp DC. 2011. Vernal transition into the breeding season. Pages 1704-1715 in McKinnon AO, Squires EL, Vaala WE, Varner DD editors. Equine Reproduction 2nd Edition. Wiley-Blackwell. Oxford.
- Shirazi A, Gharagozloo F, Niasari-Naslaji A, Bolourchi M. 2002. Ovarian follicular dynamics in Caspian mares. Journal of Equine Veterinary Science **22**: 208-211.
- Sieme H, Schäfer T, Stout TA, Waberski D, Klug E. 2003. The effects of different insemination regimes on fertility in mares. Theriogenology **60**: 1153-1164.
- Staempfli SA. 2011. Prostaglandins. Pages 1797-1803 in McKinnon AO, Squires EL, Vaala WE, Varner DD editors. Equine Reproduction 2nd Edition. Wiley-Blackwell. Oxford.
- Stout TAE. 2011. Prostaglandins. Pages 1642-1647 in McKinnon AO, Squires EL, Vaala WE, Varner DD editors. Equine Reproduction 2nd Edition. Wiley-Blackwell. Oxford.
- Squires E, Barbacini S, Matthews P, Byers W, Schwenzer K, Steiner J, Loomis P. 2006. Retrospective study of factors affecting fertility of fresh, cooled and frozen semen. Equine Veterinary Education **18**: 96-99.
- Šichtař J, Hošková K. 2013. I klisny mají své dny. Jezdectví **61**: 18-23.
- Tazawa SP, Gastal MO, Silva LA, Evans MJ, Gastal EL. 2017. Preovulatory Follicle Dynamics, and Ovulatory and Endometrial Responses to Different Doses of hCG and Prediction of Ovulation in Mares. Journal of Equine Veterinary Science **56**: 40-51.
- Tek HB. 2019. The Effect of Altrenoges Treatment Timing and Artificial Lightening on Hastening of Ovulation in Barren Mares. Acta Scientiae Veterinariae **47**: 1-5.
- Tibary A. 2011. Estrogen Therapy. Pages 1825-1835 in McKinnon AO, Squires EL, Vaala WE, Varner DD editors. Equine Reproduction 2nd Edition. Wiley-Blackwell. Oxford.
- Vácha M, Bičík V, Petrásek R, Šimek V, Fellnerová I. 2004. Srovnávací fyziologie živočichů. Masarykova Univerzita. Brno.
- Vanderwall DK, Juergens TD, Woods GL. 2001. Reproductive performance of commercial broodmares after induction of ovulation with HCG or Ovuplant™ (deslorelin). Journal of Equine Veterinary Science **21**: 539-542.
- Vidament M. 2005. French field results (1985-2005) on factors affecting fertility of frozen stallion semen. Animal Reproduction Science **89**: 115-136.
- Vizuite G, Diez E, Galisteo J, Aguera E, Aguilera-Tejero E, Perez-Marin CC. 2013. Comparison of Different Treatments for Oestrus Induction in Seasonally Anovulatory Mares. Reproduction in Domestic Animals **48**: 463-469.
- Watson ED, Thomassen R, Nikolakopoulos E. 2003. Association of uterine edema with follicle waves around the onset of the breeding season in pony mares. Theriogenology **59**: 1181-1187.

Wilson CG, Downie CR, Hughes JP, Roser JF. 1990. Effects of repeated hCG injections on reproductive efficiency in mares. *Journal of Equine Veterinary Science* **10**:301-308.

Woods J, Bergfelt DR, Ginther OJ. Effects of time of insemination relative to ovulation on pregnancy rate and embryonic-loss rate in mares. *Equine Veterinary Journal* **22**: 410-415.

