

Česká zemědělská univerzita v Praze
Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních
zdrojů

Katedra speciální zootechniky



Biotechnologické metody v chovu koní

Bakalářská práce

Autor práce: Hana Vonšovská

Vedoucí práce: Ing. Martina Janošíková

© 2017 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

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

V Praze dne 12. dubna 2017

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala Ing. Martině Janošíkové za pomoc při psaní mé bakalářské práce.

Biotechnologické metody v chovu koní

Souhrn

Cílem této práce je vytvořit literární přehled o biotechnologických metodách, využívaných v reprodukci koní. Pro jejich správné využití je třeba vycházet z anatomie a fyziologie reprodukčních orgánů koní a reprodukčního cyklu. Metody využívané v reprodukci koní jsou přirozená plemenitba, umělá inseminace, embryotransfer a klonování.

Umělá inseminace je nejrozšířenější metodou. Dělíme ji na inseminaci čerstvým, chlazeným nebo mraženým spermatem. Inseminace čerstvým spermatem imituje přirozenou reprodukci. Po odběru hřebce je sperma ihned zavedeno do reprodukčních orgánů klisny. Chlazené sperma se obvykle používá během 24 hodin, aplikuje se zředěné. Mezi výhody patří možnost převozu na kratší vzdálenosti a větší počet inseminačních dávek z jednoho skoku. Mražené inseminační dávky jsou uchovávány v tekutém dusíku. Výhodou mražené dávky je možnost převážení na dlouhé vzdálenosti a uchovávat je po libovolně dlouhou dobu. Nevýhodou je různá citlivost spermií a individualita hřebců na jednotlivé komponenty ředidel. Pro spermie hřebců jsou některé z těchto látek toxické.

Embryotransfer otevřel možnost pro klisny, které z různých důvodů nemohou odchovat své potomky. Základní postup je takový, že klisna dárkyně, od které chceme získat potomstvo, je připuštěna a po cca 7 dnech je embryo odebráno. Odebrané embryo je vloženo do klisny příjemkyně, která jej odnese až do porodu. Pokud klisna, kterou chceme reprodukovat, není schopna ani krátké březosti pro tvorbu embrya, je možné odebrat pouze oocyty a metodou ICSI oplodnit oocyt in vitro. Získaná embryo lze kryokonzervovat a využít později.

V poslední době se vědecký výzkum zabývá i metodou klonování koní. Ta je nákladná na vybavení a pracovníky. Zatím nemá výrazné praktické využití.

Technologie využívané v reprodukci koní jsou stále zdokonalovány a dávají chovatelům koní široké možnosti v jejich úspěšné reprodukci.

Klíčová slova: umělá inseminace, embryotransfer, reprodukční cyklus, klisna.

Biotechnology in horses breeding

Summary

The goal of this project is to summarize biotechnological methods used in horse breeding. For a correct understanding of these methods, good knowledge of the reproductive organs anatomy and physiology and reproductive cycle of horses. Methods used in equine reproduction are natural breeding, artificial insemination, embryo transfer and cloning.

Artificial insemination is the most widespread method. We divided it to insemination using fresh semen, cooled or frozen semen. Insemination using fresh semen imitates natural breeding. After the stallion collection, the semen is immediately introduced into the mare reproductive organs. Cooled semen is usually being used within 24 hours, applied diluted. The advantage is possibility of short distance transport and more insemination doses of one collection. Frozen insemination doses are stored in liquid nitrogen. The advantage frozen doses is that can be transported at any distance and may be kept for a long time. The disadvantage is various sensitivity of sperm and stallions individuality to components in semen extenders. For stallions sperm are some of these substances toxic.

The embryo transfer method opened a possibility for mares, which, for various reasons, can't bear their own offspring. The basic procedure is that the donor mare, from which we obtain offspring, is fertilized and after approximately seven days the embryo is taken and introduced into the recipient mare, which will bear the until the delivery. If the mare, which we want to breed, isn't capable even of short gestation to create the embryo, there is a possibility to take just the oocytes and by the ICSI method fertilize the oocyte in vitro. The embryos can be, cryopreserved and used later.

Recently the method of horses cloning is being researched. It brings, big expenses on equipment and human resources. As for now, there is no practical use of this method.

The technology used in the equine reproduction are still being refined and give horses farmers a wide range in their successful reproduction

Keywords: artificial insemination, embryotransfer, reproductive cycle, mare.

Obsah

1	Úvod	1
2	Cíl práce	2
3	Literární přehled.....	2
3.1	Pohlavní soustava koní.....	2
3.1.1	Pohlavní ústrojí klisny	2
3.1.2	Pohlavní ústrojí hřebce	4
3.1.3	Sperma	6
3.2	Estrální cyklus klisen.....	7
3.2.1	Hormony samičí pohlavní soustavy	8
3.2.2	Fáze estrálního cyklu.....	9
3.3	Zapouštění klisen	9
3.3.1	Detekce říje a doba inseminace klisny	10
3.3.2	Přirozené připouštění	11
3.4	Inseminace klisen.....	12
3.4.1	Výběr klisen pro inseminaci	13
3.4.2	Výběr hřebců pro inseminaci	13
3.4.3	Odběr spermatu	14
3.4.4	Zpracování spermatu	17
3.5	Inseminace čerstvou ID	18
3.5.1	Inseminace čerstvým neředěným spermatem	18
3.5.2	Inseminace krátkodobě konzervovaným sperma.....	18
3.5.3	Výhody inseminace čerstvou ID.....	19
3.5.4	Nevýhody inseminace čerstvou ID.....	20
3.5.5	Načasování inseminace.....	20
3.6	Inseminace mraženou ID	21
3.7	Inseminace nízkou dávkou spermatu	22
3.8	Postupy při inseminaci	23
3.9	Asistovaná reprodukce koní – embryotransfer.....	27
3.9.1	Klisna "dárce"	28
3.9.2	Odběr embryí	28
3.9.3	Superovulace.....	30
3.9.4	Klisna "příjemkyně"	31
3.9.5	Synchronizace říje	32

3.9.6	Přenos embryí	32
3.9.7	Kryokonzervace – vitrifikace embryí.....	33
3.10	Manipulace s oocyty	34
3.10.1	Odběr oocytů	34
3.10.2	Intracytoplazmatická injekce spermie (ICSI).....	34
3.11	Sexace spermií	35
3.12	Klonování koní	36
4	Závěr.....	37
5	Zdroje	38

1 Úvod

V chovu koní se stále více rozšiřuje využití jiných metod reprodukce než pouze přirozená plemenitba. Většina metod vychází od výzkumu jiných hospodářských zvířat, především skotu, kde byla potřeba nahradit přirozenou plemenitbu mnohem dříve. Bohužel u koní se zjistilo velké množství odlišností, a proto musely být vynalezeny nové postupy, spousta z nich ještě na objev čeká. Mezi nejpopulárnější metodu po celém světě patří umělá inseminace. Ta nabízí několik možností od inseminace čerstvým, přes chlazené po zmražené sperma. Překážkou u mražených inseminačních dávek je velká individualita mrazitelnosti spermií od jednotlivých hřebců. Zde je potřeba vylepšit kryokonzervační ředidla, která zaručí přežitelnost spermií. Další metoda reprodukce – embryotransfer, nabízí možnost reprodukovat klisny, které nemohou odnosit vlastní hříbě. Tato metoda je využívána hlavně u velmi cenných klisen, kde žádáme co nejvíce potomků. Zde je velkou nevýhodou proces superovulace. Brání tomu jak anatomická stavba vaječníků klisny, tak ne úplně vhodné hormonální léčby. Pokrok v reprodukci koní jde stále vpřed, proto se za poslední desetiletí setkáváme s klonováním koní. To umožňuje zachovat genetický materiál od cenných zvířat, případně pomoci plemenům, která jsou ohrožena malým počtem jedinců. U koní ke klonování využíváme přenosu jádra ze somatické buňky do oocyty. Klonování je proto jedinou metodou, kde můžeme rozmnožit jinak neplodné zvíře.

2 Cíl práce

Cílem této práce je sestavení literárního přehledu o využití biotechnologických metod v reprodukci koní.

3 Literární přehled

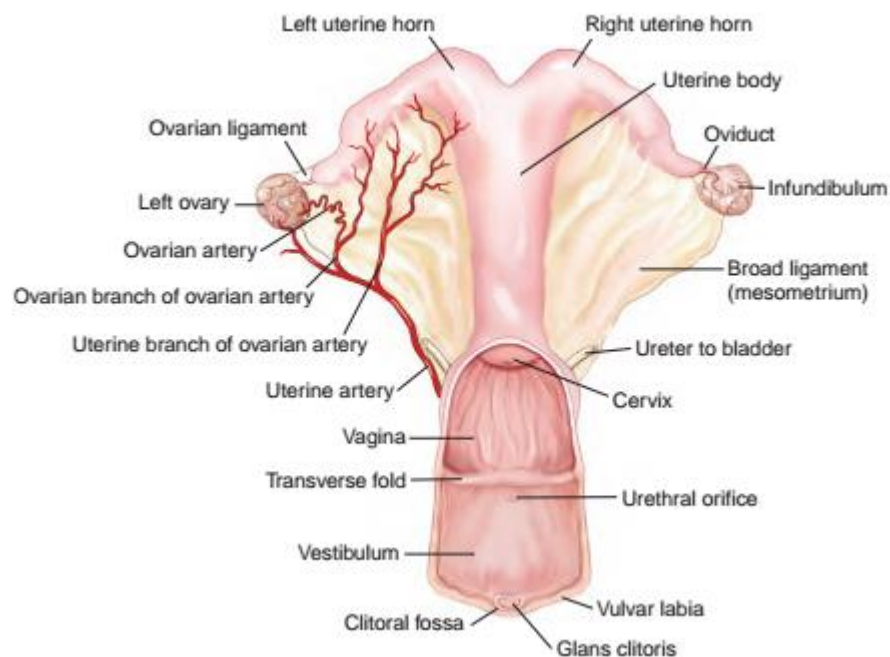
3.1 Pohlavní soustava koní

Pohlavní ústrojí (Apparatus genitalis) koní umožňuje pohlavní rozmnožování. Při pohlavním rozmnožování se spojují dvě pohlavní buňky – spermie (samčí pohlavní buňka s vajíčkem (samičí pohlavní buňka). Splynutí obou pohlavních buněk se nazývá oplození. Oplozené vajíčko se vyvíjí v děloze, odkud získává výživu a vzniká nový jedinec (Slezáková a Najbrt, 1980).

3.1.1 Pohlavní ústrojí klisny

Pohlavní ústrojí klisny slouží k produkci pohlavních buněk, k vývoji zárodku a následně plodu. Ve vaječníku tvořené hormony estrogeny vyvolávají vznik sekundárních pohlavních znaků a dále mají vliv na rozvoj mléčné žlázy a její sekreci. Kaudální část pohlavního ústrojí klisny je vhodně utvořena pro kopulaci a zároveň slouží jako porodní cesty při vypuzování plodu (Slezáková a Najbrt, 1980).

Pohlavní ústrojí klisny se skládá z vnitřních pohlavních orgánů: dvou vaječníků na ty navazují vejcovody, dělohy (ta je tvořena děložními rohy, děložním tělem a hrdlem) a vagíny. Vnější pohlavní orgány jsou tvořeny poševní předsíní s vulvou. Více než polovina pohlavního ústrojí je uložena uvnitř dutiny břišní, zbývající část je umístěna v pánevní dutině (Blanchard et al, 2003).



Obr. 1 Pohlavní ústrojí klisny

Vaječník

Vaječník (ovarium) je párová samičí pohlavní žláza, uložená v dutině břišní. Ve vaječnících se tvoří vajíčka a pohlavní hormony - estrogeny a progesteron (Marvan et al, 2007). U klisny jsou vaječníky dlouhé 5-8 cm, široké 2-3 cm, kaštanovitěho tvaru. Levý vaječník bývá zpravidla větší. Folikuly, které se tvoří na vaječníku, mívají až 0,5 cm v průměru (Slezáková a Najbrt, 1980). Folikuly, které právě ovulují mají velikost 30-50mm (Blanchard et al, 2003).

Vejcovod

Vejcovod je párová trubice tloušťky stébka. Zachytává ovulovaná vajíčka - oocyty (vajíčko zde dokončuje vývoj, případně dochází k oplození) a dopravuje je do dělohy. (Marvan et al, 2007). Vejcovod má délku 30 cm, šířku 2-3 mm (ampula vejcovodu 4-8 mm), celý vejcovod má silně vlnitý průběh (Slezáková a Najbrt, 1980).

Děloha

Děloha (uterus) slouží k vývoji nového jedince od oplození vajíčka až do narození mláděte (Marvan et al, 2007). U klisny má děloha velmi prostorné dlouhé tělo, zatímco děložní rohy jsou poměrně krátké a široké (22-25 cm na délku). Na dělohu navazuje děložní

krček (cervix uteri), jehož sliznice má vysoké listovité záhyby. Děložní krček je pouze 6 cm dlouhý, 4 cm široký (Slezáková a Najbrt 1980).

Pochva

Pochva (vagina) slouží k páření (Marvan et al, 2007). Pochva je dlouhá 20 až 25 cm, ve tvaru trubky (Blanchard et al, 2003). Poševní sliznice je bledě růžová (Slezáková a Najbrt, 1980).

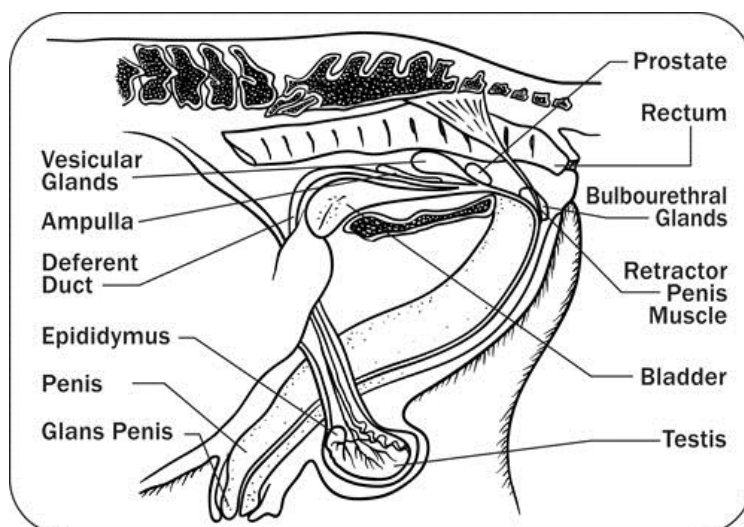
Poševní předsíň

Poševní předsíň (vestibulum vaginae) je pokračováním pochvy. Na rozdíl od ostatních částí pohlavního ústrojí, které je orgánem čistě pohlavním, je zde vývod močové trubice, slouží tedy i pro močové ústrojí (Marvan et al, 2007). Poševní předsíň klisny má rezavě hnědé zbarvení, někdy bývá pigmentovaná vnitřní stěna stydkých pysků. V poševní předsíni se nachází clitoris (glans clitoridis) s vlastním topořivým tělesem (Slezáková a Najbrt, 1980).

3.1.2 Pohlavní ústrojí hřebce

Pohlavní ústrojí hřebce (organa genitalia masculina) slouží k tvorbě samčích pohlavních buněk a k jejich zanesení do pohlavního ústrojí samice. Činností pohlavního ústrojí získává organismus samce typicky samčí ráz, dává vznik sekundárním pohlavním znakům, specifickému chování, které je ovlivněno především hormonem testosteronem (Slezáková a Najbrt, 1980).

Pohlavní buňky jsou od dosažení pohlavní dospělosti samce nepřetržitě tvořeny ve varlatech, která jsou uložena v šourku, další částí pohlavního ústrojí je chámovod, přídatné pohlavní žlázy a pyj (Reece, 2011).



Obr. 2 Pohlavní ústrojí hřebce

Varle a nadvarle

Varle (testis) je párová samčí pohlavní žláza, která je velmi citlivá na tlak a poranění (Marvan et al, 2007). Hřebec má varlata vejčitého tvaru o hmotnosti 150-300 g, hmotnost je ovlivněna věkem a plemenem (Slezáková a Najbrt, 1980). Na varle navazují vývodné cesty, přímo navazuje nadvarle (epididymis), v němž dochází ke shromažďování a funkčnímu dozrávání spermií. Nadvarle má kyjovitý tvar a rozdělujeme ho na tři části: hlava, tělo, ocas (Marvan et al, 2007). U hřebce musí dojít k sestupu varlat z dutiny břišní do šourku, sestup začíná již při porodu a k dokončení dochází během prvního týdne (Slezáková a Najbrt 1980).

Chámovod

Chámovod (ductus deferens) spojuje nadvarle s močovou trubicí. Chámovod je párová tenká trubička o tloušťce brku (Marvan et al, 2007). U hřebce chámovod vytváří ampulu o délce 20-25 cm a průměru 10-20 mm, ta slouží především jako zásobárna spermií (Samper, 2009). V ampule chámovodu se tvoří sekret, který chrání spermie před oxidačními vlivy (Morel, 2015).

Šourek a obaly varlete a semenného provazce

Šourek (scrotum) je kožní vak, v něm jsou uložena varlata, nadvarlata a semenný provazec. Nalezneme jej ve stydké krajině hřebce (Marvan 2007). Šourek hřebce je bez

chlupů s výraznou hlubokou brázdou a tenkou, obvykle černě pigmentovanou kůží (Slezáková a Najbrt, 1980).

Přidatné pohlavní žlázy

Sperma je krom spermií a výměšků z nadvarlete a chámovodů tvořeno sekrety, které vytvářejí přidatné pohlavní žlázy. Jejich sekrety jsou vylučované do močové trubice a fungují jako ředidlo spermií, ale také obsahují látky, které slouží jako výživa spermií. Důležitá je také úprava prostředí pro průchod skrz močovou trubici do pohlavních orgánů klisny (Marvan et al, 2007). Hřebci mají všechny tři typy pohlavních přidatných žláz (Slezáková a Najbrt, 1980). Mezi ně patří: semenné vaky, předstojná žláza a bulbouretrální žláza (Marvan et al, 2007).

Pyj

Pyj (penis) je pářící orgán samce, který za využití napřímení a zpevnění, v důsledku pohlavního vzrušení, dopraví semeno do pohlavního ústrojí samice (Marvan et al, 2007). Hřebčí penis je cca 50 cm dlouhý, 5 cm silný a má válcovitý tvar. Pokud dojde k erekci, může vysunout 30-50 cm. Při klidové poloze je penis mírně esovitě prohnutý a je celý skryt v předkožkovém vaku. Pokud je potřeba močení, dochází k uvolnění a vystoupení z předkožkového vaku (Slezáková a Najbrt, 1980).

3.1.3 Sperma

Sperma (semeno, chám či ejakulát) je u hřebce mléčně zbarvená tekutina, která je tvořena ze dvou hlavních složek. První je buněčná část (spermie), druhou je tekutá část semenná plasma. Semenná plasma tvoří většinový podíl z ejakulátu (95-98%). Semennou plasmu tvoří především výměšky pohlavních přidatných žláz (Marvan et al, 2007).

Ejakulát má slabý specifický hřebčí pach. Obsah jednotlivých složek ejakulátu i objem ejakulátu samotný není konstantní a je ovlivňován věkem hřebce, roční dobou, výživou, plemennými a individuálními vlastnostmi hřebce. Ejakulát je obvykle o objemu od 50 do 120 cm³. Barva zdravého ejakulátu je mléčně bílá až šedavě bílá, barva je ovlivněna koncentrací spermií. Konzistence ejakulátu je želatinová a pH ejakulátu se pohybuje okolo 7. Koncentrace spermií, která je velmi důležitým faktorem při hodnocení kvality ejakulátu,

kolísá nejčastěji v hranicích od 100 do 300.10³ v 1 ml. V běžném ejakulátu by se mělo nacházet 6 až 48 miliard spermií. Co se týče progresivních spermií, tedy zdravých a oplodnění schopných, mělo by jich být přes 60 %, ideálně však až 80 %. Během ejakulace tvoří ejakulát tři frakce. První neobsahuje žádné spermie, jejím úkolem je vyčistit a promazat močovou trubici, upravit v ní pH, zbavit se bakterií, vše tak aby bylo prostředí pro spermie příhodné. Druhou frakci tvoří především spermie, její objem je 40-80ml a koncentrace spermií činí cca 80%, k vypuzení druhé frakce dochází, jakmile žalud pyje nasedne na děložní krček klisny. Třetí frakci tvoří gelové zbytky, jejich objem záleží na hřebci samotném a na četnosti ejakulací (Morel, 2015).

3.2 Estrální cyklus klisen

Termínem "estrální cyklus" označujeme veškeré fyziologické změny, které můžeme pozorovat na pohlavních orgánech a v chování u klisen. Tyto změny se týkají především pravidelných period, kdy je klisna svolná k páření (estrus=říje). Jeden interval cyklu definujeme od začátku jednoho cyklu říje (svolnosti k páření) k dalšímu (Reece, 2011).

Klisny označujeme jako sezonně polyestrické zvíře. Sezonně polyestrická zvířata mají pohlavní cyklus (u klisen třítydenní) do značné míry ovlivněn ročním obdobím. Na podzim u většiny klisen pohlavní cyklus ustává, klisna se dostává do stavu anestrie, tedy stavu pohlavního klidu. To se týká přírodně odchovaných klisen, kde nedochází k umělé úpravě světla a teploty. S počátkem jara pohlavní cyklus znovu nastupuje a dále se opakuje v pravidelných třítydenních intervalech. Toto období, pravidelně se opakujícího pohlavního cyklu, nazýváme reprodukčním obdobím. Obvykle jsou říje na jaře - počátku reprodukčního období a na podzim – na konci reprodukčního období delší, často neplnohodnotné a nejsou nezakončené ovulací. Během jara a léta se říje zkracují a pohlavní cyklus se opakuje v pravidelně, obvykle v 21denních intervalech. Ovšem celé reprodukční období a období sezonního anestrů je ovlivněno individualitou klisny. Některé klisny si mohou zachovat pravidelný pohlavní cyklus po dobu celého roku, jiné prodělají pouze pár cyklů do roka. V praxi jako dobré vodítko může sloužit fakt, že počátek a konec reprodukčního období je svázán s obdobím línání (Dušek a kol, 2011).

Klisna dosahuje puberty v následujícím po narození. Pokud se klisna narodí později (ke konci léta), celá puberta, a tedy dospívání, se oddálí o 12 měsíců. Nelze proto přesně říci, v jakém věku klisny pohlavně dospívají, jedná se o velmi široký interval, a to od 12 do 18 měsíců (Reece, 2011).

3.2.1 Hormony samičí pohlavní soustavy

Základními hormony, které u klisen souvisí s ovariálním cyklem, březostí i porodem jsou: estrogen, progesteron a gonadotropiny (Reece, 2011).

Estrogeny

Estrogeny se tvoří ve folikulu. Navodí překrvování dělohy a pochvy klisny, otevře se děložní krček a začne se tvořit hlen. Celkově jsou estrogeny zodpovědné za říjové chování klisen (Dušek a kol, 2011). Projevy, které estrogeny navozují, se týkají spíše pohlavních orgánů, než celého organismu (Reece, 2011).

Progesteron

Progesteron je produkován žlutým tělískem na vaječníku, placentou a kůrou nadledvin. Procesy v těle navozené progesteronem probíhají obvykle po působení estrogenů, ty nabudí tkáň pro příjem signálu od progesteronu (Reece 2011). Obecně progesteron navozuje konec říje a její příznaky mizí: krček se uzavírá, děloha se připravuje pro přijetí oplozeného vajíčka (Dušek a kol, 2011).

Gonadotropiny

Pod názvem gonadotropiny je označován folikulostimulační hormon (FSH) a luteinizační hormon (LH). Název gonadotropiny odkazuje na vliv těchto hormonů na buňky vaječníků i varlat (působí uvnitř gonád). U samic FSH podněcuje růst folikulů a LH podporuje dozrání folikulu a jeho ovulaci (Reece, 2011).

3.2.2 Fáze estrálního cyklu

Estrální cyklus můžeme rozdělit na několik fází a to podle chování nebo podle změn na vaječnicích klisny.

1. Proestrus: jedná se o periodu začínající po zániku (regresi) žlutého tělíska. Proestrus končí s nástupem estru. Během proestru dochází k rychlému vývoji folikulů a následně k ovulaci. Zároveň se nastolí u klisny sexuální ochota (Reece, 2011). Přestože obvykle roste více folikulů naráz, dozrává zpravidla pouze jeden (Blanchard et al, 2003).
2. Estrus: jedná se o samotnou říji, tedy dobu sexuální ochoty. Ovulace se obvykle dostaví na konci estru. (Reece, 2011). Estrus trvá 4-7 dní (Blanchard et al, 2003).
3. Metestrus: je fáze časného postovulačního období. Během této fáze se začíná vyvíjet žluté tělísko.
4. Diestrus: je obdobím nástupu plné luteální aktivity (aktivity žlutého tělíska). Toto období a s ním i aktivita žlutého tělíska začíná obvykle okolo 4. dne po ovulaci a končí zánikem (regesí) žlutého tělíska.

V periodě estru a proestru (označováno jako folikulární perioda), jsou výrazně dominantní estrogeny. Toto období je také obdobím sexuální ochoty, naopak metestrus a diestrus (označováno jako luteální perioda) je obdobím sexuální neochoty, tedy odmítání hřebce a ztrátou říjových projevů (Reece, 2011).

3.3 Zapouštění klisen

Rozhodujícím momentem pro graviditu je správné zapouštění klisny. Největší důraz klademe na kvalitu spermatu, správnou techniku připuštění a vhodnou dobu připuštění s důslednou hygienou (Dušek a kol, 2011).

Dodržení důkladné hygieny při připuštění se může výrazně promítnout na výsledcích. Při plnohodnotné říji, především na jejím vrcholu, jsou pohlavní orgány klisny přizpůsobeny k páření a jsou tedy velmi odolné proti mikrobiální infekci. Přesto neustále

existuje nebezpečí vzniku endometritid (následek infekce po zapuštění), toto se týká především klisen, které mají z různých důvodů sníženou obranyschopnost. Je důležité tedy dbát před zapuštěním na důkladné omytí vulvy klisny mýdlem k těmto účelům určeným a dobré je použít i vhodným dezinfekční prostředek. Během celého procesu je k mytí pohlavních orgánů klisny potřeba používat jednorázových pomůcek a ostříku vodou. Vše musí být vedeno tak, aby nemohlo dojít k přenosu infekce z jedné klisny na druhou. Samozřejmostí je také hygiena hřebce, při přirozeném procesu inseminace, případně během odběru semene (Dušek a kol, 2011).

3.3.1 Detekce říje a doba inseminace klisny

Nejdůležitějším faktorem při připouštění klisen je správné načasování, ať již připouštíme přirozenou cestou, či za pomoci umělé inseminace (při inseminaci mraženým spermatem se jedná o zásadní informaci, jelikož se počítá se sníženou oplozovací schopností spermií). Je proto důležité přesně znát, kdy má klisna říji a od toho odhadnout dobu kdy ovuluje. (McKinnon et al, 2011).

Obvykle u klisen dochází k ovulaci cca 24 hod. před koncem estru - říje. Proto je dobré klisny pozorně sledovat a znát jejich obvyklý průběh a délku říje. Jako poslední vodítko slouží to, že pokud ovulace proběhla, dojde k ukončení říje. Mezi hlavní příznaky, které lze na klisně pozorovat při říji patří zdvihání ocasu, klisna se často zastavuje, doširoka roztahuje pánevní končetiny, často močí a rytmicky topoří klitoris – tomuto projevu se říká, že klisna "blýská". Některé klisny mohou mít zcela individuální a specifické projevy, stejně tak rozdílnou délku celého cyklu. (Reece, 2011).

Velký vliv na reprodukční cyklus u klisen má fotoperioda a sní svázané roční období. Nejsilnější a nejkvalitnější říje má klisna na jaře, na podzim upadá do stavu, kdy říje nemusí být přítomny vůbec až do dalšího jara. Pokud chceme uměle ovlivnit (uspíšit) nástup estrálního cyklu, prodloužíme denní dobu kdy je klisna mimo tmou, obecně stačí umělé osvětlení ve stáji. Důležité je také vědět, kdy nastupuje nová říje po porodu hříběte. Obvykle říje nastoupí do 4-7 dní a trvá do 10. až 13. dne. (Morel, 2015).

K určení doby kdy klisna ovuluje lze také využít následné metody vyšetření:

- Rektální vyšetření folikulu: k tomuto vyšetření se využívá sonografie, případně palpce. Během vyšetření se posuzuje tvar a velikost folikulu, který je přítomen na vaječníku.
- Rektální vyšetření dělohy: také je zde využito sonografu. Hodnotí se především překrvení dělohy klisny (Reece, 2011).

Cervikální hlen a krček dělohy: Hlen během ovulace je vylučován ve větším množství, má být dostatečně pružný, nezakalený. Zároveň dochází k otevření děložního krčku, který tímto usnadňuje příjem spermií. U klisen nemusí být přítomen v pozorovatelném množství, jako je tomu například u skotu (Dinger a Noiles, 1982).

3.3.2 Přirozené připouštění

Za přirozené připouštění považujeme takové, kdy je samice se samcem ve fyzickém kontaktu a dojde k páření. Při přirozené metodě připouštění záleží především na samici a její ochotě k páření. Svolnost klisny zaručuje přítomnost estrogenů v jejím těle (Reece, 2011). Nejideálnější dobou, kterou bychom měli zvolit k připouštění, je krátce před ovulací, tedy v druhé polovině říje. (Blanchard et al, 2003).

Přirozené připouštění lze provést několika způsoby. Klisna může být volně vpuštěna do ohrady s hřebcem, kde se budou volně pářit. Tato možnost nese velká rizika zranění, především hřebce a snižují možnost hygieny. Na druhou stranu se jedná o zcela přirozenou metodu. Další možností je tzv. připouštění z ruky. Klisna je držena na vodítku a hřebec je na jeden skok přiveden ke klisně, toto se opakuje po 48 hodinách, dokud je klisna ochotna. Jelikož tomuto způsobu obvykle předchází hygienické očištění i zkouška klisny, výrazně se snižují rizika oproti volnému připouštění. Někdy je klisna velmi agresivní, přestože se již blíží ovulace, nebo čistě ze strachu majitelů, se přistupuje k vyvázání jedné z hrudních končetin, aby se předešlo kopání po hřebci (Samper, 2009).

Před samotným pářením je potřeba klisnu připravit. Důkladně se jí ováže kořen ocasu bandáží, ideálně se skryjí celé žíně například za pomoci svázání provazem. Následně je potřeba klisně řádně omýt vnější pohlavní orgány a jejich blízké okolí. Klisna se poprvé

postaví za zástěnu, která ochrání hřebce v případě, že klisna ještě nebo už není svolná a mohla by zareagovat agresivně vykopnutím a hřebce vážně poranit. Pokud zkouška proběhla pozitivně a klisna projevuje říjné znaky, je odvedena mimo zástěnu a je k ní přiveden hřebec. Někteří chovatelé vyvazují ocas směrem nahoru, aby pomohli hřebci se zasunutím penisu do pochvy klisny (Dascanio, 2014).

K zasunutí penisu do pochvy (imise) a jeho udržování ve vagině pomáhají pohyby pánve hřebce. Po zesílení stimulace reflexní centrum v páteřní míše vyšle podněty pro výron a ejakulaci semene. Spermie a semenná plazma jsou ejakulovány klisně částečně i do dělohy (Reece, 2011).



Obr. 3 Přirozené připouštění

3.4 Inseminace klisen

Za umělou inseminaci (AI) považujeme osemenění klisny čerstvým nebo konzervovaným spermatem, které je manuálně přeneseno do pohlavního ústrojí klisny (Morel, 2015). Sperma je během umělé inseminace za pomoci inseminační soupravy vpraveno do děložního krčku nebo přímo do dělohy. (Dušek, 2011)

Pro použití umělé inseminace může být hned několik důvodů. Jedním z nejdůležitějších je zlepšení chovů díky lepší dostupnosti kvalitních plemeníků. Jejich sperma může být použito na velké množství klisen kdekoli na světě. Další výhodou je zamezení

nákazy plemeníků pohlavně přenosnými chorobami od klisen, což platí i opačně, protože sperma pro tvorbu inseminačních dávek je vždy vyšetřené (Blanchard et al, 2003)

3.4.1 Výběr klisen pro inseminaci

Pokud se již chovatel rozhodne k inseminaci klisny, je dobré klisnu zhodnotit, zda je vůbec k reprodukci vhodná, stejně tak zda je pro ni vhodným způsobem umělá inseminace.

Hlavní výběrová kritéria u klisen jsou následující:

- **Minulost:** zde se zaměříme především na reprodukci v minulosti klisny. Kolik měla klisna hříbat, jaká byla úspěšnost zabřeznutí, zda nedošlo k potratům atd.
- **Temperament:** u příliš temperamentních až nervózních klisen se těžko provádí jemná práce při umělé inseminaci. Řešením může být částečná sedace klisny.
- **Stáří:** pro reprodukci obecně jsou vhodné mladé klisny, starší klisny mohou hůře zabřezávat či mít problém s porody.
- **Celková stavba těla a kondice:** pokud pomineme výběr klisny z chovného hlediska, je třeba ohodnotit její zdravotní stav, aby v pořádku odnosila a porodila hříbě.
- **Uzpůsobení vnějších pohlavních orgánů:** někdy může dojít k výraznému poškození během předešlých porodů, či nevhodnému utváření, například propadlý konečník může být důvodem zanesení infekce do pohlavních orgánů klisny.
- **Uzpůsobení vnitřních pohlavních orgánů:** zde je vhodné klisnu vyšetřit palpací či ultrasonografií, zamezí se zbytečným pokusům o březost či potratům.
- **Infekce:** při infekci by nikdy nemělo dojít k inseminaci klisny, ani její reprodukci.
- **Odběry krve:** zajistí, že klisna netrpí pohlavně přenosnou chorobou, stejně tak je vhodné dbát na očkování klisny, z důvodu jejího i potomkova zdraví (Morel, 2015).

3.4.2 Výběr hřebců pro inseminaci

Výběrová kritéria pro hřebce jsou z velké části podobná těm u klisny:

- **Minulost:** zde stejně jako u klisen řešíme reprodukční minulost. Jaký je při přirozené plemenitbě či při odběru.

- **Temperament a libido:** libido je u hřebce velmi důležité. Zvláště pokud chceme hřebce odebrat, bez vysokého libida se odebírání může protáhnout časově, či být až téměř nerealizovatelné. Temperament zde souvisí hlavně s ovladatelností koně při výkonu.
- **Stáří:** u hřebce nehraje takovou roli jako u klisen, přesto je vhodné například s mladšími a nezkušenými hřebci zacházet šetrněji.
- **Celková stavba těla:** Pro časté odběry jsou důležité zdravé a pevné nohy, pevné svalstvo na bedrech a páteř, která by měla být v pořádku.
- **Předvedení pohlavního ústrojí:** jakékoli anomálie, deformity je důležité vyšetřit, mohou ovlivnit kvalitu semene.
- **Analýza semene:** zde je důležitá analýza koncentrace spermií a jejich přežitelnost po konzervaci.
- **Odběry krve:** stejně jako u klisen se hlídají přenosné choroby a očkování
- **Infekce:** infekce v těle výrazně ovlivní kvalitu ejakulátu.
- **Celkové vedení odchovu hřebce:** sem spadá jeho zdravotní a výkrmný stav, krmivo, denní program. To vše ovlivní hřebčí ejakulát (Morel, 2015).

3.4.3 Odběr spermatu

Odběr spermatu pro umělou inseminaci je nejlépe provádět v odběrové místnosti. Odběrová místnost musí splňovat základní požadavky jako dostatečně velký prostor pro manipulaci s hřebcem, splnění hygienických požadavků. Je třeba místnost po každém odběru řádně vyčistit a vydesinfikovat. Neměly by zde být zbytečné rušivé elementy a dostatečné osvětlení s dobrou cirkulací vzduchu je samozřejmostí. Podlaha je velmi důležitým aspektem, musí být z neklouzavého materiálu, například gumové rohože. Pokud by hřebec během odběru uklouzl došlo by k jeho zranění a i zrazení v odběry semene.

V odběrové místnosti se nachází fantom pro hřebce a je dobré zde mít i prostor pro případ potřeby přítomnosti klisny k nabuzení některých hřebců s menším libidem.

Samotný odběr spermatu lze zajisti několika způsoby: do umělé vagíny, za použití kondomu či manuální manipulací – masturbace. Poslední dva způsoby se používají

minimálnš. Během každého odběru je důležité neznečistit odebraný ejakulát, proto je důležité mít čisté nástroje a dodržet hygienu hřebce. (Samper, 2009).

Umělá vagina je nejčastěji používanou metodou. Většina umělých pochev pro odběr ejakulátu vychází ze dvou variant, které se v různých úpravách užívají dodnes. První varianta je tzv. otevřený typ. Otevřený typ vagíny má výhodu odběru té frakce ejakulátu, kterou chceme – tedy té, ve které jsou obsaženy spermie. Objem je přibližně o 50 % nižší, koncentrace spermií však je vyšší. Druhý typ je do uzavřené vagíny, zde dojde k zachycení celého ejakulátu. Všechny umělé vagíny by měly mít správnou teplotu, toho se dosahuje nalitím teplé vody (okolo 45 °C) do dvojité stěny vagíny. Další provedení závisí na použitém typu. Mezi základní patří:

- Typ "Missouri" navržený Mc Kenziem má zúžení vchodu pochvy pryžovým prstencem – předpoklad vyššího dráždění u báze pyje. Tato pochva se lehko skládá a omývá.



Obr. 4 Umělá vagina: Missouri typ

- Typ "Colorado", je jednou z nejtěžších umělých vagín, proto se s ní hůře manipuluje. Je tvořena dvěma pryžovými vložkami, plastovým pouzdrům a koženým límcem. Její výhodou je dlouhodobé udržení teploty vody, dá se tedy s hřebcem manipulovat déle.
- Typ "Nishikawa" se skládá z tuhého hliníkového pouzdra a jedné pryžové vložky, takže je lehký a snadno ovladatelný. Další výhodou je přímé napojení sběrné nádoby. Tato

konstrukce umožňuje přímé vypuštění ejakulátu do nádoby, čímž nedochází ke kontaktu ejakulátu s pryžovou vložkou

- Polský typ: tato umělá vagina je navržena jako otevřená. Výhodou otevřené vagíny je nezachycení první frakce ejakulátu, tedy snížení možnosti kontaminace z močové trubice penisu hřebce (Blanchard et al, 2003).

Hřebci se na umělou vaginu naučí velmi snadno. Pro mnoho hřebců je při skoku na fantom důležitá přítomnost říjící se klisny. Jako říjící se klisna může sloužit i nymfomanka, která je v kontinuálním stavu říje v důsledku hormonální nerovnováhy nebo může být léčena estradiolem-17, který vyvolá říji bez ovulace (Morel, 2015).

Jak bylo napsáno výše, je třeba používat hřebce, kteří jsou fyzicky zdatní a zdraví, aby zvládali skok na fantom. Někdy je potřeba odebrat velmi kvalitního hřebce, který trpí bolestmi zad či artritidou. Často se tyto problémy projevují u parkurových koní, kteří jsou stále ještě ve sportovní kariéře. Když dojde k sečtení námahy z parkurového skákání a ze skákání na fantom, dojde ke zvýšené bolestivosti v oblasti beder a zádě (Beuzekom et al, 2017). Pro hřebce, kteří nemohou skočit na fantom je využíváno odběru tzv. ze země. Bylo hodnoceno takto získané sperma v porovnání se spermatem získaném ze skoku na fantom. Objem ejakulátu klesl v průměru o 7 ml a koncentrace spermií asi o 1/3. Také se prodloužila doba potřebná k ejakulaci hřebce. Na pohyblivost či přežitelnost spermií tato metoda vliv neměla. Jako poslední nevýhodu lze zmínit neochotu hřebců k této metodě odběru (Burger et al, 2015).

Ihned po odběru by mělo být sperma převezeno do laboratoře, musí být minimalizována veškerá fyzická poškození, nesmí být vystaveno světlu, teplotnímu šoku. Všechny materiály, se kterými přichází sperma do styku, by měly být předehřáté na tělesnou teplotu (37-38 °C) (Blanchard et al, 2003).

Není-li možné provést posouzení okamžitě, musí být uchováno při 4-5 °C po dobu nejdéle 24 hodin, aniž by došlo ke snížení životaschopnosti a možnosti provést posouzení spermatu (Morel, 2015).

3.4.4 Zpracování spermatu

Zachycené sperma je potřeba laboratorně hodnotit. Mezi hodnocené vlastnosti patří především celkový objem, koncentrace a pohyblivost spermií. Za pohyblivé spermie se považují takové, které mají progresivní pohyb za hlavičkou. Přesné hodnoty vlastností spermatu se odvíjejí od toho, zda se bude sperma pouze chladit či mrazit (Pycock et al, 2006).

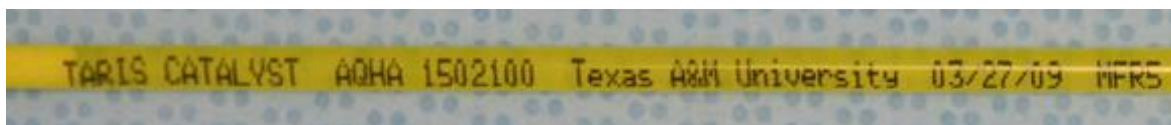
Sperma hřebce po odběru by mělo mít tyto parametry:

- Objem: 50-120 cm³
- Barva: bílá, šedě bílá
- Konzistence: vodnatá
- pH okolo 7
- Koncentrace spermií: 0,1 až 0,3 x 10⁶/mm³
- Aktivita spermií: 60-80 %
- Frekvence výskytu patologických spermií: max. 30-35 %

Pokud sperma odpovídá těmto parametrům, vyrábí se inseminační dávky. Inseminační dávka pro krátkodobou konzervaci má mít objem 10 cm³ naředěného spermatu, 300x10⁶ spermií, aktivita spermií min. 50 % a morfologicky normálních spermií minimálně 60%. Pro inseminační dávku na dlouhodobou konzervaci je požadován objem minimálně 0,5 cm³ naředěného spermatu, koncentrace spermií minimálně 250x10⁶ spermií, 60 % morfologicky normálních spermií a jejich aktivita nejméně 30 %. Pro dlouhodobou konzervaci lze použít i pejety o objemu 5 ml. Veškeré inseminační dávky musí být řádně popsány a označeny. Především o jakého hřebce se jedná, datum výroby dávky, místo kde byla dávka vyrobena (Blanchard et al, 2003).



Obr. 5 Inseminační pejety pro chlazené ID: 0,5 a 5 ml



Obr. 6 Označená ID

3.5 Inseminace čerstvou ID

3.5.1 Inseminace čerstvým neředitelným spermatem

Za inseminaci čerstvým spermatem považujeme takové provedení, kdy je hřebec odebrán a ihned je do klisny vpraven celý objem ejakulátu bez žádné úpravy. Při této metodě je požadavek minimálně na 300 milionů progresivních spermií. Tato metoda zabraňuje přenosu pohlavních chorob z hřebce na klisnu, je vhodná pro agresivní či příliš bázlivé klisny vůči hřebci a nejblíže imituje přirozenou plemenitbu (Samper, 2009).

3.5.2 Inseminace krátkodobě konzervovaným sperma

Krátkodobě konzervované sperma je po odebrání ředěné a zchlazené na teplotu 4 °C. K inseminaci je použitelné 12, v krajním případě 48 hodin, po jeho odběru. Doba použitelnosti se odvíjí podle použitého ředidla (Blanchard et al, 2003). Gibb a Aitken (2016) udává přežitelnost spermií až 72 hodin od odběru. Sperma se pro krátkodobou konzervaci ředí v poměru 1:1 až 1:2 (Blanchard et al, 2003).

Zpracování spermatu pro krátkodobou konzervaci

Sperma pro krátkodobou konzervaci je potřeba naředit vhodnými ředidly, které nejsou spermicidní a spermie ochrání a podpoří. Pro zředění se nejčastěji využívá žloutkových ředidel či ředidel na mléčné bázi (Dušek a kol, 2011). Tato ředidla slouží především k ochraně membrán spermií před změnami, které jsou vyvolány v průběhu chlazení (Gibb a Aitken, 2016). Jako další za zmínku stojí želatinová ředidla (Morel, 2015). Další vlastností je podpora spermií, aby měly dostatek energie na přežití, proto ředidla obsahují pufrovací a energetické látky (Dušek a kol, 2011). Nejvíce využívaná jsou ředidla na mléčné bázi a jsou dobře komerčně dostupná. Vhodně přidaná antibiotika pomáhají odstranit bakterie, které mohou kontaminovat sperma během odběru. Běžně používanými antibiotiky je polymyxin B sulfát, krystalický penicilin, síran amikacin a timentin (Blanchard et al, 2003).

Jakmile je sperma naředitelné, je zchlazováno na teplotu 4-10 °C. Tato teplota je dostatečně nízká na to, aby zpomalila metabolismus spermií a tím protáhla jejich

přežitelnost až na 72 hodin. Oproti jiným druhům jsou spermie hřebců velmi citlivé na teplotní šok, proto musí docházet k postupnému zchlazování a ne nárazovému. I přes veškerou snahu jsou mezi hřebci silné individuální rozdíly, a proto u některých hřebců může výrazně klesnout přežitelnost spermií již po 24 hodinách (až na 44 %). Předpokládá se, že důvodem je nedostatečná protekce ředidla, či dokonce jeho spermicidní vlastnosti na dané spermie. Z důvodu výskytu hřebců s takovýmto špatně chladielným spermatem se došlo k možnosti uchovávat spermie bez chlazení. Hlavní problém činí u této metody rychlé vyčerpání ATP u spermií, proto je třeba dodat energii zvenčí. Předpokládá se dosažení uchování spermií tímto způsobem až po dobu jednoho týdne. V tomto směru se vedou rozsáhlé výzkumy (Gibb a Aitken, 2016).

3.5.3 Výhody inseminace čerstvou ID

- AI nabízí oproti přirozenému páření četné výhody. Například rozdělení ejakulátu do několika inseminačních dávek, dovolující efektivnější využití spermatu hřebce, za předpokladu normální plodnosti hřebce. V souladu s tím několikanásobně zvyšuje počet klisen, které je hřebec za připouštěcí období schopen oplodnit.
- U plemen, jejichž stanovy plemenné knihy dovolují inseminaci, zvyšují dostupnost inseminačních pro všechny majitele klisen.
- Přídavek antibiotik do semenného plniva pro AI minimalizuje přenos pohlavních bakteriálních chorob.
- Ředidla obsahují ochranné a podpůrné látky pro spermie, které mohou zvýšit schopnost oplození u některých hřebců.
- Využití fantomu při odběru spermatu, snižuje riziko poranění chovných hřebců i klisen.
- Odběr spermatu do umělé vagíny umožňuje kontrolu kvality spermatu a včasné zjištění problémů, které mohou mít vliv na plodnost hřebců.
- Vývinem inseminační techniky s nízkými dávkami zvyšuje připuštěný počet klisen z ejakulátu a zvyšuje počty zabřeznutí u subfertilních hřebců (Blanchard et al, 2003).

3.5.4 Nevýhody inseminace čerstvou ID

- Pro úspěšnost této metody je zapotřebí znalostí a dovedností, jelikož spermie jsou velmi citlivé na poranění a prostředí, ve kterém se nachází.
- Během odběru spermatu, manipulace, zpracování a samotné inseminační techniky může dojít k poškození spermatu a následnému zhoršení schopnosti oplození.
- Náklady spojené s nákupem potřebného vybavení pro AI mohou zvýšit režijní náklady celého šlechtitelského programu.
- Další nevýhodou je zvýšené riziko poranění člověka manipulujícího s umělou vagínou během odběru spermatu. Z tohoto důvodu je potřeba řádné proškolení osob zapojených do odběru.
- Je potřeba získat určitý trénink k dosažení úrovně pro dosažení uspokojivých výsledků v hodnocení zabřeznutí, za použití techniky s nízkými inseminačními dávkami, protože požadavky na proces zpracování a manipulace se spermatem jsou zvýšené.
- Jako poslední lze uvést náklady na vybavení pro hysteroskopii při inseminaci, které jsou relativně vysoké ve srovnání s těmi, které jsou potřeba při manuálních inseminačních postupech (Blanchard et al, 2003).

3.5.5 Načasování inseminace

V chovatelských programech pro umělou inseminaci jsou klisny inseminovány každý druhý den, počínaje druhým nebo třetím dnem od počátku říje, dokud není zjištěna ovulace nebo dokud klisna nepřestane vykazovat říjné chování.

Snížení počtu inseminací během estrálního cyklu zlepšuje celkovou efektivitu šlechtitelských programů a snižuje riziko kontaminace pohlavního ústrojí klisny. To se týká především klisen se zvýšenou citlivostí na děložní infekce. Cílem by mělo být inseminovat klisnu jedenkrát, 24 hodin před ovulací (Samper, 2009).

3.6 Inseminace mraženou ID

Používání zmrazeného spermatu hřebců má spoustu výhod. Minimalizuje se riziko šíření nemocí, lze jej přepravovat na libovolné vzdálenosti a uchovávat po mnoho let genetický materiál hřebce. Významný pokrok tato metoda zaznamenala v posledním desetiletí, zároveň se zvedá i obliba této metody mezi chovateli (Alvarenga et al, 2016). Dlouhodobé skladování hřebčího spermatu je dosažitelné pouze zmrazením (Morel, 2015)

Zpracování spermatu pro dlouhodobou konzervaci

Stejně jako pro krátkodobou konzervaci je potřeba upravit ředidly i sperma pro dlouhodobou konzervaci. V tomto případě je velký rozdíl v použití kryoprotektivních látek. Kryoprotektivní látky jsou takové, které chrání spermie během procesu zmrazení a rozmrazení. U hřebců se doposud jako kryoprotektivní látka používá glycerol (Dušek a kol, 2011). Glycerol se používá především u skotu, ale ukazuje se, že je toxický pro hřebčí spermie, proto je u spermií hřebců používán v nízkých koncentracích. Jsou zkoušena nová ředidla, například kombinace cukrů, ale i zde je rozdílná citlivost hřebců (Morel, 2015).

Po zředění se sperma postupně ochlazuje a následně zmrazuje. Obvykle jím jsou plněny pejetý o obsahu 0,5 – 4 ml nebo může být uchováno i v hliníkových tubách o obsahu 7 ml. Nejdůležitější je právě rychlost schlazování, je optimální k tomuto používat programovatelné automatické zmrazovače, které již k poklesu teploty využívají kapalný dusík, ve kterém je sperma i nadále uchováváno (Samper, 2009). Pro uchování se obvykle používá tekutý dusík (-196 °C). Pokud spermie dokáže odolat procesu zmrazení i rozmrazení, může být integrita spermií v kapalném dusíku zachována po téměř neomezenou dobu, protože metabolická aktivita spermií při těchto teplotách je zanedbatelná (Blanchard et al, 2003).

Pokud chceme inseminační dávku použít pro oplození vajíčka, je potřeba ji rozmrazit. Dávku vyjmeme z tekutého dusíku a rozmrazíme ji ve vodní lázni o teplotě 37 °C. Inseminační dávku je důležité rozmrazit těsně před inseminací klisny. Jakmile totiž dojde k rozmrazení spermií, jejich životnost a s ní oplozovací schopnost rychle klesá (Samper, 2009).

Je několik funkcí spermií, u kterých je potřeba, aby zůstaly po rozmrazení zachovány z důvodu schopnosti oplodnit vajíčko:

- Pohyblivost spermií
- Normální metabolismus spermií
- Nepoškozené buněčné membrány
- Přítomnost akrozomů

(Blanchard et al, 2003).

Část spermií při celém procesu kryokonzervace je letálně poškozeno a nejsou schopny oplodnění. Z funkčních poruch to jsou především změny ve vlastnostech membránových lipidů, poškození cytoskeletárních částic a poruchy ve složení jádra. Z těchto změn vyplývá velká citlivost spermií na změny teplot, změny osmotického tlaku a oxidační stres (Blanchard et al, 2003).

Z důvodů poškození a předpokladu celkového snížení životnosti spermií oproti čerstvým, je potřeba inseminovat klisnu co nejbližší době ovulace folikulu, je dobré provést i reinseminaci po 24 hodinách od předešlé inseminace (Samper, 2009).

3.7 Inseminace nízkou dávkou spermatu

V posledním desetiletí se výrazně zvyšuje využívání i kvalita umělé inseminace. S tím se zvedají ceny za inseminační dávky některých hřebců, zvýšily se náklady v oblasti dopravy inseminačních dávek, jelikož jsou přepravovány na velké vzdálenosti. Zároveň ovšem dochází k vynálezu nových reprodukčních technologií a to vše vede k vyšším počtům inseminačních dávek z jednoho odběru hřebce. Snižuje se objem inseminačních dávek, ale i počet spermií v nich. K zavádění takovýchto dávek se využívá dvou technik. První je hysteroskopická metoda nebo rektální zavádění pružné pipety do požadovaného děložního rohu. Obě dvě metody se shledaly s dobrou úspěšností, aniž by došlo ke snížení počtu zabřeznutí oproti běžně obsahově velkým dávkám (Samper, 2010). Jednotlivé postupy jsou podobněji popsány níže.

Kvůli potřebě naprosto jemné manipulace a přesnosti zavádění inseminační dávky, je obvykle přistupováno k mírné sedaci klisny pro uklidnění (Morris et al, 2010).

Ukazuje se, že klisny lze takto inseminovat dávkami, které obsahují 100x méně spermií, než je tomu u běžných dávek. Odpovídá to tedy počtu 1-5 milionu spermií. Objem inseminační dávky je 0,2 ml (Blanchard et al, 2003).

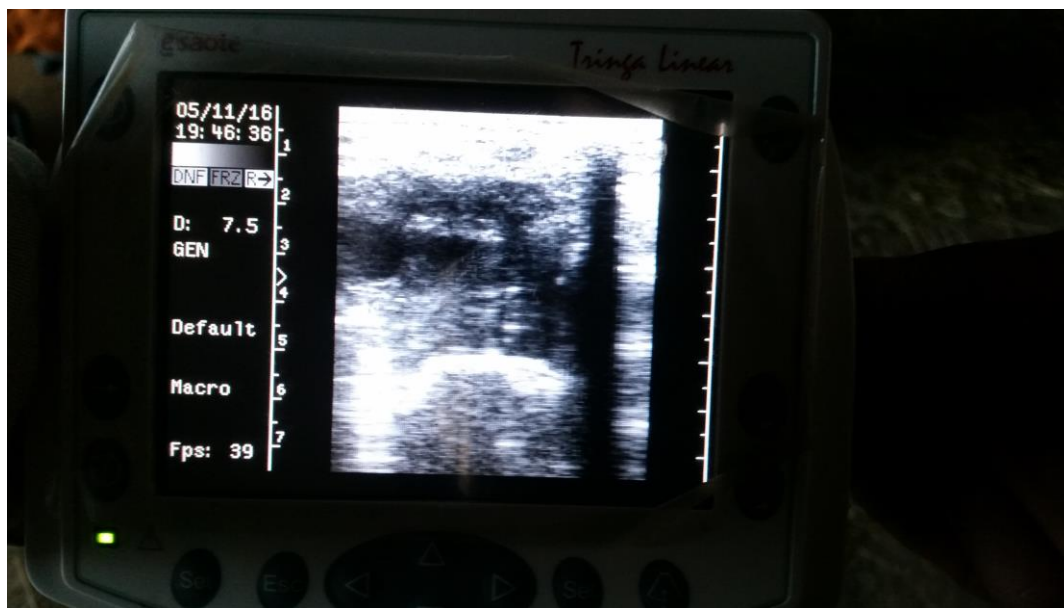
3.8 Postupy při inseminaci

Při inseminaci je důležitá hygiena. Je vhodné klisně 2x-3x opláchnout okolí reprodukčních orgánů mýdlem nebo chirurgickým mýdlem, které následně důkladně opláchneme, aby nezůstaly zbytky mýdla, které by měly spermicidní účinky a dráždily pochvu klisny. Pro umělou inseminaci se doporučuje celkově sterilní a netoxické zařízení (Blanchard, 2003).

Před inseminací je nutné klisnu vyšetřit. Vyšetří se palpací otvor děložního krčku, je-li krček otevřen na jeden až tři prsty, je možno inseminovat. Je-li krček uzavřen, klisna se neinseminuje. Je vhodné provést i ultrasonografické vyšetření na přítomnost folikulu. (Samper, 2009).



Obr. 7 Ultrasonografické vyšetření před inseminací



Obr. 8 Zobrazení folikulu na sonografu

K umělé inseminaci se používají nejčastěji katetry z plastu nebo katetry ebonitové, k nimž je připojena celoskleněná stříkačka nebo nádobka z pružného plastu. Pryžové katetry (z červené pryže) jsou pro své spermicidní vlastnosti k umělé inseminaci nevhodné. Nejčastěji se používají katetry dlouhé 500-600 mm a 4-6 mm tlusté, jejichž světlost kanálků se pohybuje mezi 1-2 mm. Stříkačky se používají nespermicidní, nejvhodnější k umělé inseminaci jsou s plastovými písty, jelikož některé gumové písty mohou mít spermicidní vlastnosti. Zdá se, že sperma každého hřebce reaguje velmi individuálně na toxické účinky u gumových pístů. Toxické účinky jsou u některých hřebců patrné již po jedné minutě kontaktu s některými typy stříkaček a pístů. Naopak se zdá, že mytí a sterilizace použitých stříkaček nemá vliv na přežitelnost spermií. Z tohoto důvodu je možné, správně omyté stříkačky použít i vícekrát, což je samozřejmě ekonomické a i ekologické (Blanchard et al, 2003).



Obr. 9 Kompletní příprava před inseminací: zde před inseminací chlazeným sperma

Sperma, ředěné i neředěné, se vpravuje přímo do dělohy klisny. Katetr napojený na inseminační stříkačku nebo pistoli je zaváděn za pomoci ukazováčku přímo do děložního krčku klisny (Morel 2015).

Pro inseminaci klisen se používají až po ramena dlouhé rukavice. Špička 20 – 22 palců dlouhého katetru se umístí do dlaně a malé množství nonspermicidního maziva se nanese na hřbet ruky. Inseminační katetr, který je krytý rukou, prochází poševní klenbou, kde pronikne skrze děložní krček, který nahmatáme za pomoci prostředníčku. Inseminační katetr dále prochází skrz děložní čípek do těla dělohy (Blanchard et al, 2003). Jakmile katetr projde skrze děložní krček, zatlačí se cca 2 cm do dělohy (Morel, 2015). Stlačením inseminační stříkačky, která je naplněna semenem a připojena ke katetru, pomalu uložíme inseminační dávku do děložní dutiny klisny.



Obr. 10 Zavádění katetru

Další možností, stejně účinnou, je inseminovat klisnu za pomoci osvětleného vaginálního zrcadla, pro zavedení katetru na děložního krčku (Blanchard et al, 2003).

Po deponaci spermatu přidržíme zevní branku krčku a simulujeme frikční pohyby hřebce tak, aby došlo k navození děložních kontrakcí. Po inseminaci je vhodné klisnu provádět (Dušek a kol, 2011).

Postup pro inseminaci nízkou dávkou spermatu

Pro tento druh inseminace se používají trochu jiné metody, než je tomu u klasické inseminace, jsou dva základní postupy. Jako první je Hysteroskopická inseminace (HI).

Používá se předeheřtý 1,2 až 1,6 metr dlouhý videoendoskop. Má tu výhodu, že lze vizualizovat celý proces a přesně lokalizovat místo aplikace. Veškeré nástroje jsou desinfikované. Endoskop je zaveden do děložního těla klisny. Inseminační technik navádí endoskop rukou skrze rektum. Špička endoskopu je zavedena do děložního rohu, s ním je přivedeno i malé množství vzduchu, aby byla vidět nálevka vejcovodu. Jakmile je nálevka vejcovodu identifikována a endoskop je v její těsné blízkosti, lze vpravit sperma. Není vhodné aplikovat objem větší než 1 ml, ten má jinak tendenci stékat skrz děložní roh (Morris et al, 2000). Běžně se používá dávka o objemu 0,1 až 0,2 ml. Po aplikaci je endoskop vyjmut a veškerý vzduch je z dělohy i děložního rohu důkladně odstraněn (Blanchard et al, 2003).

Druhou metodou je Rektální zavádění do děložního rohu (RI). Zde se katetr zavádí za pomoci 65 cm dlouhé pružné pipety. Vše je opět naváděno rukou přes konečník klisny. Pipeta je pomalu zaváděna přes děložní roh až k vaječníku, na kterém je preovulační folikul. Po správném umístění pipety se do ní vloží slámka s otevřeným koncem obsahující inseminační dávku, a za pomoci tenkého pístu se vtlačí až na konec pipety. Poté se vytlačí sperma na dané místo. Takto lze vložit i více dávek naráz (Samper a Plough, 2010).

Obě metody mají své výhody i nevýhody. Výhodami RI jsou nízké náklady na provedení a k manipulaci je potřeba pouze dvě osoby. Na druhou stranu mezi hlavní nevýhody patří riziko poranění konečníku nebo dělohy klisny. Co se týče HI, nevýhodami jsou především: potřeba většího personálu (nejméně 3 osoby) a vysoká úroveň dovednosti práce s endoskopem. Obě dvě metody lze provést velmi rychle, u metody HI by se nemělo překročit 5 minut, aby nedošlo k výraznému podráždění či traumatu dělohy. Pokud provádíme takovouto inseminaci ihned při prvním cyklu po porodu, mohou nastat potíže s manipulací ještě stále zvětšené dělohy (Lyle, 2005).

3.9 Asistovaná reprodukce koní – embryotransfer

Technika asistované reprodukce u koní je k dispozici teprve krátkou dobu, ve srovnání s jinými domácími druhy zvířat, zejména přežvýkavci. Hlavními důvody pro toto opoždění je nedostatek vaječníků získaných z jatek, nedostatečný zájem ze strany chovatelů koní a chovatelských sdružení a rozdílnost anatomie i fyziologie od ostatních druhů zvířat (Galli et al, 2013). Přesto se uskutečňují pokusy s cílem zlepšit různé biotechnologické metody. V posledních letech byla získána mláďata za pomoci klonování. Metody pro kryokonzervaci vajíček a embryí jsou neustále zdokonalovány. I přes dosavadní slibné výsledky z několika studií a výzkumů, je třeba se stále více věnovat zdokonalování: metody produkce embryí in vitro (in vitro oplodnění, klonování), kryokonzervace zárodečných buněk a embryí a umělou inseminaci klisen sexovaným spermatem (Kochan et al, 2016).

Embryotransfer je metoda asistované reprodukce, která ve světě za poslední roky stoupá v oblibě (Pycock, 2016). První úspěšný přenos embryí u koní byl proveden v roce 1972 a v současnosti se provádí okolo 25 000 přenosů ročně po celém světě (Kraemer a Duane, 2013).

Celý princip embryotransferu je nejčastěji ve vyjmutí embrya z klisny označované jako dárce a následné přenesení do klisny zvané jako příjemce (Dušek a kol, 2011).

3.9.1 Klisna "dárce"

Hlavním důvodem proč se embryotransfer provádí, je možnost odebrání oocytů klisen, které nemohou odchovat z důvodu fyzického zdraví vlastní hříbě, a vložit jej do klisny zdravé a tohoto schopné a tímto způsobem získat od první klisny zdravé potomky (Pycock, 2016). Jako další skupinou vhodnou pro embryotransfer jsou klisny, ze kterých chceme získat více potomků, než je přirozeně možné. Nebo klisny, které kvůli aktivní sportovní kariéře nemohou být březí (Blanchard et al, 2003).

U této metody reprodukce je důležité zvážit, zda je klisna, kterou chceme množit, natolik cenná, že stojí za vynaložené úsilí i finance. Jelikož se to týká klisen, u kterých standartní připouštěcí metody selhaly, je důležité, aby odborník přesně zjistil příčinu fertility klisny. To umožňuje provést nejméně složitou, nejvhodnější a úspěšnou metodu asistované reprodukce pro neplodnou klisnu a ta může takto překonat konkrétní příčiny neplodnosti (Da Silva, 2008).

Před tím, než vůbec zahájíme celý proces embryotransferu, je důležité zajistit, aby reprodukční orgány klisny byly bez jakékoli infekce a celý její odchov by se měl soustředit na zamezení vzniku endometritid, které by výrazně snížily, až znemožnily úspěšnost provedení transferu. (Blanchard et al, 2003).

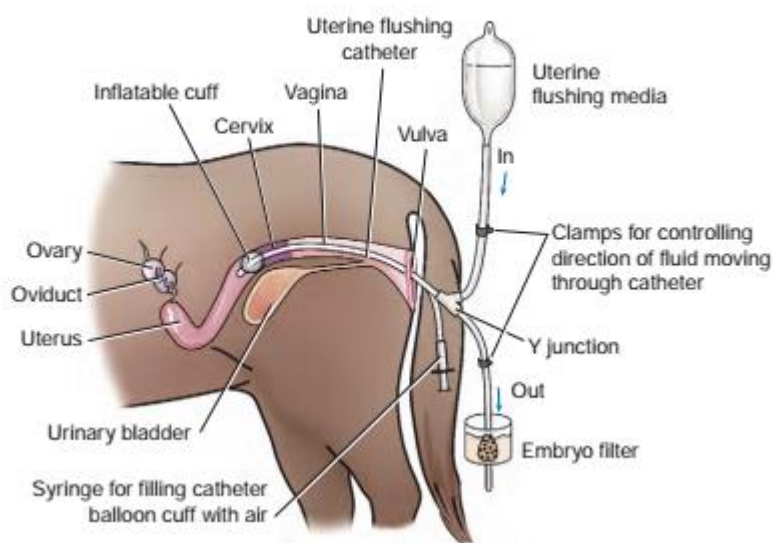
3.9.2 Odběr embryí

Během estru, který může být v přirozeném cyklu nebo uměle vyvolaný (s cílem synchronizace říje, superovulace apod.) je klisna zapuštěna. Je důležité vědět kdy klisna ovulovala (zjišťujeme sonografií), bez této informace nelze vypočítat den, kdy je vhodné provést výplach embryí (Blanchard et al, 2003). Ten se běžně provádí okolo 7. až 8. dne březosti. U klisen, které byly inseminovány mraženým spermatem, je doporučeno výplach opozdit o půl dne kvůli možnému zpoždění embryonálního vývoje (Dascanio et al., 2014). Důležité je nevyplachovat dříve než v druhé polovině 5. dne, či 6. den. Do 6. dne embryo

sestupuje do dělohy. V této době jsou embrya ve fázi moruly a po vstupu do dělohy dochází k rychlému nárůstu do stádia blastocysty. Embrya by se neměla odebírat ani starší 9 dnů, kdy klesá úspěšnost přenosu (Squires, 1999).

Před samotným výplachem embryí, je potřeba zjistit (ultrasonografií), zda se na vaječníku nachází jedno nebo více žlutých tělísek. Pokud ano, v děloze bude přítomno embryo/embrya. Pokud je přítomno žluté tělísko, přikročí se k procesu výplachu. Předem je klisna mírně sedována, protože tlak kapaliny v děloze vyvolává jistý diskomfort. Měl by být prázdný močový měchýř, aby neutlačel dělohu a klisna musí být ošetřena desinfekcí v oblasti sedacích hrbolů a vnějších reprodukčních orgánů a řádně omyta a osušena, je vhodné vyvázat zapletený ocas.

Připravené vyplachovací médium by mělo být v pokojové teplotě a před zaváděním katetru do klisny, by se jím měl naplnit právě katetr a celá hadička, která se bude zavádět. Katetr se zavádí do děložního krčku a skrze něj se vlévá pouze pod tlakem gravitace vyplachovací médium do dělohy klisny. Pohmatem přes rektum se zjistí naplnění obou děložních rohů a následně se proces otočí a médium se nechá vytékat zpět přes filtr. Proces se obvykle třikrát opakuje. U mladých klisen k naplnění postačí cca 1 l, zatímco u starších, které měly hříbata, se aplikuje celkem 2 l i více (Blanchard et al, 2003). Po výplachu jsou embrya spláchnuta z filtru do laboratorní misky a vyhledána za pomoci mřížky, při 15 násobném zvětšení (Squires, 1999). Klisně se po výplachu aplikují prostaglandiny, aby se zabránilo nechtěné březosti (Blanchard et al, 2003).



Obr. 11 Výplach dělohy

Každé odebrané embryo je potřeba hodnotit. Embrya jsou zkoumána při 40x až 80x zvětšení a řadí se do skupin od 1 (vynikající – symetrický kulovitý tvar, jednotná barva a velikost buněk) do 4 (špatné- degenerované buňky, nekompaktní embryo) (Squires, 1999). Hodnotí se také vývojové stádium (Blanchard et al, 2003).

Předpokládaný vývoj embryí podle stáří:

Stáří embrya (dny)	Průměrná velikost embrya (um)	Vývojové stádium
6	200	morula / raná blastocysta
7	400	morula / blastocysta
8	1000	blastocysta
9	2000	blastocysta

(Squires, 1999).

K epigenetickým změnám dochází nejčastěji právě od oplození do časného embryonálního vývoje. Proto je důležité embryo hodnotit, ale také se soustředit na výživný a zdravotní stav klisny, neboť se jedná o faktory, které výrazně ovlivňují kvalitu potomstva (Chavatte-Palmer et al, 2016).

3.9.3 Superovulace

Přenos embryí je nejběžnější metodou asistované reprodukce u koní, stále je však omezen neefektivní metodou superovulace u klisen (Hinrichs, 2012).

Při normálním cyklu dochází k primární folikulové vlně, kdy narůstá více folikulů, ale pouze jeden se stává dominantním a pokračuje v růstu, zatímco ostatní jdou do regrese. Následně se dominantní folikul stává preovulačním a pod vlivem hormonů pokračuje k ovulaci. V přirozeném prostředí tedy běžně ovuluje jen jeden folikul, možnost dvojité ovulace je velmi nízká.

Jak se vyvíjí reprodukční technologie, je zapotřebí především pro embryotransfer či ICSI získat během jednoho estrálního cyklu více oocytů – superovulace. Získáním většího

množství oocytů či přímo embryí vede k navýšení počtu potomků a to je u některých klisen velmi žádaný proces. K dosažení superovulace se používají různé hormonální látky jako gonadotropin (GnRH) či equinní folikulostimulační hormon (eFSH) a další. Míra úspěšnosti je velmi nízká a u klisen je pozorována individualita reakce na jednotlivé přípravky (Roser a Mayers-Brown, 2012).

Hlavní problém při superovulaci představuje stavba vaječníku klisen. Ten díky své specifické anatomii není dostatečně velký na to, aby se na něm mohlo vyvíjet více folikulů naráz. Folikuly potřebují dozrát v tzv. ovulační jamce, která svým tvarem stačí pro jediný dominantní folikul (Blanchart et al, 2003). Zatím je tedy superovulace u koní vnímána jako neúčinná (Kochan et al., 2016).

Zatím nejlépe hodnocenou látkou pro superovulaci je equinní folikulostimulační hormon (eFSH). V roce 2009 došlo k výzkumu s využitím nízkých dávek eFSH. Klisnám byl od 8. dne po ovulaci aplikován eFSH (5mg 1x denně) až do velikosti folikulů 35-40mm. Ovulace byla vyvolána prostaglandinem a klisny byly inseminovány každých 48 hodin do dosažení ovulace. Následně byla embrya vypláchnuta 8. den od ovulace. Kontrolní skupina nedostávala žádné hormony. Léčená skupina oproti kontrolní měla o 50 % vyšší výskyt dvojitých ovulací a jedna klisna měla dokonce trojitou ovulaci. Nicméně počet embryí, která byla využitelná pro další manipulaci, se u obou skupin shodoval. Stejně tak počty zabřezlých klisen "příjemkyň" byl u obou skupin stejný (Araujo et al., 2009). Stejně jako předchozí autoři, shoduje se Araujo et al. (2009) na tom, že v oblasti superovulace je stále co zkoumat a jedná se, zatím, o nespolehlivou metodu.

3.9.4 Klisna "příjemkyně"

Jako klisny "příjemkyně" vybíráme zdravé klisny, které mají kvalitní a pravidelné říje a celkově lze u nich předpokládat bezproblémový transfer embrya a následnou březost s porodem (Blanchard et al, 2003). Takto vybranou klisnu/ klisny je třeba před transferem připravit. Klisna- příjemkyně by měla být ideálně 5-6 dnů po ovulaci. Klisnu vyšetříme jak palpací, tak sonograficky – dostatečný tonus dělohy, co nejtěsněji uzavřený krček, který svědčí o dostatečném množství progesteronu, ultrasonograficky potvrdíme přítomnost

žlutého tělíska. Pokud je klisna shledána vhodnou pro transfer, je opět dostatečně hygienicky ošetřena a také mírně sedována (McKinnon et al, 2011).

3.9.5 Synchronizace říje

Správná synchronizace říje je důležitá pro úspěšné provedení embryotransferu. Je ideální, aby klisna ovulovala 1-2 dny po klisně, ze které embrya odebíráme. Je obtížné vše přesně načasovat kvůli individuální délce estru u jednotlivých klisen (McKinnon, et al, 2011). Pokud nedojde ke správné synchronizaci a cykly obou klisen se budou rozcházet o více jak dva dny, embryo s největší pravděpodobností uhyne z důvodu nevhodného děložního prostředí (Wilsher, 2011).

Nejčastěji se k synchronizaci říje používá progesteron. Ten je klisnám podáván perorálně a má výhodu, že lze aplikovat v jakékoli fázi cyklu a lze jej použít i u klisen s nepravidelným estrálním cyklem. Obvykle je podáván po dobu 5 dní. Po vysazení léčby nastává ovulace okolo 4. dne (Greco et al, 2012).

3.9.6 Přenos embryí

Většina embryí získaných od klisen- dárkyň je okamžitě použita pro přenos do klisny "příjemkyně", zde je nutné u klisen využít synchronizace říje. Případně lze embrya zachladit a použít pro přenos po dobu 24 hodin (Squires, 2016). Není rozdíl v přenosu čerstvého, zachlazeného či rozmrazeného embrya.

Pro přenos embryí se využívají dvě základní metody: chirurgická a nechirurgická. Jejich úspěšnost se uvádí okolo 70%. Chirurgická metoda je starší a v dnešní době její využití klesá. Celý princip je v provedení laparotomie (zde je nutná i lokální anestezie), vytažení děložního rohu a jeho propíchnutí jehlou. Vzniklým otvorem se vloží embryo (s malým množstvím média < 250 μ l). Po zavedení se rána v děložním rohu nezašívá a zašívá se pouze rána na břicho klisny. Jelikož embryo je v děloze klisny mobilní, připadá v úvahu uložení embrya pouze do děložního rohu.

Nechirurgická metoda je téměř totožná s metodou inseminace (Squires, 1999). Využívá se standardní inseminační pistole Cassou (nerezová, překrývá se plastovým pláštěm). Ta je k dostání pro dvě velikosti slávek-pejet. O obsahu 0,25 ml pro embrya do 1000 μ m

a o obsahu 0,5 ml pro embrya o velikosti nad 1000 μm (McCinnon, 2011). Ta je zavedena přes děložní krček do dělohy stejným způsobem jako při inseminaci. Embryo se opatrně uloží do těla dělohy nebo do děložního rohu (Squires, 1999). Celý proces by neměl trvat déle než 2 minuty a musí se bedlivě předcházet zanesení bakterií do dělohy klisny (McCinnon, 2011).

3.9.7 Kryokonzervace – vitrifikace embryí

Pouze malá část získaných embryí je zmrazena a dlouhodobě uchována, přestože se jedná o efektivní metodu uchování embryí. Jsou zde dvě hlavní příčiny, proč se tato možnost příliš nevyužívá. První překážkou je potřeba embryí menších 300 μm – tato velikost odpovídá morule či brzké blastocystě. Ta je těžká detekovat a správně načasovat výplach dělohy klisny. Důvodem proč je potřeba mrazit takto malá embrya je, že po mnoha výzkumech, pouze za použití takto malých embryí dochází k dobrému zabřezávání a celkově velmi dobře snáší proces zmrazení a rozmrazení. Dalším důvodem je nedostatek vhodných embryí ke zmrazení, či celkově nedostatek embryí, jelikož většina je ihned přenesena nebo schlazena. Výhodou je dostatek času pro přípravu klisny, která embryo přijme či jejich převoz z místa odběru (Squires, 2016).

Důvodem proč nelze mrazit embrya větší než 300 μm je tvorba blastocoelu, prvotní dutiny, která je vyplněna tekutinou. Dlouhodobě se předpokládalo, že její narušení vede k usmrcení embrya. Poslední výsledky studií došly k možnosti mikromanipulace vrtáku a narušení této dutiny. Po zhroucení blastocysty následuje vitrifikace embrya. To vedlo ke krajní možnosti kryokonzervovat embrya do velikosti 650 μm . Jedná se o náročnou a drahou metodu (Hinrichs a Choi, 2016).

Kryokonzervace embryí je odlišná od kryokonzervace spermatu. Pokud bylo aplikované pomalé schlazování podobně jako u spermatu, docházelo k rozpadu celých embryí, jednotlivé buňky nepodléhaly degradaci v takové míře jako je tomu u druhé metody vitrifikace. Vitrifikace, rychlé zmrazení embrya kapkou tekutého dusíku, je mnohem úspěšnější. Celá embrya nepodléhají v takové míře rozpadu, a to je důležité. Jednotlivé buňky uvnitř embrya jsou poškozeny více než u pomalého mrazení, ale celková přežitelnost embrya je u vitrifikace vyšší (Hendriks et al, 2015). Médium, které se používá pro vitrifikaci

se skládá především z ethylenglykolu, galaktózy a sacharózy. V celém procesu vitrifikace je důležité, aby nevznikly žádné krystalky (Hinrichs, 2012).

3.10 Manipulace s oocyty

Není však nutné vyplachovat již vzniklé embryo. Jednou z možností je získání pouze oocytů. Tento postup lze využít nejen u živých dárcovských klisen, ale také z vaječníků klisen, které nedávno zemřely (Leemans, 2012).

3.10.1 Odběr oocytů

Odběr oocytů (OPU- oocyte-pick-up) z živých klisen se provádí vypláchnutím oocytů z folikulů a to transvaginálně nebo transabdominálně – přes břišní stěnu (Leemans, 2012). Folikulární vpichy vedené transvaginálním ultrazvukem jsou široce používány u klisen pro diagnostiku, výzkum a aplikaci. Po sedaci klisny jsou folikuly z obou vaječníků odsáty jehlou zavedenou přes vaginální zeď do vaječníku (Diego, 2016). Posmrtné oocyty je možno získat vyškrábnutím folikulů (Leemans, 2012). Nezralé oocyty následně dozrávají in vitro (Hinrichs, 2013).

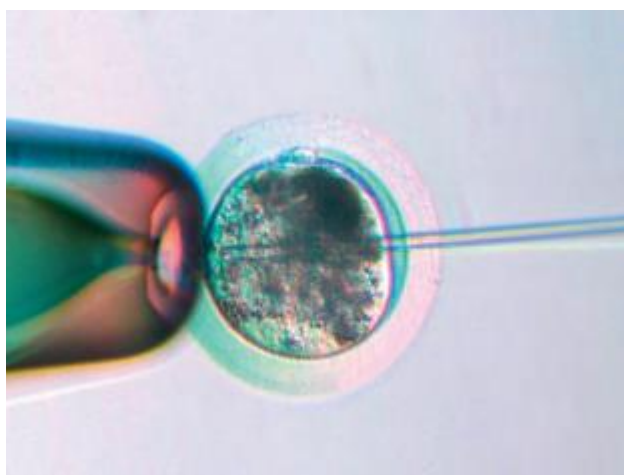
Po dozrání oocytů mohou být vajíčka oplodněna in vitro nebo mohou být vpravena do vejcovodu klisny "příjemkyně" k oplodnění (in vivo). Vzhledem k tomu, že konvenční in vitro fertilizace (IVF), je u koní neúspěšná, provádí se intracytoplazmatická injekce spermie (ICSI). Po ICSI mohou být oplodněné oocyty zavedeny do vejcovodu klisny "příjemkyně", která má synchronizovaný estrální cyklus nebo se dále kultivují in vitro až do stádia blastocysty. Následně získané blastocysty jsou přeneseny do dělohy klisny "příjemkyně" (Leemans, 2012).

3.10.2 Intracytoplazmatická injekce spermie (ICSI)

Efektivní metody pro odběr oocytů z živých klisen přinesly klinický zájem o metodu oplodnění in vitro (IVF). Konvenční metoda IVF, jak je používána u skotu, se ukázala u koní

jako neúčinná. Z tohoto důvodu byla vyvinuta efektivnější metoda pro vytvoření zygoty u koní - intracytoplazmatická injekce spermie (ICSI) (Alm, 2010).

Za ICSI považujeme metodu, kdy je vybrána jedna spermie a ta je vpravena přímo do zralého vajíčka vstřikovacím Piezo systémem (Alm, 2010). Před aplikací je potřeba provést kapacitaci spermie, nejlepší účinky má calcium inophorum (Del Campo et al, 1990). Vzniklá zygota zraje do embrya v laboratorním prostředí (in vitro) a poté je vpravena do dělohy či děložního rohu připravené klisny (Alm, 2010).



Obr. 12 ICSI – vpravení spermie do oocytu

3.11 Sexace spermií

Mezi chovateli se stává stále více populární sexace spermií, ta umožňuje (i když ne na 100%) předem určit pohlaví hříběte (Cuervo- Arango, 2015).

Sexování spermií u koní se provádí za použití průtokové cytometrie tříděním buněk na základě v nich obsažené DNA a jejími kvantitativními rozdíly mezi chromozomem X a Y. Se současnými technologiemi sexace spermií je nemožné používat inseminační dávku o normálním objemu spermatu, proto je k tomu využívána dávka s nízkým obsahem spermatu. Jelikož je při inseminaci zmrazeným sexovaným spermatem, se sníženou dávkou dosahováno malého počtu zabřeznutí a dochází i k potratům, je často volena metoda introcytoplazmatické injekce, při ní bylo dosaženo nízkého počtu dělicích se vajíček, ovšem u většiny z nich pokračoval normální vývoj a narodila se normální hříbata (Galli, 2013).

I při využití sexovaného spermatu je na místě provést 60.-70. den sonografii a potvrdit březost a požadované pohlaví. Pohlaví se v tomto stádiu vývoje určí podle polohy

genitální papily vůči ocasu a pupeční šňůře. U samic se genitální papila nachází blízko ocasu, zatímco u samců je blízko pupeční šňůry (Cuervo-Arango, 2015).

3.12 Klonování koní

Klonování, nebo také přenos nukleonového jádra – NT, je metodou asistované reprodukce, která má za cíl především udržet genetické hodnoty. Přestože úspěšnost této metody je nízká, zájem o ni pomalu roste (Olivera et al, 2016). Zároveň vystávají otázky, zda je správné takto množit koně, případně je dále využívat ve sportu apod. V Evropských zemích je zvláště Dánsko a Spojené Království proti klonování jako takovému, zatímco ve světě, zvláště Severní i Jižní Americe, je tato metoda přijímána velmi otevřeně. V Evropě se poprvé v roce 2012 zapsali 3 koně vzniklí klonováním, jako reakci na to musela FEI (jezdecká federace) umožnit vstup takovýchto koní na sportovní soutěže (Allen et al, 2016).

Klonování hříbat se provádí nejčastěji metodou přenosu jader. Pro tento postup je potřeba mít oocyt od jedné klisny a somatickou buňku od klisny druhé, jejíž genetický materiál chceme klonovat. Oocyt je potřeba enukleovat, zbavit veškerého genetického materiálu – jádra, autor uvádí i polárního tělíska. Ze somatické buňky druhé klisny se provede transfer jádra do enukleovaného oocyту. Aby došlo k fúzi jádra a oocyту, využívají se elektrické impulsy, které destabilizují buněčnou membránu a dojde ke splynutí buněk a aktivaci. Oocyt se následně vyvíjí v embryo, které je přeneseno embryotransferem do klisny pro další vývoj (Wonyou et al, 2015).

Metoda přenosu jader nabízí mnoho výhod. Nejenže lze takto produkovat velké množství potomků po jednom jedinci (na rozdíl například od štěpení embrya), ale také lze získávat potomky od neplodných jedinců, což se týká také valachů a takto vzniklí jedinci jsou dále plodní. Nevýhodou je samozřejmě vysoká finanční náročnost. Úspěšnost, tedy narození živého potomka, se uvádí 10-15 % (Keefer, 2015).

4 Závěr

V dnešní době mají chovatelé koní široké možnosti v reprodukci. Každý si může vybrat nejvhodnější metodu. Přirozené připouštění pomalu ustupuje novým metodám. Mezi nejpoužívanější patří umělá inseminace, dosahuje velmi dobré úspěšnosti v zabřezávání a nabízí mnoho výhod. Ať se jedná o inseminaci chlazenou či mraženou dávkou, majitel může vybírat z širší nabídky hřebců, inseminační dávky jsou vyráběny z vyšetřeného spermatu, tedy klesá riziko přenosu nemocí. Klisna nemusí být transportována a odpadá s tím spojený stres i náklady. Otevírá se také možnost použít hřebce, který by byl jinak nedostupný kvůli vzdálenosti. Pro majitele hřebců vytvoří z jedné dávky spermatu více inseminačních dávek, v této souvislosti je snaha rozšířit využití tzv. inseminační dávky s nízkou dávkou spermatu. Ta dává možnost vytvořit inseminační dávky až se 100x menším počtem spermií, než je tomu u běžných dávek. Většího počtu využití dosahuje i embryotransfer. Zde není tak vysoká úspěšnost, přesto se jedná o jedinečnou možnost jak umožnit reprodukci i klisnám, které nemohou odnosit vlastní hříbě. V souvislosti s embryotrasferem se vyvíjí i dozrávání oocytů v laboratorním prostředí, toho je využito např. u klisen, které v nedávné době zemřely nebo mají problémy se zabřeznutím. Embryotransfer má přes své výhody i mnoho nevýhod. Jedná se o nákladnou metodu ať z hlediska vybavení a personálu, tak z důvodu potřeby kvalitních klisen, které slouží jako příjemkyně embryí. Problémem u koní je superovulace, která je z důvodu anatomie vaječníků těžko realizovatelná. V reprodukci koní se okrajově využívá i klonování. Náročnost klonování je opravdu vysoká, dává však možnost reprodukovat i koně (v přesné genetické kopii), kteří by jinak neměli možnost se množit, např. valaši. V reprodukci koní je možnost produkce sexovaných spermií, kde jsou odděleny spermie nesoící samčí a samičí chromozom. Lze potom oplodnit vajíčko a předem znát pohlaví plodu. Metod se nabízí mnoho a každá z nich má své výhody i nevýhody, je proto na majitelích klisen, která metoda je pro ně i pro jejich klisny nejvhodnější.

5 Zdroje

Allen, W. R., Rossdale, P. D., Antczak, D. F., Stout, T. A. E. 2016. Science-in-brief: report of the havemeyer foundation W. R. (Twink) Allen symposium on equine fertility and assisted reproduction. *Equine veterinary journal*. 48 (3). 267-269.

Alm, H., Vernunft, A., Torner, H., Bhojwani, S., Becker, F., Kanitz, W. 2010. ICSI- a biotechnological method to produce equine embryos in vitro. *Hippiatrika Verlag*. 26 (1). 59-62.

Alvarenga, M. A., Papa, F. O., Neto, C. R. 2016. Advances in stallion semen cryopreservation. *Veterinary Clinics of North America – Equine Practice*. 32 (3). 521-530.

Araujo, G. H., Rocha, F. A. N., Lopes, E. P., Moya, C. F., Alvarenga, M. A. 2009. Use of a low dose of equine purified FSH to induce multiple ovulations in mares. *Reprod. domest. anim.* 44 (3). 380-383.

Beuzekom, E. L., Hoogendoorn, A. C., Colenbrander, B., Stout, T. A. E., Back, W. 2017. Hindquarter movement of sporthorse stallions during semen collection. *Journal of equine veterinary science*. 10.

Blanchard, T. L., Verner, D. D., Schumacher, J. 2003. *Manual of equine reproduction*. Mosby. 209 p. ISBN: 978-0-323-01713-8.

Burger, D., Meroni, G., Thomas, S., Sieme, H. 2015. Effects of ground semen collection on weight bearing on hindquarters, libido, and semen parameters in stallions. *Theriogenology*. 84 (5). 687-692.

Cueryo-Arango, J. 2015. Choosing the sex of the offspring in commercial equine embryo transfer center. *Medycyna weterynaryjna*. 71 (4). 195-197.

Da Silva, M. A. C. 2008. When should a mare go for assisted reproduction?. Elsevier science. 70 (3). 441-444.

Dascanio, J., McCue, P. 2014. Equine reproductive procedures. John Wiley. USA. 576 p. ISBN: 978-0-470-96039-4.

Del Campo, M. R., Donoso, X., Parrish, J. J., Ginther, O. J. 1990. In vitro fertilization of in vitro matured equine oocytes. Journal of Equine Veterinary Science. 10 (1). 18-22.

Diego, R., Douet, C., Reigner, F., Blard, T., Cognié, J., Deleuze, S., Goudet, G. 2016. Influence of transvaginal ultrasound-guided follicular punctures in the mare on heart rate, respiratory rate, facial expression changes, and salivary cortisol as pain scoring. Elsevier science inc. 86 (7). 1757-1763.

Dinger, J. E., Noiles, E. E. 1982. Vaginal and cervical-mucus ferning as a method of detecting estrus in mares. Theriogenology. 18(6). 633-642.

Dušek a kol. 2011. Chov koní. Brázda. Praha. 398 s. ISBN: 978-80-209-0388-4.

Galli, C., Colleoni, S., Duchi, R., Lagutina, I., Iazzari, G. 2013. Equine assisted reproduction and embryo technologies. Brazilian journal of animal reproduction. 10 (3). 34-343.

Gibb, Z., Aitken, R. J. 2016. Recent Developments in Stallion Semen Preservation. Journal of equine veterinary science. 43. 29-36.

Greco, G. M., Fioratti, E. G., Dell'aqua Jr. J. A., Castro-Chaves, M. M. B., Alvarenga, M. A. 2012. Pregnancy and embryo loss rates of recipients synchronized through novel long-acting progesterone protocols. Animal reproduction and veterinary radiology. 32 (7). 421-422.

Hendriks, W. K., Roelen, B. A. J., Colenbrander, B., Stout, T. A. E. 2015. Cellular damage suffered by equine embryos after exposure to cryoprotectants and cryopreservation by slow freezing or vitrification. Equine veterinary journal. 47 (6). 701-707.

- Hinrichs, K. 2012. Assisted reproduction techniques in the horse. *Csiro publishing*. 25 (1). 80-93.
- Hinrichs, K. 2013. Assisted reproduction techniques in the horse. *Reproduction fertility and development*. 25 (1). 80-93.
- Hinrichs, K., Gomez, J., Roldán, J. E., Riera, F. L. 2016. Factors affecting the efficiency of foal production in a commercial oocyte transfer program. *Elsevier science*. 85 (6). 1053-1062.
- Hinrichs, K., Choi, Y. H. 2012. Equine embryo biopsy, genetic testing, and cryopreservation. *Journal of equine veterinary science*. 32 (7). 390-396.
- Hinrichs, K., Choi, Y. H. 2016. Micromanipulation of equine blastocyst to allow vitrification. *Reproduction, fertility and development*. 28 (8). 1092-1096.
- Chavatte-Palmer, P., Robles, M., Tarrade, A., Duranthon, V. 2016. Gametes, embryos, and their epigenome: considerations for equine embryo technologies. *Journal of equine veterinary science*. 41. 13-21.
- Keefer, C. L. 2015. Artificial cloning of domestic animals. *Department of Animal and Avian Sciences*. 112 (29). 8874-8878.
- Kochan, J., Nowak, A., Migdal, A., Witkowski, M. 2016. Biotechnology in equine reproduction: prospects and limitations. *Medycyna weterynaryjna*. 72 (4). 226-230.
- Kochan, J., Nowak, A., Migdał, A., Witkowski, M. 2016. Biotechnology in equine reproduction: prospect and limitations. *Polish soc veterinary*. 72 (4). 226-230.
- Kraemer, Duane, C. 2013. History of equine transfer and related technologies. *Journal of equine veterinary science*. 33 (5). 305-308.
- Leemans, B., Smits, K., Van Soom, A., Nelis, H. 2012. Artificial reproductive techniques in the horse: applications and limitations. *Univ ghent*. 81 (6). 329-340.

Lyle, S. K. 2005. Low-dose insemination-why, when and how. *Theriogenology*. 64 (3). 572-579.

Marvan, F., Hampl, A., Hložánková, E., Kresan, J., Massanyi, L., Vernerová, E. 2007. *Morfologie hospodářských zvířat*. Brázda. Praha. 303 s. ISBN: 978-80-213-1658-4.

McKinnon, O. A., Squires, E. L., Vaala, E. W., Varner, D. D. 2011. *Equine reproduction*. Wiley Blackwell. p. 3288. ISBN-13: 978-0813819716.

Morel, D. C. G. M. 2015. *Equine reproductive physiology, breeding and stud management*. Cabi international. p. 434. ISBN: 1780644426.

Morris, L. H. A., Hunter, R. H. F., Allen, W. R. 2000. Hysteroscopic insemination of small numbers of spermatozoa at the uterotubal junction of preovulatory mares. *Journal of reproduction and fertility*. 118 (1). 95-100.

Olivera, R., Moro, L. N., Jordan, R., Luzzani, C., Miriuka, S., Radrizzani, M., Donadeu, F. X., Vichera, G. 2016. In Vitro and In Vivo Development of Horse Cloned Embryos Generated with iPSCs, Mesenchymal Stromal Cells and Fetal or Adult Fibroblasts as Nuclear Donors. *Plos one*. 11 (10).

Reece W. 2010. *Fyziologie a funkční anatomie domácích zvířat*. Grada. 480 s. ISBN: 978-80-247-3282-4.

Roser, J. F., Mayers-Brown, G. 2012. Superovulation in the mare: a work in progress. *Journal of equine veterinary science*. 32 (7). 376-386.

Samper, J. C. 2009. *Equine breeding management and artificial insemination*. Saunders Elsevier. p. 336. ISBN: 978-1-4160-5234-0.

Samper, J. C., Plough, T. 2010. Techniques for the insemination of low doses of stallion sperm. *Reproduction in domestic animals*. 45 (2). 35-39.

Samper, J. C., Tibary, A. 2006. Disease transmission in horses. *Theriogenology*. 66 (3). 551-559.

Slezáková, N., Najbrt, R. 1982. *Veterinární anatomie*. 2. díl. SZN. Praha. 520 s. ISBN: 07-006-82-04/50.

Squires, E. L. 2016. Breakthroughs in equine embryo cryopreservation. *Vet. Clin. Nort Am. Equine Pract.* 32 (3). 415-424.

Squires, E. L., McCue, P. M., Vanderwall, D. K. 1999. The current status of equine embryo transfer. *Theriogenology*. 51 (1). 91-104.

Wanyou, L., Kilyoung, S., Inhyoung, L., Hyungdo, S., Byeong, C. L., Seongchan, Y., Goo, J. 2015. Cloned foal derived from in vivo matured horse oocytes aspirated by the short disposable needle systém. *Journal of veterinary science*. 16(4). 509–516.

Wilsher, S., Lefranc, A. C., Alen, W. R. 2011. The effects of an advanced uterine environment on embryonic survival in the mare. *Equine veterinary journal*. 44 (4). 432-439.

Obr. 1,4,5,6,11,12: Blanchard, T. L., Verner, D. D., Schumacher, J. 2003. *Manual of equine reproduction*. Mosby. 209 p. ISBN: 978-0-323-01713-8.

Obr. 2: Sendel, T. 2011. *Anatomy, physiology and reproduction in the stallion*. Veterinary science and policy unit. 11 (3).

Obr. 3,7, 8, 9, 10: vlastní fotodokumentace