Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra chovu hospodářských zvířat

Fakulta agrobiologie,
potravinových a přírodních zdrojů

Biotechnologie v reprodukci koní

Bakalářská práce

Pavla Pokorná

Chov koní

Ing. Martina Janošíková

© 2021 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

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

V Praze dne 3. 5. 2021 _____

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala paní Ing. Martině Janošíkové za odborné vedení při psaní mé bakalářské práce a rodině za podporu při mých studiích.

Biotechnologie v reprodukci koní

Souhrn

V asistované reprodukci koní jsou využívány biotechnologické metody aspirace oocytů (OPU), *in vitro* oplození (IVF) a následný přenos embryí (ET) nebo intracytoplazmatická injekce spermií (ICSI).

Odběr oocytů lze provádět od živých klisen nebo *post mortem*. Odběr ze živých klisen se provádí buď invazivně přes slabinu nebo neinvazivně metodou ovum pick up. OPU se provádí pomocí transvaginální ultrazvukové sondy opakovaným výplachem folikulů aspiračními jehlami. U klisen se nedaří vyvolat úspěšnou superovulaci a například ve srovnání se skotem jsou odběry oocytů méně výnosné. Po odběru je nutné provést třídění oocytů a následné zrání *in vitro*. U koní není možné provádět samovolné oplození na Petriho misce, kvůli neschopnosti penetrace spermií přes zonu pellucidu a nedokonalé kapacitaci spermií *in vitro*. Fertilizace se provádí pomocí ICSI, kdy je spermie penetrována do oocytu pomocí Piezo mikromanipulátoru. Následná kultivace embryí probíhá do stádia blastocysty v atmosféře 5 % CO_2, 5 % O_2 a 90 % N_2 při 38, 2 °C.

Při ET se používají embrya získaná *in vitro* i *in vivo*. Embrya vzniklá *in vivo* sestupují do dělohy šestý den po ovulaci, jejich odběr se provádí proplachem dělohy. Přenos se provádí přímo do děložních rohů. Základem úspěšného procesu je správné načasování přenosu a synchronizace klisny dárkyně s příjemkyní. Úspěšnost přenosů se aktuálně pohybuje okolo 70 až 90 %. Podstatou ET je možnost odchovu násobného počtu hříbat klisny dárkyně, která vyniká sportovními schopnostmi, aniž bychom přerušili její sportovní kariéru. Stejnou metodu lze použít u klisen, které z různých důvodů nejsou schopné donosit a porodit životaschopné hříbě.

Frekventované je využití čerstvých, chlazených nebo hluboce mrazených inseminačních dávek (ID). Asi 20 % hřebců nemá dostatečnou kvalitu ejakulátu pro výrobu ID. K hodnocení dochází bezprostředně po odběru, kdy se mimo základního makroskopického hodnocení používají i přístrojové metody jako je CASA nebo průtoková cytometrie. Ejakulát splňující základní parametry se ředí ředidly na bázi mléka nebo vaječného žloutku s přidáním antibiotik, sacharidů, pufrů a kryoprotektantů, které mají zásadní vliv na přežitelnost buněk v procesu kryokonzervace. Optimalizace mrazících médií je stále předmětem výzkumu.

Klíčová slova: oocyt, spermie, *in vitro* oplození, inseminační dávka, aspirace

Biotechnology of horse reproduction

Summary

Biotechnological methods like aspiration of oocyte (OPU), *in vitro* fertilisation (IVF) and subsequent transfer of embryos (ET) or intracytoplasmic injection of sperm (ICSI) are used in artificial reproduction of horses.

Collection of oocytes can be done from live mares or *post mortem*. Collection from live mares is performed invasively through the groin or noninvasively by the method ovum pick up. OPU is made by transvaginal ultrasound probe by repeated washing of follicles with aspiration needle. Effective superovulation can't be reached in mares and for example compared to cow collections are less profitable. After collection it is necessary to make oocytes sorting and *in vitro* maturation. Spontaneous fertilisation doesn't work in Petri dish in case of horses because of sperm inability to penetrate through the zona pellucida and imperfect sperm capacitation *in vitro*. Fertilisation is made by ICSI, when sperm is penetrated to oocyte by Piezo micromanipulator. The following maturation of embryos takes place to the stage of blastocyst in atmosphere of 5 % CO_2, 5 % O_2 a 90 % N_2 at temperature of 38. 2 °C.

Embryos for ET are collected *in vitro* and *in vivo*. *In vivo* embryos descend to the uterus the sixth day after ovulation, their collection is made by uterus washing. Transfer is performed directly to the uterine horns. The main assumption condition of a successful transfer is the right timing and synchronisation of mare donor and mare recipient. Transfer rate is currently about 70 to 90 %. The key purpose of ET is the possibility to get more than one foal from mare donor with high sports skills without interruption of its sport career. Same method can be used for mare, which can't carry a foal to term and give a birth to foal from various reasons.

Fresh, chilled or deeply frozen insemination doses (ID) are frequently used. About 20 % of stallions don't have sufficient quality of ejaculate for production of ID. Evaluation is made right after collection. Besides basic macroscopic evaluation are also used instrument methods like CASA and flow cytometry. Ejaculate meeting the basic parameters is diluted by milk-based or egg yolk-based extenders with addition of antibiotics, carbohydrates, buffers and cryoprotectants, which are important for cell survivability during cryopreservation. Optimization of freezing medias is still a subject of research.

Keywords: oocyte, sperm, *in vitro* fertilisation, insemination dose, aspiration

Obsah

1 Úvod 8

2 Cíl práce 9

3 Literární rešerše 10

3.1 In vitro 10

3.1.1 Sběr oocytů 10

3.1.1.1 Laparotomie přes slabinu 10

3.1.1.2 Transkutánní punkce přes slabinu 11

3.1.1.3 Ovum pick up 11

3.1.1.4 Zisk post mortem 12

3.1.2 Třídění oocytů 13

3.1.3 Zrání oocytů 13

3.1.4 *In vitro* fertilizace 14

3.1.5 Kultivace embryí 15

3.2 Embryo transfer 16

3.2.1 Klisna dárkyně a příjemkyně 16

3.2.1.1 Synchronizace 17

3.2.2 Zisk embrya 18

3.2.3 Přenos embrya 19

3.3 Inseminační dávka 20

3.3.1 Odběr spermatu 20

3.3.1.1 Odběr epididymálních spermií 21

3.3.2 Hodnocení ejakulátu 22

3.3.2.1 Makroskopické vlastnosti 22

3.3.2.2 Mikroskopické vlastnosti 23

3.3.2.3 Další metody vyšetření 24

3.3.3 Příprava inseminační dávky 25

3.3.3.1 Ředidla 26

3.3.4 Kapacitace 29

3.4 Kryokonzervace 30

3.4.1 Kryoprotektanty 30

3.4.2 Vitrifikace 31

3.4.3 Oocyty 31

3.4.4 Embrya 32

3.4.5 Spermie 33

3.5 Průtoková cytometrie.....34
3.5.1 Sexování spermií 35
3.6 Klonování.....36
3.6.1 Rozdělení embryí 37
4 Závěr..... 38
5 Literatura 39

1 Úvod

Umělá inseminace koní (AI – z angl. Artificial insemination) je v posledních několika desetiletích velice se rozvíjející odvětví. Díky chlazeným a mrazeným dávkám má majitel klisny možnost si vybrat z široké nabídky plemeníků téměř z celého světa, tím se genetická informace plemeníka může daleko více rozšířit. To samé platí i u klisen, kdy díky odběru a následné možnosti uchovat oocyty či embrya se rozrůstá možnost jejího genetického uplatnění. Oplodnění pomocí inseminačních dávek má ale mnohem více výhod. Vzhledem k tomu, že po odběru ejakulátu je možnost ho zkontrolovat, se snižuje riziko přenosu infekce na minimum. Při přirozené plemenitbě dochází ke zraněním klisny nebo hřebce a zvířata jsou ve stresu kvůli dopravě, to vše se díky AI eliminuje. V dnešní době, kdy úspěšní sportovní koně mají přístup k nadstandartní veterinární péči, se prodlužuje doba, kdy kůň může vrcholově sportovat. Bohužel to má za následek, že především klisny po sportovní kariéře už bývají moc staré na zařazení do chovu. Díky možnosti odebrání oocytů a embryo transferu se tak prodlužuje doba, kdy od sportovní klisny můžeme získat potomky. Velkou výhodu to má i v samotném počtu hříbat – za normálních podmínek může mít klisna jedno, výjimečně dvě hříbata za rok. Díky AI je možné od jedné klisny získat nejméně jedno hříbě na jednu ovulaci.

Při náhlém úhynu zvířete je možnost odebrání oocytů i spermií *post mortem*, jejich následná kultivace *in vivo* a přenos na donošení u klisny dárkyně. Dnes již existují i techniky, jak gamety a embrya uchovat po několik let zmrazené na teplotu – 196 °C v tekutém dusíku. Tento způsob uchování byl umožněn díky objevení vlastností kryoprotektantů. Látek, které chrání buněčné membrány od teplotního šoku.

Máme-li koně s vysokým genetickým potenciálem, který se z nějakého důvodu, například z důvodu kastrace, nemůže rozmnožovat, existují dnes možnosti, jak i od tohoto jedince získat potomky. Jedná se o proces klonování, kdy se vezme jádro somatické buňky, které se vloží do oocytu jiného jedince. Takto vznikne geneticky téměř identický jedinec, kterého posléze můžeme zařadit i do chovu. Klonování je po etické stránce velmi diskutované téma, na které není jasná odpověď. Některé plemenné knihy to považují za krok zpět, zatímco jiné knihy jako možnost většího uplatnění úspěšných koní.

2 Cíl práce

Cílem práce bylo napsat literární rešerši na biotechnologie v reprodukci koní podle aktuálních článků převážně ze zahraniční literatury.

3 Literární rešerše

3.1 In vitro

In vitro je latinský termín překládaný jako „ve skle“. V medicínských a biologických oborech se pak v přeneseném slova smyslu hovoří o práci v umělých podmínkách laboratoře (Petriho miskách, zkumavce apod.)

In vitro produkce embryí lze v dnešní době provádět s oocyty získaných z živých klisen, ale i z klisen, které náhle uhynuly, tedy *post mortem*. Po sběru se oocyty dělí podle kumulo-oocytárního komplexu na tři skupiny – expandované, kompaktní a degenerující. Poté následuje zrání oocytů a nakonec dochází k oplodnění pomocí intracytoplazmatické injekce spermií (ICSI). Cena za březí klisnu se ve světě značně liší – okolo 5 až 9 tisíců dolarů. Záleží na laboratoři ale i na zemi. Dnes se úspěšnost pohybuje okolo 1,2 embrya na jeden odběr (Maserati & Mutto 2016).

3.1.1 Sběr oocytů

Pro odběr oocytů z živých klisen se používají dvě metody – invazivní a neinvazivní. Invazivní metoda spočívá v laparotomii přes slabinu nebo transkutánní punkci přes slabinu. Mezi neinvazivní metody se řadí ovum pick up (opakované vyplachování vaječníků). Sběr oocytů *post mortem* se provádí z rozřezaných vaječníků, kyretáží nebo aspirací.

Dnešní výzkumy ukazují, že úspěšnou dárkyní oocytů může být i klisna, která vlivem věku, nemocí nebo nefunkčností vejcovodů či jinou deformací pohlavních orgánů není sama schopna donosit ani poskytnout embryo pro embryo transfer (Rader et al. 2016). Navíc díky možnosti odebrat více oocytů z jedné klisny, se navyšuje počet hříbat, které můžeme získat z jedné klisny za jeden rok. V dnešní době je možné oocyty přepravovat v mediu při pokojové teplotě až 24 hodin. To dává možnost provést odběr v jiném místě, než bude probíhat následná kultivace a fertilizace (Stout 2020).

Bohužel u klisen se zatím nenašel úspěšný koňský folikulostimulační hormon (FSH), který by vyvolal superovulaci. Zlepšení přineslo použití extraktu z koňské hypofýzy se zvýšeným obsahem FSH nebo rekombinantní FSH. Ačkoliv se touto hormonální stimulací stále nedosahuje výsledků jako u superovulovaných krav – průměrný zisk na jednu krávu je 6 embryí, zvýší se tím počet získaných embryí z jedné klisny na 3-4. Ještě lepších výsledků se dosahovalo po přidání rekombinantního koňského luteinizačního hormonu. Bohužel tato metoda byla zatím uplatněna pouze v několika málo studiích (Squires 2020).

3.1.1.1 Laparotomie přes slabinu

Při odběru oocytu laparotomií jsou klisny pod mírnou sedací a zároveň dostanou i epidurální anestetikum. 24 hodin před zákrokem jsou klisny ponechány bez potravy, k vodě mají přístup neomezeně. Celkově jsou v paralumbální jámě provedeny čtyři otvory, které

prochází přes podkoží, vnější a vnitřní šikmý břišní sval pomocí trokaru o průměru 12 mm. Prvním otvorem je pomocí CO_2 naplněna břišní dutina, pro vizualizaci vaječníků, vejcovodů a dělohy. Druhým otvorem se pomocí trokaru vloží laparoskop (kamerka sklonem 30°). Dalšími dvěma otvory jsou vloženy nástroje pro odběr oocytů. Pro lepší identifikaci nálevky vejcovodu jsou vaječníky přes rektum otočeny o 180° kraniomediálním směrem. Sběr oocytů se provádí katetrem, kdy se vejcovody propláchnou roztokem methylenové modři. Čtvrt hodiny po zákroku jsou klisny kontrolovány pomocí endoskopu přes dělohu. Operace je prováděna na stojících klisnách a trvá přibližně dvacet minut (Köllmann et al. 2011).

3.1.1.2 Transkutánní punkce přes slabinu

Transkutánní punkce oocytů je oproti laparotomii poměrně jednoduchý chirurgický zákrok, který nepotřebuje žádné velké přípravy. Metoda je sice časově méně náročná, ale kvůli neschopnosti u klisen vyvolat superovulaci nemá takovou efektivitu. Klisnu je nutné předem hormonálně stimulovat, k tomu se používají různé hormony. Takto odebrané oocyty se často používají pro transfer a je dosahováno vysoké úspěšnosti. Je možné odebírat oocyty i klisnám, které mají například infekci vaginy nebo jiné problémy v místě vývodních cest pohlavních. Výhodou odběru oocytu z preovulačních folikulů je nejen to, že kumulo-oocytární komplex se již začíná oddělovat od stěny folikulu a odběr je tedy možné provést pouze pomocí jehly, ale i fakt, že skoro všechny oocyty jsou již zralé a není tedy nutná další maturace *in vitro*. Odběr oocytů lze provádět zhruba jednou za dva týdny.

Vybrané klisny jsou pravidelně sledovány transrektální sondou pro zjištění velikosti folikulů. Po naměření folikulu větších než 25 mm je klisnám aplikována dávka syntetického analogu gonadoliberinu (GnRH). Po 25-28 hodinách jsou takto velké folikuly aspirovány přes bok. Pokud se plánuje opakované odebírání, následující dva dny klisny dostanou injekci progesteronů a estrogenů. Šestý a sedmý den je klisnám podán prostaglandin F2α (PGF 2α). 13. den po první aspiraci se celý postup opakuje. Při odběru jsou klisny pod sedací a vaječníky jsou přidržovány *per rectum* (Jacobson et al. 2010).

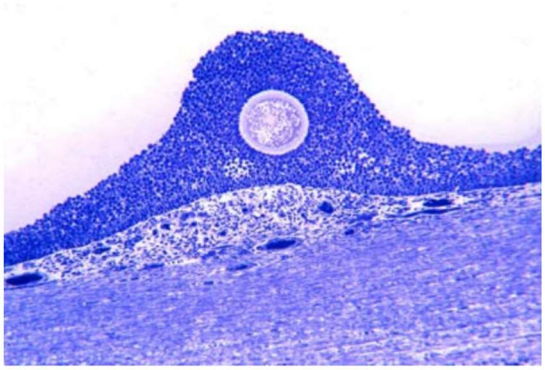
3.1.1.3 Ovum pick up

Mezi neinvazivní a pro klisnu méně riskantní postup s možností častějšího opakování patří ovum pick up (OPU). Jedná se aspirace oocytů pomocí transvaginální ultrazvukové sondy (TUGA z angl. transvaginal ultrasonic-guided aspiration). Nevýhodou této metody je vysoká cena způsobená vysokou cenou zařízení a nutností mít vysoce vyškolený personál. TUGA se skládá z vaginální sondy, ultrazvuku, vakuové pumpy a vodícího zařízení pro dvojitou aspirační jehlu s oddělenými vstupními a výstupními kanály (Galli et al. 2014). Ve snaze snížit cenu celého setu byly uplatněny i jednoplášťové jehly. S nimi je ale dosahováno horších výsledků, protože zde nedochází k turbulencím jako u dvojité jehly, které napomáhají k oddělení kumulo-oocytárního komplexu od stěny folikulu. Jehly se pohybují od velikosti 12 až 18 G.

Velikost vybrané jehly závisí na velikosti folikulu. Vyšší tlak v pumpě napomáhá zisku více oocytů, ale také zvyšuje procento těch degradovaných. Oocyty se odebírají buď kdykoliv jako nezralé z vedlejších folikulů nebo zralé z předovulačních folikulů po předchozí gonadotropinové stimulaci (Rader et al. 2016).

Oproti skotu se u klisen setkáváme s problémem, že kumulus je pevně přichycen ke granulózní membráně, viz obr. č. 1. Je tedy nutné folikul několikrát (někdy až 8krát) propláchnout médiem, a přitom jehlou seškrabávat stěnu folikulu. K aspiraci se používají všechny folikuly, které mají velikost alespoň 1 cm (Galli et al. 2014). Bohužel s tím souvisí i menší výtěžnost – oproti skotu, kde je to až 60 %, je u klisen okolo 30 %.

Velkou výhodou této metody je, že nevyžaduje žádnou velkou přípravu klisny pomocí hormonální stimulace. Během zákroku se doporučuje fixace klisny a epidurální anestezie z důvodu omezení rektální aktivity. Vaječník je opět přidržován přes rektum. Úkon lze provádět i během prvního trimestru březosti. Při opakovaném OPU se doporučuje interval 14 dní. Při aspiraci každých 7 dní docházelo u klisen ke snížení počtu folikulů (Šichtař 2018).



Obrázek 1: Koňský oocyt přichycený ke stěně folikulu (Hinrichs 2010).

3.1.1.4 Zisk post mortem

U náhle uhynulých klisen je možný sběr oocytů *post mortem*. Rozřezání vaječníků se provádí pomocí skalpelu. Vaječníky jsou do laboratoře převezeny za pokojové teploty, maximálně chlazeny při teplotě 12 °C, a následně naloženy do 5% roztoku fetálního bovinního séra ve fyziologickém roztoku pufrovaném fosfátem. Oocyty získané touto metodou je nutné přepravit do laboratoří ICSI co nejdříve po úmrtí klisny (maximálně 6 h) (Hinrichs 2010).

Mezi časově méně náročné metody, ale bohužel s nižší účinností, patří aspirace oocytů. Při rozřezání je průměrný zisk 9,5 oocytu na folikul, zato u aspirace je to pouze 6,8 oocytu. Výhodou této metody je, že už během samotného odebírání je část kumulárních buněk odstraněna (Alm et al. 1997). Přeprava probíhá v roztoku s NaCl. Samotná aspirace se provádí pomocí vakuové pumpy nebo injekční stříkačky (Hinrichs 2010). V některých případech se dokonce přistupuje ke kombinaci více metod (Šichtař 2018).

Při kyretáži jsou vaječníky také převáženy při pokojové teplotě. V laboratoři jsou očištěny. Folikuly jsou rozříznuty a pomocí kyrety jsou vyškrábnuty oocyty, a to včetně granulózní vrstvy. Tato metoda je časově náročnější a získané oocyty vykazují pomalejší schopnost maturace (Merlo et al. 2018). Na druhou stranu se dosahuje vysoké výtěžnosti a to až 18 oocytů na klisnu (Hinrichs et al. 2012).

3.1.2 Třídění oocytů

Po získání oocytů je nutné je rozdělit pod mikroskopem podle komplexu kumulus-oocyt na tři skupiny – kompaktní (Cp), expandované (Ex) a degenerující. Ze studií vyplývá, že v rychlosti maturace není rozdíl a úspěšnost je asi 60,2 %. Expandované oocyty mají zdeformované okraje a jejich cytoplazma je heterogenní. Heterogennost cytoplazmy je vysvětlována vysokou mírou meiotické aktivity. Kompaktní oocyty často pocházejí z teprve vyvíjecích se folikulů a nejsou tedy plně vyzrálé. Mají pevné tkáně i *corona radiata* (Merlo et al. 2018). Na druhou stranu Matsukawa et al. (2007) dosáhl lepších výsledků u expandovaných oocytů (Matsukawa et al. 2007). Obecně se uvádí, že kompaktní oocyty potřebují delší dobu zrání (Merlo et al. 2018).

3.1.3 Zrání oocytů

Zrání do stádia oplození schopného oocytu v metafázi II (M II) neboli maturace probíhá v inkubátorech při 38,2 °C s vlhčenou atmosférou a 5 % CO_2 v chemicky definovaném médiu (médium M119 doplněné o Earlovou sůl, 10 % roztok bovinního séra a 5 mU/ml bovinní FSH). Doba zrání se udává 22-28 h (Choi et al. 2004). Míra úspěšnosti se v různých zdrojích liší – např. K. Rader et al. (2016) uvádí úspěšnost 66 % u nezralých oocytů a u zralých uvádí dokonce 91% úspěšnost (Rader et al. 2016). Na základě odlišnosti zrání Cp a Ex oocytů (například ve spotřebě glukózy) by se při inkubaci měla odlišovat jednotlivá chemicky definovaná média. Během zrání dochází ke změnám nejen v jádře (přechod z meiózy do metafáze II, již je vyloučeno první pólové tělísko), ale i v cytoplazmě. Po dozrání není patrný rozdíl ve schopnosti tvorby blastocysty mezi kompaktními a expandovanými oocyty (Hinrichs et al. 2005).

Po dozrání je nutné oocyty oddělit od kumulárních buněk, což je u koní náročné vhledem k těsné vazbě mezi kumulem a oocytem. Očištění probíhá pomocí pipetování, kdy se postupně používají menší průměry špiček. Pipetování si můžeme ulehčit roztokem 0, 05% hyaluronidázy v CZB mediu (modifikované BMOC-2 obsahující více laktózy) (Chatot et al. 1989) nebo médiem M119 s Hanksovou solí s 10 % bovinním fetálním sérem (FBS) (Choi et al. 2003).

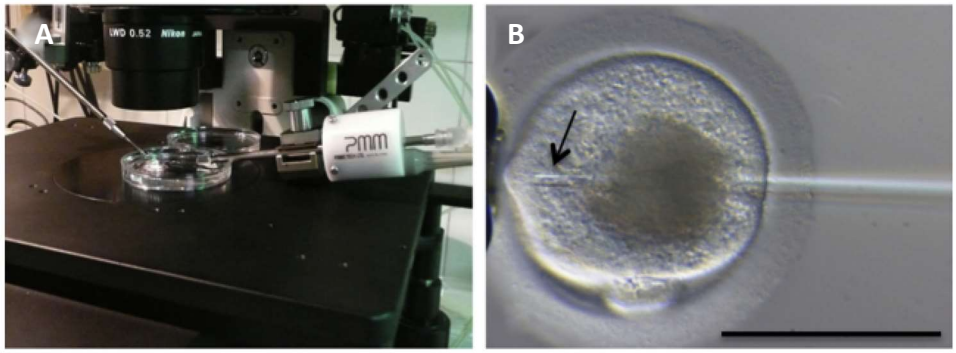
Očištěné oocyty s již vyloučeným polárním tělískem jsou připravené pro fertilizaci. Oocyty s porušenou oolemmou jsou klasifikovány jako zničené. Pokud je oolemma neporušena, ale ještě není vyloučené pólové tělísko, jsou označeny jako nezralé (Merlo et al. 2018).

3.1.4 *In vitro* fertilizace

Při běžné *in vitro* fertilizaci (IVF) probíhá oplodnění samovolně na Petriho misce, bohužel u koní se toto takřka neděje kvůli změnám na zóně pellucidy. Další teorií je nedostatečná kapacitace spermií, protože *in vitro* dozrálé oocyty po vložení do klisny lze oplodnit *in vivo*, zatímco *in vivo* dozrálé oocyty se nedaří oplodnit klasickou metodou na Petriho misce (Leemans et al. 2019). Je tedy nutné volit jinou metodu a tou je intracytoplazmatická injekce spermií (ICSI). Poprvé byla metoda ICSI použita v Belgii na počátku 90. let, první hříbě po ICSI přišlo na svět v roce 1996.

Hned po prvních pokusech ICSI se objevily názory, že pokud nejsou spermie vybrány fyziologicky, bude větší procento abnormálních spermií, které se promítnou do průběhu březosti nebo vývoje potomka. Z dosud zkoumaných těhotenství u lidí se neobjevily žádné náznaky, že by tomu tak bylo. U zkoumaných hříbat nebyl zaznamenán rozdíl v růstu, v placentě ani v 17 genech souvisejících s placentou (Šichtař 2018).

ICSI je poměrně drahá metoda, která je v dnešní době ve větší míře prováděna pouze v několika laboratořích v Evropě. ICSI je prováděno pomocí Piezo mikromanipulátoru s invertovaným mikroskopem, který je ovládán džojstikem (viz obrázek č. 2a). Pipeta přidržující oocyt má vnější průměr 120-140 µm a vnitřní 20-30 µm. Spermie se vstřikuje pomocí pipety s vnějším okrajem 7-10 µm a vnitřním 5-7 µm (viz obrázek č. 2b) (Choi et al. 2006). Mezi velké výhody ICSI je možnost využití větší škály hřebců, protože je možné použít nepohyblivé nebo lyofilizované spermie. ICSI je také velmi výhodné u hřebců, kteří jsou staří nebo již mrtví a je tedy k dispozici omezené množství inseminačních dávek. K oplodnění je totiž potřeba malé množství spermií.



Obrázek 2: (A) Piezo mikromanipulátor používaný pro metodu ICSI. (B) Detail oocytu, do kterého je vstřikována spermie. Šipka směřuje na spermii vpravovanou do oocytu (Galli et al. 2014).

Na A&A Univerzitě v Texasu se pro přípravu spermií z dávek, kde jich je dostatečné množství, používá metoda swim-up. Spermie se dají pod 1 ml spermatického media (Sp-CZB). Po 20 min inkubace při 38,2 °C na vzduchu, je vrchní vrstva odebrána a následně centrifugována. Vzniklá peleta je znovu rozpuštěna v Sp-CZB a opět centrifugována (Rader et al. 2016). Aby byla spermie oplození schopná, je nutná její kapacitace. Při běžném oplození

k tomu dochází až v pohlavních cestách samice. Během *in vitro* oplodnění se kapacitace provádí uměle v laboratoři. U koní se tomu děje pomocí kalcia ionofora (Hinrichs et al. 2002).

Při samotné ICSI je nutné spermii zpomalit, aby bylo možné její nasátí do pipety a zkontrolování její morfologie. K tomuto účelu se často používá kapka polyvinylpyrrolidonu (PVP) nebo několik impulzů do bičíku pomocí Piezo drillu. (Choi et al. 2004). Dnes existují studie, které poukazují na fakt, že PVP způsobuje změny na struktuře spermie, a to může mít za následek zastavení vývoje embrya (Strehler et al. 1998). Jiné studie naopak poukazují na zlepšení fertilizačních schopností spermie (Kato & Nagao 2009). Spermie je do oocytu injikována v úhlu 90° od pólového tělíska. Vzhledem k tomu, že kultivace oocytů probíhá při 38,2 °C, je příhodné je při této teplotě držet i během ICSI (Šichtař 2018). Jsou laboratoře, které volí jinou teplotu, např. B. Merlo et al. (2018) používá 37 °C (Merlo et al. 2018).

3.1.5 Kultivace embryí

Po úspěšné fertilizaci se nově vzniklá embrya vrací zpět do inkubátoru s teplotou 38,2 °C, ale tentokrát s atmosférou 5 % CO_2, 5 % O_2 a 90 % N_2 (Jacobson et al. 2010). V některých laboratořích se využívá namísto N_2 společná inkubace s jinými buňkami (kumulární, granulózní). Výsledky těchto studií ale nedosahují takových úspěchů. Pozitivní vývoj byl zaznamenán s dvěma možnými médii – DMEM/F-12 s 10 % FBS po celou dobu kultivace nebo kultivační médium pro lidská embrya během prvních pěti dní a následným přidáním glukózy. Kvalita vývoje by se měla kontrolovat každých 24 h a výměna kultivačního média by měla být po 48 a 96 hodinách. Třetí den se kontroluje míra štěpení. Preimplantační embrya se zde kultivují asi 7 dní. Míra úspěšnosti vývoje embryí do stádia blastocysty se mezi laboratořemi značně mění od 13 % do 42 % (Šichtař 2018). Významným ukazatelem úspěšnosti *in vitro* oplození je zabřeznutí klisny po přenosu embrya, který dnes dosahuje až 80 %. Bohužel do 60. dne březosti je zde stále větší procento ztrát než po přenosu přirozeně početých embryí (okolo 20 %) (Rader et al. 2016). V USA dosahují výsledku 50 % ohřebených klisen (Maserati & Mutto 2016).

Po proniknutí spermie pomocí ICSI se po 10-20 hodinách začne tvořit samičí a samčí prvojádro. Po splynutí dvou prvojader vzniká zygota, která se dále dělí. Při dalším dělení začne být zóna pellucida prostupnější pro tekutiny, tím začnou vznikat prostory, které nakonec vytvoří jeden blastocoel. Tímto okamžikem vzniká blastocysta. Děje se tak mezi 7 až 10 dnem. Od tohoto okamžiku můžou být nově rostoucí equinní embrya přenesena do klisny příjemkyně. Důležitým faktorem ovlivňující životaschopnost embryí je stálost kultivačních podmínek (Morris, 2018). Klisna příjemkyně by měla být ideálně čtyři až šest dní po ovulaci. Majitelé klisny dárkyně rozhodnou, kolik embryí bude přeneseno a zbytek embryí podstupuje kryokonzervaci. Po každém *in vitro* oplození je majitelům doporučováno udělat test rodičovství. Dokonce i u hříbat, která nebudou zaregistrovaná (Rader et al. 2016).

3.2 Embryo transfer

Embryo transfer (ET) je možné provádět u embryí vzniklých *in vitro*, ale i u embryí vzniklých *in vivo* v těle klisny dárkyně. V obou případech platí, že embryo je ve stádiu blastocysty. Nejdůležitější a jednou z nejtěžších částí celého transferu je správné načasování cyklu klisny dárkyně, synchronizace s klisnou příjemkyní a v případě *in vitro* oplození ideálním stářím embrya. V dnešní době se úspěšnost zisku embryí *in vivo* pohybuje okolo 75 % (Hinrichs 2018). První pokusy o přenos embryí u koní byly prováděny zároveň v Anglii a v Japonsku. Dnes se úspěšnost březosti po nechirurgickém přenosu uvádí 75 až 90 %. Existují dokonce úspěšné pokusy o rozdělení několikadenního embrya, aby vznikla identická dvojčata (Allen & Wilsher 2020).

V začátcích této metody bylo u většiny plemenných knih zakázáno zapsat více než jedno hříbě od jedné klisny nebo byl celý transfer povolen pouze u klisen, které ze zdravotních důvodů nemohly hříbě odnosit samy. Po několika soudních sporech převážně v Americe byl v roce 2002 povolen neomezený počet hříbat na jednu klisnu nejprve u Quarte Horse a postupně se povolení rozšířilo i na další plemena. Výjimka je u Anglického plnokrevníka, kde je zakázaná jakákoliv umělá inseminace. V dnešní době se mezi nejaktivnější země v ET považuje Brazílie a Argentina (Squires 2020).

3.2.1 Klisna dárkyně a příjemkyně

Klisna, od které chceme mít hříbě, ale z nějakého důvodu není schopná početí, donošení nebo nechceme přijít o její sportovní využití, je nazývána klisnou dárkyní. Transfer se také používá u klisniček okolo dvou let, které jsou na plnohodnotnou březost ještě příliš mladé. I když klisna nemusí být schopná donosit zdravé hříbě, je nutné, aby byla jinak zdravá, bez zánětů dělohy a v dobré fyzické kondici. Klisna je před očekávanou ovulací pravidelně hlídána pomocí ultrazvuku přes rektum, aby se správně určila nejvhodnější doba pro inseminaci. V případě hormonální stimulace je klisně ovulace navozena uměle po podání GnRH nebo luteinizačního hormonu (LH). Den ovulace se bere jako den 0 (Hinrichs 2018).

Důležitým faktorem ET je mít klisnu, která úspěšně odnosí, porodí a vychová hříbě od klisny dárkyně. Takovéto klisně říkáme klisna příjemkyně. Na mnoha embryo stanicích je chováno stádo takových klisen. U klisen je kladen velký důraz na fyzickou kondici bez problémů s pohybovým aparátem, důležitá je též správná anatomická stavba pohlavních orgánů (dělohy, krčku). Vzhledem k četnosti vyšetření před samotným transferem i po něm, je kladen důraz i na psychické vlastnosti klisen. Oproti klisně dárkyně se liší nízkou genetickou hodnotou pro chov. Často se klisna příjemkyně uvádí jako nejnákladnější část celého ET. Po přenosu embrya je klisna vyšetřena 5-7 den pro potvrzení březosti. Následně až do 120 dne březosti je klisně uměle dodáván progesteron (Neto et al. 2018). Pro vývoj velkého a silného hříběte je dobré zvolit klisnu příjemkyni, která je větší nebo alespoň velikostně stejná jako biologičtí rodiče hříběte. Bylo publikováno, že koňské embryo se přizpůsobuje velikosti dělohy. V pokusech bylo dokázáno, že když se dvě geneticky identická embrya vloží do velikostně odlišných klisen,

hříbě od menší klisny je po narození menší, délka březosti je kratší a ani ve dvou letech věku při stejném managementu chovu nedohnalo vzrůstem své dvojče z větší klisny (Allen 2005).

3.2.1.1 Synchronizace

U koní je poměrně náročná synchronizace estrálních cyklů klisny dárkyně a klisny příjemkyně, kvůli jejich délce mezi jednotlivými cykly. U stáda příjemkyň se už koncem roku uměle stimuluje délka denního světla, aby se zajistil podobný vstup do reprodukčního cyklu. Tím se zajistí alespoň částečná synchronizace (Deichsel et al. 2016). Před každým ET se vyberou dvě až tři klisny, které jsou stimulovány hormonálně, aby se zvýšila šance na přesnou synchronizaci s klisnou dárkyní. Více klisen příjemkyň je stimulováno z důvodu, že každá klisna může na hormony reagovat jinak a je také nutné, aby pohlavní orgány byly připraveny pro příjem embrya. Ideální stav je, když příjemkyně ovuluje den předem nebo maximálně tři dny po klisně dárkyni.

Každodenní palpace a ultrazvukové vyšetření potenciálních klisen příjemkyň je poměrně drahá a časově namáhavá činnost. Správná stimulace pomocí hormonů umožňuje maximalizaci časových možností personálu i mnohem větší pohodu pro klisny příjemkyně. Kvůli nedostatečnému sjednocení protokolů a možnosti upravení cyklu více způsoby, existuje více hormonů, které se používají. PGF 2α se používá pro navození estru u jinak cyklující klisny. Kombinace estrogenu a progestinu se aplikuje acyklickým klisnám nebo při nutnosti rychlé synchronizace. Dále se používají steroidní hormony, lidský choriový gonadotropin a jejich antagonisté (Neto et al. 2018). Pro navození říje u náhodně cyklujících klisen se používají dvě injekce po čtrnácti dnech cloprostenolu. U 90 % klisen se říje dostavila do šesti dnů od poslední injekce. Jiné laboratoře, které podávaly progestagen po dobu deseti dnů, desátý den doplněn o analog prostaglandinu a následných deset dnů hCG, měly synchronizaci u 75 % zkoumaných zvířat (Allen & Wilsher 2020).

Při pokusu podle O. Neto (2018) byly klisny příjemkyně rozděleny do sedmi skupin podle fáze cyklu (G2-G8, přičemž klisny v G2 skupině byly v anestru, klisny v G7 a G8 byly v časném diestru) a jednu skupinu kontrolní (G1). Skupiny G2-7 dostaly na začátku léčby jednu injekci prostaglandinu, skupina G8 dostala dávky dvě ve dvou dnech. Počátek experimentu se bral jako den -4. Skupiny G2-7 dostaly dinoprost tromethamin (syntetický analog PGF2α) a estradiol 17β. Estradiol 17β se podával po tři dny. V den 0 byl klisnám injikován dlouhodobě působící altrenogest. V den +3 - +8 bylo klisnám nechirurgicky transferováno embryo, přičemž rozdíl ovulace s klisnou dárkyní byl nula až pět dní. Po ET dostala každá klisna další dávku dlouhodobě působícího altrenogestu. U klisen v G8 skupině léčba obdobná, jen v -3 den dostaly druhou dávku dinoprostu tromethaminu. Březost byla detekována +10 - +12 den a klisny dostávaly každý týden dávku dlouhodobě působícího progesteronu až do 120 dne březosti. Během celého experimentu byly klisny porovnávány s klisnami z kontrolní skupiny, které nedostaly žádné hormonální dávky. Z výsledků testu vyplývá, že po této hormonální léčbě byla míra březosti nejhorší u skupiny G7, což byly klisny v časném diestru, které podstoupili pouze jednu injekci dinoprostu tromethaminu. Dle výsledků jiných skupin to

vypadá, že úspěšnost zabřeznutí byla nižší v důsledku malého otoku děložní sliznice před ET kvůli nedostatečné luteolýze. Míra březosti nezávisela na dni ET (+3 - +8).

Díky použití synchronizačních protokolů obsahujících více hormonů se dají srazit náklady na chov velkého stáda klisen příjemkyň, protože tímto postupem můžeme sesynchronizovat klisny v různých stádiích cyklu. Nevýhodou je, že ne všechny hormony musí být dostupné v každé zemi nebo že použití některých látek může být v dané zemi zakázané. U asi 14 % klisen došlo k selhání ovulace po stimulaci analogů hCG a GnRH (Neto et al. 2018).

3.2.2 Zisk embrya

Oplozený oocyt sestupuje do dělohy až 6. den po ovulaci. Pro zisk embryí mladších šesti dnů je nutný chirurgický zákrok. Zákrok se provádí v celkové narkóze, kdy je médiem propláchnut vejcovod. U klisny tento proces komplikují dva problémy. Pokud je proplachován pravý vejcovod, dochází v důsledku kratšího *ligamentum ovarii proprium* k horšímu proplachu a pnutí vazu. V krajních případech může dojít k poranění až vykrvácení. Zadruhé papily ve vejcovodech velmi účinně zabraňují průtoku tekutiny z dělohy do vejcovodu. Kvůli tomu u klisen není možné provádět proplach vejcovodů přes dělohu, jako je tomu u krav. Ač je tato metoda značně nepraktická, má poměrně vysokou míru úspěšnosti (Allen & Wilsher 2020).

U klisen je mnohem jednodušší zisk embryí pomocí proplachu dělohy. Díky kratšímu děložnímu hrdlu a výhodnějšímu umístění děložních rohů je tento postup úspěšnější než u krav. Před samotným výplachem se klisna často seduje a je umístěna do fixačního boxu. Oblast okolo vulvy, hráze a konečníku je očištěna a vydezinfikována. Jedná se o nechirurgický zákrok, který se provádí pomocí katetru. Ten je manipulován přes rektum do jednoho z děložního rohů, který je vyplachován. Tento postup se používal hlavně dříve a nebylo s ním dosahováno takových výsledků. Dnes se častěji přistupuje k výplachu celé dělohy. Děloha je proplachována médiem (fyziologický roztok pufrovaný fosfátem s 5 % BSA (hovězí sérový albumin)), během průplachu je přes rektum děloha masírována. Celý proces se opakuje dvakrát až třikrát. Celkově je použito až dva litry média, záleží na velikosti dělohy a stáří klisny. V začátcích této metody ještě nebyly tak účinné embryonální filtry. Embrya se v médiu nechala klesnout na dno, vrchní část média byla odstraněna a embrya se dále hledala na miskách pomocí mikroskopů. Dnes se médium nechá protéct přes filtry a embrya jsou hledána na něm (Allen & Wilsher 2020). Proplach celé dělohy zvýšil zisk embryí až na dvojnásobek oproti proplachu jednoho děložního rohu – z dřívějších 44 % na dnešních 87 % (Oguri & Tsutsumi 1974). K proplachu se nejčastěji přistupuje sedmý nebo osmý den po ovulaci, protože větší embrya jsou náchylnější k poničení (Allen & Wilsher 2020).

V rámci celého ET je nutné dodržovat maximální sterilitu všech nástrojů. Nástroje se pro každou klisnu berou vždy nové a čisté. V rámci předcházení jakémukoliv zavedení infekce do dělohy klisny, se často do vyplachovacího média přidávají antibiotika. Pro průplachu je ultrasonograficky zkontrolováno, že veškeré médium vyteklo z klisny ven. Poté je klisně podán PGF2α pro zahájení luteolýzy.

3.2.3 Přenos embrya

Embryo se po vyjmutí kontroluje a omývá. Poté je připraveno na transfer nebo se kryokonzervuje. Samotný přenos embrya se dá provádět laparotomicky přes břišní stěnu do děložního rohu, podobně jako u krav. Embryo je přeneseno pomocí Pasteurovy pipety s minimem média. Pokud je transfer proveden více jak tři dny po ovulaci, úspěšnost zabřeznutí je až 75 %. Úspěšný chirurgický přenos embryí se dokonce povedl v sedmdesátých letech i mezidruhově. Pokus představoval přenosy mezi osly, zebrami, domestikovaným koněm a koněm Převalským. Zajímavé na tom je, že každý druh má jiný počet chromozomů.

U nechirurgického ET se embryo přenáší inseminační pipetou přes děložní hrdlo přímo do těla dělohy. Pokud si inseminátor nebo veterinář přes rektum přidržuje děložní rohy, přenáší se embryo přímo do rohů (Allen & Wilsher 2020). Velký pokrok přineslo použití Wilsherových kleští, pomocí kterých může veterinář lépe roztáhnout a uchopit děložní čípek, díky čemuž je možné mnohem lépe nasměrovat pipetu s embryem na správné místo v děloze. Studie uvádějí, že za použití této metody úspěšnost zabřeznutí dosahuje až 92 % (Card 2018). V některých zemích Evropské Unie je dokonce povolen pouze nechirurgický přenos embryí.

V počátcích bylo nutné chovat klisnu dárkyní a příjemkyni v jedné stáji. S objevením podmínek, ve kterých je možné embrya převážet, se velice usnadnil celý proces ET. V roce 1975 byl proveden pokus, kdy 5 equinních embryí bylo převezeno z Anglie do Polska v králičích vejcovodech. Z celkového počtu se narodila dvě zdravá hříbata. Dnes se embrya převáží chlazená při 5 °C v médiu, kdy vydrží 12 až 24 hodin(Allen & Wilsher 2020). Před přenosem embryí vzniklých *in vivo* se provádí zjišťování pohlaví pomocí specifického H-Y antigenu s přesností 82 % (Aurich & Schneider 2014). Další možností je biopsie několika málo buněk a jejich analýza na PCR, kde se pomocí specifické sondy hledají určité oblasti na X chromozomu (Moore & Hasler 2017).

3.3 Inseminační dávka

Posledních několik desítek let se u koní stále častěji volí umělá inseminace a to jak čerstvým, chlazeným nebo hluboce mrazeným spermatem. Pro chovatele to má několik výhod. Snižuje se stres z přepravy jak u hřebce tak u klisny. Eliminují se rizika zranění, která hrozí při přirozené plemenitbě. Velká výhoda spočívá v možnosti získání inseminační dávky od hřebce, který se například nachází na jiném kontinentě, a tím rozšířit uplatnění jeho cenné genetické informace. Umělá inseminace umožňuje i vyšetření ejakulátu a zabránění přenosu chorob mezi koňmi. V roce 1985 bylo umělou inseminací oplodněno jen asi 2 % německých sportovních klisen, v posledních letech studie uvádějí, že toto procento stouplo až na 90 % (Aurich 2012). U koní, na rozdíl od skotu, není kladen důraz na odolnost spermií vůči chlazení při výběru plemeníka. Takže zatím co u skotu se protokoly chlazení a mrazení stále zjednodušují, u koní se musí přizpůsobovat jednotlivým hřebcům. V roce 1986 byli provedeny studie na spermiích hřebců v Československu, kde 35 % bylo hodnoceno jako dobře mrazitelné, 25 % průměrně a 40 % nebylo doporučeno k zamrazování (Loomis & Graham 2008). Dnes se procento hřebců se špatnou kvalitou ejakulátu pohybuje spíše okolo 20 % (Aurich et al. 2020).

Na počátku dvacátého století, kdy se s umělou inseminací postupně začínalo, se sperma do klisen zkoušelo vkládat v želatinových tobolkách (Aurich 2012).

Dnes je umělá inseminace povolená ve všech plemenných knihách, vyjma Anglického plnokrevníka, kde je povolena pouze přirozená plemenitba.

3.3.1 Odběr spermatu

Odběr spermatu se provádí na odběrových stanicích a je nutné dodržet všechny přísné hygienické podmínky. Důležité je, aby všechny látky, které přijdou do styku s ejakulátem, byly nespermicidní. Hřebci, od kterých se sperma odebírá, musejí předem projít výběrovými podmínkami a být zapsaní do dané plemenné knihy. Sperma se odebírá do umělých vagín. V dnešní době existuje několik modelů lišících se váhou, velikostí i použitými materiály. Snahou je, aby umělá vagína co nejvíce připomínala pohlavní cesty klisny. Toho je dosahováno pomocí vody ohřáté na 44-48 °C, některé modely používají i vzduch. Teplotu je důležité držet v těchto hodnotách, protože nižší teplota by mohla hřebci způsobit šok z chladu a vyšší teplota by už mohla působit spermicidně. Vagína se skládá z pevného obalu a dvou vložek. Obal a vrchní vložka tvoří prostor, který se naplní vodou. Vnitřní vložka je často doplněna ještě o jednu jednorázovou vložku pro zvýšení sterility (Dascanio & McCue 2014). Pro ochranu hřebce je vnitřek vagíny potřen vazelínou nebo lubrikantem, některé stanice používají i komerčně dostupné lubrikační gely. Na konci je vagina zakončena sběrací nádobkou. Hřebci naskakují na fantoma nebo na živou klisnu a před odběrem je pyj vždy důkladně očištěn teplou vodou, aby nedošlo k znečištění vzorku (Serafini et al. 2019).

Kvalitu inseminační dávky především ovlivňuje hřebec, od kterého je. Důležitý je věk, ale ukazuje se, že kvalita závisí i na ročním období. Podle studie profesora J. Auricha et al.

(2020) mají hřebci nejlepší ejakulát v letních měsících (Aurich et al. 2020). Ne každý ejakulát je vhodný pro tvorbu chlazených nebo hluboce zmrazených dávek. Tento faktor záleží na přesném složení semenné plazmy a membrán spermií. Semenná plazma je hlavně produkována přídatnými pohlavními žlázami a při přirozeném páření zajišťuje spermiím výživu, příznivé podmínky a usnadňuje jim pohyb v samičích pohlavních orgánech. Výron semene u hřebce je rozdělen na několik částí. Nejdříve se uvolní výměšek bulbouretrální žlázy fungující jako lubrikant, následuje frakce bohatá na spermie a jako poslední se vyloučí gelová frakce ze semenných váčků obsahující hlavně glukózu a proteiny. Pro co nejlepší kvalitu inseminační dávky je nutné hned po odběru ejakulát přecedit a odstranit gelovou část ejakulátu. Důležitý je co nejrychlejší převoz do laboratoře. Při jakékoliv manipulaci se musí všechno vybavení předehřát na teplotu 38 °C. Ideálně by měl být odběr proveden po co nejmenším sexuálním stimulu a během jednoho skoku. Tak se dosáhne ejakulátu o největší koncentraci spermií a s menší kontaminací (Aurich 2008).

V případě, že hřebec není schopný přirozené ejakulace, například kvůli zranění nebo vrozené vadě, je možné od něj sperma odebrat po chemické stimulaci. Toho je dosahováno pomocí dvou léků – imipramin hydrochloridu a xylazinu. Ejakulát má většinou velmi malý objem a vysokou koncentraci spermií. Sperma se může hned použít (Dascanio & McCue 2014). Další možností je elektroejakulace. Ta ale není u hřebců příliš vhodná, protože při ní dochází ke kontaminaci ejakulátu močí (Melo et al. 2010).

3.3.1.1 Odběr epididymálních spermií

Jako u klisen, i u hřebců je možný odběr spermií *post mortem*. Spermatogeneze probíhá v semenotvorných kanálcích ve varleti. Nově vzniklé nezralé spermie putují do nadvarlete, kde dochází k jejich dozrání a je zde i jejich rezervoár. Odběr se provádí z ocasu nadvarlete, jeho konečného úseku. K odběru spermií z nadvarlete se nepřistupuje pouze po smrti hřebce, ale provádí se i po kastraci nebo po vážném zranění znemožňující další využívání hřebce jako plemeníka. Chovatel může v tomto případě požádat o tzv. terminální odběr spermatu, jedná se o poslední možnost rozšíření genetické informace hřebce. Spermie po úhynu hřebce vykazují nižší pohybové vlastnosti než sperma od hřebců po plánované kastraci. Zajímavé je, že po správném promytí a naředění například ředidlem INRA96 se tyto vlastnosti zlepšily a dosahovaly téměř stejných hodnot jako spermie po kastraci (Gloria et al. 2016).

Po odstranění varlat a nadvarlat je nutné podvázat chámovod, protože jinak by mohlo dojít ke ztrátě obsahu nadvarlat. Poté je nutné vše opláchnout buď fyziologickým roztokem nebo laktátovým Ringerovým roztokem, aby se odstranila případná krev a nečistoty. Převoz by měl probíhat bez přístupu vzduchu ve specializovaných chladících zařízeních nebo by měla být nadvarlata rovnou zpracována. Samotný odběr spermií je možné provádět několika způsoby – aspirací, rozkrájením nebo retrográdním proplachem, kdy se pomocí proudu tekutiny z injekční stříkačky připevněné na chámovod vyplachuje ocas nadvarlete. Z těchto tří metod je nejvýhodnější proplach, protože vzorek neobsahuje jiné buněčné typy a získá se tak nejvíce spermií. Některé výzkumy dokonce uvádějí, že při odběru epididymálních spermií je možno získat více spermií než při odběru ejakulátu do umělé vagíny (Melo et al. 2010).

Nepřítomnost semenné plazmy je u epididymálních spermií poměrně rozporuplná záležitost. Na jednu stranu díky její absenci nemusí ejakulát podstupovat centrifugaci, kde dochází k částečnému poškození některých spermií. Na druhou stranu může způsobovat zhoršené pohybové vlastnosti epididymálního spermatu. Při pokusech, kdy se semenná plazma uměle přidávala, došlo ke zlepšení u 62 % vzorků, zbylých 38 % bylo beze změny (Miró et al. 2020).

Při kryokonzervaci nebyl zaznamenán rozdíl v motilitě u nejprve zchlazených a následně zmrazených nebo u rovnou zmrazených spermií, ale je doporučeno provést kryokonzervaci nejdéle 96 hodin po odběru při skladování při 4 °C. Výzkumy ukazují, že epididymální spermie jsou méně náchylné k poškození způsobené chladem, jak ukazuje obrázek č. 3. Po inseminaci čerstvými epididymálními spermiemi o koncentraci $200*10^6$ ml^{-1} v dávce se míra březosti pohybuje okolo 45 %. Při inseminaci rozmrazenými epididymálními dávkami o stejné koncentraci se míra březosti pohybuje od 8 do 18 % při. U dvojnásobné koncentrace spermií v rozmrazené dávce se úspěšnost zvedla na 66, 6 % (Melo et al. 2010).

	TM	PM	PMI
G1	60.2 ± 16.99^{b}	30.8 ± 14.22^{b}	41.2 ± 20.32^{b}
G2	85.1 ± 5.85^{a}	46.1 ± 8.46^{a}	74.9 ± 10.49^{a}
G3	83.1 ± 7.52^{a}	38.3 ± 7.14^{ab}	71.7 ± 9.85^{a}

Obrázek 3: Průměrné hodnoty pro celkovou pohyblivost (TM, z angl. total motility), progresivní motilitu (PM, z angl. progressive motility) a membránovou integritu (PMI, z angl. plasma membrane integrity) spermatu odebraného pomocí umělé vagíny (G1), epididymálního spermatu odebraného okamžitě po kastraci (G2) a epididymálního spermatu skladovaného 24 hodin při 5 °C *(Melo et al. 2010)*.

3.3.2 Hodnocení ejakulátu

Hodnocení ejakulátu se provádí ideálně po každém odběru a dělí se na makroskopické a mikroskopické metody. Mezi makroskopické metody patří hodnocení těch vlastností, které jsme schopní popsat bez použití mikroskopu, tedy pouhým okem. Provádí se hned po odebrání. Mikroskopické testy se provádí v laboratoři. Sice nemáme žádné přesné testy, které by nám určili fertilitu hřebce, ale je důležité, aby odebrané sperma splňovalo základní parametry. Při jakékoliv manipulaci je nutné všechno vybavení předehřát na teplotu 38 °C (Love 2016).

3.3.2.1 Makroskopické vlastnosti

Makroskopicky se vyšetřuje objem, pach, barva a čistota. Koňský ejakulát by měla být mírně zrnitá, hustá, neprůhledná tekutina o objemu 30 až 250 ml. Objem se může i u jednoho plemeníka lišit na základě četnosti a době odběru, sexuálního vzrušení a celkového fyzické stavu zvířete. Podle objemu ejakulátu jsme schopni odhadnout, kolik inseminačních dávek vyrobíme. Měření se provádí pomocí odměrného válce nebo kalibrované váhy (Morel 2008).

Hustota závisí na složení semenné plazmy a koncentraci spermií. Příliš řídký ejakulát naznačuje malý počet spermií a husté sperma naopak zabraňuje pohybu spermií. Barva a pach závisí na příměsích. Ve spermatu by neměla být krev, moč ani žádné sraženiny, ukazující

například na zánět. Fyziologický ejakulát je bílé barvy bez zápachu. Barvu může ovlivnit i krmivo. Tyto vlastnosti se hodnotí přímo ve sběrači. Barva se hodnotí proti bílému světlu. Jakýkoliv ejakulát odlišující se od fyziologických hodnot by se neměl dále používat k umělé inseminaci (Sieme et al. 2003).

3.3.2.2 Mikroskopické vlastnosti

Po převezení do laboratoře se ejakulát vyšetřuje pomocí mikroskopu, cytometru a dalších laboratorních přístrojů. Důležitým údajem je koncentrace spermií a z toho počet živých spermií, dále se měří například schopnost odolávat chladu, pH a morfologické změny. Mezi mikroskopická vyšetření se počítá i kultivace a identifikace bakterií a plísní. I u plodných hřebců nevykazujících známky infekce či zánětu se může zjistit jejich přítomnost (Dascanio & McCue 2014).

Koncentrace se počítá přístrojově pomocí fotospektrometru, kdy se vzorek naředí opticky jasným ředidlem v poměru 1:30. K ředění se používá 10% formalín a 0,9% salin. Koncentrace se stanovuje na základě zakalení vzorku. Výhodou je rychlost, jednoduchost a potřeba malého množství vzorku (Morel 2008). Nevýhoda spočívá v tom, že i semenná plazma či jiné nečistoty můžou vzorek zakalit i tím uměle navýšit počet spermií. Kvůli tomu byl vynalezen NucleoCounter, který využívá propidium jodidu k obarvení nukleových kyselin a fluorescenční sondu, která se váže přímo na DNA (Love 2016). Výpočet lze provádět i ručně pomocí Bürkerovy počítací komůrky. Ta obsahuje podložní sklíčko s počítací mřížkou, na které se nanese určitý objem naředěného spermatu a krycí sklíčko. Výsledná koncentrace se dopočte podle poměru naředění použitého vzorku. Metoda je časově náročnější, ale lze ji provádět přímo ve stáji. Minimální koncentrace spermií pro použití umělé inseminace je 100-200*10^6 ml^{-1} (Morel 2008).

Pohyblivost neboli motilita je jeden z nejdůležitějších faktorů kvality spermií. Pozorování se provádí pomocí mikroskopu s fázovým kontrastem na zředěném vzorku. Celková pohyblivost se měří u všech spermií vykazujících nějaký pohyb. Podílu spermií pohybujících se správným směrem se říká progresivní motilita. Všeobecně se udává hodnota 40 % progresivně pohybujících se spermií jako krajní hodnota pro zajištění schopnosti oplození. Každá plemenná kniha minimální procento pohyblivosti určuje sama. U holandského teplokrevníka je to minimálně 50 % progresivně pohybujících se spermií (Colenbrander et al. 2003), v jiných knihách nebo studiích je minimální hranice dokonce 70 % (Aurich et al. 2020). Jako progresivní pohyb se bere pohyb vpřed nebo ve velkých kruzích za hlavičkou. Motilita je velice závislá na stáří ejakulátu, na teplotě i pH. Je potřeba ji měřit co nejdříve po odebrání. Měření motility pod mikroskopem vyžaduje vysoce proškolený perzonál a i tak je výsledek subjektivní. Pro eliminaci lidského faktoru se v dnešní době častěji měří pohyblivost počítačem pomocí metody CASA (z angl. computer-assisted semen analysis) (Love 2016). Motilitu můžeme měřit i po určitých časových intervalech a v různých teplotách, tím zjistíme životaschopnost spermií. Klasicky se měření provádí po 3 a po 8 hodinách. Motilita po 3 hodinách by neměla klesnout pod 45 % a po 8 hodinách při 22 °C by se hodnota stále měla držet nad 10 %. Takovéto sperma je vhodné k použití jako chlazené či v podobě mrazené

dávky. Zjistilo se, že při odstranění semenné plazmy se životaschopnost chlazených spermií zvýší.

Další důležitý ukazatel kvality inseminační dávky je morfologie spermií. Spermie se nejčastěji zkoumají pomocí barvení, kdy se metodou eosin-nigrosin obarví hlavičky mrtvých spermií do fialova (Love 2016). Vyskytuje-li se v ejakulátu velké množství spermií s primárním poškozením, které vzniklo již během spermatogeneze (zdvojení hlavičky, bičíků či absence nebo změny tvaru některé části) může se jednat o dlouhodobý či trvalý problém s plodností u hřebce. Při zvýšeném výskytu nezralých spermií s protoplazmatickou kapičkou na krčku se může jednat pouze o dočasný problém a je nutné snížit frekvenci odběru ejakulátu. Druhotné poškození je způsobeno nešetrným zacházením s ejakulátem či problémem při samotné ejakulaci. Může se jednat o prasklé hlavičky, zlomené bičíky či úplné oddělení bičíku od hlavičky. Pro úspěšné oplodnění vajíčka a následný vývoj embrya je nutná zdravá spermie bez jakýchkoliv vad. Je tedy nutné všechny abnormality zaznamenávat. Pro kvalitní ejakulát vhodný k inseminaci se bere ten, který má alespoň 65 % morfologicky zdravých spermií (Morel 2008).

Mezi další prováděné testy patří měření koncentrace vodíkových iontů (pH). Hodnota pH je důležitá, protože jeho vysoká hodnota působí spermicidně a může značit infekci či jiné příměsi. Stanovuje se pomocí pH metru hned po odběru. Čím déle po odběru se jeho hodnota určuje, tím je výsledek nepřesnější. V důsledku hromadění vedlejších metabolitů (kyseliny mléčné) se pH snižuje. Z tohoto důvodu se ejakulát ředí co nejdříve po odběru nejčastěji v poměru 1:1. Na hodnotě pH se podílejí i jiné faktory, například četnost a doba odběrů a koncentrace spermií. Výsledek může zkreslit i odebrání pouze části ejakulátu, protože každá frakce má jinou hodnotu pH. Jako ideální pH se udává hodnota 7,3-7,8 (Morel 2008).

Dále se provádějí testy například na genetické vady, termorezistenci, účinek různých ředidel a antibiotik nebo motilitu připravené inseminační dávky po rozmrazení. Jedná-li se o již používaného plemeníka, testy se průběžně porovnávají. U nově zařazeného hřebce se testy provádějí za použití více ředidel a v odlišných podmínkách (Dascanio & McCue 2014).

3.3.2.3 Další metody vyšetření

Pro eliminaci lidského faktoru a tím přesnějšího vyhodnocení vzorku se dnes používají počítačová měření jako například **CASA**. Zdokonalení snímací techniky a velká výkonnost počítačů umožňuje převod pohybu spermií na digitální informaci, která se dále vyhodnocuje. Zaznamenává se pohyb, směr i rychlost pohybu. Tím je počítač schopný odlišit progresivní pohyb od toho nežádoucího. Zároveň je schopný i pozorovat morfologii spermií – velikost a tvar hlavičky a bičíku. Systém CASA se nejčastěji používá v humánní medicíně. Pro větší využití ve veterinární medicíně je nutná přesná standardizace postupů a přesné naprogramování a zanesení pohybových modelů jednotlivých živočišných druhů. Zajímavé je, že za posledních 40 let, kdy se tato metoda používá, se sice enormně zlepšila výkonost všech počítačů, ale algoritmy používané pro převod informací z fotografií do digitálních dat se příliš nezměnily. Nevýhodou této metody je vysoká cena zařízení a nutnost pravidelných kontrol (Amann & Waberski 2014).

Naopak mezi levné laboratorně hojně využívané testy patří **HOS** test (hypoosmotic swelling test). Pro správné fungování spermií je nutná funkční membrána. Membrána musí mít svou integritu, ale zároveň musí být semipermeabilní, aby mohla aktivně reagovat na změny prostředí, kapacitaci nebo kontakt s membránou oocytu. Jakmile se spermie dostane do prostředí, které je hypoosmotické, dojde k jejímu zvětšení v důsledku umožnění průchodu molekulám vody dovnitř přes membránu. V případě velkého koncentračního rozdílu vnitřku buňky a extracelulární tekutiny může dojít až k lýzi buňky. Test se dá provést pomocí roztoku sacharózy nebo fruktózy a citrátu sodného předehřátého na 37 °C, jehož koncentrace je natolik hypotonická, aby došlo ke změně velikosti spermie, ale zároveň nedošlo k lýzi buňky. Živé spermie, které mají aktivní membránu, se zvětší a jejich bičík se mírně zkroutí. Následně se pod mikroskopem určí procento aktivních spermií. Test se velmi často používá u rozmrazeného spermatu pro zjištění počtu živých spermií (Ramu & Jeyendran 2013).

3.3.3 Příprava inseminační dávky

Za předpokladu, že je sperma vhodné k tvorbě inseminačních dávek, je nutné se rozhodnout, za jak dlouho bude dávka použita. Čím déle máme v plánu sperma skladovat, tím je náročnější příprava inseminační dávky. U okamžitého použití stačí sperma pouze přefiltrovat od gelové frakce a nečistot a použít ho buď neředěné u jedné klisny nebo ho naředit a vyrobit tím více inseminačních dávek k okamžité spotřebě. Důležité je dávku skladovat při tělesné teplotě (38 °C) (Aurich 2012). Všeobecně se sperma doporučuje hned naředit ředidly buď v poměru 1:1 nebo rovnou na požadovanou koncentraci spermií. Většinou se jedná o koncentraci 560-100 miliónů spermií na mililitr (Loomis 2011). Velký posun při skladování ejakulátu přineslo objevení antibiotik. Dříve se ejakulát nemohl skladovat při pokojové teplotě, protože docházelo k mikrobiálnímu bujení, ale nižší teploty zase ničili spermie a dávka tím byla znehodnocena (Aurich 2012).

Při delším skladování je nutné sperma zcentrifugovat. Doporučuje se odstranit 80-95% semenné plazmy. Centrifugace se musí provádět velmi opatrně a i tak se okolo 25 % spermií ztratí v supernatantu. Tomuto kroku se dá vyhnout již při odběru, kdy odebereme pouze tu část ejakulátu, která je nejbohatší na spermie. Případně jsou i laboratoře, které k odstranění plazmy nevyužívají centrifugaci, ale ejakulát filtrují přes síta, kterými spermie neprojdou a tím se oddělí od semenné plazmy. Po centrifugaci se odstraní supernatant a peleta se znovu rozředí (Loomis 2011). Pakliže je nutné sperma dopravit na jiné místo, než se nachází hřebec, je možné dávku pouze zchladit. Takto vydrží 48-72 hodin. K přepravě či uchovávání se používají speciální nádoby, které jsou schopné udržet teplotu okolo 5 °C. Jestliže bude skladování delší, je nutné dávku zamrazit tekutým dusíkem a přidat látky na ochranu buněčných struktur. Takto skladovaná vydrží i několik let. Všeobecně platí, že chlazení či mrazení musí být postupné a pomalé (<0,3 °C / min), naopak rozmrazení musí být co nejrychlejší. Probíhá ve vodní lázni o teplotě 37 °C po dobu 20-30 sekund (Aurich 2008).

V USA se často inseminační dávky zamrazují v tzv. slámkách – pejetách o objemu 0,5 ml s koncentrací 200 miliónů spermií na mililitr. Při použití spermatu pro účely ICSI lze

takovou slámku nařezat na 6 až 10 částí, přičemž každou lze rozmrazit samostatně. Každou z těchto částí lze znovu naředit na koncentraci 1 milión spermií na mililitr. Tímto postupem můžeme několikanásobně zvýšit počet inseminačních dávek od plemeníka, který je například po smrti a již od něj není možné získat nové dávky (Choi et al. 2006).

3.3.3.1 Ředidla

Ředidla neslouží pouze k navýšení objemu a tím možnosti inseminace více klisen, ale všeobecně mají prodloužit životaschopnost spermií. Hrají důležitou roli ve výživě spermií, mají pufrační funkci, chrání sperma před jeho vlastními metabolity a následky chlazení či mrazení. Důležitými složkami ředidel jsou lipidy, lipoproteiny a cukry, dále obsahují i další látky jako jsou například antibiotika či kryoprotektanty. Většinou se používají ředidla na bázi kravského mléka nebo vaječného žloutku či jejich kombinace. Dříve se dokonce sperma ředilo přímo čerstvým kravským mlékem. Dnes je cílem najít takové ředidlo, které zachová dobré vlastnosti i u spermatu, které není vhodné k zamrazení.

Koncentrace antibiotik je velice důležitá, protože příliš vysoká hodnota by mohla negativně působit na motilitu a životaschopnost spermií. Na druhou stranu nízká koncentrace by nemusela dostatečně zabránit růstu bakterií a způsobit jejich rezistenci. Často se používá kombinace více antibiotik, např. penicilin a gentamicin nebo penicilin a Amikacin či Timetin (Hernández-Avilés et al. 2019). Cílem je pokrýt co největší škálu bakterií za použití co nejmenší koncentrace antibiotik. Některé látky mohou způsobit nižší motilitu, což ale u použití dávky pro účely ICSI tolik nevadí. Konkrétně u gentamicinu by se neměla používat dávka větší, než 1000 μg/ml (Jasko et al. 1993). Vzhledem k tomu, že každý hřebec má jinou mikroflóru, může se lišit i vhodnost antibiotik podle daného jedince. Někdy jsou ředidla doplňována i o antimykotika.

Častěji používaná jsou ředidla na bázi **kravského mléka**, které mají samy o sobě dobré pufrovací vlastnosti a udržují dobré pohybové vlastnosti ejakulátu. Dají se používat pro pozorování, centrifugaci i skladování. Dnešní ředidla se připravují z odstředěného mléka se sníženým obsahem tuku nebo ze sušeného mléka. Ochranou složkou mléka jsou kaseinové micely. V kombinaci s glycerolem a laktózou je dosahováno dobrých výsledků pří zamrazování. Přesný mechanizmus funkce micel není známý. Zajímavé je, že když se vyfiltrují pouze kaseinové micely a laktóza, není dosahováno takové účinnosti (Loomis 2011). Další velmi prospěšné látky, které se podařilo z mléka vyselektovat, jsou proteiny fosfokasein a β-laktoglobulin (Pagl et al. 2006). Do ředidel se přidává 7,5 % roztok hydrogenuhličitanu sodného kvůli jeho pufračním schopnostem (Jasko et al. 1993). Přesná složení se můžou lišit mezi jednotlivými ředidly. Mezi ta nejčastěji používaná patří Kenneyho ředidlo (NFDSMG). Na trhu je mnoho jeho modifikací, ale to původní obsahuje odstředěné sušené mléko a glukózu. Před použitím se ředí redestilovanou vodou a mohou se uchovávat i zamrazená. Jeho modifikace někdy obsahují další cukry nebo jsou použita jiná antibiotika. Další časté ředidlo je INRA 82, které má více cukrů a více pufrovacích látek (Loomis 2011). Dobře přijímáno je i ředidlo INRA 96, které má stálé chemicky přesně definované složení, obsahuje hlavně fosfokaseiny a β-laktoglobuliny (Aurich et al. 2007), ale obsah antibiotik je nižší, takže je doporučováno

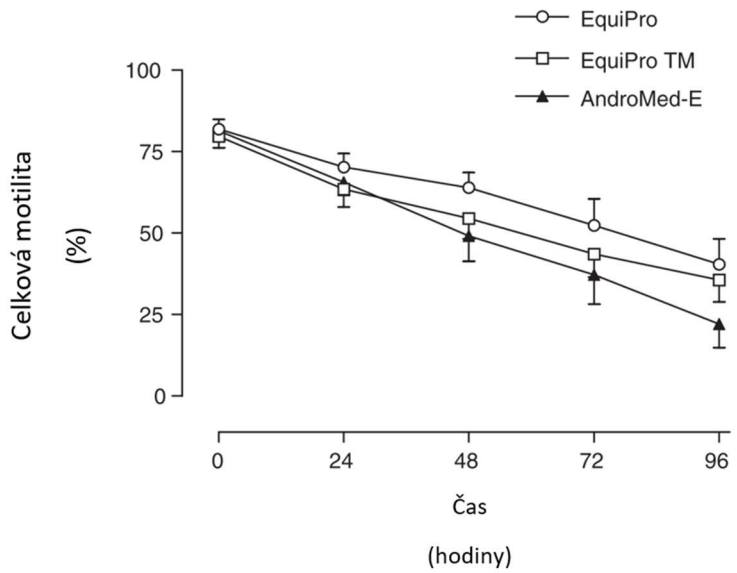
k němu přidávat Timetin (Loomis 2011). Mezi komerčně často používaná ředidla patří EquiPro. Ředidlo sice neobsahuje sušené mléko, ale obsahuje přesně definované kaseináty, syrovátkové proteiny a různé cukry. V dnešní době ho lze koupit s různou kombinací antibiotik i čistě bez nich. Ředidlo se dodává v sušené formě a před použitím se ředí destilovanou vodou. Ředidlo se stejným složením, ale již naředěné, se prodává pod názvem EquiPro TM (Aurich et al. 2007).

Velmi pozitivní vliv na zachování integrity membrány u skladování při pokojové teplotě, ale i během chlazení a zamrazování byl zaznamenán u ředidel na bázi **vaječného žloutku**, který obsahuje mnoho fosfolipidů a lipoproteinů – konkrétně LDL (z angl. low density lipoprotein – nízkodenzitní lipoprotein). Přesný mechanizmus účinku není znám, ale nejspíš se proteiny LDL váží na buněčnou membránu rychleji než škodlivé plazmatické peptidy a tím jí stabilizují. Skvělé výsledky jsou s fosfatidylcholinem z vaječného žloutku a sóji, který membránu chrání, ale nijak se do ní nezabudovává. Jiné výzkumy naznačují, že by LDL mohl tvořit ochranný film kolem spermie nebo že by dokonce mohl nahrazovat poškozené fosfolipidy z membrán. U býků se zjistilo, že jejich proteiny semenné plazmy – BSP (z angl. bovine seminal plasma) výborně reagují s LDL lipidy a tím výrazně ovlivňují kvalitu spermií. Na druhou stranu tyto proteiny interagují s cholesterolem a tím výrazně ovlivňují toleranci vůči chladu. Jejich účinek velice závisí na koncentraci, délce působení a koncentraci semenné plazmy. Při přirozeném připouštění jsou tyto proteiny součástí procesu kapacitace. Při snížené koncentraci u inseminačních dávek to může být důvod snížené schopnosti oplodnění (Bergeron & Manjunath 2006). Bohužel na rozdíl od mléčných ředidel jsou složitější na přípravu a tím můžou způsobit zhoršení kvality připravené dávky. Klasicky obsahují redestilovanou vodu, glukózu a laktózu, vinan sodno-draselný, žloutek, kyselinu paraaminobenzoovou a směs antibiotik. Dnes se vaječný žloutek nahrazuje sójovým lecitinem (Pagl et al. 2006). Toho například využívá ředidlo AndroMed-E, které neobsahuje ani žádné další složky živočišného původu. Původně bylo používáno pro uchovávání ejakulátu skotu (Aurich et al. 2007).

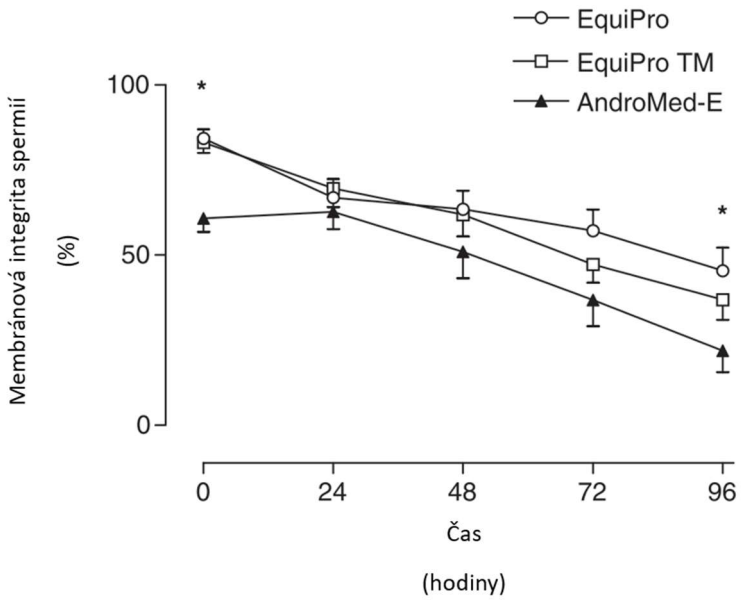
Nevýhodou těchto ředidel je fakt, že jejich složení, vzhledem k tomu že se jedná o živočišné produkty, se u jednotlivých šarží může měnit a tím ovlivňovat vlastnosti jednotlivých inseminačních dávek. Dnes je snaha o vytvoření ředidel s jasně definovaným složením, které tak bude mít stálé účinky na spermie a nebude obsahovat žádné škodlivé látky, které se můžou vyskytovat v ředidlech z mléka či vaječného žloutku (Pagl et al. 2006).

V roce 2007 vyšla studie, kde Aurich at al. (2007) srovnává tři komerčně prodávaná ředidla – EquiPro, EquiPro TM a AndroMed-E. Zajímavé je, že i když ředidla EquiPro a EquiPro TM by měla mít stejná chemická složení, lepších výsledků se dosahuje s EquiPro. Jednou z teorií, proč tomu tak je, by mohla být lepší kvalita vody, která se použila k rozpuštění ředidla. Ve studii se kvalita ejakulátů měřila po odběru a poté každých 24 h po dobu čtyř dní. Celková motilita byla v den ředění u všech ředidel skoro stejná, v následujících dnech kontinuálně klesala, přičemž po 24 h byla nejnižší u EquiPro TM, ale po 48 h se již nadále držela nejnižší u ředidla AndroMed-E, jak ukazuje graf č. 1. Dalším důležitým faktorem pro výběr ředidla je zachování integrity membrány během chlazení. V této studii byla po celou dobu

měření nejnižší u ředidla AndroMed-E, viz graf č. 2. Ze studie vyplývá, že pro použití semenné dávky po více jak 24 h, je doporučováno použít ředidlo EquiPro. Při použití méně jak 24 h po odběru přicházejí v úvahu všechna tři ředidla. EquiPro TM je vhodné při použití v polních podmínkách, protože se dodává již naředěné (Aurich et al. 2007).



Graf 1: Celková motilita (%) spermií po naředění EquiPro (○), EquiPro TM (□) a AndroMed-E (▲) ředidly během skladování při 5 °C po 96 h (Aurich et al. 2007).



Graf 2: Membránová integrita spermií (%) po naředění EquiPro (○), EquiPro TM (□) a AndroMed-E (▲) ředidly během skladování při 5 °C po 96 h (Aurich et al. 2007).

3.3.4 Kapacitace

Spermie po ejakulaci není hned oplození schopná. Nejprve musí projít několika změnami na povrchu i vně buňky, aby byla schopná rozrušit buňky *corona radiata* a navázat se na zónu pellucidu. Tento proces dozrávání spermií se nazývá kapacitace. Při oplození *in vivo* probíhá v samičích pohlavních cestách po kontaktu se sekrety vejcovodů a dělohy. Při kapacitaci dochází k odstranění cholesterolu z membrány, tím membrána mění svoji fluiditu a stává se prostupnější pro jiné molekuly, jako například pro Ca^{2+} (Leemans et al. 2019). Tím, že dovnitř spermie začne pronikat vápník a hydrogenuhličitany, dochází ke změnám pH a aktivaci adenylylcyklázy. To způsobí zvýšení koncentrace cAMP. Všechny tyto děje posléze vedou k aktivaci proteinkinázy a fosforylaci tyrosinu (McPartlin et al. 2008). Dochází i k hyperaktivaci – změně pohybu, aby byla spermie schopna projít přes děložní hlen k oocytu. V podmínkách *in vitro* je nutné se pokusit napodobit podobné podmínky, jako jsou v pohlavních cestách klisny, aby mohlo dojít ke kapacitaci. U ostatních savčích spermií stačí kultivace v kapacitačním médiu obsahujícím $HCO3^{-}$, Ca^{2+} a albumin. Navíc u každého druhu se přidávají druhově specifické látky, které celý proces zahajují. U skotu se například přidávají látky podobné heparinu. Bohužel u koní je toto médium bez výsledků (Leemans et al. 2019). Jedno z kapacitačních médií používaných u koní je modifikované Whittenovo médium (MW). MW obsahuje NaCl, KCl, glukózu a mnoho dalších látek. Pro použití u spermií se navíc přidává $NaHCO_3$ a BSA, pH se udržuje na 7,25. Tím je dosahováno vysoké míry fosforylace tyrosinu (McPartlin et al. 2008). Přesné fyziologické procesy zatím nejsou zcela jasné, ale zdá se, že důležitou roli hraje ovariální tekutina a kontakt spermie se stěnou vejcovodu. Celý proces probíhá v prostředí *in vitro* během několika sekund po kontaktu spermií s médiem. Po dokončení kapacitace mají spermie velmi omezenou dobu přežití. Díky změnám na membráně se kapacitované spermie dají detekovat fluorescenčním barvením pomocí merocyaninu 540 na průtokové cytometrii (Neild et al. 2005).

Po úspěšné kapacitaci, kdy se spermie dostane až k vajíčku, dochází k navázání na zónu pellucidu a následné akrozomální reakci. Akrozom je membránová organela na vrcholu hlavičky původem z Golgiho aparátu (Hirohashi & Yanagimachi 2018). Při reakci neboli při exocytóze dochází k splynutí vnější akrozomální a plazmatické membrány spermie a vylití obsahu akrozomu – převážně štěpících enzymů, které napomáhají rozrušení zóny pellucidy a fúzi spermie s oocytem (Neild et al. 2005). V *in vitro* podmínkách se spermie po kultivaci v kapacitačních médiích dále kultivují v médiích obsahující progesteron a kalcium ionofor, které mají za úkol vyvolat akrozomální reakci (McPartlin et al. 2008).

3.4 Kryokonzervace

Kryokonzervace umožňuje skladovat gamety, ale i již oplodněné oocyty po mnoho desítek let. Kryokonzervace obecně znamená pomalé ochlazení a následné zmrazení na –196 °C pomocí tekutého dusíku. Pro rychlé zmrazení se používá pojem vitrifikace. Vzhledem k nízkým teplotám se mění fyzikální vlastnosti ředidla i samotných gamet a je proto nutná ochrana pomocí dalších látek, tzv. kryoprotektantů. Kryoprotektanty se dělí na prostupující a neprostupující buněčnou membránou. Při zamrazování hraje důležitou roli objem vzorku, koncentrace ředidla i kryoprotektantů, ale i rychlost mrazení a potom následného ohřívání.

3.4.1 Kryoprotektanty

Při snižování teploty se uvnitř i na povrchu buňky dějí změny, které by bez přidání specifických látek vedly k jejímu nenávratnému zničení a tím způsobily její smrt. Mezi tyto změny patří například přechod buněčné membrány z fluidního do gelového stavu. K těmto přesmykům mezi lipidy a proteiny dochází při chlazení, ale i naopak při opětovném rozmrazování. Jinak se tomuto ději také říká teplotní šok. Se snižující se teplotou se také zpomaluje metabolismus buněk.

Čistá voda, když zmrzne, vytvoří krystaly a postupně k sobě přitahuje další čistou vodu z okolí. Tím se kolem krystalů utvoří nezamrzající kanálky s velkou koncentrací látek. Vše, co se dostane do krystalu, je zničeno, zatímco buňky nacházející se v těchto kanálcích můžou přežít. V důsledku vysokých koncentrací látek v kanálcích, dochází vlivem osmotického tlaku k zmenšování buněk. Při dalším snižování teploty na -196 °C dochází ke stavu, kdy jsou veškeré metabolické procesy pozastaveny. Aby se omezilo poškození biologických materiálů během zamrazování, přidávají se k nim látky, které mají jiné fyzikální vlastnosti než voda a zamrzají při mnohem nižších teplotách, tzv. kryoprotektanty. Při zmrazení brání tvorbě krystalů v okolí i uvnitř samotné buňky (Loomis & Graham 2008).

Kryoprotektanty se dělí na prostupující a neprostupující buněčnou membránou. Mezi ty prostupující patří glycerol, etylenglykol či propylenglykol (Loomis 2011). Fungují na tom principu, že pomalu prostupují do buňky a tím nahrazují vodu. Velké riziko poškození nastává po rozmrazení, kdy je nutné kryoprotektanty vymýt pryč. Při vymytí fyziologickým roztokem proniká voda do buněk mnohem rychleji, než intracelulární kryoprotektant opouští buňku (De Coster et al. 2020). Tyto průchody přes buněčnou membránu mění osmotický tlak, což může být pro mnoho buněk smrtelné. U glycerolu se musí důsledně hlídat koncentrace, protože při vyšších hodnotách je pro spermie toxický – maximální koncentrace se uvádí 5 % (Wu et al. 2015). Jako neprostupující se používají různé cukry, například sacharóza, trehalóza či rafinóza. Sacharidy všeobecně zvyšují viskozitu a tím zabraňují vzniku nebezpečných krystalů. Koncentrace kryoprotektantů celkově závisí na jeho druhu (Consuegra et al. 2019). Často se používají různé kombinace prostupujících i neprostupujících kryokonzervantů dohromady (De Coster et al. 2020).

3.4.2 Vitrifikace

Vitrifikace je proces, kdy buňky projdou tuhnutím podobnému tuhnutí skla do nekrystalického (amorfního) stavu. Toho lze dosáhnout buď vysokými koncentracemi kryoprotektantů (až 80 %), protože poté nemají látky tendenci tvořit krystaly a rovnou přechází do nekrystalického stavu. Takto vysoké koncentrace jsou však už pro buňky toxické. Proto se používá metody rychlého zmrazení pomocí tekutého dusíku, kde stačí menší koncentrace kryoprotektantů. Díky rychlému zmrazení je zabráněno tvorbě krystalů a buňky rovnou přecházejí do amorfního stavu (De Coster et al. 2020). Obecně je pomocí vitrifikace dosahováno lepších výsledků. U spermií se používají kryoprotektanty, které neprostupují buněčnou membránou, například cukry. Při takovémto uskladnění je ejakulát naředěný vitrifikačním médiem obsahující kryoprotektanty nejprve ochlazen během jedné hodiny na 5 °C a poté rovnou vložen do kapalného dusíku (Consuegra et al. 2019). U oocytů a embryí se používají kryoprotektanty prostupující membránou, protože na rozdíl od spermií snesou jejich vysokou koncentraci a tím spojené změny osmotických tlaků. Často používaný je glycerol (Hidalgo et al., 2018). U oocytů se používá téměř výhradně vitrifikace, protože po kryokonzervaci se zatím nepovedlo získat embryo (De Coster et al. 2020).

3.4.3 Oocyty

První pokusy o uchování oocytů proběhly již v roce 1958. Od té doby metody velice pokročily především pomocí objevení funkce kryoprotektantů. V lidské medicíně je dokonce dosahováno podobných výsledků následného oplození a vývoje embrya, jako při použití čerstvých oocytů. Bohužel o koní se stále nedaří dosáhnout takových výsledků, aby se kryokonzervace dala používat v běžné praxi (Hinrichs 2018). Kryokonzervují se oocyty nezralé i zralé, které dozrály *in vitro* i *in vivo*. U nezralých oocytů je výhoda v tom, že chromatin je stále ještě dekondenzován a je chráněn jadernou membránou. U zralých oocytů, které se kryokonzervují ve stádiu druhého meiotického dělení, je již chromatin kondenzován a jaderná membrána je rozpuštěna. Tím pádem je genetická informace vystavena toxickým účinkům kryoprotektantů, což může vést k pozastavení nebo špatnému pozdějšímu dělení. Přesto je ale dosahováno lepších výsledků se zralými oocyty, nejspíše kvůli vlastnostem buněčné membrány. Je i rozdíl u oocytů zralých *in vivo* a *in vitro*, lepší výsledky jsou s oocyty dozrálými *in vivo.* Bohužel to je mnohem méně praktické, vzhledem k nutnosti neustále hlídat růst folikulu, hormonální léčbě klisny a nízké úspěšnosti vyvolání superovulace. Úroveň úspěšnosti značně ovlivňuje tloušťka corony radiaty. Ta sice na jednu stranu chrání oocyt, ale na stranu druhou příliš silná vrstva brání průniku kryoprotektantů (De Coster et al. 2020).

Kryokonzervace oocytů má mnoho výhod. Vzhledem k tomu, že proces *in vitro* fertilizace je poměrně náročný na časový managment, poskytuje kryokonzervace čas navíc a je možné počkat a vybrat vhodného hřebce. V případě, že geneticky cenná klisna náhle uhynula a byly jí odebrány oocyty post mortem, máme možnost je uchovat po delší dobu. Dále tato technika umožňuje zisk oocytů z mladých klisen před jejich sportovní kariérou a jejich

pozdější použití, protože u starších klisen již klesá úspěšnost OPU (Cuervo-Arango et al. 2019). Významná je i možnost převézt oocyty například na jiný kontinent a rozšířit tím genetickou informaci klisen na větší vzdálenosti. Toho se hojně využívá u divokých koní, kde je velmi omezena rozmanitost genetické informace. V neposlední řadě, pokud by se kryokonzervace začala více používat u oocytů získaných z jatečného materiálu, získali bychom téměř neomezený přísun pro studování mechanizmu přenosu somatických jader neboli klonování.

Oocyty a embrya se na vitrifikaci připravují tzv. dvoufázově. Nejdříve jsou ponořeny na relativně dlouhou dobu 10-15 min do média, které obsahuje jen asi polovinu kryoprotektantů potřebných ke správně vitrifikaci. Tím je zajištěna větší stabilita osmotických tlaků uvnitř a vně buněk. Teprve poté jsou umístěny do roztoku, který obsahuje požadovanou koncentraci kryoprotektantů. Bohužel u koní je to dost dlouhá doba, aby se projevila jejich toxicita a ovlivnila pozdější vývoj embryí. Dnes se zkouší doba expozice okolo 105 sekund (De Coster et al. 2020).

Při použití kombinace kryoprotektantů se jako neúčinnější jeví ethylenglykol, propylenglykol a trehalóza či sacharóza. Díky kombinaci dvou prostupujících kryoprotektantů je možné snížit jejich individuální koncentraci a tím se vyhnout toxickým úrovním. Toxicitu lze nadále snížit použitím dalších látek, například makromolekul (BSA) a syntetických látek zabraňujícím tvorbě ledu (polyvinylpyrrolidon, polyvinylalkohol). Z cukrů je dosaženo nejlepších výsledků po použití trehalózy, kdy dozrálo 42 % oocytů a až 80 % oplozených oocytů se začalo štěpit (Canesin et al. 2017). Bohužel po použití vitrifikace se u koní stále dosahuje velmi nízké míry březosti, takže je nutné provádět další studie (Squires 2020).

3.4.4 Embrya

Dříve se kryokonzervace embryí příliš nepoužívala z důvodu jejich malého, ale s příchodem *in vitro* oplození a tím získání většího počtu embryí, roste poptávka po možnosti jejich uchování. Velký zájem je v dostihovém světě, kde by zamrazení a přenos až ve chvíli, kdy se to majiteli hodí, umožnilo určovat dobu narození hříběte (Squires 2020). Jako všechny metody umělého oplození, je i kryokonzervace embryí asi nejvíce vyzkoušena u skotu, kde se např. v Americe až 70 % embryí nejprve zamrazí a přenesena jsou až ve vhodné chvíli (Moore & Hasler 2017). U embryí závisí na velikosti, objemu a stádiu vývoje. Mnohem lepších výsledků je dosahováno s morulou nebo časnou blastocystou do velikosti 300 µm. Při vitrifikaci embrya vzniklého *in vivo*, je nutné odběr provést 6-7 den po ovulaci (Hinrichs 2018). Čím větší embryo je, tím dochází k většímu poškození v důsledku nedostatečné ochrany všech buněk kryoprotektanty. V případě vitrifikace větších embryí jsou pokusy o odstranění až 90 % tekutiny z blastocoelu. Při použití mikromanipulátoru je dosahováno poměrně dobrých výsledků. Bohužel ne každá laboratoř ho má k dispozici, takže je nutné posílat embrya z laboratoří do jiných laboratořích, což celý proces značně komplikuje. Byly i pokusy o odstranění tekutiny bez mikromanipulátoru, ale to nevedlo k dobrým výsledkům. Míra březosti po přenosu vitrifikovaných embryí se po 25 dnech pohybuje okolo 62 %. Pro srovnání, po přenosu čerstvých embryí je dosahováno 75 % březostí (Squires 2020). Jedno ze

základních médií používaných pro vitrifikaci embryí je modifikované DBPS (z angl. Dulbecco's phosphate buffered saline) obsahující 137 mM chlorid sodný, 1,5 mM dihydrogenfosforečnan draselný, 8,1 mM hydrogenfosforečnan sodný a 2,7 mM chlorid draselný, navíc doplněný o 0,3 mM pyruvát sodný, 3,3 mM glukózu a 20% FBS. Jako kryoprotektanty se přidávají buď 1,4 M glycerol samotný nebo v kombinaci s ethylen-glykolem v poměru 1,4 M : 3,6 M nebo 3,4 M : 4,6 M. Při rozehřívání se do základního média přidává 0,5 M galaktóza (Diaz et al. 2016).

3.4.5 Spermie

Jak již bylo uvedeno výše v předchozí kapitole, kvalita ejakulátu závisí i na věku hřebce. Bylo zjištěno, že kvalita se snižuje po 9. roku hřebce. Je tedy lepší hřebce zařadit do chovu dříve než po ukončení jeho sportovní kariéry. Výhoda u hřebců je, že na rozdíl od přežvýkavců hřebci vykazují stejnou kvalitu ejakulátu před i po rozmrazení i u pohlavně nedospělých jedinců. Velice důležitá je rychlost mrazení. U kryokonzervace se doporučuje tento postup: na 5 °C ochlazovat rychlostí 0,3 °C/min, do -25 °C rychlostí 10 °C/min a na -140 °C rychlostí 25 °C/min, poté vložit do tekutého dusíku o teplotě -196 °C. V mnoha evropských i amerických plemenných knihách se po rozmrazení jako přijatelné bere 35 % progresivně se pohybujících spermií o koncentraci $250*10^6$ spermií/ml (Aurich et al. 2020).

Při vitrifikaci spermií se dosahuje dobrých výsledků při objemu 100 µl a koncentraci $100*10^6$ spermií/ml. Ohledně sacharidů používaných jako kryoprotektantů se zjistilo, že dobré hodnoty po rozmrazení vykazuje ejakulát s použitím 100 nM trehalózy. Nicméně vhodná koncentrace sacharidů závisí na přesném postupu vitrifikace a objemu i koncentraci spermií v inseminační dávce. Všeobecně platí, že čím větší objem dávky, tím je potřeba větší koncentrace sacharidů, protože zamrazení a opětovné rozehřátí trvá déle a je nutné zachování větší viskozity (Consuegra et al. 2019).

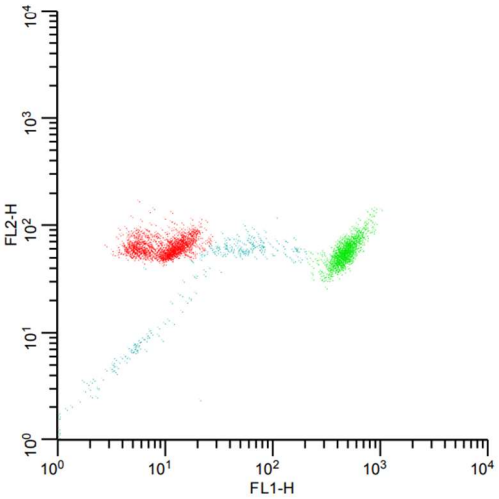
Z kryoprotektantů prostupující membránou se často používá glycerol. Původně byl používán u býčích spermií, kde bylo dosahováno velmi dobrých výsledků. U koní bohužel takovýchto výsledků dosaženo nebylo, protože hřebčí spermie jsou mnohem citlivější na změny osmotických tlaků a je pro ně toxické nestejnoměrné promísení glycerolu se zbytkem ředidla. Nicméně při použití glycerolu o koncentraci 3,5% je zlepšena pohyblivost a životaschopnost spermií díky stabilizaci membrány. Glycerol se používá i v kombinaci s dalšími kryoprotektanty, například s methylformamidem. Vzhledem k tomu, že každý kryoprotektant zlepšuje jinou vlastnost spermatu, je dobré při kryokonzervaci vždy volit takovou kombinaci kryoprotektantů, aby se co nejvíce podpořila kvalita ejakulátu i po rozmrazení (Wu et al. 2015).

3.5 Průtoková cytometrie

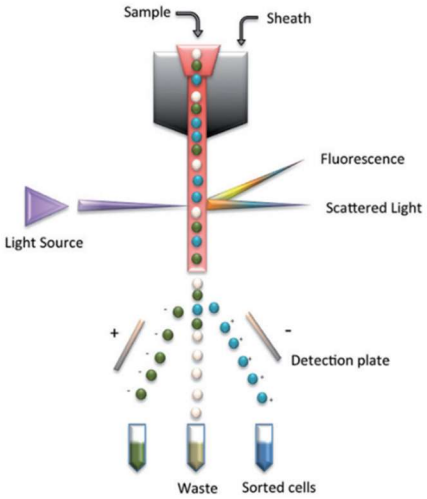
Průtoková cytometrie je přístrojová metoda, která umožňuje měření a případné rozdělení buněk podle námi zvolených parametrů. Dříve se cytometrie používala pouze k měření buněk, dnešní přístroje zvládají i menší částice jako jsou viry, chromozomy, jiné buněčné organely nebo měření obsahu různých látek. Jedná se o poměrně náročnou metodu, která je hojně využívána ve výzkumných laboratořích i praxi. Výhodou je její rychlost (až 5000 částic za sekundu) a možnost zpracování vzorku o vysoké koncentraci materiálu najednou. Před samotným měření je nutné buňky obarvit fluorescenčními barvivy, poté jsou osvětlovány a snímány fotodetektorem a následně rozdělovány na základě odlišných signálů během individuálního proudění. Vzhledem k průtoku v úzkém proudu, musí být měřené částice menší než 30 µm (Givan 2011). Moderní přístroje jsou schopné měřit až 14 různých parametrů (Adan et al. 2017). U umělého oplození koní se průtoková cytometrie nejvíce používá pro hodnocení kvality ejakulátu a pro sexování spermií či embryí neboli rozdělení dle pohlaví. U spermií se hodnotí integrita membrány, podíl živých a mrtvých spermií, mitochondriální činnost nebo intracelulární koncentrace vápníku.

Základní podmínkou pro měření na cytometru je, aby částice (buňky) byly v roztoku jednotlivě a nedržely se při sobě. Měřená suspenze buněk se ředí na koncentraci $5*10^5$ ml^{-1} (Givan 2011). Částice jsou rozpuštěny v nosné kapalině, která zároveň zabraňuje jejich shlukování. Suspenze je do přístroje vkládána ve zkumavce, na jejímž konci je tenká kapilára, z které jsou jednotlivé částice strhávány proudem plášťové tekutiny na základě rozdílných tlaků obou kapalin a vstřikovány do průtokové komory. Nejčastěji se jako plášťová tekutina používá pufrovaný fyziologický roztok. Rychlost průtoku se odvíjí podle měřených parametrů. Pomalý tok umožňuje lepší osvětlení a je proto používán například pro měření DNA, rychlý tok se používá více u kvalitativního měření buněk. Během měření je důležité správné nastavení tlaků a nepřítomnost vzduchových bublinek, které by zkreslily výsledky. Hlavní je zajistit, aby docházelo k laminárnímu proudění, nikoliv k turbulentnímu (Adan et al. 2017). K osvětlení se používá tenký paprsek monochromatického světla – laser. Dnes se většinou používají dvou a tří laserové cytometry. Nejčastěji používanými jsou argonový laser s vlnovou délkou 488 nm, UV laser s vlnovou délkou 350 nm nebo fialový laser s vlnovou délkou 408 nm. Výhodou použití více laserů je možnost obarvení buněk více barvivy (až čtyřmi) a tím možnost zkoumání více parametrů najednou (Givan 2011). Fotodetektory se skládají ze soustavy filtrů, čoček a zrcadel, které pomáhají rozdělit jednotlivé vlnové délky ke správným detektorům. Světlo dopadající na buňku se odráží ve dvou směrech. Jako přímý rozptyl (FSC, z angl. forward scatter) je označován odraz směřující ve směru laseru a udává velikost buňky. Boční rozptyl (SSC, z angl. side scatter) je kolmý k ose laseru a odráží strukturu buněčné membrány a buněčných organel. Pokud mají být měřené buňky tříděny podle zvolených parametrů, nechají se kapičky při průchodu průtokovou komorou elektrostaticky nabít a následně vychýlit do sběracích nádobek. Signály z fotodetektorů jsou převedeny na elektrické impulzy. Výsledkem měření na průtokové cytometrii vznikne graf v případě měření jednoho parametru v podobě

histogramu, v případě dvou parametrů dot plot graf viz obrázek č. 4. Zjednodušený nákres průtokové cytometrie znázorňuje obrázek č. 5 (Adan et al. 2017).



Obrázek 5: Výsledek z průtokové cytometrie v podobě dot plot grafu. Červená populace představuje mrtvé spermie obarvené propidiem jodidem (PI), zelená populace jsou živé spermie obarvené barvivem SYBR-14. Body mezi těmito populacemi jsou umírající spermie, které již pomalu propouští PI přes buněčnou membránu (Love 2016).



Obrázek 4: Zjednodušené schéma průtokové cytometrie s následným rozdělením částic (Adan et al. 2017).

3.5.1 Sexování spermií

U savců určují pohlaví plodu spermie, které nesou buď chromozom X nebo Y. Mezi chovateli roste zájem o určení, jaké pohlaví se narodí. Vše začalo u skotu, kde chovatelé preferovali narození samic v mléčném průmyslu a naopak samců v masném průmyslu. U koní se preference pohlaví liší u každého plemene i v každém sportovním odvětví. U póla preferují více klisny, v dostizích chtějí více hřebců (Aurich & Schneider 2014). Nevýhodou třídění spermatu je jeho klesající kvalita a tím potřeba vyšší koncentrace spermií v dávce. Přesnost třídění pomocí průtokové cytometrie je více jak 90 %. U oplodnění čerstvým roztříděným spermatem se míra březosti pohybuje okolo 52 %, což je stále velmi uspokojivé, bohužel u chlazených či mrazených se míra pohybuje jen okolo 12 % (Squires 2020). Zvýšení úspěšnosti zabřezávání po inseminaci tříděným spermatem lze dosáhnout vložením spermatu dále do dělohy blíže k ústím vejcovodů (Aurich & Schneider 2014). K barvení se velmi často používá barvivo Hoechst 33342, které je propustné přes buněčnou membránu a může tak barvit DNA. Klíčový je malý rozdíl obsahu chromozomální DNA mezi X a Y spermiemi. Díky možnosti kombinace několika parametrů se rovnou vybírají jen životaschopné spermie (Moore & Hasler 2017).

3.6 Klonování

Klonování je poměrně nová a velice lukrativní metoda, jak obnovit či zvýšit reprodukční schopnosti geneticky velmi cenných jedinců. První hříbě vzniklé klonováním se narodilo v roce 2003 v Itálii. Jednou z největších výhod klonování je to, že umožňuje zisk i od jedinců, kteří byli vykastrovaní (Hinrichs 2018).

Klonování je velmi náročný proces, při kterém se jádro somatické buňky vloží do oocytu místo jeho vlastního jádra. Vznikne tak jedinec geneticky téměř naprosto shodný s původním jedincem (De Coster et al. 2020). Od původního jedince se klon liší mitochondriální DNA, kterou zdědí po dárkyni oocytu. Zajímavé je, že pokud by dárkyně vajíčka a jedinec, ze kterého bylo odebráno somatické jádro, byli příbuzní po mateřské linii, klon by byl s dárcem jádra zcela geneticky identický. Somatické jádro lze získat téměř z každé buňky. Dobrých výsledků je dosahováno s mezenchymálními buňkami získanými z kostní dřeně. Proces odstraňování jádra z buňky se nazývá enukleace. Oocyty použité při klonování by měly být ve stádiu MII, u somatických buněk je preferován klidový stav v G0 fázi (Hinrichs 2018). Jsou i protokoly, kdy se pro klonování berou buňky v G2 fázi. Oocyty se nechávají zrát v chemicky definovaném médiu TCM 199 doplněného o prasečí folikulostimulační hormon (pFHS, z angl. porcine follicle-stimulating hormone), lidský somatomedin (hIGF, z angl. human inzuline-like growth factors), myší epidermální růstový faktor (mEGF, z angl. mouse epidermal growth factor) a 20% FBS (Maserati & Mutto, 2016).

Vzhledem k tomu, že při klonování se zcela obchází použití spermií, které při normálním oplození přinášejí polovinu genetické informace a aktivují oocyt k dokončení meiózy, je nutný po implantaci jádra do oocytu aktivační impuls k začátku embryonálního dělení (Hinrichs 2018). Nejčastěji používaným aktivátorem je roztok 6-dimethylaminopurinu a cykloheximidu, přičemž míra aktivace přesahuje 90 %. Jiné laboratoře používají místo cykloheximidu extrakt ze spermií (Galli et al. 2014). Poté probíhá kultivace *in vitro* podobná kultivaci embryí. Vzhledem k tomu, že v somatických buňkách jsou některé geny vypnuté, je důležitým úkolem oocytů znovu nastartovat všechny geny (Hinrichs 2018). Následný přenos do klisny příjemkyně se provádí ve stádiu blastocyst nebo je možná kryokonzervace (Galli et al. 2014).

U hospodářských zvířat je klonování nejvíce prostudováno o skotu. U koní se stále nedaří dosáhnout dobrých výsledků. To je z velké míry způsobeno nedostatkem oocytů k prozkoumání celého procesu. Jedním z důvodů je to, že se stále nedaří u klisen vyvolat superovulaci. Pokud by se více rozšířila kryokonzervace oocytů z jatečného materiálu, mohlo by to urychlit proces zdokonalení klonování (De Coster et al. 2020). Transfer klonovaných embryí stále dosahuje nízké míry březosti, proto se často přistupuje k ET dvou embryí. V případě uchycení obou embryí bývá jedno embryo odstraněno (Galli et al. 2014). Bohužel u klonovaných mláďat se vyskytuje větší procento poruch než u normálních mláďat. Často se vyskytují problémy s placentou, syndrom NMS (z angl. neonatal maladjustment syndrome), či problémy s klouby. V dnešní době zápis klonů do plemenné knihy dovolují jen některé organizace. Mezinárodní jezdecká federace, která pořádá například i Olympijské hry, účast

klonů povolila (Hinrichs 2018). Některé plemenné knihy povolují zapsat jedince vzniklého klonováním pouze za předpokladu, že k jeho vzniku byl použit oocyty klisny, která je také zapsané v této plemenné knize. Ve světě mezi špičku v komerčním klonování patří společnost Viagen LLC. Původem společnost pochází z USA, ale laboratoře pro klonování koní má v Kanadě, kde mohou odebírat oocyty z jatečného materiálu (Maserati & Mutto 2016).

3.6.1 Rozdělení embryí

Speciálním typem klonování je i rozdělení embryí, kdy se z jednoho embrya udělá několik samostatných. To má výhody jak v laboratorní praxi, kdy se na identicky stejných jedincích dají zkoumat epigenetické vlivy prostředí, a v praxi to má výhodu v navýšení počtu potomků od jedné klisny vzhledem k neschopnosti u klisen vyvolat superovulaci. Základní podmínkou je, aby buňky byly stále v totipotentním stádiu a měly aktivované všechny geny. To je zajištěno štěpením co nejrannější moruly. Pokusy o dělení i velmi ranné blastocysty končily neúspěchem. Jednodušší odběr embrya se provádí po sestoupení do dělohy. Bohužel koňské embryo po sestoupení během několika hodin přejde do stádia blastocysty, a proto se klisnám aplikuje dávka lidského prostaglandinu E2 pro urychlení sestoupení a tím možnosti rychlejšího odebrání. Maximální počet jedinců vzniklých po rozdělování embryí jsou čtyři (Allen 2005).

4 Závěr

Mezi chovateli stále roste zájem o využití biotechnologií v reprodukci koní. Bohužel u koní mnoho technologií, používaných hojně u jiných hospodářských zvířat, nefunguje. U odběru oocytů je to jiným anatomickým uchycením oocytu ve folikulu, při oplodnění *in vitro* je to neschopnost správné kapacitace spermie. U klisen je dále velkou překážkou špatná odpověď na hormonální léčbu při pokusu vyvolat superovulaci. Všechny tyto problémy způsobují, že produkce embrya *in vitro* je velice drahá záležitost, která se provozuje jen v relativně málo laboratořích ve světě.

Zajímavým odvětvím biotechnologií je odběr gamet od náhle uhynulých jedinců, tedy post mortem. U klisen se dosahuje poměrně vysoké výtěžnosti a to až 18 oocytů na jednu klisnu. Po úspěšném provedení ICSI oplodnění se embrya kultivují do stádia blastocyty. K embryo transferu je nutné získat klisnu, která se stane náhradní matkou hříběte. Klisna musí být naprosto zdravá bez pohybových problémů. Úspěšnost přenosu se dnes pohybuje až okolo 90 %. Pro ET je možnost použít i embrya vzniklá *in vivo*, v tom případě je nutná správná synchronizace klisny dárkyně s příjemkyní. Míra úspěšnosti při odběru embrya vzniklých v těle klisny dárkyně je okolo 75 %.

U tvorby inseminačních dávek jsou důležité dvě věci – kvalita ejakulátu a správně zvolené ředění. Bohužel u výběru hřebců do plemenných knih nehraje roli kvalita jejich ejakulátu, takže zatímco u skotu jsou již poměrně standardizované protokoly na ředění a případné mrazení, u koní tomu tak stále není. Mezi plemeníky je až 20 % hřebců, jejichž ejakulát není vůbec vhodný k inseminaci jinak než čerstvými dávkami. Objevení antibiotik umožnilo tvorbu chlazených inseminačních dávek, další velký pokrok přineslo objevení účinků kryoprotektantů. To umožnilo hluboké zamrazení spermií, oocytů i embryí po mnoho desítek let. Díky možnosti delšího uchování gamet a embryí je možnost většího rozšíření genetické informace cenných jedinců po světě.

Vzhledem ke stále rostoucí poptávce chovatelů k možnosti ovlivnění pohlaví plánovaného hříběte, jsou dnes přístrojové metody, jak na základě rozdílnosti chromozomů X a Y oddělit spermie nesoucí daný chromozom. Stejně lze vyseparovat i embrya, ale s rostoucí velikostí rozdělovaných částic roste i náročnost pro zachování kvality buněk. Zajímavou metodou biotechnologií je klonování, které je u některých plemenných knih zakázané, zatímco v jiných knihách je vnímáno jako přínosné pro chov.

Umělá inseminace, embryo transfer, kryokonzervace a klonování jsou moderní metody, jak upravit a řídit rozmnožovaní koní. Ve vrcholovém sportu jsou kladeny na koně čím dál tím větší nároky a chovatelé se na ně snaží odpovídat výběrem co nejlepších rodičovských párů. Biotechnologie v reprodukci koní neslouží jen pro vznik co nejvýkonnějších koní, ale můžou být i prospěšné v pokusech o záchranu divokých koní či obnově vymírajících plemen.

5 Literatura

Adan A, Alizada G, Kiraz Y, Baran Y, Nalbant A. 2017. Flow cytometry: basic principles and applications. Critical Reviews in Biotechnology **37(2)**: 163–176.

Allen WR. 2005. The development and application of the modern reproductive technologies to horse breeding. Reproduction in Domestic Animals **40(4)**: 310–329.

Allen WR (Twink)., Wilsher S. 2020. Historical Aspects of Equine Embryo Transfer. Journal of Equine Veterinary Science **89(SI)**: 102987.

Alm H, Torner H, Kanitz W, Becker F, Hinrichs K. 1997. Comparison of different methods for the recovery of horse oocytes. Equine Veterinary Journal. Supplement **25(25)**: 47–50.

Amann RP, Waberski D. 2014. Computer-assisted sperm analysis (CASA): Capabilities and potential developments. Theriogenology **81(1)**: 5–17.

Aurich C., Seeber P, Müller-Schlösser F. 2007. Comparison of different extenders with defined protein composition for storage of stallion spermatozoa at 5°C. Reproduction in Domestic Animals **42(4)**: 445–448.

Aurich C. 2008. Recent advances in cooled-semen technology. Animal Reproduction Science **107**: 268–275.

Aurich C, Schneider J. 2014. Sex determination in horses-Current status and future perspectives. Animal Reproduction Science **146(1–2)**: 34–41.

Aurich JE. 2012. Artificial Insemination in Horses-More than a Century of Practice and Research. Journal of Equine Veterinary Science **32(8)**: 458–463.

Aurich JE, Kuhl J, Tichy A, Aurich C. 2020. Efficiency of Semen Cryopreservation in Stallions. Animals **10**: 1–14.

Bergeron A, Manjunath P. 2006. New Insights Towards Understanding the Mechanisms of Sperm Protection by Egg Yolk and Milk. Molecular Reproduction and Development **73**: 1338–1344.

Canesin HS, Brom-de-Luna JG, Choi YH, Ortiz I, Diaw M, Hinrichs K. 2017. Blastocyst development after intracytoplasmic sperm injection of equine oocytes vitrified at the germinal-vesicle stage. Cryobiology **75**: 52–59.

Card C. 2018. Non-surgical embryo transfer technique and recipient mare pregnancy rate. Veterinary Record **183(10)**: 320–322.

Chatot CL, Ziomek CA, Bavister BD, Lewis JL, Torres I. 1989. An improved culture medium supports development of random-bred 1-cel mouse embryos in vitro. Journal of Reproduction and Fertility **86(2)**: 679–688.

Choi YH, Chung YG, Walker SC, Westhusin ME, Hinrichs K. 2003. In vitro development of equine nuclear transfer embryos: Effects of oocyte maturation media and amino acid composition during embryo culture. Zygote **11(1)**: 77–86.

Choi YH, Love LB, Varner DD, Hinrichs K. 2004. Factors affecting development competence of equine oocytes after intracytoplamic sperm injection. Reproduction **127(2)**: 187–194.

Choi YH, Love CC, Varner DD, Hinrichs K. 2006. Equine blastocyst development after intracytoplasmic injection of sperm subjected to two freeze-thaw cycles. Theriogenology

65(4): 808–819.

Colenbrander B, Gadella BM, Stout TAE. 2003. The predictive value of semen analysis in the evaluation of stallion fertility. Reproduction in Domestic Animals **38(4)**: 305–311.

Consuegra C, Crespo F, Dorado J, Diaz-Jimenez M, Pereira B, Ortiz I, Hidalgo M. 2019. Vitrification of stallion sperm using 0.25 ml straws: Effect of volume, concentration and carbohydrates (sucrose/trehalose/raffinose). Animal Reproduction Science **206(May)**: 69–77.

Cuervo-Arango J, Claes AN, Stout TA. 2019. The recipient's Day after ovulation and the number of corpora lutea influence the likelihood of pregnancy in mares following transfer of ICSI frozen embryos. Theriogenology **135**: 181–188.

Dascanio J, McCue P. 2014. *Equine reproductive procedures*. Wiley blackwell, Iowa.

De Coster T, Velez DA, Van Soom A, Woelders H, Smits K. 2020. Cryopreservation of equine oocytes: Looking into the crystal ball. Reproduction, Fertility and Development **32(5)**: 453–467.

Deichsel K, Schrammel N, Aurich J, Aurich C. 2016. Effects of a long-day light programme on the motility and membrane integrity of cooled-stored and cyropreserved semen in Shetland pony stallions. Animal Reproduction Science **167**: 68–73.

Diaz F, Bondiolli K, Paccamonti D, Gentry GT. 2016. Cryopreservation of Day 8 equine embryos after blastocyst micromanipulation and vitrification. Theriogenology **85(5)**: 894–903.

Galli C, Duchi R, Colleoni S, Lagutina I, Lazzari G. 2014. Ovum pick up, intracytoplasmic sperm injection and somatic cell nuclear transfer in cattle, buffalo and horses: From the research laboratory to clinical practice. Theriogenology **81(1)**: 138–151.

Givan AL. 2011. Flow cytometry: An Introduction. Pages 1-29 in Hawley TS , Hawley RG editors. Methods in Molecular Biology. Humana Press, New York.

Gloria A, Carluccio A, Petrizzi L, Noto F, Contri A. 2016. Characteristics of frozen epididymal spermatozoa from stallions that died 12 to 36 hours after colic surgery. Theriogenology **85(2)**: 345–350.

Hernández-Avilés C, Love CC, Serafini R, Teague SR, Varner DD. 2019. Supplemental Antibiotics in a Commercial Extender for Stallion Semen. Journal of Equine Veterinary Science **80**: 33–35.

Hidalgo M, Consuegra C, Dorado J, Diaz-Jimenez M, Ortiz I, Pereira B, Sanchez R, Crespo F. 2018. Concentrations of non-permeable cryoprotectants and equilibration temperatures are key factors for stallion sperm vitrification success. Animal Reproduction Science **196(April)**: 91–98.

Hinrichs K, Love CC, Brinsko SP, Choi YH, Varner DD. 2002. In vitro fertilization of in vitro-matured equine oocytes: Effect of maturation medium, duration of maturation, and sperm calcium ionophore treatment, and comparison with rates of fertilization in vivo after oviductal transfer. Biology of Reproduction **67(1)**: 256–262.

Hinrichs K, Choi YH, Love LB, Varner DD, Love CC, Walckenaer BE. 2005. Chromatin configuration within the germinal vesicle of horse oocytes: Changes post mortem and relationship to meiotic and developmental competence. Biology of Reproduction **72(5)**:

1142–1150.

Hinrichs K. 2010. In Vitro Production of Equine Embryos: State of the Art. Reproduction in Domestic Animals **45(SUPPL. 2)**: 3–8.

Hinrichs K. 2010. The equine oocyte: Factors affecting meiotic and developmental competence. Molecular Reproduction and Development **77(8)**: 651–661.

Hinrichs K, Choi YH, Norris JD, Love LB, Bedford-Guaus SJ, Hartman DL, Velez IC. 2012. Evaluation of foal production following intracytoplasmic sperm injection and blastocyst culture of oocytes from ovaries collected immediately before euthanasia or after death of mares under field conditions. Molecular and Cellular Endocrinology **186(2)**: 199–203.

Hinrichs K. 2018. Assisted reproductive techniques in mares. Reproduction in Domestic Animals **53**: 4–13.

Hirohashi N, Yanagimachi R. 2018. Sperm acrosome reaction: Its site and role in fertilization. Biology of Reproduction **99(1)**: 127–133.

Jacobson CC, Choi YH, Hayden SS, Hinrichs K. 2010. Recovery of mare oocytes on a fixed biweekly schedule, and resulting blastocyst formation after intracytoplasmic sperm injection. Theriogenology **73(8)**: 1116–1126.

Jasko DJ, Bedford S., Cook NL, Mumford EL, Squires EL, Pickett BW. 1993. Effects of antibiotics on motion characteristics of cooled stallion spermatozoa. Theriogenelogy, *40*, 885–893.

Kato Y, Nagao Y. 2009. Effect of PVP on sperm capacitation status and embryonic development in cattle. Theriogenology **72(5)**: 624–635.

Köllmann M, Rötting A, Heberling A, Sieme H. 2011. Laparoscopic techniques for investigating the equine oviduct. Equine Veterinary Journal **43(1)**: 106–111.

Leemans B, Stout TAE, Schauwer C De, Heras S, Nelis H, Hoogewijs M, Soom A Van, Gadella BM. 2019. Update on mammalian sperm capacitation: how much does the horse differ from other species?. Reproduction **157**: R181–R197.

Loomis P, Graham J. 2008. Commercial semen freezing: Individual male variation in cryosurvival and the response of stallion sperm to customized freezing protocols. Animal Reproduction Science **105(1–2)**: 119–128.

Loomis P. 2011. Basic Principles and Techniques for Semen Freezing. Pages 1-5. XVII SIVE International Congress. Palco, Montesilvano.

Love CC. 2016. Modern Techniques for Semen Evaluation. Veterinary Clinics of North America - Equine Practice **32(3)**: 531–546.

Maserati M, Mutto A. 2016. In Vitro Production of Equine Embryos and Cloning: Today's Status. Journal of Equine Veterinary Science **41**: 42–50.

Matsukawa K, Akagi S, Adachi N, Sato F, Hasegawa T, Takahashi S. 2007. In vitro development of equine oocytes from preserved ovaries after intracytoplasmic sperm injection. Journal of Reproduction and Development **53(4)**: 877–885.

McPartlin LA, Littell J, Mark E, Nelson JL, Travis AJ, Bedford-Guaus SJ. 2008. A defined medium supports changes consistent with capacitation in stallion sperm, as evidenced by increases in protein tyrosine phosphorylation and high rates of acrosomal exocytosis. Theriogenology **69(5)**: 639–650.

Melo CM, Monteiro GA, Avanzi BR, Guasti PN, Alvarenga MA, Dell'Aqua JA, Zahn FS, Papa FO. 2010. Advances in stallion's epididymal sperm technology. Pferdeheilkunde **26(1)**: 48–52.

Merlo B, Mari G, Iacono E. 2018. In vitro developmental competence of horse embryos derived from oocytes with a different corona radiata cumulus-oocyte morphology. Animal Reproduction Science **198**: 233–237.

Miró J, Morató R, Vilagran I, Taberner E, Bonet S, Yeste M. 2020. Preservation of Epididymal Stallion Sperm in Liquid and Frozen States: Effects of Seminal Plasma on Sperm Function and Fertility. Journal of Equine Veterinary Science **88:** 102940.

Moore SG, Hasler JF. 2017. A 100-Year Review: Reproductive technologies in dairy science. Journal of Dairy Science **100(12)**: 10314–10331.

Morel D. 2008. Equine Reproductive Physiology, Breeding and Stud Management. Cabi, Cambridge.

Morris LHA. 2018. The development of in vitro embryo production in the horse. Equine Veterinary Journal **50(6)**: 712–720.

Neild DN, Gadella BM, Agüero A, Stout TAE, Colenbrander B. 2005. Capacitation, acrosome function and chromatin structure in stallion sperm. Animal Reproduction Science **89(1-4 SPEC. ISS.)**: 47–56.

Oguri N, Tsutsumi Y. 1974. Non surgical egg transfer in mares. Journal of Reproduction and Fertility **41(2)**: 313–320.

Oliveira Neto I V., Canisso IF, Segabinazzi LG, Dell'Aqua CPF, Alvarenga MA, Papa FO, Dell'Aqua JA. 2018. Synchronization of cyclic and acyclic embryo recipient mares with donor mares. Animal Reproduction Science **190**: 1–9.

Pagl R, Aurich JE, Müller-Schlösser F, Kankofer M, Aurich C. 2006. Comparison of an extender containing defined milk protein fractions with a skim milk-based extender for storage of equine semen at 5 °C. Theriogenology **66(5)**: 1115–1122.

Rader K, Choi YH, Hinrichs K. 2016. Intracytoplasmic Sperm Injection, Embryo Culture, and Transfer of In Vitro–Produced Blastocysts. Veterinary Clinics of North America - Equine Practice **32(3)**: 401–413.

Ramu S, Jeyendran RS. 2013. The hypo-osmotic swelling test for evaluation of sperm membrane integrity. Methods in Molecular Biology **927**: 21–25.

Serafini R, Ghosh S, Love CC, Medrano JMR, Teague SR, LaCaze KA, Varner DD. 2019. Effect of artificial vagina lubricants on stallion sperm quality. Theriogenology **139**: 121–125.

Šichtař IJ. 2018. In vitro produkce embryí u koní. Veterinářství **10**: 716–720.

Sieme H, Martinsson G, Rauterberg H, Walter K, Aurich C, Petzoldt R, Klug E. 2003. Application of techniques for sperm selection in fresh and frozen-thawed stallion semen. Reproduction in Domestic Animals **38(2)**: 134–140.

Squires E. 2020. Current Reproductive Technologies Impacting Equine Embryo Production. Journal of Equine Veterinary Science **89**: 102981.

Stout TAE. 2020. Clinical Application of in Vitro Embryo Production in the Horse. Journal of Equine Veterinary Science **89**: 103011.

Strehler E, Baccetti B, Sterzik K, Capitani S, Collodel G, De Santo M, Gambera L, Piomboni P. 1998. Detrimental effects of polyvinylpyrrolidone on the ultrastructure of spermatozoa (Notulae seminologicae 13). Human Reproduction **13(1)**: 120–123.

Wu Z, Zheng X, Luo Y, Huo F, Dong H, Zhang G, Yu W, Tian F, He L, Chen J. 2015. Cryopreservation of stallion spermatozoa using different cryoprotectants and combinations of cryoprotectants. Animal Reproduction Science **163**: 75–81.