

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra veterinárních disciplín



**Persistentní endometritida po připouštění u klisen
Bakalářská práce**

Autor práce: Ester Bisová

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

© 2015 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci "Persistentní endometritida po připouštění u klisen" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce.

V Praze dne

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala Ing. Jiřímu Šichtařovi, Ph.D. za odborné vedení při psaní této práce a vstřícné jednání při konzultacích.

V Praze dne

Podpis autora

Persistentní endometritida po připouštění u klisen

Souhrn

Určitý stupeň zánětu endometria po připouštění je u klisen fyziologický a nezbytný pro eliminaci nadbytečného množství spermií, bakterií a jiných kontaminantů v reprodukčním traktu. Většina klisen se dokáže zbavit přechodného zánětu dělohy do 24 hodin po připouštění. U 10-15 % klisen v chovu však přetrvává zánětlivá tekutina v děloze 24-36 hodin po připouštění a tento stav se označuje jako perzistentní endometritida po připouštění (PMIE). Endometrium se zbavuje zánětu při PMIE pomocí kontrakcí myometria, uvolněním polymorfonukleárních neutrofilů (PMNs) a imunoglobulinů do lumen dělohy. Klisny lze považovat za vnímavé k PMIE pokud zánětlivé reakce v děloze přetrvávají 96 hodin po vpravení bakterií či spermií do dělohy. PMIE je nejčastěji způsobena nedostatečnou myometrální aktivitou a narušeným zčišťováním dělohy. Vnímavost klisen k PMIE úzce souvisí například s jejich věkem. K diagnostice PMIE se používá elektromyografie, scintigrafie, transrektální ultrasonografie s tím, že nejčastěji využívané je cytologické vyšetření. U klisen vnímavých k PMIE lze využít také biopsii endometria a jednotlivé stupně zánětu jsou označovány IIB-III. Používání antibiotik k léčbě PMIE je sporné s ohledem na vznik rezistencí. Oxytocin a $\text{PGF}_{2\alpha}$ napomáhají odstraňovat zánětlivou tekutinu z dělohy, neboť zvyšují kontraktilitu dělohy a kortikosteroidy jsou protizánětlivé, proto se také používají k eliminaci PMIE. U vnímavých klisen je vhodnější použít inseminaci než přirozenou plemenitbu z důvodu omezení kontaminace dělohy. Při přípravě mražené inseminační dávky je nutné odstranit semennou plazmu, která však u čerstvého spermatu eliminuje výskyt PMIE. Z tohoto důvodu je u klisen vnímavých k PMIE vhodnější použít semeno čerstvé. Nejvhodnější prevencí PMIE je zavedení inseminační dávky malého objemu a s nízkým počtem spermií přímo do papily. Zánětlivé produkty přítomné v děloze při sestupu embrya do dělohy narušují jeho životaschopnost, čímž se snižuje schopnost klisny zabřeznout. U Klisen, jež měly přítomnu zánětlivou tekutinu v děloze 48 hodin po připouštění, byla četnost zabřezávání 49 %, zatímco u klisen prostých zánětu dělohy byla četnost zabřezávání 62 %. Praktiky v léčbě endometritidy i používané nástroje se stále vyvíjejí a zlepšují, následkem je zvýšená četnost zabřezávání u klisen z 50-60 % na 75-85 %. I přes toto zlepšení je endometritida (včetně PMIE) častým problémem snižující četnost zabřezávání u klisen.

Klíčová slova: klisna, reprodukce, děloha, endometritida

Persistent breeding-induced endometritis in mares

Summary

A certain degree of inflammation of endometrium after breeding of mares is physiological and necessary for elimination of excess spermatozoa, bacteria and other contaminants in the reproductive tract of mares. Most of mares are able to defuse of inflammation of uterus 24 hours after breeding. However, 10-15 % broodmares are affected by persistence on inflammatory fluid in uterus 24-36 hours after breeding. This condition is called as a persistent mating-induced endometritis (PMIE). Endometrium get rid of inflammation using of myometral contractions, release of polymorphonuclear neutrophils (PMNs) and immunoglobulins into uterine lumen. Mares can be considered as a susceptible to PMIE if inflammatory reactions in uterus persists 96 hours after infusion of bacteria or spermatozoa into uterus. PMIE mostly develop due to insufficient myometral activity and damaged uterine clearance. Susceptibility of mares to PMIE closely related with their age. For diagnosis of PMIE can be used electromyography, scintigraphy, transrectal ultrasonography and cytology which is the most common. In susceptible mares to PMIE can be used biopsy of endometrium and the individual grades of inflammation are IIB-III. Treatment PMIE with antibiotics is questionable because of development of resistances. Oxytocin and PGF_{2α} remove inflammation fluid from the uterus because of they increase contractions of uterus. Corticosteroids have anti-inflammatory effect, so they are use to elimination of PMIE. For susceptible mares is suitable to use insemination than natural breeding because of minimal contamination of the uterus. In the preparation of the frozen insemination doses must be remove the seminal plasma, which normal eliminate occurrence of PMIE. For this reason is suitable to use fresh semen in mares susceptible to PMIE. The best prevention of PMIE is using a small volume and low numbers of spermatozoa in insemination dose directly into the papilla. Inflammation products in the uterus reduce viability of embryo when it descent to the uterus so mares have decreasing ability to become pregnant. In the mares which have inflammation fluid in the uterus 48 hours after breeding, pregnancy rate was 49 %. While in mares without inflammation fluid in the same time, pregnancy rate was 62 %. Practitioners in the treatment of endometritis and using of tools still improve, so result is increasing pregnancy rate in mares from 50-60 % to 75-85 %. Despite this improvement endometritis (including PMIE) is frequent problém decreasing of pregnancy rate in mares.

Keywords: mare, reproduction, uterus, endometritis

Obsah

1. Úvod	2
2. Cíl práce.....	3
3. Anatomie reprodukčního traktu klisny	4
4. Hormonální řízení.....	6
5. Fyziologie reprodukce	10
5.1. Změny na děloze v průběhu estrálního cyklu.....	15
6. Oplození vajíčka.....	16
7. Časný embryonální vývoj.....	16
8. Inseminace	17
9. Faktory ovlivňující zabřezávání	18
10. Endometritida	22
10.1. Typy endometritidy	23
10.2. Obranné mechanismy dělohy	23
10.3. Příčiny vzniku endometritidy	27
10.4. Vnímavost klisen k endometritidě.....	27
10.5. Diagnostika endometritidy	30
10.6. Léčba	32
10.7. Prevence	34
10.8. Vliv endometritidy na zabřezávání.....	36
11. Závěr	40
Seznam použité literatury	41

1. Úvod

Dříve byli koně používáni zejména pro práci na poli, jako soumaři nebo jako dopravní prostředek. Ve 20. století lidstvo objevilo nového pomocníka v podobě automobilů, traktorů nebo jiných strojů. Proto došlo zhruba v polovině 20. století k prudkému úpadku v početních stavech koní. Technický pokrok a snížení pracovní náročnosti řady nejen zemědělských prací však způsobili opětovnou potřebu lidí po kontaktu s těmito zvířaty. Dnes jsou koně chováni hlavně na sport či jako partner pro rekreaci. Chov koní se z těchto důvodů v současné době stává stále populárnějším. Aby byli tito nejen sportovní koně vhodnými partnery pro člověka, je nutné jim zajistit odpovídající péči. Životní podmínky se velmi liší u koní divokých a u koní chovaných člověkem. Koně ve volné přírodě neměli zrovna nejvhodnější podmínky pro nerušený život. Divocí koně byli neustále vystavováni mnohým nebezpečím a to od predátorů až po samotnou nutnost zajistit stádu často nedostupnou potravu a tím přežít. Boj o přežití byl však vynikajícím selekčním kritériem. Ti, kteří se nedokázali přizpůsobit rychlosti stáda při útěku od nebezpečí, byli nemocní, staří či jinak indisponovaní, nepřežili. Tím byl zajištěn jednoduchý chod života, zůstávali pouze silní, kteří se mohli úspěšně množit a přivést na svět nové generace. Toto jednoduché pravidlo bylo násilím narušeno člověkem, který koně domestikoval. Zatímco přírodní zákony fungovali logicky a velmi přesně, člověk při snaze vychovat si co nejlepšího pomocníka, vybíral rodičovské generace téměř nahodile a to pouze s důrazem na vzhled zvířete a jeho ochotu pro něho pracovat. Z tohoto důvodu jsou dnešní koně daleko náchylnější k nemocem a zdravotním komplikacím. S tím souvisí fakt, že divocí koně nebo i dnešní tzv. primitivní koně mají podstatně vyšší plodnost na rozdíl od vyšlechtěných, především sportovních plemen koní. Proto je endometritida, tedy zánět dělohy, který vzniká v důsledku připouštění klisny, v dnešní době hlavní příčinou přechodné nebo přetrvávající neplodnosti klisen.

2. Cíl práce

Cílem práce je sepsat literární rešerši shrnující nejnovější poznatky o perzistentní endometritidě po přípuštění u klisen.

3. Anatomie reprodukčního traktu klisny

Hlavními orgány samičí pohlavní soustavy jsou vnitřní orgány (vaječníky, vejcovody, děloha, děložní krček a pochva) a vnější orgány - vulva a stydké pysky (Bergfelt, 2009). Reprodukční trakt klisny je trubicovitý, ve tvaru písmene Y (Morel, 2005). Skládá se z vaječnicků a tubulárních genitálií, které jsou spojeny cévními, lymfatickými a nervovými tkáněmi a závěsnými vazy. Většina pohlavních orgánů klisen se nachází v abdominální dutině, zatímco zbylá část je uložena v dutině pánevní. Během vývoje před narozením klisny probíhají diference orgánů a tkání, jako u jiných samic hospodářských zvířat. Vývojově pochází kraniální část této soustavy z mezodermy, zatímco kaudální část se vyvinula z entodermy. Jde o zárodečné listy vznikající během gastrulace časně embryonálního vývoje (Bergfelt, 2009).

Kraniální část reprodukčního traktu klisny je připevněna ke stěnám abdominální dutiny pomocí širokých vazů - levého a pravého (Schweizer et al., 2006), dvojvrstevné serózní blány pobřišnice, nacházející se přibližně v místě třetího a čtvrtého bederního obratle až do čtvrtého křížového obratle. Naproti tomu kaudálně umístěná část je chráněna volnou povázkou a tukovou tkání. Široké vazy zajišťují krevní, lymfatické a nervové zásobení reprodukčních orgánů. Široké vazy mají 3 části, mesometrium (děložní rohy, tělo dělohy), mesosalpinx (oviductus) a mesovarium (ovaria). Tyto části vazů poskytují konkrétním orgánům upevnění, výživu a odvod nepotřebných metabolitů (Bergfelt, 2009).

Od ostatních druhů hospodářských zvířat se pohlavní soustava klisen liší. Vaječník klisny se odlišuje ovulační jamkou, odkud se pravidelně uvolňují oocyty, u ostatních zvířat se uvolňují kdekoli na povrchu vaječnicku (Schweizer et al., 2006). Vaječník klisny je párový orgán (Frandsen et al., 2009). Během puberty dochází k transformaci vaječnicků, kůra vaječnicku je částečně pohlcena dřemí, vzniká tak specifický fazolovitý tvar vaječnicků klisny. Vaječník klisny je unikátní v tom, že vnější vrstva vaječnicku, přímo pod bělavým obalem, je tvořena dřemí, obsahuje krevní a lymfatické cévy a nervstvo. Vnitřní vrstvu tvoří kůra, která vystupuje na povrch pouze v místě ovulační jamky, kde dřemí chybí. U jiných domácích zvířat je poloha kůry a dřemě obrácená. Dorzální část vaječnicku se spojuje s mesovariem, nazývá se velké zakřivení. Ventrální část vaječnicku je konkávní v důsledku vytvoření ovulační jamky (Bergfelt, 2009). V porovnání s jinými druhy je vaječník klisny výrazně větší a těžší, váží totiž 40-80 g (Kimura et al., 2005). Velikost vaječnicků je odlišná podle sezonních změn. Vaječníky se zvětšují v období připouštěcí sezóny (4-8 cm x 4-6 cm), v inaktivním období

mohou být až poloviční (Morel, 2005). Vaječníky klisny se nacházejí v dorzální části břišní dutiny, kranioventrálně od kyčelních kostí, na úrovni třetího a pátého bederního obratle. Levý vaječník je obvykle umístěn kaudálněji, je to způsobeno pozicí levé ledviny, která je oproti pravé též kaudálněji (Bergfelt, 2009). Celý vaječník, kromě ovulační jamky, je pokryt fibrózní blánou, která zajišťuje komplexní ochranu všem vývojovým stádiím folikulů (Morel, 2005).

Na vaječníky navazují vejcovody, které se svým kaudálním koncem pojí s děložními rohy. V průměru má každý vejcovod 5 mm, jejich průběh je silně zvlněný (Morel, 2005). Trubice vejcovodu se skládá ze třech částí. Nálevka vejcovodu (imfundibulum) je opatřena fimbriemi. Většina fimbrií vejcovodu je připojena ke kranální části vaječníku, zbylé fimbrie k ventrálnímu okraji vaječníku a zcela překrývají ovulační jamku vaječníku. Ampulla je nejširším úsekem vejcovodu, v průměru má přibližně 6 mm. Tato část je dlouhá 10-15 cm. Ampulla se zužuje v úzký krček, isthmus, který přechází v děložní rohy. Isthmus je dlouhý 10-15 cm s průměrem 3 mm (Bergfelt, 2009). Isthmus se do děložního rohu otevírá pomocí papilly (Schweizer, 2006), která přechází do lumenu dělohy. Toto spojení papily s dělohou se nazývá uterotubulární spojení (Morel, 2005). Morfologie vejcovodů je obdobná jako u dělohy. Periferně se nachází serózní vrstva. Následují dvě vrstvy hladké svaloviny, vnější podélná a vnitřní kruhová, mezi nimi je vrstva cévního zásobení. Vnitřní vrstva je tvořena sliznicí (Bergfelt, 2009).

Děloha (uterus) je dutý svalový orgán připevněný širokým děložním vazem, který se připojuje k obratli a poskytuje tomuto orgánu ochranu (Morel, 2005). Klisny mají jednoduchou dvourohou dělohu. Tělo děložní kaudálně přechází v krček a leží většinou mezi pánevní a abdominální dutinou (Bergfelt, 2009). V děloze dochází k nidaci oplodněného vajíčka a následnému vývoji nového jedince. Děloha má asi 8-10 cm dlouhé tělo a 2 kraniolaterálně divergující rohy. Děložní rohy jsou poměrně krátké, neboť dosahují délky 20-25 cm (Červený, 2011). Děložní rohy leží v břišní dutině kranioventrálně od kyčelního hrbolu, ventrokaudálně od vaječníků a zasahují až k pánevnímu vchodu, kde navazují na děložní tělo. Podle Bergfelta (2009) je spojení rohů a těla dělohy důležité z klinického hlediska, protože tato oblast má význam pro časný embryonální vývoj a dá se zde snadno detekovat ultrazvukem a posuzovat stav zárodka. Děložní stěna se rozděluje na tři vrstvy: a) vnější tkáňová vrstva poskytující ochranu; b) střední svalová vrstva, která umožňuje roztažení dělohy při růstu plodu a kontrakce během porodu; c) vnitřní endometrium je uspořádané v záhybech a slouží jako místo připevnění placenty (Morel, 2005). Endometrium nebřezích klisen vytváří vysoké řasy, žlutohnědé až červené barvy (Červený, 2011). Tělo děložní u

klisny je oproti ostatním hospodářským zvířatům prostornější, neboť plod během březosti se vyskytuje hlavně v těle dělohy (Morel, 2005). Tělo děložní kaudálně přechází v krček a leží většinou mezi pánevní a abdominální dutinou (Bergfelt, 2009).

Děložní krček (cervix) je těsné, silnostěnné, hladkosvalové spojení mezi dělohou a pochvou (Morel, 2005). Svalovina děložního krčku je podobná svalovému svěrači. Dále děložní krček obsahuje četná elastická vlákna, která umožňují tonicitu krčku. Mukózní buňky děložního krčku produkují velké množství hlenu. Děložní krček je 5-8 cm dlouhý, široký je 2-5 cm. Kaudálně vyčnívá do poševní klenby a o 2-4 cm proniká do pochvy jako děložní čípek. Záhyby děložního krčku přecházejí na děložní čípek a vytváří tak jeho lalokovitý vzhled (Bergfelt, 2009). Pouhou zevní adspekci není děložní čípek zřetelný (Červený, 2011), je však možné ho vyšetřit palpací, ultrazvukem, použitím spekula nebo rektálně. U klisen v sexuálně inaktivním období, během diestru nebo březosti (v obou obdobích převládá hormon progesteron), je děložní krček velmi silně uzavřen a vytváří bělavý, hustý sekret, který dělohu efektivně chrání. Naopak v období sexuálně aktivním, estru (nadvláda estrogenu), je krček v relaxaci, růžové barvy a s menším množstvím sekretu (Morel, 2005). Během porodu se musí děložní krček plně dilatovat, aby mohlo hříbě projít z dělohy dále do porodních cest (Schweizer et al., 2006).

Pochva (vagina) má dvojitou funkci, jedná se o kopulační orgán a zároveň porodní cestu hříběte (Schweizer et al., 2006). Pochva také tvoří bariéru mezi dělohou a vnějším prostředím. Pochva má bezžláznatou sliznici, nicméně přijímá sekrety z děložního krčku. Rozmanitá velikost pochvy v různých fázích reprodukčního života je dán schopností roztažitelnosti, ale i schopností opětovného smrštění (Bergfelt, 2009).

Poševní předsíň je část reprodukčního traktu, která spojuje vaginu s externími genitáliemi. Přechod mezi pochvou a poševní předsíní je ohraničen uretrálním vývodem. Do poševní předsíně vyúsťují uretrální i reprodukční orgány. Sliznice poševní předsíně obsahuje četné množství mukózních žláz (Frandsen et al., 2009).

Vulva je nejkaudálněji umístěnou částí reprodukčního traktu klisny. Zahrnuje stydké pysky (pravý a levý) a klitoris. Vůlí řízené stahy stydkých pysků jsou zajištěny příčně pruhovaným svalstvem (Bergfelt, 2009; Frandsen et al., 2009). Klitoris je erektilní tkáň, která má stejný embryonální původ jako samčí penis (Frandsen et al., 2009).

4. Hormonální řízení

Hormony jsou chemičtí poslové, kteří fungují při extrémně malých koncentracích. Endokrinní soustava má za úkol regulovat a řídit veškeré pochody v organismu, ovlivňuje tedy i pohlavní funkce organismu. Hormony cirkulují v těle za účelem fyziologické odpovědi organismu na situaci (Frandsen et al., 2009).

V centrální nervové soustavě je část předního mozku, diencefalon – mezimozek, který se skládá ze 3 částí (hypotalamus, hypofýza a epifýza neboli šišinka). Tyto části produkují nervové a endokrinní signály k regulaci vývoje a udržování činností reprodukčního traktu. Hypotalamus je uložen mediálním směrem v mozku a jde o nejvíce ventrálně umístěnou část mezimozku (Bergfelt, 2009). Hypotalamus řídí produkci a uvolňování pohlavních hormonů z pohlavních žláz. Jedná se o uvolňovací (releasing) a inhibiční (statiny) hormony. V hypotalamu vzniká například gonadotropin - releasing hormon (GnRH), který reguluje produkci LH (luteinizačního) a FSH (folikulostimulačního) hormonu. Jde o peptidický neurohormon (produkt buněk nervové soustavy). Doposud nebyla zjištěna existence specifického FSH - releasing hormonu u koní. U klisen je většina hypotalamické GnRH vlny následována LH vlnou z hypofýzy a více jak 80% LH vln je doprovázeno vlnou FSH. Frekvence GnRH vlny se mění v závislosti na fázi estrálního cyklu. Během luteální fáze trvá GnRH interval přibližně 120 minut, v den ovulace je tento interval 30 minutový (Alexander and Irvine, 1987). Hypofyzární žláza je zavěšena v nálevce pod hypotalamem a leží ve výklenku spodiny lebeční. Hypofýza je morfologicky rozdělena na 3 části: přední lalok - adenohypofýza, střední lalok a zadní lalok - neurohypofýza (Bergfelt, 2009).

Adenohypofyzárními hormony jsou FSH, LH a prolaktin. FSH a LH patří mezi gonadotropiny, hormony, které ovlivňují pohlavní soustavu samců i samic. Ovlivňují například jejich vývoj nebo stimulují sekreci jiných pohlavních hormonů. FSH napomáhá růstu folikulů, stimuluje oogenezi a též se uplatňuje při uvolňování estrogenů ve vaječniku, placentě a kůře nadledvin. Díky LH dochází pravidelně k uvolňování, ovulaci, zralých folikulů z vaječniku, nebo k vývoji žlutého tělíska během březosti (Bergfelt, 2009). Zvýšenou koncentraci LH před ovulací doprovází nepatrně zvýšená koncentrace FSH, která však následně klesá k nejnižší hodnotě (Bergfelt et al., 1991), zatímco LH dosahuje maxima. Druhá fáze vzestupu FSH se uskutečňuje v polovině luteální fáze, tato fáze již není doprovázena zvýšeným uvolňováním LH. Který den cyklu tato druhá FSH vlna nastane, závisí zcela na individualitě klisen (Ginther et al., 2005). Na rozdíl od jiných druhů domácích zvířat, u kterých se projevují krátké ale výrazné předovulační LH vlny, u klisen nejsou

pozorované žádné odlišnosti v koncentraci LH před ovulací. Nicméně během estru lze u klisen pozorovat zjevné zvýšení LH po několik dní (Ginther et al., 2010).

Prolaktin ovlivňuje především mléčné žlázy, účastní se ale též sezonních změn na reprodukčním traktu (Bergfelt, 2009). Hladina prolaktinu v krvi se zvyšuje v období pozdní březosti, prudce se zvyšuje během porodu. Prolaktin podporuje anatomický i funkční vývoj sekrečního epitelu mléčné žlázy, která je tak již před porodem připravena na laktaci (Frandsen et al., 2009). Mimo FSH a LH produkuje adenohipofýza ještě 2 glandotropní hormony, tedy hormony, jež řídí činnost jiných endokrinních žláz. Jde o adrenokortikotropní hormon (ACTH) a tyreostimulační hormon (TSH), mohou být produkovány kromě předního laloku hypofýzy i jejím středním lalokem, nicméně jsou tímto lalokem vylučovány jen v omezenější míře. Oba tyto hormony mají přímý nebo nepřímý efekt na reprodukci. ACTH a TSH se však uplatňují především během růstu, při vývoji centrální nervové soustavy a udržují homeostázu (Bergfelt, 2009). Hlavním cílem ACTH jsou buňky kůry nadledvin (vnější části nadledvin), které produkují glukokortikoidy, steroidní hormony, které regulují metabolismus organismu. TSH stimuluje syntézu hormonů štítné žlázy (thyroxin a trijodthyronin), které jsou nezbytné pro růst a vývoj mladých jedinců (Frandsen et al., 2009).

Buněčná těla neuronů, jejichž axony se tvoří v infundibulu hypofýzy, pocházejí z hypotalamu a jejich terminální část přiléhá ke kapilárám nervového laloku hypofýzy. Hypotalamo-hypofyzární systém vznikne spojením infundibula hypofýzy s hypotalamem. Toto spojení je zajištěno arterioly a kapilárami, zajišťuje komunikaci mezi oběma částmi (hypotalamem a hypofýzou) systému (Frandsen et al., 2009).

Neurohypofyzární hormony se syntetizují v hypotalamu, konkrétně v tělech hypotalamických neuronů. Do neurohypofýzy jsou tyto hormony přenášeny pomocí axonů a následně se zde skladují. Stejně jako u adenohipofyzárních hormonů, i zde jde o neurosekrety, hormony produkovány nervovými buňkami (Reece, 2011). Oxytocin je produkován jádrem hypotalamických neuronů. Krevním oběhem je odváděn k cílovým orgánům (Frandsen et al., 2009), kde způsobuje stahy hladké svaloviny, u reprodukčních orgánů (dělohy) a mléčné žlázy. Z hlediska fyziologického umožňuje oxytocin uvolňování prostaglandinů z endometria samic (Bergfelt, 2009). Správná funkce oxytocinu v mléčné žláze se projevuje fenoménem spouštění mléka, kde sající mládě stimuluje ejekci mléka, které se uvolňuje z vývodného systému mléčné žlázy. V obřezlé děloze oxytocin působí na myometrium a způsobuje děložní kontrakce napomáhající vypuzení plodu při porodu.

Roztažení děložního krčku plodem stimuluje další sekrece oxytocinu. Injekční aplikace oxytocinu při porodu umocňuje kontrakce myometria a napomáhá tak snazšímu vypuzení plodu. Neurohypofýza produkuje ještě jeden hormon, antidiuretický (ADH), jež řídí hospodaření s vodou v těle (Frandsen et al., 2009).

Hormony estrogenu a progesteronu jsou steroidní hormony odvozené od cholesterolu a mají přímou souvislost s reprodukční soustavou samic. Estrogeny i progesteron vznikají ve vaječnicku, placentě a kůře nadledvin. Nejdůležitějšími estrogenu u samic jsou 17 β -estradiol, který se vyskytuje u samic, jež nejsou březí. Zatímco estron se nachází v organismu březích zvířat, jeho účinky nejsou však tak silné jako u estradiolu. Estrogeny zajišťují v těle samice řadu funkcí. Stimulují růst endometriálních žláz a umožňují jejich následnou sekreci, podporují vývoj mléčné žlázy, celkově ovlivňují sexuální chování, regulují secernaci LH adenohypofýzou, uvolňují PGF_{2 α} . Estrogeny mají vliv na sliznice reprodukčního traktu samic, které pod jejich vlivem v období estru nejprve proliferují, potom epitelové vrstvy rohovatí. Růst samic není tak intenzivní na rozdíl od samců, kteří jsou pod značným vlivem testosteronu. Estrogeny totiž zabraňují dlouhodobému růstu epifýz kostí (Reece, 2011).

Základní funkcí progesteronu je připravit samici na březost. Progesteron zvyšuje sekreci děložních žláz a snižuje motilitu dělohy a umožňuje implantaci časného embrya do endometria dělohy (Frandsen et al., 2009). Podporuje vytvoření příznivého prostředí v děloze během březosti tím, že způsobí těsné uzavření děložního krčku, který již neprodukuje hlen. V děloze působením progesteronu vzniká uterinní mléko, které zajišťuje výživu embrya v rané fázi. Progesteron je antagonistou oxytocinu, neboť zamezuje stahům děložní svaloviny. Progesteron ovlivňuje i mléčnou žlázu, jejíž alveoly se vyvíjejí, následná sekrece mléka je též stimulována progesteronem (Reece, 2011). Progesteron potlačuje syntézu LH, čímž zabraňuje počátku nového cyklu u březí samice (Frandsen et al., 2009).

Relaxin je peptidický hormon. V nejvyšších koncentracích se relaxin vyskytuje u samic během březosti. Relaxin je produkován především žlutým tělískem, placentou a dělohou. Toto však platí pro samice domácích zvířat s výjimkou klisen. U klisen tvorba relaxinu žlutým tělískem vaječnicku není tak jednoznačná. Aktivita relaxinu u klisen se neprojevuje před 80. dnem březosti, kdy je žluté tělísko funkční. Po 180. dni, již žluté tělísko podlehló regresí a relaxin je produkován nepřetržitě. U březích klisen je tedy výhradním zdrojem relaxinu placenta (Steward et al., 1982).

Prostaglandin $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) má luteolytické účinky, tedy způsobuje zánik žlutého tělíska. Tento prostaglandin se syntetizuje v endometriu dělohy (Ginther et al., 2011). Regrese žlutého tělíska indukovaná $PGF_{2\alpha}$ probíhá v čase maximální koncentrace progesteronu (Zavy et al., 1978).

PMSG (pregnant mare serum gonadotropin) vzniká kolem 35. dne březosti v endometriu v místě tzv. endometriálních pohárků nebo také kalíšků. PMSG je secernován endometriem, buňky, které se tohoto děje účastní, pocházejí z placenty. PMSG má účinek na tvorbu nových ovulujících folikulů v průběhu březosti, z kterých vznikají sekundární žlutá tělíska, ta produkují progesteron. Celý tento komplex zabezpečuje udržení březosti u klisen. PMSG je produkován dělohou přibližně do 130. dne. K zániku žlutých tělísek na vaječníku dochází kolem 150. dne gravidity (Reece, 2011).

Fotoreceptory uvnitř oka dokáží rozpoznat světelnou délku dne, tato informace je pomocí neuronů dopravena k epifyze, kde se začne tvořit melatonin. Melatonin působí na hypotalamus, který secernuje GnRH. Následkem zvýšené tvorby gonadotropinů je ovlivněna a navozena reprodukční činnost zvířat, zvláště pak po zimním anestru u samic. Melatonin se produkuje ve tmě (Bergfelt, 2009). V pubertě, kdy ještě plně neprobíhají pohlavní funkce, se produkuje jen velmi málo melatoninu (Frandsen et al., 2009).

5. Fyziologie reprodukce

Puberta mladých klisen je doprovázena první ovulací, která je výsledkem správné činnosti osy hypotalamus-hypofýza-vaječníky. Klisničky dosahují puberty ve 12-24 měsících (Bergfelt, 2009). Přesto tyto většinou jednoroční klisničky, nejsou pro hřebce atraktivní, jako je tomu u starších samic (Asa, 1986). Klisny narozené dříve v roce (leden až květen) mohou puberty dosáhnout příštího jara, zatímco pozdní klisny (narozené v červnu až listopadu) mají první ovulaci posunutou až na léto následujícího roku. Špatná výživa a vystavení zvířat stresovým situacím potlačuje vývoj endokrinního systému a nástup dospělosti (Bergfelt, 2009).

Cyklická pohlavní činnost u samic hospodářských zvířat se projevuje změnami na pohlavních orgánech, změnami v pohlavním chování i na organismu jako celku. Veškeré tyto změny se nazývají říjový (estrální) cyklus (Kudláč et Elečko, 1987).

Klisna je přechodným typem mezi polyestrickou a monoestrickou samicí, pohlavní cyklus se sice opakuje v kratších intervalech několikrát za sebou, nicméně toto plodné období se střídá s anestríí, kdy klisna neřídí. Klisna je tedy samicí polyestrickou, projevuje řídí po celý rok, s výraznou pohlavní sezónností, v zimě klisny neřídí (Kudláč et Elečko, 1987). Celé období sexuálních projevů klisen se nazývá chovatelská sezóna (Morel, 2008). Řídí klisen se projevuje s ohledem na skutečnost, že hříbě musí být přivedeno na svět v období, kdy se píče objevuje hojně a v odpovídající kvalitě, dalším předpokladem jsou vhodné klimatické podmínky, přičemž rozhodující je teplota prostředí (Crowell-Davis, 2007).

Ovulační aktivita klisen souvisí s délkou světelného dne. Pokud vystavíme klisnu umělému zdroji světla, obnoví se cyklická pohlavní činnost dříve než v běžných podmínkách (Kooistra et Ginther, 1975). U méně domestikovaných plemen koní probíhá pravidelná ovulační aktivita v období mezi květnem a říjnem. Selekcí chovaných koní se však toto období prodlužuje. Přibližně 30 % klisen jezdeckých a sportovních plemen vykazuje ovulační aktivitu skrze celé zimní období. Kromě fotoperiodismu ovlivňují estrální cyklus klisen i další faktory: věk klisny, výživa, teplota prostředí a hormonální činnost organismu (Heidler et al., 2004).

Přechod mezi zimním obdobím anestru a ovulačně aktivním obdobím je provázeno nepravidelnostmi v délce estrálního cyklu, který se může odchylovat od normálu o několik dní ale i týdnů. U klisen, které nejsou vystavovány sezónním změnám a střídání ročních období, tedy klisny ustájené, navíc krmené po celý rok kvalitně, se může estrální cyklus vyskytovat téměř nepřetržitě, lze pozorovat krátké anestrické období, které se však navrátí za krátko k plodnému stadiu (Ginther et al., 2008).

Estrální cyklus lze rozdělit na fázi folikulární, kdy se vyvíjí dominantní folikul. Tato fáze je synonymem pro estrus, secernuje se hormon estrogen. Druhou fází je luteální fáze. Vzniká žluté tělísko. Tato fáze nastává při diestru, převládá hormon progesteron (Frandsen et al., 2009; Morel, 2008; Samper et Pycock, 2007).

Estrální cyklus zahrnuje 4 fáze: proestrus, estrus, metestrus a diestrus (Frandsen et al., 2009). Zatímco tři první fáze mohou projevovat značnou variabilitu v trvání v závislosti na individualitě klisen, diestrus je z hlediska časového trvání poměrně stabilním obdobím, neovlivní tak celkovou délku cyklu (Samper et Pycock, 2007).

Proestrus

Proestrus je první fází estrálního cyklu. Jde o období před říjí, které trvá přibližně 3 dny. Pod vlivem FSH dochází k dozrávání Graafova folikulu. Rostoucí folikul produkuje estrogen, který navodí přípravu pohlavních orgánů na budoucí estrus. Endometrium a epitel pochvyproliferuje, prokrvují se pohlavní orgány, žlázy děložního krčku produkují hlen, děložní krček se otevře, nastává kontrakční aktivita dělohy. Zvyšuje se i koncentrace LH, který zajistí ovulaci během estru. Samice je připravena na říjí, zatím ale není svolná k páření (Kudláč et Elečko, 1987).

Téměř zralé folikuly jsou důležité, neboť produkují steroidy (estrogeny, progesteron a androgeny), ovlivňující růst folikulů, jejich regresi, strukturní a funkční změny dělohy a děložního krčku, chování během estru, vývoj oocyty a ovulaci. Graafovy folikuly obsahují antrální dutinu naplněnou folikulární tekutinou, která je tvořena krví a sekrety folikulárních buněk. Granulózní buňky folikulu v jedné nebo více vrstvách obklopují vnitřní stěnu folikulu. Vnější obal folikulu tvoří theca folliculi interna a theca folliculi externa. Theca folliculi obsahuje receptory pro LH nezbytné pro tvorbu androgenů, kdežto granulózní buňky folikulu mají receptory pro FSH i LH nepostradatelné pro produkci estrogenu (Ginther et al., 1992).

Estrus

Říje neboli estrus je obdobím, kdy je klisna ochotná přijmout hřebce, projevuje se pozitivně vůči samci a může být úspěšně oplodněna. Během estru dochází k dozrávání folikulů a následné ovulaci. Ovulace klisny probíhá spontánně, v pravidelných 21 denních intervalech (Morel, 2008). Délka estrálního cyklu souvisí s reprodukční fází klisny. Rozdíly jsou u laktujících a nelaktujících klisen, kdy laktující klisny mají říjí kratší (Heidler et al., 2004). Podstatný vliv má i plemenná příslušnost klisen. Cyklus klisen typu pony je přibližně o dva dny delší než u velkých plemen (Aurich, 2011). Podle ročního období trvá estrus 24 hodin až 5-7 dní (Samper et Pycock, 2007).

Pohlavní orgány během estru dosahují maximálního nabuzení. Sliznice jsou prokrvené, žlázy děložního krčku produkují velké množství hlenu, který vytéká z vulvy, děložní krček je zcela otevřen. Svalovina dělohy a vejcovodů pod vlivem oxytocinu vykazuje nadměrnou kontraktilitu, která umožňuje transport spermií k místu oplození. Koncentrace estrogenů během estru dosahují maxima. Stydké pysky jsou překrvené a vytéká z nich cervikální hlen. Pro klisnu je typické blýskání, klisna je rozkročená, kontrahuje stydké pysky a odhaluje klitoris a zarudlou sliznici poševní předsíně (Kudláč et Elečko, 1987). Říjící se

klisna se k hřebci otáčí zádí se zvednutým ocasem, odkrývá perineální prostor a blýská stydkými pysky (Asa et al., 1983). Klisny v říji se projevují častým močením nepatrného objemu moči, zatímco klisny v diestru močí méně často větší objem moči. Při testaci schopnosti hřebců rozeznat mezi říjící a diestrickou samicí podle fenoménu blýskání bylo zjištěno, že hřebci se projevují v přítomnosti klisen ať už v říji nebo v diestru shodně, tedy flémují a nedokáží rozeznat potenciální svolnost klisny k páření. Nicméně v polních podmínkách zvýšené močení klisny vyvolalo jasnější odezvu hřebce v podobě flémování. Z výsledků polních testů je zřejmé, že zvýšená frekvence močení klisen v říji napomáhá vyhledat klisnu k páření pomocí chemosenzorů hřebce (Stahlbaum et Houpt, 1989).

Estrální chování se začíná projevovat na základě zvyšující se koncentrace estradiolu (Frandsen et al., 2009; Ginther, 1992), který je produkován dominantním folikulem (Bergfelt, 2009). Klisny mohou projevovat sexuální chování i v období anestru, čímž se stávají mezi ostatními kopytníky unikátními. Udržují tak správnou sociální strukturu ve stádě, ve kterém se hřelec zdržuje po celý rok. U ostatních kopytníků dochází ke střetu samice se samcem jen v období připouštění (Crowell-Davis, 2007).

Ovulace běžně nastává 24-36 hodin před koncem estru, tedy přibližně 1-2 dny před koncem estru a označuje se jako 0. den (Frandsen et al., 2009; Ginther, 1992). Převážná většina klisen (69-78 %) ovuluje v tomto časovém rozmezí. 10-14 % klisen ovuluje až po ukončení estru (Ginther, 1992). Ovulace je proces, kdy dojde k narušení povrchu folikulu v blízkosti ovulační jamky. Folikulární tekutina, granulózní buňky folikulu a oocyt jsou uvolněny z vaječníku (Bergfelt et Adams, 2007). Tento proces je spuštěn pomocí LH, který způsobí zvýšení intrafolikulárního tlaku (Kudláč et Elečko, 1987).

Při ovulaci dochází ke krvácení z kapilár stěn folikulu, jež byly narušeny. U klisny je však toto krvácení minimální. Například u krav je krvácení výraznější, krev vytéká do dělohy a pohlavním ústrojím dále z těla, mísí se v estru s děložními hleny a jedná se o jeden ze znaků tiché říje u krav (Kudláč et Elečko, 1987).

Velikost folikulu je rozhodujícím kritériem pro odhad počátku ovulace. Ultrazvukem je možno změřit předovulační folikul (Rantanen et McKinnon, 1998). Využívá se elektronického měřidla, které je součástí ultrazvuku. Rozmezí ve velikostech ovulačních folikulů jsou velké, 30-70 mm (Bergfelt et Adams, 2007). Průměr Graafova folikulu je odlišný dle sezóny (o 5-8 mm je folikul větší na jaře než v létě). Rozdíly ve velikosti folikulu jsou i mezi plemeny. V kategorii jezdeckých plemen bývají rozdíly folikulů před ovulací

přibližně 3 mm, u miniaturních koní jsou folikuly menší o 5 mm, tažné klisny mají naopak folikuly o 10 mm větší. Při několikanásobné ovulaci jsou folikuly o 4-9 mm menší než při ovulaci jednoho folikulu (Ginther, 1995). Průměr dominantního folikulu se příliš nemění posledních 48 hodin před ovulací (McKinnon et Voss, 1993). Maximálního průměru folikuly dosahují o 1 nebo 2 dny dříve (Bergfelt et Adams, 2007).

U klisen se běžně uvolňuje jedno vajíčko za cyklus (Morel, 2005). Ovulace dvou vajíček najednou je u méně domestikovaných plemen vzácností, u domestikovaných koní se však dvojnásobná ovulace pohybuje v 7-25 % případů (Heidler et al., 2004). Zvláště neobvyklým jevem je ovulace dvou vajíček v témže cyklu u plnokrevných plemen. Tento úkaz je patrně zapříčiněn určitou heritabilitou této vlastnosti. U ostatních plemen se dvojnásobná ovulace vyskytuje s četností 5-10 %. Klisny běžně nevyužívané v chovu nebo klisny, které dosud neměly hříbě, inklinují k ovulaci dvojnásobného počtu vajíček častěji než chovné klisny. Březost klisny s dvěma plody v děloze končí nejčastěji potratem (Evans et al., 1997).

Na rozdíl od ostatních druhů zvířat, klisny hned během prvního estru v pubertě jako v první říji po zimě nebo po porodu, vykazují říjové chování (Aurich, 2011). U klisen se vyskytuje říje i v průběhu laktace. První říje po porodu lze označit jako tzv. hříběcí horečku (Crowell-Davis, 2007), nastává ve 4-10 dni post partum (Ginther, 1992). Inseminace je zpravidla neefektivnější 9. den po ohřebení (Kudláč et Elečko, 1987).

Metestrus

Metestrus je poříjové období, ustávají veškeré projevy říje a svolnosti k páření. Jakmile se vajíčko s folikulární tekutinou uvolní, vznikne na vaječníku prázdná dutina, kterou vyplní krevní sraženina. Vzniklá sraženina vyplňující prostor po prasklém folikulu se označuje jako žluté tělíčko nebo také corpus luteum (CL). Zpočátku má CL červenou barvu, ve chvíli, kdy se již stává neaktivním a zmenšuje se, přechází jeho zbarvení v hnědou, nakonec je bělavé barvy. Hlavním úkolem CL je sekrece progesteronu, hormonu březosti. Po celou dobu existence CL je uvolňován progesteron, který brání znovuzahájení cyklu (Morel, 2005).

Diestrus

Diestrus trvá 14-16 dní (Samper et Pycocok, 2007). Progesteron z CL inhibuje estrální chování (Hedberg et al., 2007). Pokud jsou klisny v diestru vystaveny hřebci, neprojevují vůči

němu ochotu, naopak mohou být agresivní. Klisna, která je v době diestru vystavena blízkému kontaktu s hřebcem, klopí uši dozadu, obličejové svaly má napnuté a po hřebci kope a útočí na něho (Crowell-Davis, 2007).

Žluté tělísko v diestru dokončuje svůj vývoj a maximálního rozměru 10-25 mm dosahuje 12.-14. den cyklu. Progesteron ovlivňuje dělohu, která produkuje uterinní mléko (výživa nezahnížděného embrya). V pohlavním ústrojí klisny se pod vlivem progesteronu připravuje vhodné prostředí pro nidaci embrya v endometriu (Kudláč et Elečko, 1987).

Pokud nedošlo k oplození, dochází k regresi žlutého tělíska (luteolýze). Regrese CL je pomalý proces, který je dokončen až po začátku nové říje (Kudláč et Elečko, 1987). Luteolýza je započata prostřednictvím spontánní vlny PFG_{2α} z dělohy. Jizva patrná na vaječniku vzniklá následkem regrese žlutého tělíska se nazývá bílé tělísko (corpus albicans). Ultrazvukem je možné bílé tělísko snadno zpozorovat (Bergfelt, 2009).

5.1. Změny na děloze v průběhu estrálního cyklu

Při ultrazvukovém vyšetření morfologie endometria lze přesně odhadnout fázi estrálního cyklu. Většina cyklických změn na pohlavním ústrojí klisen je pod kontrolou ovariálních steroidů – estrogenů a progesteronu. Během estrálního cyklu prodělává děloha klisen značné změny. Ve folikulární fázi pod vlivem estrogenů endometrium dělohy proliferuje a značně se prokrvuje, záhyby endometria bují a narůstají. Při ultrazvukovém vyšetření se proliferace endometria projevuje heterogenitou celkového obrazu (Samper et Pycock, 2007). Děloha v důsledku zvýšené permeability kapilár a následnému bujení pojivového vaziva zvětšuje svůj objem. Žlázy endometria se vyvíjejí a produkují velké množství hlenu. Myometrium klisny v říji vykazuje vysokou kontraktilitu, která je způsobena oxytocinem (Kudláč et Elečko, 1987).

Endometriální záhyby bývají ultrazvukem dobře pozorovatelné již ke konci diestru. Více patrnými se stávají během estru a povětšinou se zmenšují dva dny před a v průběhu ovulace, kdy překrvení sliznice ustupuje (Samper et Pycock, 2007).

Kontrakce dělohy v jednotlivých obdobích mění svůj charakter. Směr kontrakčních sil může být orientován od děložních rohů k vejcovodům, umožňuje transport spermií v estru. Kontrakce směřované z dělohy k děložnímu krčku v diestru vypuzují z organismu hlen a čistí pohlavní ústrojí na konci cyklu (Kudláč et Elečko, 1987).

6. Oplození vajíčka

Březost (gestace) trvá od oplození vajíčka až do narození mláďete. Březost zahrnuje oplodnění, vývoj raného embrya v lumen samičího reprodukčního traktu, implantaci embrya ve stěně děložní, placentaci – vývoj plodových obalů a průběžný růst plodu (Frandsen et al., 2009).

Oplození zahrnuje splynutí dvou rodičovských haploidních pohlavních buněk (oocytu a spermie) za vzniku diploidní zygoty (Kudláč et Elečko, 1987). Udává se, že vajíčko je životaschopné 6-36 hodin po ovulaci (Morel, 2008).

Oocyty po ovulaci jsou spuštěny z vaječníku ovulační jamkou a jsou unášeny k místu oplození, které probíhá v druhé třetině vejcovodu. Toto místo vejcovodu se nazývá ampulla (Morel, 2005). U uhnížděného embrya ve fázi časně březosti klisny bylo prokázáno, že embryo řídí průchod vejcovodem samo pomocí gonadotropinů, které produkuje (Betteridge, 2007). V ampulli čeká vajíčko na spermie (Morel, 2008). Záhyby ampulle vejcovodu poskytují vhodné a výživně bohaté prostředí pro oplození vajíčka, kdežto převážně svalovinou tvořený isthmus vejcovodu, má bohatě řasinkatý epitel, který podporuje aktivní pohyb spermií až k místu oplození a následný aktivní posun oplozeného vajíčka z vejcovodu do dělohy (Bergfelt, 2009). Přechod vajíčka po ovulaci do dělohy u klisen trvá 5-6 dní (England, 2005). Uterotubulárním spojením vajíčko klisny, která byla zapouštěna, neprojde, dokud není oplodněno spermií (Morel, 2008).

Spermie jsou při připouštění klisen nebo přirozené plemenitbě deponovány na vrchol děložního krčku, v blízkosti dělohy (Doty et al., 2011; Kudláč et Elečko, 1987). I přestože spermie po ejakulaci vykonávají aktivní posuvný pohyb vpřed za hlavičkou, hlavním transportním mechanismem zůstávají kontrakce pohlavního ústrojí samice vyvolané oxytocinem, který se začíná syntetizovat na základě fyzického dráždění reprodukčního ústrojí klisny při připouštění (Frandsen et al., 2009).

7. Časný embryonální vývoj

U klisen vzniká dvoubuněčné embryo již 24 hodin po oplození (Marvan et al., 2011). Ze zygoty mitotickým dělením vznikne morula, útvar o 16-32 blastomerách (Kudláč et Elečko, 1987). Blastomery jsou buňky, které vznikají ve vajíčku, s narůstajícím množstvím blastomer se jejich velikost zmenšuje, zatímco celková velikost vajíčka se nemění (Marvan et

al., 2011). Z moruly, ve které se vytvořila dutinka (blastocel) naplněná tekutinou, vzniká blastocysta. Vnější obalem blastocysty je trofoblast, který je tvořen periferními extraembryonálními buňkami blastomery (Kudláč et Elečko, 1987). Z trofoblastu se později vyvíjejí plodové obaly a placenta. Vnitřní centrálně umístěné blastomery vytvářejí embryoblast, z kterého vznikne vlastní zárodek (Frandsen et al., 2009; Kudláč et Elečko, 1987; Marvan et al., 2011).

Morula plavoucí v děloze před uhnízděním je vyživována sekrety žláz endometria – děložním mlékem (embryotrofé). Uterinní mléko je šedo-mléčné barvy a obsahuje proteiny, tuky, glukózu, fruktózu a glykogen, látky nutné pro výživu časného embrya (Kudláč et Elečko, 1987).

8. Inseminace

Ať už při přirozeném připouštění nebo umělé inseminaci, je nutné denní nebo obdenní ultrazvukové vyšetření na zjištění doby ovulace podle velikosti Graafova folikulu (Samper, 2000). Připouštění 48-72 hodin před ovulací může být úspěšné a může vést k oplodnění klisny, pokud je použit plodný hřebec (Crowell-Davis, 2007; Samper et Pycoc, 2007). Při využití umělé inseminace chlazeným spermatem se inseminační dávka aplikuje 12-24 hodin před ovulací. Mražené sperma se používá 6-8 hodin před ovulací (Samper et Pycoc, 2007).

Umělá inseminace má mnoho výhod v porovnání s přirozenou plemenitbou (Metcalf, 2003). S použitím inseminace je možné předejít problémům souvisejícím s reprodukcí. Oplození při inseminaci probíhá bez fyzického kontaktu klisny s hřebcem, čímž je eliminováno riziko šíření přenosných chorob. Inseminace je preventivním řešením pohlavních chorob (*Klebsiella aeruginosa*, *Pseudomonas aeruginosa*), ale i nepohlavních nemocí - herpesvirus, koňská chřipka, infekční anémie koní (Morel, 1993). Z jedné odebrané dávky spermatu lze ředěním získat několik inseminačních dávek. Ředidlo prodlužuje trvanlivost inseminační dávky a obsahuje antibiotika, čímž se redukuje riziko vzniku pohlavních chorob. Dalším pozitivem je, že inseminační dávky je možné transportovat snadněji než hřebce (England, 2005). Takovéto usnadnění transportu inseminačních dávek má za následek značnou genetickou variabilitu, která má pozitivní přínos v chovu. Zranění klisny nebo hřebce při připouštění je v případě inseminace též vyloučeno (Metcalf, 2003). Inseminace je vhodnou metodou oplození v případě získaných abnormalit pohlavního ústrojí klisny. U vrozených

abnormalit se využití klisny k chovatelským účelům nedoporučuje, neboť je zde riziko genetického přenosu dané vady (Morel, 1993).

9. Faktory ovlivňující zabřezávání

Klisny mají nejnižší plodnost v porovnání s ostatními samicemi hospodářských zvířat (Watson, 1994). Koně byli selektováni podle vhodnosti k válečnému využití a schopnosti závodit, nikoli však s ohledem na plodnost (Engelken, 1999; Pycoc, 2007). Obecně se dá říci, že četnost zabřezávání klisen je 40-70 % u velkých plemen (England, 2005). Ovšem Nath et al. (2010) uvádějí, že zabřezávání klisen dosahuje průměrně 68 %. U většiny plemen je zabřezávání klisen za jeden cyklus 43-56 %. V průběhu celé sezóny, tedy včetně několikerého zapouštění klisen, je četnost zabřezávání 70-80 % (Brück et al., 1993). Špatné zabřezávání může být způsobeno problémem na straně klisny, hřebce nebo obou pohlaví. Pokud je nízká plodnost u hřebce i klisny, připouštění končí neúspěchem (LeBlanc, 2008).

Reprodukční status klisny významně ovlivňuje její reprodukční schopnosti (Sharma et al., 2010) a průměrnou četnost zabřezávání (Samper et al., 2002). Klisny lze charakterizovat z reprodukčního hlediska na prvničky, jalové a laktující (Morris et Allen, 2002). Klisny s hříbětem mají nejvyšší četnost zabřezávání, neboť podle úspěchu z minulého reprodukčního období lze předpokládat jejich vlohy pro reprodukci (Langlois et Blouin, 2004). Vysoká míra zabřezávání je při připouštění během prvního estru po porodu, kdy ovulace nastává 10 den po porodu (Ischii et al., 2001). Přesto je vysoká míra zabřezávání klisen s hříbětem v kontrastu s negativním vlivem laktace (Brück et al., 1993). Podle Ginther (1992) je u klisen po porodu snížena schopnost zabřeznout o 18-22 %. U jalových klisen a starých prvniček je pozorována nízká míra zabřezávání (Samper, 2001). Tichá říje je projev klisny, při kterém dochází k říji a ovulaci, ale klisna neprojevuje říjové chování a vůči hřebci se staví odmítavě. Nejčastěji se tichá říje vyskytuje u klisen, které dosud nebyly zapouštěny nebo u klisen v laktaci (England, 2005).

Věk klisen má výrazný vliv na zabřezávání zapouštěných klisen (Bosh et al., 2009; Sharma et al., 2010). Staré klisny mají nižší četnost zabřezávání a zvýšenou embryonální mortalitu (Morris et Allen, 2002). Ze studií na plnokrevných klisnách v subtropických podmínkách vyplývá, že poměrně staré klisny, přes 13 let, byly neplodné ze 40 %. Naproti tomu tři čtvrtiny zabřezlých klisen byly mladší 13 let. Zhruba 50 % klisen, které nezabřezly již dvě sezóny za sebou, neuspěly ani v příští sezóně, proto by vyřazení těchto klisen z chovu

mělo zlepšit reprodukci (Sharma et al., 2010). Nezabřezávání starších klisen může být zapříčiněno neschopností folikulů ovulovat, je ale pravou, že přesný důvod vzniku neovulujících folikulů není zcela objasněn (LeBlanc, 2008).

Klesající plodnost s věkem klisen byla přisouzena chronickým degenerativním změnám na endometriu (Rickett et Alonso, 1991; Bracher et al., 1996) a potenciální vnímavostí k děložním infekcím, které vznikají vlivem špatného peritoneálního spojení a neschopností dělohy se se zánětem vypořádat důsledkem jejího stárnutí (Kalirajan et Rajasundaram, 2008).

Schopnost zabřeznout ovlivňuje plemeno klisny (Hafez et Hafez, 2000), lze tedy říci, že plodnost je spjata s určitou genetickou predispozicí. Například u plnokrevných klisen v důsledku slabého peritoneálního spojení často dochází k vniknutí vzduchu do pohlavního ústrojí a následnou neplodností. Teplokrevné klisny mohou mít anatomické abnormality (LeBlanc, 2008), mezi které patří defektní vulva, špatné sevření předsíňo-vaginálního prostoru, perzistentní hymen, abnormální děložní krček, defekty v děloze, defektní vejcovod nebo vaječníky (Noakes, 2001). Nicméně i přes výskyt těchto defektů jsou tyto klisny nejplodnější a to i při horším managementu chovu (LeBlanc, 2008).

Další faktory ovlivňující zabřezávání klisen jsou tělesná kondice klisny a výživa. Přijímané živiny a energetická bilance jsou vyjádřeny tělesnou kondicí (Cavinder et al., 2009). Nejvyšší plodnosti (91 %) byla pozorována při tělesné kondici 3 (Fradinho et al., 2014). Klisny s tělesnou kondicí pod průměrnou hodnotu mají opožděnou ovulaci na začátku sezóny o 26 dní (duben) na rozdíl od klisen s nadprůměrnou tělesnou kondicí, které dosáhnou plnohodnotnou ovulaci již na začátku března. Četnost zabřezávání u klisen s podprůměrnou tělesnou kondicí je pouze 25 % a do oplození je zapotřebí připouštět 2,5 až 3,5 cyklu. Klisny v nadprůměrné kondici zabřeznou v 70 %. Klisny s průměrnou tělesnou kondicí dosahují až 95 % míry zabřezávání při oplození za 1,5 cyklu (Henneke et al., 1984). Dlouhotrvající restriktce živin projevující se hodnotou tělesné kondice tedy výrazně snižuje fertilitu klisen (Niekerk van et Niekerk van, 1998).

Ultrasonografické vyšetření umožňuje diagnózu patologických stavů na děloze či vaječnicích, které ovlivňují četnost zabřezávání (Noakes, 2001). U starších klisen se častěji vyskytují děložní cysty, které způsobují redukci prokrvení dělohy (Ferreira et al., 2008). Kromě toho je kvůli přítomnosti cyst zpožděna ovulace a stává se nepravidelnou (Carnevale

et al., 1994). Následně uvolněné oocyty jsou morfologicky abnormální (Rambags et al., 2005) a klisna je dočasně neplodná (Brück et al., 1993).

Podstatný je i vliv hřebce na četnost zabřezávání klisen (Morel et Gunnarson, 2000). Velké rozdíly v kvalitě ejakulátu jsou jednak mezi jednotlivými plemeny, podstatná je zejména individualita hřebce (Parlevliet et al., 1994). Z hlediska kvality ejakulátu se sleduje počet spermií a jejich schopnost progresivního pohybu. U dočasně neplodných klisen se používá semeno od hřebce, které u plodných klisen způsobí úspěšné zabřeznutí již na první připouštění (LeBlanc, 2008).

Byly pozorovány podstatné interakce mezi věkem hřebce a počtem klisen, které v sezóně připouštěl. Četnost zabřezávání klesá se stoupajícím věkem hřebce, u klisen se snižuje v průběhu připouštěcí sezóny. Nicméně připouštění klisen hřebci staršími 16 let mají vyšší míru zabřezávání, pokud tito hřebci připouštěli alespoň 12 klisen v jedné sezóně. Četnost zabřezávání po připouštění starším hřebcem se snižuje hlavně v posledních měsících sezóny (Ewert et al., 2013). Produkce spermií hřebce klesá, pokud jsou klisny zapouštěny v krátkých intervalech (Buiten et al., 2003). Tento faktor snižující plodnost hřebce lze pozorovat, pokud za sezónu připouští více jak 80 klisen (Merkt et al., 1979).

Hysteroskopická inseminace je depozice malého objemu semene do papily, místa spojení dělohy s vejcovodem (Lindsey et al., 2002). Používají se inseminační dávky o objemu 0,25-0,5 ml (Samper, 2007). Tento druh inseminace je považován za stejně účinnou nebo vede k vyšší četnosti zabřezávání než při běžně používané inseminaci do děložního těla (Morris et al., 2003). Podle Woodse et al. (2000) není žádný rozdíl ve výsledku při inseminaci do děložního těla nebo děložního rohu. Rigby et al. (2000) poukazují na skutečnost, že při zavedení semene na vrchol toho děložního rohu, na který navazuje vaječník s dominantním folikulem, dojde k pohybu spermií ve směru připraveného oocytu (77 %), v porovnání s deponací semene do děložního těla, kdy se k připravenému vejcovodu dostane pouze 54 % spermií. Naopak Samper (2001) uvádí, že zavedení semene do místa uterotubulárního spojení zvyšuje pravděpodobnost zabřeznutí.

Četnost zabřezávání je shodná při inseminaci konvenční i hysteroskopické pokud je aplikována inseminační dávka 14×10^6 pohyblivých rozmražených spermií (67% zabřeznutí oproti 64%). Avšak pokud je inseminační dávka redukována na 3×10^6 spermií, míra

zabřezávání je jednoznačně vyšší při hysteroskopické inseminaci – 47%, oproti 15% (Morris et al., 2003).

Zabřezávání klisen po inseminaci mraženým semenem je relativně neúspěšné v porovnání s čerstvým nebo chlazeným semenem (Pickett et al., 2000). Předpokládá se, že zabřezávání je nižší v důsledku vzniklých vad na spermiích při procesu zmrazování a následného rozmrazování (Watson, P. F., 2000). Při připouštění klisen mraženým semenem je výhodnější aplikovat inseminační dávku několikrát, použití jediné inseminační dávky snižuje zabřezávání, neboť kryoprotektiva snižují životaschopnost spermií (Samper, 2001).

Inseminace každý den nebo ob den neovlivňuje následné zabřeznutí (Squires et al., 1998). Počet připouštění či inseminací tedy nemá na četnost zabřezávání vliv (Morris et Allen, 2002). Avšak pokud jde o indukci ovulace pomocí exogenních hormonů, došlo ke snížení počtu připouštění za říji a připouštění do zabřeznutí klisny (Camillo et al., 2004).

Připouštěcí sezóna je načasována v souladu s potřebami nově narozeného hříběte, které by se mělo rodit do období, kdy je dostatek potravy (Malpaux, 2006; Nie et al., 2007). Klisny jsou sezónně polyestrické (Nie et al., 2007). Avšak některé klisny mají období zimního anestrů kratší, nebo jsou dokonce polyestrické po celý rok (Hafez et Hafez, 2000). Pohlavní aktivita většiny klisen závisí na délce světelného dne (Ginther, 1992a; Nagy et al., 2000). Estrální cyklus klisen se proměňuje v průběhu roku z přechodné fáze na jaře na pravidelné cykly v průběhu léta (LeBlanc et McKinnon, 2011). Ovariální hormony, které se uvolňují v období pohlavní aktivity, ovlivňují sexuální chování klisny, připravují organismus na páření, zabřeznutí a následnou březost (Nie et al., 2007). Období zapouštění klisny je tedy na začátku jara a v létě. Dalším negativním vlivem na zabřezávání je fakt, že od začátku 19. století je 1. leden považován za oficiální datum narození plnokrevných koní. Toto datum nebere v úvahu přirozenost koní, tedy plození hříbata na jaře. Chovatelé koní jsou nuceni zapouštět klisny už v zimě nebo velmi brzy z jara, s čímž se pojí řada chovatelských problémů. Význam časného zapouštění klisen, před příchodem jejich plodného období je zejména prodej odstávčat, který se uskutečňuje výhradně na podzim. Hříbata narozená dříve, dosahují na podzim lepší kondice a proto je možné je výhodněji prodat (Pycock, 2001). I přesto, že je možné u klisen uměle vyvolat estrus brzy na jaře nebo v předjaří (Williams et al., 2012), při říji od února do dubna často nedochází k ovulaci a zabřezávání v tomto období je výrazně nízké. Nejvyšší úspěšnost zabřezávání bývá od května do června (Hafez et Hafez, 2000).

Zabřezávání klisen ovlivňuje v dnešních podmínkách lidský faktor a efektivní vyhledávání říje. U klisny krátce po anestru, lze sice pozorovat příznaky říje, avšak folikuly nedozrávají dostatečně a oplození je tedy v tomto období nemožné. Nižší míra zabřezávání je patrná pokud se zapouští více jak 4 dny před ovulací. Nevhodnější doba pro páření nebo inseminaci je 24 – 48 hodin před ovulací, neboť spermie jsou do té doby schopné projít procesem kapacitace a stát se plodnými. Páření či inseminace den po ovulaci má málokdy pozitivní výsledek (England, 2005). Úspěšné zabřeznutí je možné podpořit zkoušením klisny hřebcem, vyšetřením pochvy a rektální palpací pohlavních orgánů (Hafez et Hafez, 2000). Z výše zmíněného vyplývá, že efektivní spolupráce mezi majitelem klisny a inseminačním technikem má nejméně významný dopad na četnost zabřezávání klisen (Samper, 2001).

Dále je třeba si uvědomit, že přeprava na klisnu působí jako stresor, tudíž nemusí následnou péči a snahy o zapouštění akceptovat (England, 2005). Nebylo potvrzeno, že by měl na plodnost klisen vliv stres způsobený letním počasím, problém se zabřeznutím v teplých oblastech se patrně týká nevyhovujícího managementu chovu (Sharma et al., 2010).

Nejčastější zdravotní problémy klisen spojené s neschopností zabřeznout jsou nahromadění tekutiny v děloze bezprostředně po estru, chronický zánět a nepravidelnosti v estrálním cyklu. Nepravidelnosti v estrálním cyklu během chovné sezóny souvisí se zánětem dělohy, nádorem na vaječniku, systémovým problémem (laminitida, Cushingův syndrom) a neobvyklou funkcí endokrinního systému. Jakákoli abnormalita ve zdravotním stavu klisny se projeví na její schopnosti úspěšně zabřeznout (LeBlanc, 2008).

Obecně lze říci, že nejčastějšími důvody nízké míry zabřezávání je zejména špatné načasování připouštění a fyziologická odpověď organismu klisny na semeno (Traub-Dargatz et al., 1991).

10. Endometritida

Endometritida je zánět vnitřní vrstvy dělohy, který je způsoben infekcí nebo chemickým podrážděním (Schweizer et al., 2006). Zánět endometria může vznikat po zapouštění klisny (Morel, 2008). Předpokládá se, že zánětlivá odpověď dělohy je nezbytností pro účinné odstranění kontaminace bakteriemi a pro odstranění nadbytečného množství spermií v děloze (Troedsson, 2006; Doty et al. 2011).

10.1. Typy endometritidy

Endometritidu lze rozdělit na akutní nebo chronickou (Pycock, 2007), subklinickou, poporodní, bakteriální, fungální, virovou, vyvolanou připouštěním, perzistentní a jiné. (Hurtgen, 2006). Jednotlivé klisny nelze přesně a bezpodmínečně zařadit do jedné skupiny. Klisny mohou patřit do různých kategorií i v průběhu jedné reprodukční sezóny, nebo mohou v jednom okamžiku být zařazeny do více než jedné ze skupin (Watson E. D., 2000). Podle způsobu vzniku je endometritida infekční nebo neinfekční (Pycock, 2007), tedy způsobena bakteriemi nebo kontaminací dělohy spermii (Troedsson, 2006).

Podle současné literatury lze rozdělit perzistentní endometritidu na 4 skupiny podle průběhu: pohlavně přenosné choroby, chronickou infekční endometritidu, perzistentní endometritidu vyvolanou připouštěním-persistent mating-induced endometritis (PMIE) a chronickou degenerativní endometritidu - endometrosu (Troedsson et al., 1993a; Watson E. D., 2000).

10.2. Obranné mechanismy dělohy

Obranný systém dělohy, který má vliv na rezistenci vůči perzistentní endometritidě, může být humorální, celulární nebo mechanický (Pycock et Allen, 1988). Značné úsilí je třeba věnovat definování a určení mechanismů, kterými rezistentní jedinci eliminují bakterie a jiné kontaminanty. Důležité je také znát příčiny vzniku dysfunkcí obranných mechanismů, které vedou k náchylnosti vůči endometritidě. Zjištění těchto faktorů a určení terapie dysfunkcí náchylných klisen vede k zlepšení plodnosti klisen (Lyle, 2011).

Samičí reprodukční trakt má mnoho mechanismů, kterými lze zabránit infekcím. Kromě fyzických bariér (poševní předsíň, vulva, pochva, děložní krček) jsou dalšími obrannými prvky lokální imunitní mechanismy a fyzické odstranění produktů zánětu (Bain, 1966). Již 4 hodiny po připouštění nebo inseminaci se spermie dostanou přes lumen dělohy do vejcovodu (Brinsko et al., 1991). Nicméně jen nepatrné množství spermií dosáhne tohoto cíle (Scott et al., 1995). Přebytek spermií je odstraněn myometrálními kontrakcemi a odchází z pohlavního traktu klisny děložním krčkem (Troedsson et al., 1998). Přesto kontrakce dělohy neodstraní všechny nadbytečné spermie. Proto je zapotřebí i jiných mechanismů clearance dělohy (Rozeboom et al., 1998). Kdyby fungovala pouze specifická imunitní odpověď, mohla by být narušena plodnost klisen při dalším připouštění (Asbury et al., 1982). Proto musí být eliminace spermií při průchodu reprodukčním traktem samice dosažena kombinací vrozené

imunitní odpovědi a mechanické clearance pomocí sekundární vlny uterinních kontrakcí. Tento mechanismus vyvolá kaskádu zánětlivých reakcí a příliv buněk, které se zánětem souvisí do lumen dělohy (Doty et al., 2011).

Většina imunoglobulinů, které se vyskytují v lumen dělohy, pocházejí z endometria. Sérem jsou přiváděny pouze imunoglobuliny v průběhu zánětu dělohy. Lokální imunita je tedy v děloze klisny na rozdíl od ostatních druhů zvířat dobře vyvinuta (Blanchard et al., 1998). Dalo by se říci, že množství imunoglobulinů v děloze koresponduje s jejím stavem (Williamson et al., 1983). U klisen s narušenou rezistencí vůči perzistentní endometritidě bylo v děložní tekutině nalezeno větší množství imunoglobulinů - IgA, IgG a IgG(T) než u rezistentních klisen (Asbury et al., 1980). Při jiné studii bylo zjištěno zvýšené množství IgA, nikoli však IgG nebo IgG(T) v děloze při endometritidě (Mitchell et al., 1982). Nebylo jednoznačně potvrzeno ani to, že by klisny vnímavé k endometritidě měly nedostatečnou koncentraci imunoglobulinů nebo pouze některého z nich v krevním séru nebo v děloze oproti rezistentním klisnám (Blanchard et al., 1998). Avšak Troedsson et al. (1993d) pozorovali klesající hladiny IgG v děloze 24 hodin po kontaminaci dělohy zapouštěním. Z rozdílných závěrů autorů vyplývá, že podle koncentrace imunoglobulinů nelze prokázat, zda klisna je či není rezistentní vůči endometritidě (Williamson et al., 1983). Troedsson (1999) dodává, že protilátkami zprostředkovaná obrana dělohy je u vnímavých klisen funkční stejně jako u rezistentních. Příčina vzniku vnímavosti k perzistentní endometritidě je tedy způsobena jinými faktory.

Polymorfonukleární neutrofilny (PMNs - polymorphonuclear neutrophils) jsou prvními buňkami, které vstupují do místa zánětu (Lehrer, 1988). PMNs jsou podstatné v boji organismu proti organismům, které jej napadají. Tyto buňky migrují z krevního řečiště do místa infekce jako odpověď na lokálně produkované chemoatraktanty (Blanchard et al., 1998). Spermie a bakterie spouštějí uvolňování PMNs do lumen dělohy (Neely et al., 1979). Komplementová kaskáda zprostředkovává sérii biologických reakcí, které slouží jako obrana proti cizí látce. Před vlastní fagocytózou dochází k vyšší propustnosti cév, chemotaxi, opsonizaci a aktivaci membránových lipáz. Nakonec dochází k lýze cílového organismu (Watson et al., 1987). Předpokládá se, že spermie iniciují uvolnění PMNs aktivací komplementu (Troedsson et al., 1995a). Aktivace komplementové kaskády je výsledkem štěpení faktoru C5 na C5a a tento se štěpí na C5b. Komplement C5a zprostředkovává chemotaxi PMNs, výsledkem je uvolnění PMNs do lumen dělohy (Kotilainen et al., 1994).

Tento mechanismus aktivace komplementu v děložních sekretech přítomností spermií byl potvrzen v in vitro i in vivo podmínkách (Rozeboom et al., 2001).

Následkem aktivace komplementu je uvolnění PMNs do dělohy. PMNs se uvolňují do dělohy již 30 minut po inseminaci klisen (Katila, 1995). Jiné studie uvádějí, že k migraci PMN do děložního lumen nastává za 2 hodiny po kontanimaci (Pycock et Allen., 1988). Normální zánětlivá reakce po připouštění a následná přítomnost PMNs v lumen dělohy je způsobena chemotaktickými pohyby spermií (Troedsson, 1999). Dá se předpokládat, že chemotaktická role spermií je nezbytná pro clearance dělohy od přebytečných spermií a semenné plazmy (Troedsson et al., 2001). Nicméně zánětlivý proces může být zpožděn důsledkem potlačení fagocytózy a migrací PMNs v semenné plazmě, tudíž spermie mohou pronikat do vejcovodu, kde dojde k oplození (Scott et al., 1995).

Při aktivaci PMNs dochází k uvolňování $\text{PGF}_{2\alpha}$, který způsobí myometrální kontrakce (Fantone et Ward, 1994). Myometrální kontrakce jsou regulovány oxytocinem (Ko et al., 1989). Děložní kontrakce jsou užitečné, neboť dochází k odstraňování kontaminantů a zánětlivých produktů (Katila, 1995). Odstranění kontaminantů a produktů zánětu je možné buď odchodem z děložního krčku, nebo lymfatickou cestou (Troedsson, 1999). Kontrakce dělohy tedy působí jako prevence perzistence endometritidy a poškození dělohy. Jestliže zánětlivé procesy po ovulaci přetrvávají, nastává luteolýza a prostředí dělohy neposkytuje embryu prostředí potřebné pro jeho vývoj je podstatný důvod způsobující neplodnost klisen (Katila, 1995).

PMNs ničí patogeny nemocí dvěma způsoby. Prvním mechanismem je fagocytóza, kdy cizorodé látky jsou pohlceny a následně odstraněny. Druhým prostředkem k zahubení patogenů jsou extracelulárně umístěné neutrofilové pastě pro tyto patogeny (neutrophil extracellular traps - NETs). NETs jsou tvořeny novým úsekem DNA a histony s antimikrobiálními peptidy. NETs obklopují místo zánětu, odstraňují patogeny, které zánět způsobují a snižují riziko dalších zánětlivých reakcí (Amulic et Hayes, 2011).

Semenná plazma je tekutou částí ejakulátu. Umožňuje transport spermií a zároveň je chrání před fagocytózou v děloze (Parlevliet et al., 1997). V in vivo podmínkách u klisen bylo zjištěno, že semenná plazma nepotlačuje uvolňování PMNs do lumen dělohy (Kotilainen et al., 1994). Je tedy pravda, že semenná plazma indukuje přechodný endometriální zánět (Fiala et al., 2007), ten je ale charakterizován pouze rychlým a přechodným přívalem PMNs. Vazba PMNs na opsonizované spermie a následná fagocytóza byli redukovány, když byly spermie

chráněny semennou plazmou (Scheytt et Gilbert, 1995). Semenná plazma jednoznačně pozměňuje dobu trvání a intenzitu odpovědi samičího pohlavního ústrojí (dělohy) na spermie (Doty et al., 2011). Všechny tyto obranné funkce semenné plazmy zabraňují počátečnímu zánětu vyvolaného přítomností spermií v děloze. Důvodem je usnadnění průchodu spermií do krčku vejcovodu, který slouží jako zásobárna samčích buněk v těle samice (Thomas et al., 1994).

Zánět může být potenciálně nebezpečný pro spermie, které právě procházejí dělohou. Populace životaschopných spermií je chráněna nejprve spojením s PMNs, potom i fagocytózou PMNs. Tento mechanismus zajišťuje, aby dostatečné množství spermií pro oplození dosáhlo vejcovodu. Tento mechanismus ochrany spermií je důležitý zejména, pokud je klisna inseminována opakovaně a v děloze již probíhají zánětlivé reakce (Doty et al., 2011). Dříve se předpokládalo, že semenná plazma ochraňuje spermie před fagocytózou a před vlivy zánětem poškozeného prostředí. Experimenty v in vitro podmínkách demonstrují, že efekt semenné plazmy na vazbu spermií s PMNs a jejich fagocytóza jsou závislé na frakcích proteinů v semenné plazmě (Alghamdi et al., 2004). Obranné reakce dělohy se selektivně zaměřují na mrtvé spermie, což je způsobeno specifickými proteiny v semenné plazmě. Při rozštěpení proteinů semenné plazmy bylo zjištěno, že jeden protein potlačuje vazbu PMNs na živé spermie, zatímco jiný podporuje vazbu PMNs na mrtvé spermie (Woodward et Troedsson, 2011). Podařilo se izolovat a identifikovat protein semenné plazmy ve spermatu hřebce, který potlačuje vazbu PMN na spermie a následně eliminuje PMNs v děloze. Je jím cystein - rich secretory protein – 3 (CRISP–3)(Doty et al., 2011). Cytokiny jsou interceculární signální proteiny, které jsou uvolňovány imunitními, ale i jinými buňkami (Baraňao, 1997; Feghali et al., 1997). Přítomnost spermií a bakterií vede k uvolnění předzánětlivých cytokinů (Madill et al, 2000), které jsou produkovány leukocyty v děloze a buňkami endometria (Baraňao, 1997). Jde o interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6) a faktor nádorové nekrózy (tumor necrosis factor - TNF). Předzánětlivé cytokiny vyvolávají zánět a celou řadu na sebe navazujících reakcí (Schroder et al., 2004). Cytokiny mají za následek uvolnění PMNs. PMNs migrují skrze endometrium, uvolněný PGF 2_{α} způsobuje kontrakce dělohy (Troedsson, 1999). Oxytocin také působí na kontrakce svaloviny endometria, jeho uvolňování je spojeno se stimulací vyvolanou připouštěním (Madill et al., 2000).

Fáze akutní odpovědi - acute phase responses (APR) je systematická odpověď organismu na zánět nebo poškození tkáně (Bauman et Gauldie, 1994). APR zahrnuje fyzické a molekulární bariéry, reakce organismu na infekci, zbavuje organismus potenciálních

patogenů, zahajuje zánětlivé procesy a celkově přispívá k uzdravení jedince (Petersen et al., 2004). Jedním ze znaků této akutní odpovědi je produkce plazmických proteinů, které se označují jako proteiny akutní fáze (acute phase protein - APP). APP jsou primárně syntetizovány v hepatocytech (Murata et al., 2004). APP je možné měřit v plazmě, čímž lze zjistit průběh APR. Zánícená tkáň produkuje interleukin (IL)-6, tato molekula signalizuje syntézu APP z hepatocytů (MacKay, 2000). Mezi proteiny akutní fáze patří fibrinogen (Fib), haptoglobin (Hp) a sérový amyloid A (SAA) (Blanchard et Macpherson, 2011).

10.3. Příčiny vzniku endometritidy

Zdrojem kontaminace endometria je přirozené připouštění i inseminace (Pycock, 2001). V minulosti byl výzkum zaměřován na endometritidu způsobenou infekcí. Bylo však zjištěno, že přechodná endometritida nastává i při sterilním vpravení spermií do dělohy. Endometritida může vznikat i po inokulaci spermií bez semenné plazmy do děložního prostoru (Kotilainen et al., 1994). Při experimentech bylo zjištěno, že nejčastěji je endometritida způsobená buď spermii, nebo bakteriemi jako jsou *Streptococcus zooepidemicus* nebo *Escherichia coli*. Ačkoli mechanismy clearance dělohy na tyto antigeny jsou v úzkém vztahu, existují mezi nimi odchylky. Proto jsou endometritida vyvolaná připouštěním a bakteriální endometritida řešeny odděleně (Woodward et Troedsson, 2014), neboť záleží na původu zánětu (Troedsson et al., 1993b). Nejčastějším důvodem vzniku perzistentní endometritidy po připuštění je selhání fyzikální clearance dělohy, která následně není schopna zbavit se nahromaděné tekutiny a produktů zánětu (Troedsson et al., 2000), kterými jsou neutrofilů, imunoglobuliny, komplement a enzymy (Pycock et Allen, 1990).

10.4. Vnímavost klisen k endometritidě

Metody predikce vnímavosti klisen k perzistenci endometritidy jsou limitovány reprodukční historií klisny. Identifikace vnímavých klisen před připouštěním je podstatná pro efektivní léčbu předtím, než endometritida perzistuje (Woodward et al., 2011). Nicméně určení vnímavých klisen k PMIE před připouštěním je složité. U některých klisen je tekutina v děloze přítomna již před připouštěním, avšak většinu klisen je možné identifikovat až po připuštění (LeBlanc et al., 1994). Klisny jsou klasifikovány jako vnímavé k perzistentní endometritidě pokud přesáhne trvání clearance dělohy od zánětu 96 hodin po inokulaci bakterií nebo spermií a pokud je děloha patologická. Mechanismus zodpovědný za přetrvávající přítomnost intraluminální tekutiny je narušená fyzikální clearance, která je

výsledkem redukce aktivity a motility myometria (Troedsson, 1999). Rezistentní klisny dokáží dělohu zbavit infekce nebo zánětu pomocí třech mechanismů. Jde o kontrakce dělohy, lymfatickou drenáž a otevření děložního krčku (LeBlanc et al., 1995).

Kvalita endometria je hlavní známkou zdravotního stavu dělohy (Schlafer, 2007). Bylo potvrzeno, že patologické stavy na děloze souvisí s vnímavostí k perzistentní infekční endometritidě (Troedsson et al., 1993b) a s perzistentní endometritidou po připuštění (Woodward et al., 2012). Nezávadnost endometria a jeho posouzení závisí na funkčnosti žláz, lymfatické tkáně, fibrózních změn a propustnosti stěny endometria pro zánětlivé buňky (Kenney et Doig, 1986).

Adekvátní ochrana reprodukčního traktu je nezbytností pro prevenci děložní infekce (Morel, 2005). Zdravé klisny chrání před kontaminací fyzické bariéry. Jsou jimi vulva, poševní předsíň, pochva a děložní krček (Pascoe, 1979). Vulvární bariéra je nejkaudálněji umístěna a je tvořena důkladným spojením stydkých pysků klisny. Pochva je od okolního prostředí chráněna svými stěnami, jež pochvu přirozeně uzavírají a přilehajíce na pánevní kost, tvoří tak nepropustnou bariéru (Morel, 2005).

U klisen s dobře utvářenou pánví a přizpůsobenou hrází, tvoří svěrač mezi předsíní a vagínou důkladné spojení oddělující vaginální a vestibulární lumen. Jakákoli odchylka, vulva táhnoucí se výš nad pánevní dno, dopředně skloněná, je predispozicí pro kontaminaci pochvy vzduchem nebo výkaly (Schweizer et al., 2006). Klisny s povislou dělohou pod pánev mají nižší schopnost clearance dělohy oproti klisnám, které mají dělohu položenou na pánevním okraji (LeBlanc et al., 1998). Poslední bariéra je tvořena svaly těsně uzavírající děložní krček (Morel, 2005).

Klisny, které intenzivně závodí, musí mít výbornou kondici a fitness. Tyto klisny však v důsledku své fyzické kondice téměř ztrácí tukovou tkáň v oblasti perinea. Rektum se následně posouvá kranialním směrem a vulva se dostává nad pánevní okraj. Změna vzájemného umístění rekta a vulvy způsobuje opakovanou kontaminaci vulvy a poševní předsíně výkaly. Nepřetržité sportovní zatížení klisen, ochabnutí svalů v oblasti perinea a estrus přispívají k relaxaci perineálního prostoru. Velmi častým jevem u mladých klisen, které závodí, je nasávání vzduchu, výkalů a bakterií do pochvy a poševní předsíně – takový stav se označuje jako pneumovagina (Evans et al., 1986). Aspirace vzduchu způsobuje vysychání vaginální sliznice a predisponuje ji k bakteriálním infekcím (England, 2005). Jestliže se bakterie vyskytnou v pohlavním ústrojí klisny v určitém, limitujícím množství, mohou projít

skrz děložní krček a dostat se až do dělohy, kterou infikují a následně způsobí neplodnost klisny (Morel, 2005; Causey, 2007). Nedostatečné perineální spojení má přímou souvislost s endometritidou klisen po připuštění (Hemberg et al., 2005).

Identifikovat pneumovaginu je může být snadné, pokud se klisna pohybuje, lze slyšet neobvyklý, dobře znatelný zvuk ze zadní části jejího těla. U některých klisen je určení pneumovaginy složitější, zvuk lze slyšet, jen pokud relaxují, nebo pokud přenášejí váhu z jedné pánevní končetiny na druhou. Plyn se dostává z vaginy nedokonalým těsnícím systémem pohlavních orgánů do dělohy, kde je možné tento plyn identifikovat pomocí ultrazvuku. Chirurgicky lze pneumovaginu eliminovat Cashlikovou vulvoplastií, která se však nepoužívá příliš hojně. Výsledkem této metody je spojení dorzální části stydkých pysků, přičemž se redukuje velikost otvoru. Dočasné uzavření části vulvy klisny je nejvhodnějším řešením, ale pouze do doby, kdy je klisnu třeba zapustit (England, 2005).

Pokud bariéry reprodukčního traktu klisny bránící infekcím fungují normálně, děložní krček je otevřen pouze v období říje. V diestru, kdy z klisny nevychází žádná děložní tekutina ani hlen je děložní krček těsně uzavřen. Toto uzavření potenciálního vstupu cizorodých látek do těla zabraňuje průniku patogenů (Tibary et Fite, 2007).

Všechny tyto faktory souvisí i pokročilým věkem klisny (Carnevale et Ginther, 1992). Věk je spojován s narušením systémové imunitní odpovědi u koní, ale i jiných druhů zvířat (Barbacini et al., 2003). Bylo zjištěno, že existují rozdíly v boji proti zánětu dělohy u mladých, chovných, starších klisen a klisen neschopných zabřeznout. Modelem pro tyto studie byl *Streptococcus zooepidemicus*, kterým se v organismu uměle vyvolá zánět pro studium perzistentní endometritidy (Zent et al., 1998). Několik dní po uměle vyvolané infekci, došlo u starších klisen k chronickému zánětu a zjevnému výtoky z pochvy. Mladé klisny se dokázaly snáze vypořádat se zánětem a v dalším cyklu úspěšně zabřezly (Liu et Troedsson, 2008). Věk je tedy významný faktor, který predisponuje klisny ke vzniku PMIE (Barbacini et al., 2003).

U starších multiparních klisen s dilatovanou dělohou často dochází k nahromadění tekutiny v pohlavním ústrojí po připuštění a následné endometritidě (Troedsson et al., 1993a). Také klisny, které zadržují přebytek tekutiny v děloze během diestru (Brinsko et al., 2003) nebo mají pozitivní kulturu v děloze již před připuštěním (Riddle et al., 2007), budou mít pravděpodobně problémy se zdoláním zánětu dělohy po připuštění (Woodward et Troedsson, 2013). Klisny vnímavé k PMIE mají velmi často narušenou lymfatickou drenáž. Výsledkem

je nahromadění zánětlivé tekutiny v děloze, neboť nedochází k odchodu této tekutiny děložním krčkem nebo je snížena absorpce tekutiny lymfatickou tkání (LeBlanc et al., 1995).

U vnímavých klisen k endometritidě byla pozorovány zvýšená i snižená funkce PMN v děloze (Troedsson et al., 1993a). Podle počátečních studií se předpokládalo, že klisny senzitivní vůči endometritidě mají poškozené PMN. Bylo však zjištěno, že PMNs v děloze mají sníženou schopnost fagocytózy oproti rezistentním klisnám (Watson et al., 1987). Rozdílné závěry jsou způsobeny jinými podmínkami při experimentech a jinou fází estrálního cyklu klisen během experimentu (Troedsson et al., 1993c). Narušená fagocytóza u vnímavých klisen je nejspíše způsobena nedostatečnou opsonizací, nikoli dysfunkcí PMN (Causey et al., 1995).

Alghamdi et al. (2005) uvádějí, že u vnímavých klisen k PMIE dochází 13 hodin po inseminaci k nahromadění oxidu dusnatého (NO) v děloze. NO je produkován mnoha typy buněk - neutrofilym makrofágy, hepatocyty, epiteliálními i endoteliálními buňkami (Li et al., 2010). NO způsobuje uvoňování hladké svaloviny, což vysvětluje sníženou myoelektrickou aktivitu dělohy u vnímavých klisen 6 až 19 hodin před propuknutím zánětu způsobeného připouštěním (Alghamdi et al., 2005).

10.5. Diagnostika endometritidy

Již pár hodin po připouštění lze podle průběhu zánětu rozlišit klisny rezistentní a vnímavé k PMIE. Nicméně definitivní diagnózu PMIE je možné určit teprve, pokud zánětlivé změny v děloze jsou pozorovány po dobu 48-72 hodin po připouštění (Woodward et Troedsson, 2013). U klisen podezřelých z PMIE je třeba zjistit jejich reprodukční historii (Woodward et al., 2012) a kompletní hodnocení vulvární a peritoneální anatomie, relaxační schopnost a uzavření děložního krčku, cytologické testy a kultury, transrektální ultrasonografii a děložní biopsie. Některé histopatologické změny v děložní biopsii korelují s vnímavostí klisen k PMIE (Troedsson et al., 1993b). Bez ohledu na příčinu vzniku endometritidy, hlavními znaky, které poukazují na zánět endometria je přítomnost neutrofilů a nahromaděná tekutina v děloze (Troedsson, 2006). Klinické příznaky endometritidy jsou vzácné, avšak bývá pozorován poševní výtok, zkrácená luteální fáze cyklu a nízká plodnost klisen (Cocchia et al., 2012).

Vnímavé klisny mívají narušenou myometrální aktivitu dělohy, která je považovaná za nejvýznamnější faktor vedoucí k perzistentní endometritidě (Woodward et Troedsson, 2013).

S využitím elektromyografie je možné sledovat kontrakce dělohy (Troedsson et al., 1993b). Vnímavé klisny je možné identifikovat i scintigrafií a ultrasonografií. Tyto metody též odhalí redukovanou myometrál ní kontraktilitu, jež je způsobena akutním zánětem (LeBlanc et al., 1994; Nikolakopoulos et Watson, 1999). Scintigrafie je užitečnou metodou, nicméně se využívá zejména pro výzkum PMIE, v praxi nemá uplatnění (Woodward et al., 2012). Transrektální ultrasonografie se využívá pro detekci nahromaděné děložní tekutiny (Pycock et Newcomb, 1996). Vnímavé klisny k PMIE se vyšetřují ultrazvukovým vyšetřením 3-12 hodin po připouštění (Pycock, 2001). Většina případů endometritidy je však diagnostikována ultrazvukem děložního lumen 24 hodin po připouštění (England, 2005).

Mikroskopickým vyšetřením tkáně endometria lze zhodnotit stav dělohy. Mikroskopický vzorek normálního, zdravého endometria je charakteristický rovnoměrným uspořádáním endometriálních žláz a výskytem několika málo nebo žádných zánětlivých buněk (Kenney et Doig, 1986). Takový vzorek se hodnotí jako I. stupeň. Poškozené endometrium má rozšířené žlázy, obklopené vrstvami fibrózních buněk. Takové žlázy nejsou funkční, je zde velká pravděpodobnost vzniku zánětu endometria, dochází k degenerativním změnám endometria. Jedná se o nejzávažnější, II. stupeň. Klisny s endometriálním stupněm IIB-III, který byl stanoven na základě analýzy biopsie, jsou považovány za potenciálně vnímavé k perzistentní endometritidě po připouštění (Woodward et al., 2012), neboť degenerativní změny na endometriu predisponují tyto klisny k zadržování zánětlivé tekutiny v děloze (Kenney et Doig, 1986). Bylo potvrzeno, že patologie endometria souvisí s perzistentní endometritidou způsobenou infekcí (Troedsson et al., 1993a). Nicméně není jisté, zda byla vnímavost k PMIE pozorována i další připouštěcí období. Též počet pozorování této studie nebyl velký (Woodward et al., 2012).

V současné době je diagnostika endometritidy s využitím cytologie nejpoužívanější metodou. Tato metoda detekce endometritidy se nezměnila od prvních poznatků v oblasti diagnostiky, s výjimkou používaných pomůcek. Prohloubily se však vědomosti o změnách organismu při endometritidě (Liu et Troedsson, 2008). Nepřímo lze endometritidu určit bakteriologickým testem (Wingfieldnet et Ricketts, 1982).

Ve své studii na soukromé farmě Tuppis et al. (2014) zjišťovali, zda je pro účely reprodukce klisen podstatné měřit v krvi koncentraci proteinů akutní fáze - sérového amyloidu A (SAA), haptoglobinu (Hp) a fibrinogenu (Fb). Koncentrace těchto proteinů byly měřeny každých 48 hodin v průběhu estru až do 5, 6 nebo 7 dní po inseminaci rozmraženým

spermatem. Při studii byly sledovány klisny s různou reprodukční historií, včetně několika klisen s endometritidou. V průběhu pozorování však nebyly odhaleny žádné změny koncentrace proteinů akutní fáze před ani po inseminaci rozmraženým semenem. Rozdíly koncentrace nebyly zjevné jak mezi skupinami klisen s odlišným reprodukčním statutem ani při měření koncentrace proteinů v jednotlivých časových intervalech v průběhu estru u klisen. Závěrem studie Tuppise et al., (2014) je zjištění, že měření koncentrace proteinů akutní fáze nemá v reprodukci koní opodstatnění. Z výsledků vyšetření krve totiž není možné rozeznat klisny vnímavé k endometritidě od rezistentních klisen.

Pro zlepšení reprodukce klisen je třeba věnovat pozornost zejména efektivní identifikaci a vhodné manipulaci s klisnami s PMIE (Troedsson, 2011). Diagnóza endometritidy může být brzděna ignorací stávajícího stavu. Problémy v diagnostice endometritidy bývají především v nedostatečné veterinární kontrole po připuštění a nepřikládáním významu výtoku z vulvy. Po připuštění dochází k fyziologickému uvolňování výtoku z pochvy klisny. Nicméně rozpoznání v jakém případě je již tento výtok patologický není snadné (England, 2005). Vyšetření klisen po připuštění umožňuje brzkou determinaci nahromaděné děložní tekutiny a následně je možné zahájit nutnou terapii (Samper, 2001).

10.6. Léčba endometritidy

Před zahájením léčby perzistentní endometritidy je zásadní identifikace klisen vnímavých k PMIE a měla by se týkat pouze klisen, u kterých je léčení žádoucí (Woodward et Troesson, 2013). Samotná léčba je zaměřena na podporu fyzikální clearance dělohy a odstranění kontaminantů a zánětlivých produktů (Troedsson, 1999). Do 4 hodin po připuštění jsou spermie nezbytné pro oplození přítomny ve vejcovodu. Embryo sestupuje do dělohy kolem 5,5 dne. Klisny mohou být léčeny bezpečně od 4 hodin po připuštění až do 3. dne od ovulace. Koncentrace progesteronu po ovulaci rapidně roste, proto je doporučeno vyhnout se léčbě už od 2. dne po ovulaci, neboť by mohlo být narušeno prostředí pro časné embryo v případě úspěšného oplození. Léčba by se měla uskutečňovat s ohledem na dobu připuštění, nikoli ovulace. Dříve veterináři často čekali až na ovulaci než začali s léčbou. V to dobu v děloze byl už nadbytek děložní tekutiny a bakterií (Pycock, 2001).

Existuje několik variant léčby PMIE, které zohledňující příčinu jejího vzniku. Antibiotika se používají k eliminaci bakterií. Použití antibiotik pro léčbu PMIE je však sporné. V některých chovech se antibiotika klisnám podávají po každém připuštění bez ohledu na skutečnost, že tuto léčbu nepotřebuje přibližně 90 % zapouštěných klisen. Pokud

dojde 12 hodin po inokulaci *S. zooepidemicus* k výplachu dělohy nebo se aplikuje látka, která zvyšuje kontrakce dělohy (ecbolic agents), je dosaženo stejného výsledku jako při použití antibiotik (Troedsson et al., 1995a). Látky zvyšující kontraktilitu dělohy (oxytocin, PGF_{2α}) jsou využívány pro odstranění zánětlivé tekutiny (Witte et al., 2012). Lze je aplikovat intravenózně, intramuskulárně nebo intrauterinně (England, 2005). Léčba pomocí oxytocinu nebo PGF_{2α} 4-8 hodin po přípuštění zvyšuje četnost zabřezávání vnímavých klisen (Pycock et Newcomb, 1996). Pokud jde o dávkování, nižší dávky oxytocinu v porovnání s vyššími, způsobují výraznější myometrální kontrakce a mají vyšší účinnost při odstraňování zánětlivé děložní tekutiny (Campbell et England, 2002). Pozornost je třeba věnovat načasování léčby pomocí PGF_{2α}. Zabřeznutí klisen může být ohroženo, pokud je PGF_{2α} aplikován 2 dny po ovulaci. Působení PGF_{2α} v tuto dobu zpožďuje vytvoření CL a znemožňuje jeho funkčnost. Nepřítomnost CL znemožňuje vývoj časného embrya (Brendemuehl, 2002).

Výplachem dělohy dochází k likvidaci děložního obsahu (Witte et al., 2012). Výplach dělohy může být proveden 6-12 hodin po připouštění u vnímavých klisen. Zároveň lze aplikovat oxytocin 3 a 12 hodin po připouštění (Knutti et al, 1997). Výhodou použití výplachu dělohy u klisen je, že nemá žádný negativní vliv na následnou březost (England, 2005). Při výplachu dělohy je potřeba odhadnout naléhavost mechanického odstranění děložního obsahu (Pycock, 2001). Tekutina v děloze se vyplachuje 2-3 litry fyziologického sterilního roztoku solného. Tento roztok reguluje množství bakterií, ředí vzniklé toxiny a odstraňuje nadbytečné úlomky buněk dělohy (England, 2005). Před použitím se roztok předeřeje na 42°C. K výplachu dělohy lze použít i laktát. Látka určená na výplach je aplikována pomocí katetru do lumen dělohy. Nejčastěji se používá katetr na výplach embryí. Délka katetru je 80 cm (Pycock, 2001). Mechanické podráždění dělohy, které tato procedura způsobuje, může mít za následek příliv PMNs do dělohy (England, 2005). Výplach dělohy je možné provést i za použití PGF_{2α}, jak bylo zmíněno, podporuje děložní kontrakce (Troedsson, 1999), neboť zvyšuje myoelektrickou aktivitu (Pycock, 2001) u klisen se zpožděnou fyzikální clearance. Cadario et al. (1995) dokládá, že pokud byl rezistentním klisnám podáván inhibitor prostaglandinu, došlo u nich ke zpoždění clearance dělohy a staly se vnímavými k endometritidě.

Kortikosteroidy jsou známé protizánětlivé látky působící na všechny tělní systémy. Léčba kortikosteroidy je používána také pro zlepšení plodnosti klisen. Po aplikaci kortikosteroidu prednisolonu acetátu dochází k vyšší četnosti zabřezávání u klisen, které měly dříve problém se zadržováním tekutiny v děloze po připouštění (Dell'Aqua et al., 2006).

Dalším účinným kortikosteroidem v boji proti PMIE je dexamethason, který se aplikuje v čase kolem připouštění. Aplikace dexamethasonu působí efektivně a bezpečně při léčbě klisen vnímavých k PMIE. Dexamethason snižuje nahromadění děložní tekutiny, zároveň ale nezamezuje obrannému mechanismu dělohy pomocí PMNs. Zároveň tento kortikosteroid nenarušuje schopnost klisen zabřeznout ani estrální cyklus není ovlivněn (Bucca et al., 2008).

U neléčených klisen rezistentních i vnímavých bylo 24 hodin po inseminaci pozorováno zvýšené množství PMNs v děloze. Ke snížení PMNs během diestru však došlo pouze u rezistentních klisen. Dosažení stejného snížení PMNs u vnímavých klisen na hodnotu PMNs u klisen rezistentních je možné při léčbě pomocí extraktu ze stěn buněk mykobakterií (mycobacterial cell wall extract - MCWE)(Fumoso et al., 2000). Při umělém vpravení *S. zooepidemicus* a následné léčbě MCWE, došlo ke snížení počtu klisen postižených endometritidou (Rogan et al., 2007), neboť MCWE silně stimuluje imunitu (Yuksel et al., 2011). MCWE u vnímavých klisen snižují hladinu cytokinů (zahajují zánět), na hodnotu která se vyskytuje 24 hodin po připouštění u rezistentních klisen (Fumoso et al., 2007).

Při léčbě endometritidy v praxi je třeba si uvědomit, že přechodný zánět je normální reakce na semeno a je nutný k úspěšnému oplození klisny. Je pravděpodobné, že časná léčba po připouštění klisny nezlepší její plodnost. Nehledě na to, že i samotná léčba v tomto období může být zdrojem kontaminace a může tak narušit úspěšné zabřeznutí (Liu et Troedsson, 2008).

10.7. Prevence

Pro prevenci endometritidy se používá chirurgická korekce defektního spojení vnějších pohlavních orgánů klisny (Witte et al., 2012). U takto problémových klisen se používá Caslickova procedura neboli vulvoplastie (Caslick, 1937). Jde o běžný zákrok, kterým je zabráněno průniku vzduchu, výkalů a jiných kontaminantů z vnějšího prostředí (Monin, 1972). Někdy je však tento zákrok neopodstatněný a bylo by jím zabráněno zlepšení fyzické kondice klisny a zvýšení váhy. Operace by se měla používat jen u klisen s defektním utvářením vulvy, nikoli pokud klisna nemůže zabřeznout (Pycock, 2001).

Vyšetření vnímavých klisen k endometritidě a jejich léčba by měla proběhnout v rozmezí 4-6 hodin po připouštění. Na ostatní klisny by se chovatelé v souvislosti s endometritidou měli zaměřit nejpozději do 24 hodin po připouštění (England, 2005). Jalové

klisny je třeba léčit již před přechodným obdobím na podzim. Pokud je klisna vhodně léčena, její pohlavní ústrojí, respektive děloha, efektivně zregeneruje. Při zapuštění v další sezóně je pravděpodobnost zabřeznutí vyšší (LeBlanc, 2008).

U vnímavých klisen k endometritidě je důležitá zejména řádná hygiena při porodu a při poporodním vyšetření. Narušení fyzických bariér oddělujících pohlavní ústrojí klisny od vnějšího prostředí je nutné maximálně omezit z důvodu potenciální kontaminace. Jakékoli vyšetření pohlavních orgánů je nutné provádět za relativně aseptických podmínek. Pokud je při vyšetření děložního krčku zjištěno jeho poranění nebo srůsty této oblasti, je nutné tyto problémy řešit před připouštěním. Před připouštěním je nutné dodržovat hygienická opatření jako podvázání ocasu bandáží a omytí vulvy a perinea čistou vodou. Zapouštění je třeba ideálně načasovat, aby se množství podnětů (kontaminace) pro vznik endometritidy minimalizoval. Možností, jak dosáhnout minimálních zákroků pro úspěšné oplodnění, je sledování estrální aktivity klisny s využitím rektální palpce i ultrasonografie. Nejvhodnější čas pro připouštění (ovulace) je snadněji predikován, jakmile se cyklus klisny stává pravidelným. Toto období nastává po několika nepravidelných cyklech na začátku jara. Klisna by se měla zapuštět jednou a to 1-2 dny před očekávanou ovulací. Z hlediska hygieny je inseminace je účinnou metodou pro redukci PMIE (Pycocock, 2001).

Minimální kontaminace dělohy je možné dosáhnout po infuzi velkého objemu (100-500 ml) látky prodlužující životnost spermií spolu s antibiotiky do dělohy bezprostředně před připouštěním. Nejčastěji se však používá infuze malého objemu antibiotik 4 hodiny po připuštění. Antibiotika lze aplikovat až 4 dny po ovulaci, ovšem v závislosti na době připouštění. Oproti přirozené plemenitbě je inseminace účinnější v prevenci endometritidy. Používají se naředěné inseminační dávky, které jsou obohacené o antibiotika. V děloze je nasledně dosaženo takřka aseptického prostředí (England, 2005). U klisen vnímavých k PMIE po připouštění je doporučována preventivní aplikace antibiotik do dělohy. Četnost zabřezávání vnímavých klisen je zvýšena, pokud jsou jim podávána širokospertrá antibiotika v kombinaci s oxytocinem (Ramirez et al., 1999). Avšak při této preventivní aplikaci antibiotik je možnost vytvoření rezistence mikroorganismů (Tibary et Fite, 2007).

Účinnost imunoglobulinů v děloze vnímavých klisen je diskutabilní (Blanchard et al., 1998). Imunitní odpověď organismu klisny po připuštění je možné podpořit infuzí séra nebo kolostra do dělohy (England, 2005). Kolostrum klisny je bohatým zdrojem imunoglobulinů, proto může být využíváno pro úspěšnou léčbu endometritidy klisen. Vnímavé klisny nemají

nedostatečné množství imunoglobulinů. Navíc aplikace neaseptického kolostra může v děloze vyvolat přechodnou komplikaci v imunitní odpovědi organismu (Blanchard et al., 1998).

Intenzita zánětlivé reakce závisí na koncentraci a objemu inseminační dávky (Kotilainen et al., 1994). Silnější zánět nastává v děloze po inseminaci koncentrované inseminační dávky mraženého semene v porovnání s čerstvým nebo naředěným semenem. Po aplikaci inseminační dávky velkého objemu dochází k uvolnění značného množství děložní tekutiny a spermatu vaginou z těla samice krátce po inseminaci. Naproti tomu je pravděpodobné, že spermie pocházející z inseminační dávky malého objemu jsou vystaveny přímému kontaktu s endometriem klisny po delší dobu, což způsobuje uvolňování více PMNs do lumen dělohy (Squires et al., 1989). Zánětlivá reakce nastává bez ohledu na to, zda jsou spermie vitální nebo jsou již mrtvé (Katila, 1997). Pro redukci endometritidy po připuštění je doporučována inseminační dávka s nižším počtem spermií a o nižším objemu aplikovaná přímo do papily mezi dělohou a vejcovodem (Lindsey et al., 2001).

Při procesu zmrazování spermií musí být odebrána semenná plazma (Kotilainen et al., 1994). Absence semenné plazmy v mražené inseminační dávce tudíž souvisí s výraznou a protrahovanou endometritidou vyvolanou připuštěním (Troedsson et al., 2001).

10.8. Vliv endometritidy na zabřezávání

U normálních klisen se zánět dělohy nejvýrazněji projevuje 10-12 hodin po připuštění (Pycock, 2007). Tento přechodný zánět dělohy vyvolaný spermiemi nemá žádný negativní vliv na následnou březost (Troedsson et al., 2005). Přibližně jen 10-15 % chovných klisen udržuje intrauterinní tekutinu v organismu 24-36 hodin po připuštění. U těchto klisen dochází k patologické perzistentní formě endometritidy vyvolané připuštěním (Zent et al., 1998). Katila (1995) uvádí, že klisna je ohrožena perzistentní endometritidou, pokud není schopna eliminovat infekci 2 dny po připuštění. V normálním případě se děloha zčistí a zbaví zánětu dříve, než zárodek sestoupí z vejcovodů do dělohy. Perzistentní endometritida, která vznikla jako reakce na semeno, má významnější vliv na neúspěšné zabřeznutí klisen než infekční endometritida (Troedsson, 1999). Včasná diagnóza ohrožení klisny začínající perzistentní endometritidou je podstatná z důvodu zvýšení pravděpodobnosti úspěšného průběhu březosti (Troedsson, 1999; Woodward et al., 2011).

Produkty zánětu v děloze působí škodlivě na spermie, neboť zhoršují jejich motilitu (Alghamdi et al., 2001). Proto je plodnost klisen ovlivněna dobou, za kterou se děloha vypořádá se zánětem (Katila, 1995). Podstatný je také fakt, že embryo u klisen sestupuje do dělohy 5-6 den po připuštění (Troedsson, 1999). V tuto dobu embryo vyžaduje příhodné prostředí v děloze, prosté zánětu (Traubz-Dargats et al., 1991). Studie na myších potvrdily, že životaschopnost embrya je narušena, pokud je v děloze přítomna zánětlivá tekutina, bakterie a produkty zánětu (Waite et al., 1982). Při perzistenci endometritidy dochází k zániku žlutého tělíska a časně embryonální mortalitě, neboť se uvolňuje PGF_{2α} (Neely et al., 1979).

Přítomnost zánětlivé tekutiny v děloze podstatně snižuje četnost zabřezávání klisen (Watson et al., 2001) ať už se tato tekutina vyskytuje v děloze v diestru (Adams et al., 1987) nebo estru (Pycock et Newcomb, 1996). Watson E. D. (2000) uvádí, že míra zabřezávání u klisen s intrauterinní tekutinou 48 hodin po připouštění byla 49 %. Naproti tomu klisny, u kterých nebyla přítomna tekutina v děloze, zabřezly s pravděpodobností 62 %. Četnost březích klisen s uměle vyvolanou endometritidou před připouštěním byla vyšší, pokud byly klisny připuštěny spermatem s obsahem semenné plazmy (77 %). Naopak pokud inseminační dávka obsahovala spermie s látkou prodlužující jejich životaschopnost, četnost zabřeznutí klisen se rapidně snížila na 5 % (Alghamdi et al., 2004).

Inseminace mraženým semenem se rozšiřuje po celém světě (Newcomb, 1999). Avšak Kotilainen et al. (1994) uvádějí, že inseminace mraženým semenem jednoznačně zvyšuje zánětlivou odpověď organismu klisny oproti přirozené plemenitbě. Naproti tomu Zent et al. (1998) poukazují na skutečnost, že nahromadění tekutiny v děloze se den po připouštění neliší u inseminace ani přirozené plemenitby. V obou případech je tekutina přítomna u 16 % klisen.

Watson et al. (2001) ve své studii zjišťovali, zda čas inseminace mraženým semenem ovlivňuje perzistenci děložní tekutiny. Studie byla provedena na 95 klisnách. Většina klisen byla teplokrevná, ostatní byli plemene quaterhorse nebo plnokrevníci. Všechny sledované klisny byli před provedenou inseminací vyšetřeny a u žádné nebyly známky nadměrného množství děložní tekutiny. K inseminaci klisen bylo použito semeno od 42 plemeníků z 18 chovných stanic. Inseminační dávky měly objem 0,5 ml. Pouze jediné chovatelské centrum hřebců dodávalo inseminační dávky o objemu 5 ml. Po rozmrazení semene byl minimální počet progresivně se pohybujících spermií 100 milionů. Studované klisny byly ve věku 3 až 16 let, tedy relativně mladé. Proto by u neselektované populace klisen byla přítomnost děložní tekutiny po inseminaci mraženým semenem pravděpodobně vyšší. Navíc u klisny

s opakovanými problémy s reprodukcí by se jednoznačně nepoužilo mraženého semene. Klisny byly inseminovány buď 12 hodin před ovulací, nebo 8 hodin po ovulaci. Watson et al. (2001) zjistili, že čas provedení inseminace neměl jednoznačný vliv na četnost zabřezávání ani na akumulaci děložní tekutiny. Četnost zabřezávání u klisen inseminovaných 12 hodin před ovulací byla 41 %. Po zapouštění 8 hodin po ovulaci zabřezlo 44 % klisen. Při vyšetřování klisen 12 hodin po inseminaci bylo zjištěno, že 34 % klisen inseminovaný před ovulací mělo v děloze nahromaděnou zánětlivou tekutinu. Pro porovnání 21 % klisen inseminovaných po ovulaci mělo přítomnu zánětlivou děložní tekutinu.

Katila (1995) uvádí, že 8 hodin po inseminaci čerstvým semenem je nejvyšší nárůst množství děložní tekutiny. Tudíž výsledek studie Watsona et al. (2001) není překvapivý. Klisny byly vyšetřovány transrektálně ultrasonografií. Bylo zjištěno, že 35 % klisen mělo v děloze zánětlivou tekutinu 12 hodin po inseminaci. Při vyšetřování klisen 18-24 hodin po inseminaci byla přítomna tekutina v děloze již jen u 14 % klisen. Čas, kdy je děložní tekutina po inseminaci detekována, neovlivňuje míru zabřezávání. Navíc četnost zabřezávání se nesnižuje, pokud je léčba zahájena až 18-24 hodin po inseminaci. Zent et al. (1998) zmiňují, že pokud zánětlivá tekutina v děloze přetrvává 48 hodin po připuštění, schopnost klisen zabřeznout se prudce snižuje v porovnání s klisnami bez přítomnosti této tekutiny v děloze. Celková četnost zabřezávání u klisen se zánětlivou tekutinou v děloze je pouze 33 %. Zmíněné klisny musí podstoupit odpovídající léčbu (Watson et al., 2001).

Podle Evanse et al. (1987) souvisí zvyšující se koncentrace progesteronu s potlačením imunitní odpovědi dělohy a s děložní clearance. Watson et al. (1988) poukazují na to, že koncentrace estrogenu a progesteronu je výrazně vyšší před ovulací. Estrogen je v době ovulace produkován předovulačním folikulem. Watson et al. (2001) se nejprve domnívali, že při inseminaci po ovulaci klisny existuje vyšší riziko akumulace děložní tekutiny oproti inseminaci před ovulací klisny. Nicméně po pokusech v laboratoři došli k závěru, že koncentrace cirkulujícího estrogenu a progesteronu při inseminaci nesouvisí s přítomností zánětlivé tekutiny v děloze 12 hodin po inseminaci. Z toho vyplývá, že četnost zabřezávání není ovlivněna koncentrací těchto steroidů v krvi při inseminaci.

Díky lepším znalostem změn v organismu, které způsobuje endometritida a kvůli lepším léčebným praktikám a nástrojům v léčbě se četnost zabřezávání klisen s endometritidou zvýšila z 50-60 % na 75-85 % (Liu et Troedsson, 2008). Nicméně i přes toto

zlepšení potvrdili průzkumy veterinářů v USA, že endometritida je hned třetím nejčastějším problémem, který snižuje plodnost u klisen (Traub-Dargatz et al., 1991).

11. Závěr

Endometritida vzniká v děloze klisny z mnoha důvodů a lze ji rozdělit na akutní, chronickou, subakutní, poporodní a perzistentní. Perzistentní endometritidu lze rozdělit na 4 skupiny. Jednou z nich je perzistentní endometritida vyvolaná připouštěním (PMIE).

Zánět dělohy po připouštění u klisen je fyziologická reakce. Pokud endometritida perzistuje, podstatně narušuje březost, neboť dochází k zániku žlutého tělíska, uvolňuje se $\text{PGF}_{2\alpha}$ a embryo odumírá. PMIE se vyskytuje u 10 - 15 % chovných klisen.

Po připouštění klisny vzniká endometritida jako reakce dělohy na spermie, bakterie nebo složky ředidla ejakulátu. Mechanickými obrannými mechanismy dělohy jsou myometrální kontrakce, které odstraňují kontaminanty z dělohy. První buňky, které vstupují do dělohy po vzniku zánětu, jsou PMNs. PMNs fagocytují spermie a bakterie. Při přirozené plemenitbě jsou spermie chráněny semennou plazmou, která zmírňuje zánět dělohy. Spermie pak mohou snáze projít do vejcovodu. Semenná plazma tedy snižuje výskyt PMIE u klisen. Naopak, při výrobě inseminačních dávek, je odebrána semenná plazma, důsledkem je přetrvávání zánětu dělohy a vznik PMIE.

Podle náchylnosti k endometritidě je možné klisen rozdělit na vnímavé nebo rezistentní. Klisny jsou považovány za vnímavé, pokud v děloze zánětlivá tekutina přetrvává 48 - 72 hodin po připouštění. Nejčastěji je perzistence této tekutiny v děloze klisen způsobena nedostatečným zčištěním dělohy. Diagnostika endometritidy je možná pomocí elektromyografie, scintigrafie, transrektální ultrasonografie, biopsie. Nejčastěji se však používá cytologické vyšetření. PMIE klisen je léčena s ohledem na časné embryo, proto se klisny nejpozději léčí 3. den po ovulaci. Oxytocin a $\text{PGF}_{2\alpha}$ zvyšují kontraktilitu dělohy, čímž odstraňují zánětlivou tekutinu z dělohy. Kortikosteroidy mají protizánětlivé účinky.

Pro prevenci PMIE je nezbytná hygiena reprodukčního traktu klisny, zejména při připouštění. Inseminace je z tohoto důvodu vhodnějším řešením u vnímavých klisen k PMIE, oproti přirozené plemenitbě, neboť kontaminace pohlavního ústrojí klisny je výrazně omezena. U klisen vnímavých k PMIE se jako prevence používá infuze antibiotik do dělohy. Výskyt PMIE u klisen lze redukovat aplikací inseminační dávky malého množství spermií a malého objemu přímo do papily.

Seznam použité literatury

- Adams, G. P., Kastelic, J. P., Bergfelt, D. R., Ginther, O. J. 1987. Effect of uterine inflammation and ultrasonically-detected uterine pathology on fertility in the mare. *Journal of Reproduction and Fertility. Supplement.* 35. 445-454.
- Alexander, S. L., Irvine, C. H., G. 1987. Secretion rates and short-term patterns of gonadotropin-releasing hormone, FSH and LH throughout the periovulatory period in the mare. *Journal of Endocrinology.* 114. 351 – 362.
- Alghamdi, A., Troedsson, M. H. T., Laschkewitsch, T., Xue, J. L. 2001. Uterine secretion from mares with post-breeding endometritis alters sperm motion characteristics in vitro. *Theriogenology.* 55 (4). 1019-1028.
- Alghamdi, A. S., Foster, D. N., Troedsson, M. H. T. 2004. Equine seminal plasma reduces sperm binding to polymorphonuclear neutrophils (PMNs) and improves the fertility of fresh semen inseminated into inflamed uteri. *Reproduction.* 127 (5). 593-600.
- Alghamdi, A. S., Foster, D. N., Carlson, C. S., Troedsson, M. H. 2005. Nitric Oxide Levels and Nitric Oxide Synthase Expression in Uterine Samples from Mares Susceptible and Resistant to Persistent Breeding-induced Endometritis. *American Journal of Reproductive Immunology.* 53 (5). 230-237.
- Amulic, B., Hayes, G. 2011. Neutrophil extracellular traps. *Current Biology.* 21 (9). R297-R298.
- Asa, C. S., Goldfoot, D. A., Ginther, O. J. 1983. Assessment of the sexual behavior of the pregnant mares. *Hormones and Behavior.* 17 (4). 405 – 413.
- Asa, C. S. 1986. Sexual behavior of mares. *The Veterinary Clinics of North America: Equine Practice* 2. 2 (3). 519 – 534.
- Asbury, A. C., Halliwell, R. E. W., Foster, G. W., Longino, S. J. 1980. Immunoglobulins in uterine secretions of mares with differing resistance to endometritis. *Theriogenology.* 14 (4). 299-308.

- Asbury, A. C., Schultz, K. T., Klesius, P. H., Foster, G. W., Washburn, S. M. 1982. Factors affecting phagocytosis of bacteria by neutrophils in the mare's uterus. *Journal of Reproduction and Fertility*. Supplement. 32. 151-159.
- Aurich, Ch. 2011. Reproductive cycles of horses. *Animal Reproduction Science*. 124 (3). 220-228.
- Bain, A. M. 1966. The role of infection in infertility in the thoroughbred mare. *Veterinary Records*. 78. 168-173.
- Barañao, R. I. 1997. Citoquinas en el proceso reproductivo. *Reproducción*. 12 (1). 15-27.
- Barbacini, S., Necchi, D., Zavaglia, G., Squires, E. L. 2003. Retrospective study on the incidence of postinsemination uterine fluid in mares inseminated with frozen/thawed semen. *Journal of Equine Veterinary Science*. 23 (11). 493-496.
- Baumann, H., Gauldie, J. 1994. The acute phase response. *Immunology Today*. 15 (2). 74-80.
- Bedford, S. J., Hinrichs, K. 1994. The effect of insemination volume on pregnancy rates of pony mares. *Theriogenology*. 42 (4). 571 - 578.
- Bergfelt, D. R. 2009. Anatomy and Physiology of the Mare. In: Samper, J., C. (ed.). *Equine Breeding Management and Artificial Insemination*. Elsevier Health Sciences. USA. p. 113 – 131. ISBN: 1416052340.
- Bergfelt, D. R., Mann, B. G., Schwartz, N. B., Ginther, O. J. 1991. Circulating concentrations of immunoreactive inhibin and FSH during the estrous cycle of mares. *Journal of Equine Veterinary Science*. 11 (6). 319 – 322.
- Bergfelt, D. R., Adams, G. P. 2007. Ovulation and Corpus Luteum Development. In: Samper, J., C., Pycock, J., F., McKinnon, A., O. (eds.). *Current Therapy in Equine Reproduction*. Elsevier Health Sciences. p. 1 – 13. ISBN: 0721602523.
- Betteridge, K. J. 2007. Equine embryology: An inventory of unanswered questions. *Theriogenology*. 68. S9 – S21.

- Betteridge, K. J., Eaglesome, M. D., Mitchell, D., Flood, P. F., Beriault, R. 1982. Development of horse embryos up to twenty two days after ovulation: observations on fresh specimens. *Journal of Anatomy*. 15. 191-209.
- Blanchard, T. L. Macpherson, M. L. 2011. Breeding mares on foal heat. In: McKinnon, A. O., Squires, E. L., Vaala, W. E., Varner, D. D. (eds.). *Equine Reproduction*. 2nd ed. Blackwell Publishing Ltd. Chichester. p. 2294-2301. ISBN: 0813819716.
- Blanchard, T. L., Varner, D. D., Schumacher, J. 1998. *Manual of Equine Reproduction*. Mosby-Year Book. St. Louis. p. 209. ISBN: 0815143788.
- Bosh, K. A., Powell, D., Shelton, B. Zent, W. 2009. Reproductive performance measures among Thoroughbred mares in central Kentucky, during the 2004 mating season. *Equine Veterinary Journal*. 41 (9). 883 - 888.
- Bracher, V., Mathias, S., Allen, W. R. 1996. Influence of chronic degenerative endometritis (endometrosis) on placental development in the mare. *Equine Veterinary Journal*. 28 (3). 180-188.
- Brendemuehl, J. P. 2002. Effect of oxytocin and cloprostenol on luteal formation, function and pregnancy rates in mares. *Theriogenology*. 58. 623-626.
- Brinsko, S. P., Varner, D. D., Blanchard, T. L. 1991. The effect of uterine lavage performed four hours post insemination on pregnancy rate in mares. *Theriogenology*. 35 (6). 1111-1119.
- Brinsko, S. P., Rigby, S. L., Varner, D. D., Blanchard, T. L. 2003. A practical method for recognizing mares susceptible to post-breeding endometritis. *Proceeding of American Association of Equine Practitioners*. 49. 363-365.
- Brück, I., Anderson, G. A., Hyland, J. H. 1993. Reproductive performance of thoroughbred mares on six commercial stud farms. *Australian Veterinary Journal*. 70 (8). 299-303.

- Bucca, S., Carli, A., Buckley, T., Dolci, G., Fogarty, U. 2008. The use of dexamethasone administered to mares at breeding time in the modulation of persistent mating induced endometritis. *Theriogenology*. 70 (7). 1093-1100.
- Buiten, A. V., Westers, P., Colenbrander, B. 2003. Male, female and management risk factors for non-return to service in Dutch mares. *Preventive Veterinary Medicine*. 61 (1). 17-26.
- Cadario, M. E., Thatcher, M. J. D., LeBlanc, M. M. 1995. Relationship between prostaglandin and uterine clearance of radiocolloid in the mare. *Biology of Reproduction Monography1: Equine Reproduction VI*. 495-500.
- Cadario, M. E., Merritt, A. M., Archbald, L. F., Thatcher, W. W., LeBlanc, M. M. 1999. Changes in intrauterine pressure after oxytocin administration in reproductively normal mares and in those with a delay in uterine clearance. *Theriogenology*. 51 (5). 1017-1025.
- Camillo, F., Pacini, M., Panzani, D., Vannozzi, I., Rota, A., Aria, G. 2004. Clinical use of twice daily injections of buserelin acetate to induce ovulation in the mare. *Veterinary Research Communications*. 28. 169-172.
- Campbell, M. L. H., England, G. C. W. 2002. A comparison of the ecbolic efficacy of intravenous and intrauterine oxytocin treatments. *Theriogenology*. 58. 473-477.
- Carnevale, E. M., Ginther, O. J. 1992. Relationships of age to uterine function and reproductive efficiency in mares. *Theriogenology*. 37 (5). 1101-1115.
- Cashlick, E. A. 1937. The vulva and the vulvo-vaginal orifice and its relation to genital health of the Thoroughbred mares. *Cornell Veterinary*. 27 (2). 178-187.

Causey, R. C. 2007. Uterine Therapy for Mares with Bacterial Infections. In: Samper, J., C., Pycock, J., F., McKinnon, A., O. (eds.). *Current Therapy in Equine Reproduction*. Elsevier Health Sciences. p. 105 – 115. ISBN: 0721602523.

Causey, R. C., Paccamonti, D. L., Todd, W. J. 1995. Antiphagocytic properties of uterine isolates of *Streptococcus zooepidemicus* and mechanisms of killing in freshly obtained blood of horses. *American Journal of Veterinary Research*. 56. 321-328.

Cavinder, C. A., Vogelsang, M. M., Gibbs, P. G., Forrest, D. W., Schmitz, D. G. 2009. Variances in reproductive efficiency of mares in fat and moderate body condition following parturition. *Professional Animal Scientist*. 25 (3). 250 –

Cocchia, N., Paciello, O., Auletta, L., Uccello, V., Silvestro, L., Mallardo, K., Paraggio, G., Pasolini, M. P. 2012. Comparison of the cytobrush, cottonswab, and low-volume uterine flush techniques to evaluate endometrial cytology for diagnosing endometritis in chronically infertile mares. *Theriogenology*. 77 (1). 89-98.

Crowell-Davis, S. L. 2007. Sexual behavior of mares. *Hormones and Behavior*. 52 (1). 12-17.

Červený, Č. 2011. *Vademecum anatomie domácích savců pro studium a veterinární praxi*. Brázda. Praha. 271 s. ISBN: 8020903891.

Dell'Aqua, J. A., Papa, F. O., Lopes, M. D., Alvarenga, M. A., Macedo, L. P., Melo, C. M. 2006. Modulation of acute uterine inflammatory response after artificial insemination with equine frozen semen. *Animal Reproduction Science*. 94. 270-273.

Domenico, P., Salo, R. J., Cross, A. S., Cunha, B. A. 1994. Polysaccharide capsule-mediated resistance to opsonophagocytosis in *Klebsiella pneumoniae*. *Infection and Immunity*. 62 (10). 4495 - 4499.

Doty, A., Buhi, W. C., Benson, S., Scoggin, K. E., Pozor, M., Macpherson, M., Mutz, M., Troedsson, M. H. T. 2011. Equine CRISP3 Modulates Interaction Between Spermatozoa and Polymorphonuclear Neutrophils. *Biology of Reproduction*. 85 (1). 157 – 164.

- Engelken, T. J. 1999. Reproductive health programs for beef herds: analysis of records for assessment of reproductive performance. In: Youngquist, R. S. (ed.). Current Therapy in Large Animal Theriogenology. WB Saunders Co. Philadelphia. p. 451–456. ISBN: 0721693231.
- England, G. 2005. Fertility and Obstetrics in the Horse. 3rd ed. Blackwell Publishing. Oxford. p. 320. ISBN: 1405120951.
- Evans, M. J., Hamer, J. M., Gason, L. M., Graham, C. S., Asbury, A. C., Irvine, C. H. G. 1986. Clearance of bacteria and non-antigenic markers following intra-uterine inoculation into maiden mares: effect of steroid hormone environment. Theriogenology. 26 (1). 37-50.
- Evans, M. J., Hamer, J. M., Gason, L. M., Irvine, C. H. 1987. Factors affecting uterine clearance of inoculated materials in mares. Journal of Reproduction and Fertility. Supplement. 35. 327-334.
- Evans, T. J., Constantinescu, G. M., Ganjam, V. K. 1997. Clinical reproductive anatomy and physiology of the mare. In: Youngquist, R., S. (ed.). Current Therapy in Large Animals Theriogenology. WB Saunders. Philadelphia. p. 46 – 47. ISBN: 0721653969.
- Ewert, M., Böröcz, J., Uphaus, H., Oldenhof, H., Distl, O., Sieme, H. 2013. Factors affecting pregnancy rates in the German Thoroughbred Breed. Tierärztliche Praxis Großtiere. 41(3). 147-152.
- Fantone, J. C., Ward, P. A. 1994. Inflammation. In: Farber, R. E. (ed.). Pathology. 2nd ed. JP Lippincott. Philadelphia. p. 33-36. ISBN: 0397510474.
- Favre-Bonte, S., Joly, B., Forestier, C. 1999. Consequences of reduction of *Klebsiella pneumoniae* capsule expression on interactions of this bacterium with epithelial cells. Infection and Immunity. 67 (2). 554 - 561.
- Feghali, C. A., Wright, T. M. 1997. Cytokines in acute and chronic inflammation. Frontiers of Bioscience. 2 (1). d12-d26.

- Ferreira, J. C., Gastal, E. L., Ginther, O. J. 2008. Uterine blood flow and perfusion in mares with uterine cysts: effect of the size of the cystic area and age. *Reproduction*. 135 (4). 541-550.
- Fiala, S. M., Pimentel, C. A., Mattos, A. L. G., Gregory, R. M., Mattos, R. C. 2007. Effect of sperm numbers and concentration on sperm transport and uterine inflammatory response in the mare. *Theriogenology*. 67 (3). 556-562.
- Fradinho, M. J., Correia, M. J., Grácio, V., Bliebernicht, M., Farrim, A., Mateus, L., Martin-Rosset, W., Bessa, R. J. B., Caldeira, R. M., Ferreira-Dias, G. 2014. Effect of body condition and leptin on the reproductive performance of Lusitano mares on extensive system. *Theriogenology*. 81 (9). 1214-1222.
- Frandsen, R. D., Wilke, L. W., Fails, A. D. 2009. *Anatomy and Physiology of Farm Animals*. Wiley-Blackwell. Iowa. p. 512. ISBN: 0813813943.
- Freeman, D. A., Woods, G. L., Vanderwall, D. K., Weber, J. A. 1992. Embryo-initiated oviductal transport in mares. *Journal of Reproduction and Fertility*. 95 (2). 535-538.
- Fumuso, E. A., González, C., Videla Dorna, I., Inchausti, E., Tallarico, M., Berestin, V., Wade, J., Aguilar, J., Losinno, L., Soto, P., Bowden, R. A., 2000. Effect of an immunomodulator in mares resistant and susceptible to endometritis. In: *Proceedings of the Second International Conference on Experimental and Clinical Reproduction Immunobiology*. 15-18.
- Fumuso, E. A., Aguilar, J., Giguère, S., Rivulgo, M., Wade, J., Rogan, D. 2007. Immune parameters in mares resistant and susceptible to persistent post-breeding endometritis: effects of immunomodulation. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 118 (1). 30-39.
- Ginther, O. J. 1992. *Reproductive Biology of the Mare: Basic and Applied Aspects*. 2nd ed. Cross Plains. Equiservices Publishing. p. 642. ISBN:0964007215.
- Ginther, O. J. 1995. *Ultrasonic Imaging and Animal Reproduction: Horses book 2*. Equiservices Publishing. USA. p. 394. ISBN: 0964007246.

- Ginther, O. J., Gastal, E. J., Gastal, M. O., Beg, M. A. 2005. Regulation of circulating gonadotropins by the negative effects of ovarian hormones in mares. *Biology of Reproduction*. 73 (2). 315 – 323.
- Ginther, O. J., Gastal, M. O., Beg, M. A. 2008. Dynamics of the equine preovulatory follicle and periovulatory hormones: what's new? *Journal of Equine Veterinary Science*. 28 (8). 454 – 460.
- Ginther, O. J., Almamun, M., Shahiduzzaman, A. K. M., Beg, M. A. 2010. Disruption of the periovulatory LH surge by a transient increase in circulating 17 β -estradiol at the time of ovulation in the mares. *Animal Reproduction Science*. 117 (1). 178 – 182.
- Ginther, O. J., Hannan, M. A., Beg, M. A. 2011. Luteolysis and associated interrelationships among circulating PGF 2α , progesterone, LH, and estradiol in mares. *Domestic Animal Endocrinology*. 41, 174–84.
- Hafez, E. S. E., Hafez, B. 2000. Horses. In: Hafez, E. S. E., Hafez, B. (eds.). *Reproduction in Farm Animals*. 7th ed. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia. p. 192-217. ISBN: 0683305778.
- Hedberg, Y., Dalin, A. M., Forsberg, M., Lundeheim, N., Sandh, G., Hoffmann, B., Ludwig, C., Kindahl, H. 2007. Effect of ACTH (tetracosactide) on steroid hormone levels in the mare: Part B: Effect in ovariectomized mares (including estrous behavior). *Animal Reproduction Science*. 100 (1). 92-106.
- Heidler, B., Aurich, J. E., Pohl, W., Aurich, C. 2004. Body weight of mares and foals, estrous cycles and plasma glucose concentration in lactating and non-lactating Lipizzaner mares. *Theriogenology*. 61 (5). 883-893.
- Hemberg, E., Lundeheim, N., Einarsson, S. 2005. Retrospective study on vulvar conformation in relation to endometrial cytology and fertility in thoroughbred mares. *Journal of Veterinary Medicine Series A., Physiology, Pathology, Clinical Medicine* 52 (9). 474-477.
- Henneke, D. R., Potter, G. Kreider, J. L. 1984. Body condition during pregnancy and lactation and reproductive efficiency of mares. *Theriogenology*. 21 (6). 897-909.

- Hurtgen, J. P. 2006. Pathogenesis and treatment of endometritis in the mare: a review. *Theriogenology*. 66 (3). 560-566.
- Ishii, M., Shimamura, T., Utsumi, A., Jitsukawa, T., Endo, M., Fukuda, T., Yamanoi, T. 2001. Reproductive performance and factors that decrease pregnancy rate in heavy draft horses bred at the foal heat. *Journal of Equine Veterinary Science*. 21 (3). 131-136.
- Kalirajan, R., Rajasundaram, R. C. 2008. Incidence of endometritis in relation to age and Caslick index in mares. *Indian Veterinary Journal*. 85 (8). 893–894.
- Katila, T. 1995. Onset and duration of uterine inflammatory response of mares after insemination with fresh semen. *Biology Reproduction Monograph 1. Equine Reproduction VI*. 515-517.
- Katila, T. 1997. Interactions of the uterus and semen. *Pferdeheilkunde*. 13 (5). 508-511.
- Katila, T. 2001. Sperm-uterine interactions: a review. *Animal Reproduction Science*. 68 (3). 267-272.
- Kenney, R. M., Doig, P. A. 1986. Equine endometrial biopsy. In: Morrow, D. A. (ed.). *Current Therapy in Theriogenology: Diagnosis, Treatment, and Prevention of Reproductive Diseases in Small and Large Animals*. 2nd ed. W.B. Saunders, Philadelphia. p. 723–729. ISBN: 0721665801.
- Kimura, J., Hirano, Y., Takemoto, S., Nambo, Y., Ishinazaka, T., Mishima, T., Tsumagar, S., Yokota, H. 2005. Three – dimensional reconstruction of the equine ovary. *Anatomia, Histologia, Embryologia*. 34 (1). 48 – 51.
- King, S. S., Young, D. A., Nequin, L. G., Carnevale, E. M. 2000. Use of specific sugars to inhibit bacterial adherence to equine endometrium in vitro. *American Journal of Veterinary Research*. 61 (4). 446 – 449.
- Knutti, B., Pycocock, J. F., Paccamonti, D., Jonker, H., Van der Weijden, G. C. 1997. The influence of early post-breeding uterine lavage on uterine fluid accumulation in the mare highly susceptible to acute endometritis. *Pferdeheilkunde*. 13. 545-545.

- Ko, J. C. H., Lock, T. F., Davis, J. L., Smith, R. P. 1989. Spontaneous and oxytocin-induced uterine motility in cyclic and postpartum mares. *Theriogenology*. 32 (4). 643-651.
- Kooistra, L. H., Ginther, O. J. 1975. Effect of artificial light on the oestrus cycle of the mare. *Journal of Reproduction and Fertility*. Supplement. 23. 231 – 246.
- Kotilainen, T., Huhtinen, M., Katila, T. 1994. Sperm induced leukocytosis in the equine uterus. *Theriogenology*. 41 (3). 629-636.
- Kudláč, E., Elečko, J. (eds.). 1987. *Veterinární porodnictví a gynekologie*. Státní zemědělské nakladatelství. Praha. 576 s. ISBN: 0705387.
- Langlois, B., Blouin, C. 2004. Statistical analysis of some factors affecting the number of horse births in France. *Reproduction Nutrition Developement*. 44 (6). 583–595.
- LeBlanc, M. M. 2008. When to refer an infertile mare to a theriogenologist. *Theriogenology*. 70 (3). 421-429.
- LeBlanc, M. M., McKinnon, A. O. 2011. Breeding the problém mare. In: McKinnon, A. O., Squires, E. L., Vaala, W. E., Varner, D. D. (eds.). *Equine Reproduction*. 2nd ed. John Wiley & Sons. Unoted Kingdom. p. 2620-2642. ISBN: 0813819716.
- LeBlanc, M. M., Neuwirth, L., Asbury, A. C., Tran, T., Mauragis, D., Klapstein, E. 1994. Scintigraphic measurement of uterine clearance in normal mares and mares with recurrent endometritis. *Equine Veterinary Journal*. 26 (2). 109–113.
- LeBlanc, M. M., Johnson, R. D., Mays, M. B. C., Valderrama, C. 1995. Lymphatic clearance of India ink in reproductively normal mares and mares susceptible to endometritis. *Biology of Reproduction*. 1. 501-506.
- LeBlanc, M. M., Neuwirth, L., Jones, L., Cage, C., Mauragis, D. 1998. Diffecences in uterine position of reproductively normal mares and those with delayed uterine cleatance detected by scintigraphy. *Theriogenology*. 50 (1). 49-54.
- Lehrer, R. I. 1988. Neutrophipls and host defense. *Annals of International Medicine*. 109. 127-142.

- Leipold, S. D., Graham, J. K., Squires, E. L., McCue, P. M., Brinsko, S. P., Vanderwall, D. K. 1998. Effect of spermatozoal concentration and number on fertility of frozen equine semen. *Theriogenology*. 49 (8). 1537-1543.
- Li, D., Liu, Y., Li, Y., Lv, Y., Pei, X., Guo, D. 2010. Significance of nitric oxide concentration in plasma and uterine secretes with puerperal endometritis in dairy cows. *Veterinary Research Communications*. 34 (4). 315-321.
- Lindsey, A. C., Bruemmer, J. E., Squires, E. L. 2001. Low dose insemination of mares using non-sorted and sex-sorted sperm. *Animal Reproduction Science*. 68(3). 279-289.
- Lindsey, A. C., Schenk, J. L., Graham, J. K., Bruemmer, J. E., Squires, E. L. 2002. Hysteroscopic insemination of low numbers of flow sorted fresh and frozen/thawed stallion spermatozoa. *Equine Veterinary Journal*. 34 (2). 121-127.
- Liu, I. K. M., Troedsson, M. H. T. 2008. The diagnosis and treatment of endometritis in the mare: Yesterday and today. *Theriogenology*. 70 (3). 415 - 420.
- Lyle, S. K. 2011. Immunological consideration. In: McKinnon, A. O., Squires, E. L., Vaala, W. E., Varner, D. D. (eds.). *Equine Reproduction*. 2nd ed. John Wiley & Sons. United Kingdom. p. 2587-2596. ISBN: 0813819716.
- MacKay, R. J. 2000. Inflammation in horses. *The Veterinary Clinics of North America. Equine Practice*. 16 (1). 15-27.
- Macpherson, M. L. 2005. Treatment strategies for mares with placentitis. *Theriogenology*. 64 (3). 528 -534.
- Madill, S., Troedsson, M. H., Alexander, S. L., Shand, N., Santschi, E. M., Irvine, C. H. 2000. Simultaneous recording of pituitary oxytocin secretion and myometrial activity in oestrous mares exposed to various breeding stimuli. *Journal of Reproduction and Fertility. Supplement*. 56. 351-361.
- Madsen, M., Christensen, P. 1995. Bacterial flora of semen collected from Danish warmblood stallions by artificial vagina. *Acta Veterinaria Scandinavica*. 36 (1). 1-7.

- Malpaux, B. 2006. Seasonal regulation of reproduction in mammals. In: Neill, J. D., Challis, J. R. G., Pfaff, D. W., Plant, T. M., de Kretser, D. M., Richards, J. S., Wassarman, P. M. (eds.). *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. 3rd ed. Elsevier Academic Press. United Kingdom. p. 2231-2281. ISBN: 0125154024.
- Marvan, F., Hampl, A., Hložánková, E., Kresan, J., Massanyi, L., Vernerová, E. 2011. *Morfologie hospodářských zvířat*. Brázda. Praha. 304 s.+24 s. přílohy. ISBN: 8021321885.
- Metcalf, E. 2003. Artificial Insemination of the Mare with Shipped Semen. In: Robinson, N., E. (ed.). *Current Therapy in Equine Medicine*. 5th ed. Elsevier Health Sciences. USA. p. 271 - 276. ISBN: 0721695402.
- Merkt, H., Jacobs, K. O., Klug, E., Aukes, E. 1978. An analysis of stallion fertility rates (foals born alive) from the breeding documents of the Landgestut Celle over a 158-year period. *Journal of Reproduction and Fertility*. Supplement. 27. 73-77.
- McEntee, K. 1990. *Reproductive Pathology of Domestic Mammals*. Academic Press. California. p. 401. ISBN: 0124833753.
- McKinnon, A. O., Voss, J. L. 1993. *Equine Reproduction*. Lea and Febiger. Philadelphia. p. 1100. ISBN: 0812114270.
- Mitchell, G., Liu, I. K., Perryman, L. E., Stabenfeldt, G. H., Hughes, J. P. 1981. Preferential production and secretion of immunoglobulins by the equine endometrium--a mucosal immune system. *Journal of Reproduction and Fertility*. Supplement. 32. 161-168.
- Monin, T. 1972. Vaginoplasty: a surgical treatment for urine pooling in the mare. *Proceeding of American Association of Equine Practitioners*. 18. 99-102.
- Morel, M. D. 1993. *Equine Reproductive Physiology, Breeding and Stud Management*. Farming Press. Ipswich. p. 450. ISBN: 0852362556.
- Morel, M. D. 2005. *Breeding horses*. Blackwell Publishing Ltd. Oxford. p. 224. ISBN: 1405129664.
- Morel, M. C. D. 2008. *Equine Reproductive Physiology, Breeding and Stud Management*. 3rd ed. CABI. USA. p. 359. ISBN: 1845934507.

- Morel, M. D., Gunnarsson, V. 2000. A survey of the fertility of Icelandic stallions. *Animal Reproduction Science*. 64 (1). 49-64.
- Morris, L. H. A., Allen, W. R. 2002. Reproductive efficiency of intensively managed Thoroughbred mares in Newmarket. *Equine Veterinary Journal*. 34 (1). 51-60.
- Morris, L. H. A., Tiplady, C., Allen, W. R. 2003. Pregnancy rates in mares after a single fixed time hysteroscopic insemination of low numbers of frozen-thawed spermatozoa onto the uterotubal junction. *Equine Veterinary Journal*. 35 (2). 197-201.
- Murata, H., Shimada, N., Yoshioka, M. 2004. Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview. *Veterinary Journal*. 168 (1). 28-40.
- Nath, L. C., Anderson, G. A., McKinnon, A. O. 2010. Reproductive efficiency of Thoroughbred and Standardbred horses in north-east Victoria. *Australian Veterinary Journal*. 88 (5). 169 – 175.
- Neely, D. P., Kindahl, H., Stabenfeldt, G. H., Edqvist, L. E., Hughes, J. P. 1979. Prostaglandin release patterns in the mare: physiological, pathophysiological, and therapeutic responses. *Journal of Reproduction and Fertility*. Supplement. 27. 181-189.
- Newcombe, J. R. 1999. Practical evaluation of the fertilising capacity of frozen-thawed horse semen. *Veterinary record*. 145 (2). 46-47.
- Nie, G., Sharp, D. C., Robinson, G., Cleaver, B. D., Porter, M. B. 2007. Clinical Aspects of Seasonality in Mares. In: Younquist, R. S., Threlfall, W. R. (eds.). *Current Therapy in Large Animal Theriogenology*. 7nd ed. Saunders Elsevier. St. Louis. p. 68-73. ISBN: 0721693231.
- Niekerk van, F. E., Niekerk van, C. H. 1998. The effect of dietary protein on reproduction in the mare. VII. Embryonic development, early embryonic death, foetal losses and their relationship with serum progesterone. *Journal of the South African Veterinary Association*. 69 (4). 150-155.

- Nikolakopoulos, E., Watson, E. D. 1999. Uterine contractility is necessary for the clearance of intrauterine fluid but not bacteria after bacterial infusion in the mare. *Theriogenology*. 52 (3). 413-423.
- Nikolakopoulos, E., Watson, E. D. 2000. Effect of infusion volume and sperm numbers on persistence of uterine inflammation in mares. *Equine Veterinary Journal*, 32 (2). 164-166.
- Noakes, D. 2001. Pregnancy and its diagnosis. In: Noakes, D., E., Parkinson, T. J., England, G. C., W. (eds.). *Arthur's Veterinary Reproduction and Obstetrics*. 8th ed. W.B. Saunders Company. Philadelphia. p. 69–118. ISBN: 0702028878.
- Parlevliet, J. M., Kemp, B., Colenbrander, B. 1994. Reproductive characteristics and semen quality in maiden Dutch Warmblood stallions. *Journal of Reproduction and Fertility*. 101 (1). 183-187.
- Parlevliet, J. M., Tremoleda, J. M., Cheng, F. P. 1997. Influence of semen, extender and seminal plasma on the defence mechanism of the mare's uterus. *Pferdeheilkunde*. 13. 540.
- Pascoe, R. R. 1979. Observations of the length and the angle of declination of the vulva and its relation to fertility of the mare. *Journal of Reproduction and Fertility*. Supplement. 27. 299-305.
- Pickett, B. W., Voss, J. L., Squires, E. L., Vanderwall, D., McCue, P. M., Bruemmer, J. E. 2000. Collection, preparation and insemination of stallion semen. Bulletin no. 10. Fort Collins, CO: Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory. p. 94–95.
- Petersen, H. H., Nielsen, J. P., Heegaard, P. M. 2004. Application of acute phase protein measurements in veterinary clinical chemistry. *Veterinary Research*. 35 (2). 163–187.
- Portus, B. J., Reilas, T., Katila, T. 2005. Effect of seminal plasma on uterine inflammation, contractility and pregnancy rates in mares. *Equine Veterinary Journal*, 37 (6). 515-519.
- Pycock, J. F. 2001. Infertility in the mare. In: Noakes, D. E., Parkinson, T. J., England, G. C. W. (eds.). *Arthur's Veterinary Reproduction and Obstetrics*. Saunders. 8th ed. St. Louis. p. 577-620. ISBN: 0702025563.

- Pycock, J. F. 2007. Therapy for Mares with Uterine Fluid. In: Samper, J. C., Pycock, J. F., McKinnon, A. O. (eds.). *Current Therapy in Equine Reproduction*. Saunders Elsevier. St. Louis. p. 93-104. ISBN: 0721602523.
- Pycock, J. F., Allen, W. E. 1988. Pre-chemotactic and chemotactic properties of uterine fluid from mares with experimentally induced endometritis. *Veterinary Records*. 123. 193-195.
- Pycock, J. F., Allen, W. E. 1999. Inflammatory components in uterine fluid from mares with experimentally induced bacterial endometritis. *Equine Veterinary Journal*. 22 (6). 422-425.
- Pycock, J. F., Newcombe, J. R., 1996. The relationship between intraluminal uterine fluid, endometritis, and pregnancy rate in the mare. *Equine Practice*. 18. 19–22.
- Rambags, B. P. B., Krijtenburg, P. J., Van Drie, H. F., Lazzari, G., Galli, C., Pearson, P. L., Colenbrander, B., Stout, T. A. E. 2005. Numerical chromosomal abnormalities in equine embryos produced in vivo and in vitro. *Molecular Reproduction and Development*. 72 (1). 77-87.
- Ramirez, S., Sedrish, S. A., Paccamonti, D. L., French, D. D. 1999. Ultrasound as an aid for diagnosis of ovarian abscesses in two mares. *Veterinary Radiology and Ultrasound*. 40 (2). 165-168.
- Rantanen, N. W., McKinnon, A. O. 1998. *Equine diagnostic ultrasonography*. Williams & Wilkins. p. 677. ISBN: 0683071238.
- Reece, W. O. 2011. *Fyziologie a funkční anatomie domácích zvířat*. 2. rozšířené vydání. Grada Publishing. Praha. 480 s. ISBN: 8024732824.
- Ricketts, S. W., Alonso S. 1991. The effect of age and parity on the development of equine chronic endometrial disease. *Equine Veterinary Journal*. 23 (3). 189-192.
- Riddle, W. T., LeBlanc, M. M., Stromberg, A. J. 2007. Relationships between uterine culture, cytology and pregnancy rates in a Thoroughbred practice. *Theriogenology*. 68 (3). 395-402.

- Rigby, S. L., Derczo, S., Brinsko, S., Blanchard, T., Taylor, T., Forrest, D. W., Varner, D. 2000. Oviductal sperm numbers following proximal uterine horn or uterine body insemination. *Proceedings of the American Association on Equine Practice*. San Antonio. 46. p. 332–334.
- Roberts, R. M., Xie S., Mathialagan, N. 1996. Maternal recognition of pregnancy. *Biology of Reproduction*. 54 (2). 294-302.
- Rogan, D., Fumuso, E., Rodriguez, E., Wade, J., Bruni, S. S. 2007. Use of a mycobacterial cell wall extract (MCWE) in susceptible mares to clear experimentally induced endometritis with *Streptococcus zooepidemicus*. *Journal of Equine Veterinary Science*. 27 (3). 112-117.
- Rozeboom, K. J., Troedsson, M. H. T., Crabo, B. G. 1998. Artificial insemination induces a post-mating inflammatory response in gilts. *Journal of Animal Science*. 76. 66.
- Rozeboom, K. J., Troedsson, M. H., Rocha, G. R., Crabo, B. G. 2001. The chemotactic properties of porcine seminal components toward neutrophils in vitro. *Journal of Animal Science*. 79 (4). 996-1002
- Samper, J. C. 2000. *Equine Breeding Management and Artificial Insemination*. WB Saunders. Philadelphia.
- Samper, J. C. 2001. Management and fertility of mares bred with frozen semen. *Animal reproduction science*. 68 (3). 219-228.
- Samper, J. C. 2007. Techniques for Artificial Insemination. In: Youngquist, R. S., Threlfall, W. R. (eds.). *Current Therapy in Large Animal Theriogenology*. Saunders Elsevier. St. Louis. p. 37-42. ISBN: 0721693231.
- Samper, J. C., Vidament, M., Katila, T., Newcombe, J., Estrada, A., Sargeant, J. 2002. Analysis of some factors associated with pregnancy rates of frozen semen: a multi-centre study. *Theriogenology*. 58. 647–650.
- Samper, J. C., Pycock, J. F. 2007. The normal uterus in estrus. In: Samper, J., Pycock, J. F., McKinnon, A. O. (eds.). *Current Therapy in Equine Reproduction*. Saunders Elsevier. St. Louis. p. 32 – 35. ISBN: 0721602523.

- Scott, M. A., Liu, I. K. M., Overstreet, J. W. 1995. Sperm transport to the oviducts: abnormalities and their clinical implication. *Proceeding American Association of Equine Practitioners*. 41. 1-2.
- Sharma, S., Dhaliwal, G. S., Dadarwal, D. 2010. Reproductive efficiency of Thoroughbred mares under Indian subtropical conditions: A retrospective survey over 7 years. *Animal Reproduction Science*. 117 (3). 241-248.
- Scheytt, A. F., Gilbert, R. O. 1995. Stallion seminal plasma as a factor in the pathogenesis of equine endometritis. *Proceeding of Society for Theriogenology*. 306.
- Schlafer, D. H. 2007. Equine endometrial biopsy: Enhancement of clinical value by more extensive histopathology and application of new diagnostic techniques? *Theriogenology*. 68 (3). 413-422.
- Schroder, K., Hertzog, P. J., Ravasi, T., Hume, D. A. 2004. Interferone-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *Journal of Leukocyte Biology*. 75. 163-189.
- Schweizer, Ch. M., Cable, Ch. S., Squires, E. L. 2006. *Breeder's guide to mare, foal and stallion care*. Eclipse Press. United States. p. 382. ISBN: 1581501438.
- Stahlbaum, C., Houpt, K. A. 1989. The role of the flehmen response in the behavioral repertoire of the stallion. *Physiology and Behavior*. 45 (6), 1207 – 1214.
- Steward, D. R., Stabenfeldt, G. H., Hughes, J. P., Meagher, D. M. 1982. Determination of the Source of Equine Relaxin. *Biology of Reproduction*. 27 (1). 17-24.
- Squires, E. L., Barnes, C. K., Rowley, H. S., McKinnon, A. O., Pickett, B. W., Shideler, R. K. 1989. Effect of uterine fluid and volume of extender on fertility. *Proceedings of the 45th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners (USA)*. 25-30.
- Squires, E. L., Brubaker, J. K., McCue, P. M., Pickett, B. W. 1998. Effect of sperm number and frequency of insemination on fertility of mares inseminated with cooled semen. *Theriogenology*. 49 (4). 743-749.

- Tibary, A., Fite, Ch., L. 2007. Reproductive Tract Infections. In: Sellon, D. C., Long, M. T. (eds.). *Equine Infectious Diseases*. Saunders Elsevier. Missouri. p. 84-103. ISBN: 1416024064.
- Thomas, P. G., Ball, B. A., Brinsko, S. P. 1994. Interaction of equine spermatozoa with oviduct epithelial cell explants is affected by estrous cycle and anatomic origin of explant. *Biology of Reproduction*. 51 (2). 222-228.
- Townson, D. H., Pierson, R. A., Ginther, O. J. 1989. Characterization of plasma progesterone concentrations for two distinct luteal morphologies in mares. *Theriogenology*. 32 (2). 197-204.
- Traub-Dargatz, J. L., Salman, M. D., Voss, J. L. 1991. Medical problems of adult horses, as ranked by equine practitioners. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 198 (10). 1745-1747.
- Troedsson, M. H. T. 1995. Uterine response to semen deposition in the mare. *Proceeding Society for Theriogenology*. 130-135.
- Troedsson, M. H. T. 1997. Therapeutic considerations for mating-induced endometritis. *Pferdeheilkunde*. 13. 516-520.
- Troedsson, M. H. T. 1999. Uterine clearance and resistance to persistent endometritis in the mare. *Theriogenology*. 52 (3). 461-471.
- Troedsson, M. H. 2006. Breeding-induced endometritis in mares. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*. 22 (3). 705-712.
- Troedsson, M. H. T. 2011. Endometritis. In: McKinnon, A. O., Squires, E. L., Vaala, W. E., Varner, D. D. (eds.). *Equine Reproduction*. 2nd ed. Wiley-Blackwell. United Kingdom. p. 2608-2619. ISBN: 0813819716.

Troedsson, M. H., Liu, I. K. 1991. Uterine clearance of non-antigenic markers (Cr^{51}) in response to a bacterial challenge in mares potentially susceptible and resistant to chronic uterine infections. *Journal of Reproduction and Fertility*. Supplement. 44, 283-288.

Troedsson, M. H., deMoraes, M. J., Liu, I. K. 1993a. Correlations between histologic endometrial lesions in mares and clinical response to intrauterine exposure with *Streptococcus zooepidemicus*. *American Journal of Veterinary Research*. 54 (4). 570-572.

Troedsson, M. H. T., Liu, I. K. M., Ing, M., Pascoe, J., Thurmond, M. 1993b. Multiple site electromyography recordings of uterine activity following an intrauterine bacterial challenge in mares susceptible and resistant to chronic uterine infection. *Journal of Reproduction and Fertility*. 99 (2). 307-313.

Troedsson, M. H., Liu, I. K., Thurmond, M. 1993c. Function of uterine and blood derived polymorphonuclear neutrophils (PMN) in mares susceptible and resistant to chronic uterine infection: phagocytosis and chemotaxis (CUI). *Biology of Reproduction*. 49 (3). 507-514.

Troedsson, M. H., Liu, I. K., Thurmond, M. 1993d. Immunoglobulin (IgG and IgA) and complement (C3) concentrations in uterine secretion following an intrauterine challenge of *Streptococcus zooepidemicus* in mares susceptible to versus resistant to chronic uterine infection. *Biology of Reproduction*. 49 (3). 502-506.

Troedsson, M. H. T., Scott, M. A., Liu, I. K. 1995a. Comparative treatment of mares susceptible to chronic uterine infection. *American Journal of Veterinary Research*. 56 (4). 468-472.

Troedsson, M. H. T., Steiger, B. N., Ibrahim, N. M., King, V. L., Foster, D. N., Crabo, B. G. 1995b. Mechanism of sperm-induced endometritis in the mare. *Biology of Reproduction*. 52 (1). 307.

Troedsson, M. H., Liu, I. K., Crabo, B. G. 1998. Sperm transport and survival in the mare: a review. *Theriogenology*. 50 (5). 807-818.

- Troedsson, M. H. T., Lee, C. S., Franklin, R., Crabo, B. G. 2000. Post-breeding uterine inflammation: the role of seminal plasma. *Journal of Reproduction and Fertility*. 56. 341-349.
- Troedsson, M. H. T., Loset, K., Alghamdi, A. M., Dahms, B., Crabo, B. G. 2001. Interaction between equine semen and the endometrium: the inflammatory response to semen. *Animal Reproduction Science*. 68 (3). 273-278.
- Troedsson, M. H. T., Desvousges, A., Alghamdi, A. S., Dahms, B., Dow, C. A., Hayna, J., Valesco, R., Collahan, P. T., Macpherson, M. L., Pozor, M., Buhi, W. C. 2005. Components in seminal plasma regulating sperm transport and elimination. *Animal Reproduction Science*. 89 (1). 171-186.
- Tuppits, U., Orro, T., Einarsson, S., Kask, K., Kavak, A. 2014. Influence of the uterine inflammatory response after insemination with frozen-thawed semen on serum concentrations of acute phase proteins in mares. *Animal Reproduction Science*. 146 (3 - 4). 182 - 186.
- Waelchli, R. O., Winder, N. C. 1991. Mononuclear cell infiltration of the equine endometrium: Immunohistochemical studies. *Equine Veterinary Journal*. 23 (6). 470-474.
- Waites, G. T., Bell, S. C. 1982. Glycoken-induced intrauterine leukocytosis and its effect on mouse blastocysts implantation in vivo and in vitro. *Journal of Reproduction and Fertility*. 66. 563-569.
- Watson, E. D. 1994. Infertility in the mare. *Journal of Comparative Pathology*. 111 (4). 333-351.
- Watson, E. D. 2000. Post-breeding endometritis in the mare. *Animal Reproduction Science*. 60 – 61. 221 – 232.
- Watson, P. F. 2000. The cause of reduced fertility in cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science*. 60-61. 481-492.
- Watson, E. D., Stokes, C. R., Bourne, F. J. 1987. Cellular and humoral defence mechanisms in mares susceptible and resistant to persistent endometritis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 16 (1). 107-121.

- Watson, E. D., Hinrichs, K. 1988. Changes in the concentrations of steroids and prostaglandin F in preovulatory follicles of the mare after administration of hCG. *Journal of Reproduction and Fertility*. 84 (2). 557-561.
- Watson, E. D., Tromson, S. R. 1996. Lymphocyte subsets in the endometrium of genitally normal mares and mares susceptible to endometritis. *Equine Veterinary Journal*. 28 (2). 106-110.
- Watson, E. D., Barbacini, S., Berrocal, B., Sheerin, O., Marchi, V., Zavaglia, G., Necchi, D. 2001. Effect of insemination time of frozen semen on incidence of uterine fluid in mares. *Theriogenology*. 56 (1). 123-131.
- Widders, P. R., Stokes, C. R., David, J. S., Bourne, F. J. 1985. Specific antibody in the equine genital tract following systemic and local immunization. *Immunology*. 54 (4). 763-769.
- Williamson, P., Duning, A., O'Conner, J., Penhale, W. J. 1983. Immunoglobulin levels, protein concentrations and alkaline phosphatase activity in uterine flushings from mares with endometritis. *Theriogenology*. 19 (3). 441-448.
- Williams, G. L., Thorson, J. F., Prezotto, L. D., Velez, I. C., Cardoso, R. C., Amstalden, M. 2012. Reproductive seasonality in the mare: neuroendocrine basis and pharmacologic control. *Domestic Animal Endocrinology*. 43 (2). 103-115.
- Wingfield, D. N., Ricketts, S. W. 1982. Results of concurrent bacteriological and cytological examinations of the endometrium of mares in routine stud farm practice 1978-1981. *Journal of Reproduction and Fertility*. Supplement. 32. 181-185.
- Witte, T. S., Melkus, E., Walter, I., Senge, B., Schwab, S., Aurich, C., Heuwieser, W. 2012. Effects of oral treatment with N-acetylcysteine on the viscosity of intrauterine mucus and endometrial function in estrous mares. *Theriogenology*. 78 (6). 1199-1208.
- Woods, J., Rigby, S., Brinsko, S., Stephens, R., Varner, D., Blanchard, T. 2000. Effect of intrauterine treatment with prostaglandin E₂ prior to insemination of mares in the uterine horn or body. *Theriogenology*. 53 (9). 1827-1836.

Woodward, E. M., Christoffersen, M., Campos, J., Bentancourt, A., Horohov, D., Scoggin, K. E., Squires, E., Troedsson, M. H. T. 2011. Endometrial Cytokine Expression in Mares with Different Resistance to Persistent Breeding Induced Endometritis (PBIE) at Multiple Time Points after Insemination. Annual Meeting Proceeding for The Society for the Study of Reproduction. 44. 18-19.

Woodward, E. M., Christoffersen, M., Campos, J., Squires, E. L., Troedsson, M. H. T. 2012. Susceptibility to persistent breeding-induced endometritis in the mare: relationship to endometrial biopsy score and age, and variations between seasons. *Theriogenology*. 78 (3). 495-501.

Woodward, E., M., Troedsson, M., H. 2013. Equine Breeding-Induced Endometritis: A Review. *Journal of Equine Veterinary Science*. 33 (9). 673–682.

Woodward, E., M., Troedsson, M., H. 2014. Inflammatory mechanisms of endometritis. *Equine Veterinary Journal*. Doi: 10.1111/evj. 12403.

Yuksel, Z. S., Buber, E., Kocagoz, T., Alp, A., Saribas, Z., Acan, N. L. 2011. Mycobacterial strains that stimulate the immune system most efficiently as candidates for the treatment of bladder cancer. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*. 20 (1). 24-28.

Zavy, M. T., Bazer, F. W., Thatcher, W. W. 1978. Uterine luminal prostaglandin F in cycling mare. *Prostaglandins*. 16 (4). 643 – 649.

Zent, W. W., Troedsson, M. H., Xue, J. L. 1998. Postbreeding uterine fluid accumulation in a normal population of Thoroughbred mares: a field study. *Proceeding American Association of Equine Practitioners*. 44. 64-65.