

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra veterinárních disciplín

Asistovaná reprodukce u ovcí - embryotransfer

Bakalářská práce

autor práce: MVDr. Miroslav Hrdlička

školitel: MVDr. Petr Slavík, Ph.D.

2012

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci na téma Asistovaná reprodukce u ovcí – embryotransfer vypracoval samostatně a použil jen pramenů, které cituji a uvádím v přiložené bibliografii.

V Praze dne: 20. 3. 2012

Podpis autora práce:

Souhrn: Asistovaná reprodukce u ovcí – embryotransfer

Klíčová slova: ovce, reprodukce, reprodukční biotechnologie, embryotrasfer

Práce popisuje metody asistované reprodukce v chovu ovcí. Mezi základní technologie patří detekce říje, synchronizace říje a ovulace, překonání sezónního anestru, inseminace ovcí a superovulace s embryotransferem.

Základem každé z metod je správná detekce říje. Vzhledem k tiché říji se u ovcí využívá berana-prubíře. Jako prubíře je vhodné používat mladé, temperamentní, licentované berany. Zvládnutím synchronizace říje byl položen základní kámen k rozšiřování a širšímu uplatnění dalších reprodukčních biotechnologií, především inseminace a embryotransferu. Rozlišujeme dva základní přístupy. Buďto zkracujeme luteální fázi cyklu pomocí prostaglandinů nebo naopak prodlužujeme tuto fázi pomocí gestagenů. Synchronizaci říje doplňuje načasování a zpřesnění doby ovulace. K tomu se používají koňský choriový gonadotropin nebo humánní choriový gonadotropin či jejich kombinace. Základem k překonání sezónního anestru je tzv. beraní efekt a dále se používají hormonální preparáty, především gestageny, koňský choriový gonadotropin či melatonin. Zavedení inseminace vedlo k intenzifikaci ve šlechtění. V současné době není na území ČR žádná schválená inseminační stanice. Objem inseminační dávky závisí na způsobu použití, t.j. na místě deponování spermií a způsobu konzervace semene. Mezi metody inseminace patří vaginální, cervikální, transcervikální intrauteriní a laparoskopická intrauterinní. Koncepce je závislá na metodě inseminace a pohybuje se od 20 do 80 %. Před samotným transferem embryí je třeba vhodný výběr dárců a příjemců. K superovulaci je možno využít koňský sérový gonadotropin nebo dnes nejčastěji používaný folikuly stimulující hormon. Odběr embryí je možno provést mezi 5 - 9 dnem po inseminaci. Využívá se buď laparotomický nebo laparoskopický přístup do dělohy. Celkový počet získaných embryí na jeden výplach je průměrně 6 - 10. Embrya se podle kvality dělí do 4 skupin. Je možné embrya přenášet jak čerstvá, tak mrazit a uchovávat v tekutém dusíku. Přenos embryí je opět laparotomicky nebo laparoskopicky. Úspěšnost transferu se pohybuje mezi 20 – 80 %.

Summary: Biotechnology in reproduction of sheep – embryo transfer

Keyword: sheep, reproduction, assisted reproduction methods, embryo transfer

The aim of this study is to describe the assisted reproduction methods in sheep breeding. These methods comprise a heat detection, heat and ovulation synchronization, resolution of a seasonal anoestrus, sheep insemination and superovulation with embryo transfer.

All these methods are based on a right heat detection. Because of silent heat in a sheep it is necessary to use an assayer ram. Young, vivid and licensed rams should be used. Heat synchronization in a herd is essential for an application of other biotechnologies like an artificial insemination and embryo transfer. There are two principal methods of synchronisation. Either the luteal phase of the cycle is shortened by force of prostaglandin or prolonged by the gestagens. It is also necessary to induce an ovulation to get a right synchronisation. The horse choriotropic gonadotropin, human choriotropic gonadotropin or a combination of both are used for this purpose.

To resolve the seasonal anoestrus the “ram effect” can be used in addition to hormone treatment by using gestagens, horse choriotropic gonadotropin or melatonin.

Implementation of an artificial insemination led to an intensification in breeding. Currently there is no approved insemination station in the Czech Republic. Insemination dose volume depends especially on the method of application chosen. Vaginal, cervical, transcervical and laparoscopic intrauterine method can be used. The conception result relies on the insemination method and it lies between 20 % and 80 %.

Embryo transfer is preceded by a right choice of donors and acceptors and by a superovulation to get enough of embryos. Serum gonadotropin or the folliculus stimulating hormone can be used to induce a superovulation. 5 - 9 days after the insemination the embryos can be removed. Laparotomy or laparoscopy approach to the uterus can be used. The total number of embryos gained in one douche reaches 6 - 10. Fresh embryos as well as embryos frozen in liquid nitrogen can be used for transfer. Laparotomy or laparoscopy approach can be also used for embryos insertion. The transfer success ranges from 20 % to 80 %.

1. Obsah

1. Obsah.....	5
2. Úvod:	6
2.1. Historie.....	6
2.2. Současnost.....	7
3. Cíl práce.....	8
4. Literární přehled	9
4.1. Asistovaná reprodukce	9
4.1.1. Detekce říje	9
4.1.2. Synchronizace říje a ovulace	10
4.1.3. Překonání sezónního anestru	12
4.1.4. Inseminace ovcí	13
4.1.5. Superovulace a transfer embryí	18
5. Závěr:.....	28
6. Přehled literatury:	29
7. Obrazová příloha:	32

2. Úvod:

Asistovaná reprodukce v chovu ovcí, která se již dlouhou dobu ve světě hojně využívá, si pomalu získává svoje místo na slunci také u nás. Synchronizace říje, překonání sezónního anestrusu se již začínají uplatňovat v praxi, umělá inseminace a embryotransfěr na svoje rozšíření a komerční využití zatím čeká.

Prostřednictvím inseminace vnášíme do stád nové geny, které působí změny úrovně řady vlastností. Použitím hluboce zmrazených inseminačních dávek, které mohou být nakoupeny a dovezeny z chovatelsky vyspělých zemí, zvyšujeme a zrychlujeme genetický zisk s cílem urychleného zvýšení užitkovosti. Využití embryotransféru je v oblasti chovu genových rezerv či v možnosti dovozu jedinců nového plemene, bez nutnosti složitého transportu chovných zvířat přes půl světa.

I proto je důležité, aby byli chovatelé či veterinárně – zemědělství odborníci vzděláni na vysoké úrovni ohledně asistované reprodukce u ovcí.

2.1. Historie

Ovce patří k nejdéle domestikovaným hospodářským zvířatům. Byly domestikovány v Přední Asii v 10. až 9. tisíciletí před n.l., v Evropě asi o 2 tisíciletí později (Horák, 2007). Z počátku se využívaly na maso a na kožichy. Až později se chovaly také na mléko a začali se vyrábět sýry.

Snahy o intenzifikaci zemědělství na konci 19. století se týkaly také chovu hospodářských zvířat, ovce nevyjímaje. Z pohledu ovlivňování reprodukce znamenala velký pokrok práce profesora Ivanova, který se zabýval umělou inseminací. Zpočátku především koní, ale v rámci experimentů také inseminací ovcí. Celkem inseminoval 35 ovcí. V roce 1912 vydal profesor Ivanov svoji monografii „Umělé oplodňování hospodářských zvířat“. Tato práce byla přeložena do mnoha jazyků a z Ivanovy školy se inseminace začala šířit do celého světa. Z počátku se výrazně zapojila Čína a Japonsko. Komerčně se poprvé v Evropě uplatnila ve Francii. (FOOTE, 2002)

V Československu se začala inseminace ovcí pokusně využívat v roce 1947 na Slovensku a od roku 1950 i v Čechách. Po tomto období se inseminace ovcí začala intenzivně rozvíjet v celém Československu. V důsledku celkového nezájmu o chov ovcí se v roce 1961 přestala inseminace využívat. Začala se opět používat po roce 1974 v souvislosti s budováním

specializovaných podniků na chov ovcí při organizování turnusového a mimosezónního přípouštění. Na Slovensku takto v 70. letech bylo inseminováno cca 8 % ovcí (Gamčík 1992). Po změně režimu byla za změnéné ekonomické situace v roce 1990 uzavřena jediná česká inseminační stanice beranů.

První přenos embryí u ovcí byl uskutečněn v roce 1932 a překvapivě byla prvním dárcem embryí koza. Warwick a spol. prováděli pokusy s mezidruhovým přenosem embryí. Za 147 dní po přenosu ovce v pořádku porodila. Přenos ovčích embryí se uskutečnil v roce 1933 (Betteridge, 2003). Mezidruhové přenosy, kdy příjemcem je ovce, se uskutečňují z různých důvodů i dnes (Santiago-Moreno, 2001)

2.2. Současnost

Mezi současné využívané reprodukční biotechnologie v ČR patří především metody synchronizace říje či překonání sezónního anestru. Ohledně inseminace či embryotransféru nejsou přesná čísla dispoziční, přesto je kvalifikovaný odhad maximálně stovky těchto zákroků. Z toho vyplívá nepoměrně nižší využívání než u ostatních hospodářských zvířat. Komerčně nejsou ani inseminační dávky beranů nabízeny.

Embryotransferu (ET) u ovcí v České Republice pravidelně a systematicky nevěnuje žádný tým. Poptávka ze strany chovatelů je prakticky nulová. V roce 2010 bylo provedeno pravděpodobně celkem 16 ET (Čunát, 2011). Překonání sezónního anestru zatím nepatří v ČR mezi požadované biotechnologie, ale stejně jako u ET, dá se předpokládat v dohledné době především z ekonomických důvodů požadavek ze strany chovatelů na plošnější zavedení této metody.

S měnícími se postoji obyvatel k výrobkům z ovčího mléka a s oblibou nákupu přímo od českých farmářů vyvstane i v řadách chovatelů touha po rychlejším genetickém zisku, zkvalitněním domácího genofondu a tím pádem i poptávka po reprodukčních biotechnologiích analogicky jako u chovu skotu.

3. Cíl práce

Cíle této práce je vytvořit literární rešerši, která se bude tématicky věnovat asistované reprodukci u ovcí. Budou zde zhodnoceny poslední poznatky a postupy, které se v současné době prosazují v oblasti umělé inseminace a embryotransferu.

4. Literární přehled

4.1. Asistovaná reprodukce

4.1.1. Detekce říje

Správná detekce říje je základem pro všechny reprodukční biotechnologie. V současnosti se v ČR detekce provádí především při připouštění z ruky. Pro inseminaci či ET se vzhledem k velikosti stád používá spíše synchronizace říje, díky čemuž je docíleno většího množství zvířat se stejnou fází reprodukčního cyklu v jeden čas, což zefektivňuje a zlevňuje tyto metody.

Projevy říje jsou u ovcí nevýrazné. Proestrus trvá u ovce cca 2 dny, začíná prokrvováním vulvy a tvorbou poševního sekretu. Ovce ještě nevyhledávají berana. V další fázi – estru – je ovce erotizovaná přítomností berana, který je aktivně vyhledává či mnoho ovcí berana vyhledává samo. Vulva je prokrvená, mírně zvětšená a je patrné zvlhnutí řídkým, sklovitě průhledným hlenem, který od poloviny do konce estru houstne a stává se bělavým. K ovulaci dochází 6-12 hodin po skončení estru. Říjový cyklus trvá u ovcí průměrně 17 dní.

Vzhledem k tomu, že u ovcí probíhá tzv. tichá říje, je vhodné k vyhledávání říjí používat berana-prubíře (DOLEŽEL, 2000, GAMČÍK, 1992). Je několik způsobů jak z berana udělat prubíře. Asi nejrozšířenější způsob je přiložení nejlépe PVC zástěrky na břišní krajinu, čímž docílíme zakrytí předkožkového vaku. A tím je znemožněno prubířovi po fázi vzeskoku na plemenci provést fázi zásunu a následnou ejakulaci. Takovýto beran prubíř vyžaduje zvýšenou péči o zástěrku, která by se měla denně měnit, prát a desinfikovat. Výhodou této metody je zabránění přímému pohlavnímu kontaktu samce se samicí a tím zmenšení rizika zavlečení choroboplodných zárodků do pohlavního traktu plemence. Obdobnou výhodu získáme používáním prubíře s dislokovaným pijem. Penis se chirurgicky dislokuje nejméně o 45 ° na levou stranu (PUGH, 2002). GAMČÍK doporučuje odchýlení penisu o 90 °. Po měsíční rekonvalescenci od provedení tohoto chirurgického zákroku je prubíř použitelný ve stádě k detekci říjných plemenic. Nevýhodou této metody je to, že se někteří prubíři naučí připouštět i s tímto hendikepem. Další používanou metodou je vasektomie, kdy dochází k chirurgickému přerušení vývodných cest pohlavním. Při vasektomii se oboustranně odstraní 40 – 50 mm *ductus deferens*. Pohlavní reflexy se upraví do 3 dnů a na detekci říje je prubíř použitelný za 6 týdnů. Další chirurgická metoda je částečné odstranění nadvarlat. Když by byla operace provedena nedůkladně, může nadvarle

během 1-2 let regenerovat. Odstraněné nadvarlete je spolehlivější metoda než vasektomie (GAMČÍK, 1992). Nevýhodou obou těchto metod je nezabránění zasouvání penisu do vagíny plemence při detekci říje. Proto se někdy kombinuje dislokace pije a vasektomie (PUGH, 2002). V literatuře je také popisována metoda androgenizace skopce. Jednou za 4 týdny se injekčně aplikovalo 150 mg propionátu testosteronu (GAMČÍK, 1992). Ošetření nemá negativní vliv na zdravotní stav. V současné době není injekční testosteron komerčně k dispozici.

Optimální poměr plemenic a prubíře PUGH doporučuje 30 – 40 ku 1. GAMČÍK udává poměr na 50 – 60 ovcí jednoho prubíře. Jako prubíře je vhodné používat mladé, temperamentní, licentované berany. Prubíř se pouští do stáda 2x denně, testace ovcí by neměla být delší jak 1 – 1,5 hodiny (GAMČÍK, 1992). Po tuto dobu je třeba ovce pozorovat a říjné plemence označit. Kvůli časové náročnosti ze strany ošetřujícího personálu se někdy prubíř nechává ve stádě celodenně. K rozpoznání detekovaných zvířat se používají barevné značkovače umístěné buďto na záď plemence či na hrud' prubíře. Odpadá časově náročné sledování a označené zvířata jsou 2x denně ze stáda vybírána a je s nimi dále pracováno dle uvážení chovatele.

4.1.2. Synchronizace říje a ovulace

Zvládnutím synchronizace říje byl položen základní kámen k rozšiřování a širšímu uplatnění dalších reprodukčních biotechnologií, především inseminace a ET. Předpokladem úspěchu synchronizace říje je normální průběh pohlavního cyklu u synchronizovaných zvířat. Zvířata musí být v optimálním výživném stavu, před začátkem synchronizace je doporučováno provést antiparazitární léčbu, úprava paznehtů či další nutná chovatelsko – veterinární opatření.

Prakticky můžeme synchronizaci provádět pomocí hormonálního ovlivnění zvířat. Rozlišujeme dva základní přístupy. Buďto zkracujeme luteální fázi cyklu pomocí prostaglandinů nebo naopak prodlužujeme tuto fázi pomocí gestagenů (Wildeus, 2000).

Prostaglandiny

Aplikací prostaglandinů lyzujeme žluté tělísko přítomné na vaječnicích a tím přivedeme zvíře z diestru do říje. U ovcí je možno úspěšně aplikovat prostaglandiny od 5. až 6. dne říjového cyklu. Doporučované dávkování $\text{PGF}_{2\alpha}$ je 10 – 20 mg pro dosis a cloprostenolu (syntetický derivát $\text{PGF}_{2\alpha}$) 75 μg na 45 kg ovcí (PUSGH, 2002). The Merck

Veterinary Manual (9th edition) uvádí dávkování $\text{PGF}_{2\alpha}$ více jak 15 mg pro dosis, dávkování cloprostenolu 125 μg . Říje se dostaví za 30 – 60 hodin. Aplikujeme-li prostaglandiny plošně na celé stádo, po první aplikaci bude mít synchronizovanou říji 60 až 70 % zvířat ve stádě. Proto se někdy používá dvojitá aplikace s rozestupem 9 až 11 dní, kdy se tímto způsobem synchronizuje většina stáda. Při použití prostaglandinu je třeba dbát zvýšené opatrnosti, protože jeho aplikace březím ovcím (do 50 dne po koncepci) vyvolává abortus.

Gestageny

Principiálně fungují gestageny opačně než prostaglandiny – prodlužují luteální fázi. V použití s gonadotropiny se značně zpřesňuje nejen doba nástupu říje po konci jejich podávání, ale také doba ovulace. Proto je také tato metoda více využívána než používání prostaglandinů.

Gestageny se vyrábějí v několika různých lékových formách. S dostupností v ČR je to horší. Žádné gestageny nejsou v ČR pro ovce registrované. Některé se po udělení výjimky Ústavem pro kontrolu veterinárních biopreparátů a léčiv (ÚSKVBL) dovážejí ze zahraničí, některé jsou vysloveně zakázané používat.

Perorálně aplikovaný melengestrol acetát (MGA, dávkování 0,22mg/ per dosis po dobu 14 dní) dnes není v ČR k dispozici.

Podkožní implantáty s MGA jsou dnes v ČR pro potravinová zvířata zakázána a jinde ve světě používané implantáty (např. Synchro-Mate B – účinná látka norgestomet) u nás nejsou k dispozici.

Intravaginální hubky s účinnou látkou flugestone acetate (Chronogest CR a.u.v.) tak zůstávají jediným dostupným (i když s obtížemi) gestagenem. Zavedení nečiní žádné potíže, také komplikace během 14 denního použití jsou minimální. Mezi občasné komplikace patří zánět vagíny (Doležel, 1997), což ale souvisí s neaseptickým zavedením než samotnou hubkou. Implantát je zaveden po dobu 14 dní, poté je vyjmut. U ovcí je možno hubku vyndat již po 9 dnech s očekávaným úspěchem (PUGH 2002). Toho se využívá, když je třeba po synchronizaci připouštět jedním beranem. Hubky jsou vyjímány postupně po dobu několika dní a beran se tak postupně zvládá spářit s většinou ovcí.

Na Novém Zélandu je registrován CIDR – intravaginální tělísko pro ovce. Účinná látka je medroxyprogesteron acetat 0,3g pro dosis. Účinná látka je napuštěna v silikonovém

tělisku. Jeho užití je stejné jako intravaginální hubky. V ČR je registrována obdoba pro skot, kde je 4x více účinné látky. Vzhledem k povaze lékové formy a ceně zatím nebyla snaha využít CIDR pro skot také u ovcí.

Synchronizaci říje doplňuje načasování a zpřesnění doby ovulace. K tomu se používají koňský choriový gonadotropin (eCG) nebo humánní choriový gonadotropin (hCG) či jejich kombinace. PUGH doporučuje aplikaci 200 IU hCG v kombinaci 400 IU eCG (v ČR dostupný preparát PG600 a.u.v.) intramuskulárně při vyndávání progesteronových implantátů. Po takovémto ošetření se dostaví říje za 24 – 48 hodin a je doporučována frontální inseminace za 48 až 60 hodin. Další možné schéma je použití 500 IU eCG (Sergon a.u.v.) při vyndávání progesteronových implantátů. Po takovéto aplikaci se říje také dostaví za 24 – 48 hodin. Je možné též aplikovat prostaglandiny 24 hodin před ukončením gestační léčby a tím podpořit následnou říji. Avšak většina autorů popisuje spíše použití eCG či hCG.

4.1.3. Překonání sezónního anestru

Překonání sezónního anestru je v chovatelsky vyspělých zemích poměrně rozšířená metoda, která v našich podmínkách zatím nenalezla odpovídající uplatnění. Díky této metodě je chovatel schopen odchovávat jehňata 2x ročně, nebo alespoň 3x za 2 roky. Další uplatnění této metody je bahnění v námi zvoleném, většinou příznivějším, období roku.

Ovce patří mezi sezónně polyestrické zvíře. V našich zeměpisných šířkách nastupuje u chovaných beranů a ovcí plodné období ve druhé polovině roku, kdy dochází zkracování světelného dne. Druhou vlnu nástupu plodného období lze pozorovat na jaře. Projevy říjí i počet opakování jsou však výrazně nižší.

Před zařazením plemenic do programu připouštění mimo hlavní sezónu, by měly být všechny plemenice ultrazvukově vyšetřeny. Tím se vyloučí abnormality na vaječnicích (syndrom ovariálních cyst, srůsty, novotvary) nebo na děloze (pyometra, březost), které by vedly k selhání této technologie. (PUGH, 2002). Samozřejmostí je odpovídající výživný a zdravotní stav.

Základem je stimulace plemenic beranem – tzv. beraní efekt. Podmínkou je zamezení kontaktu plemenic s beranem nejméně po dobu 3 až 4 týdnů. Následně je do stáda přidán beran a u části plemenic se indukují říje během 5 až 7 dní (UNGERFELD, 2004).

K překonání anestru se dále používají hormonální preparáty, především gestageny, eCG či melatonin.

Použití gestagenů a eCG je stejné jako u synchronizace říje (viz. 4.1.2.).

Exogenní melatonin je možno použít u acyklických, sezóně acyklických bahnic k vyvolání říje a ovulace. Podává se nejméně po dobu 6 týdnů a během této doby jsou ovce izolovány od berana. Pak je beran přidán do stáda a ponechán u takto ošetřených bahnic nejméně 35 dní, kdy by měly proběhnout 2 říjové cykly. Léčba melatoninem je mnohem úspěšnější na konci anestrického období. V ČR není žádný preparát s melatoninem pro zvířata registrován. K podávání exogenního melatoninu je dále vhodné upravit světelný režim. Nebo lze světelný režim použít samostatně.

Během období krátké doby přirozeného osvětlení (zima) je celému stádu vytvořen světelný režim o 16 - 20 hodinách světla denně. Takto jsou zvířata držena po dobu nejméně 2 měsíců. Poté je ukončen řízený světelný režim a zvířata jsou exponována pouze přirozenému světelnému režimu, který je kratší než ten řízený a proto se během 10 až 20 dnů dostaví plodná říje. Je vhodné držet berany ve stejném světelném režimu. (PUSG, 2002).

4.1.4. Inseminace ovcí

Při použití mrazeného spermatu odebíraného v průběhu celého roku při 9 odběrech týdně získal chovatel od jednoho berana 12 000 narozených jehňat (Louda, 2009).

Rozhodne-li se chovatel začít používat umělou inseminaci, je třeba vybírat zvířata dokonale zdravá, bez onemocnění končetin. Také připouštění mladých, pohlavně nedospělých zvířat je nevhodné. Hrubovlné či polohrubovlné ovce je vhodné měsíc před inseminací ostříhat. Aby bylo dosaženo požadovaných výsledků, musí být kromě dobrého stavu pohlavního aparátu také odpovídající kondice. Proto je nutné 4 – 6 týdnů před začátkem inseminací začít upravovat krmnou dávku tak, aby v době inseminace byla zvířata v ideální chovné kondici. PUGH doporučuje dále vybírat bahnice, které porodily a odchovaly zdravá jehňata.

V chovu ovcí se využívají následující metody inseminace – klasická vaginální inseminace, intracervikální inseminace a intrauterinní inseminace (LYMBEROPOULOS, 2001, GAMČÍK, 1992, MITCHELL, 2004).

Inseminační dávka

Objem inseminační dávky závisí na způsobu použití, t.j. na místě deponování spermií a způsobu konzervace semene. Při inseminaci do pochvy je objem inseminační dávky 0,3-0,5

ml, při cervikální metodě 0,05-0,20 ml (v závislosti na hloubce zavedení katétru do lumen děložního krčku) a při intrauterinní inseminaci 0,05-0,1 ml na každý děložní roh. (GAMČÍK, 1992).

Metoda inseminace	Způsob konzervace semene		
	čerstvé	ředěné	mražené
Vaginální	300	nepoužívá se	nepoužívá se
Cervikální	100	150	180
Transcervikální intrauterinní	60	60	60
Laparoskopicky (do obou rohů)	20	20	20

Tabulka 1: Minimální počet aktivních spermií v inseminační dávce ($\times 10^6$) (GAMČÍK, 1992)

V současné době není na území ČR žádná schválená inseminační stanice. Chceme-li používat inseminační dávky, musíme se spoléhat buď na dovezené mražené dávky, nebo dávky vyrobit od beranů působících v daném stádě. Komerčně vyrobené inseminační dávky z odběru od berana z jiného stáda se dostávají na hranu Zákona 154/2000 Sb. o šlechtění, plemenitbě a evidenci zvířat, protože se nejedná o schválenou inseminační stanici. Samozřejmostí je provádění inseminace osobou odborně způsobilou podle výše zmíněného zákona.

Používá-li se čerstvé semeno nebo je čerstvé semeno ředěno, je vhodné provést orientační analýzu odběru. Sledované parametry by měly být alespoň objem a barva ejakulátu, koncentrace a motilita spermií, množství morfologicky abnormálních spermií.

Dle dříve používané ČSN 46 6219 pro čerstvé sperma berana by objem ejakulátu měl být vyšší jak 0,5 ml, barva smetanová se světlým odstínem. Hustota ejakulátu minimálně $2,5 \times 10^9$ v 1 ml, aktivita spermií minimálně 60 % a maximálně 20 % malformovaných spermií. (GAMČÍK, 1992). LOUDA uvádí odlišně koncentraci minimálně 2×10^9 v 1 ml pro krátkodobě uchovávané sperma a $2,8 \times 10^9$ v 1 ml pro mražené sperma, aktivitu minimálně 70 % a patologických spermií maximálně 15 %.

Dnes je v nabídce několik komerčních ředidel použitelných u ovcí. HEGEDŮŠOVÁ (2011) porovnávaly v našich podmínkách využití Triadilu, Andromedu, Ovipro, Biladyl, Optidyl, Andromed CSS I. a II., Biociphos. Jako stabilizační se ukázalo ředidlo Triladyl, vykazující dlouhodobě ustálené výsledky. Výsledky ukazují hranici použitelnosti ředidel Biociphos a Byladil po dobu 96 hodin. Jako nejlepší pro krátkodobé uchování se jeví ředidlo

Ovipro, které má vysoký efekt přežitelnosti pouze prvních 48 hodin. Avšak je doporučováno i při používání komerčního ředidla (o samovýrobě nemluvě) před začátkem připouštěcí sezóny ověřit jejich kvalitu alespoň provedením zkoušky přežitelnosti. (LOUDA, 2009).

Ředění se provádí okamžitě po odběru přímo ve sběrači. Teplota ředidla i semene musí být stejná 25-30 °C. Stanovené množství ředidla se pomocí vyhřáté pipety nechá přitékat po stěně sběrače do spermatu a současně se sběračem pomalu otáčí a tím se mísí sperma a ředidlo. K dokonalému promísení se buď zamíchá celý objem sterilní skleněnou tyčinkou, nebo se opakovaně pipetou nasává a vypouští ředěný ejakulát. Beraní sperma je podstatně citlivější na chladový šok než sperma býčí, zvláště kolem teploty 15 - 18 °C (GAMČÍK, 1992, YANIZ, 2005). Proto by chlazení na teplotu 3-5 °C mělo probíhat pozvolna, nejméně 4 hodiny (GAMČÍK, 1992) Při této teplotě se krátkodobě konzervované sperma uchovává po dobu až 96hodin.

Inseminační dávky se dnes téměř výhradně zamrazují do pejet buď o objemu 0,25 ml nebo 0,5 ml. Pejeta se plní při 30 °C ředěného semene a následně se ekvilibrují podle typu ředidla do 5 °C za 1,5 - 2 hodiny. Pak je zahájen proces mražení. Ke zmrazování inseminačních dávek je možno použít mrazicí přístroj, používaný např. pro zmrazování inseminačních dávek u skotu či na zamrazování embryí. Na tomto přístroji je možno zvolit program podle použitého komerčního ředidla. Výrobce mrazicích ředitel udává způsob mražení. K pokusným účelům je použitelné mražení podle jednoduchého postupu. Do polystyrenové krabičky se nalije tekutý dusík. Ve výši 30-40 mm nad tekutý dusík se horizontálně položí připravené inseminační dávky v pejetách. Vše se přikryje alobalem, aby dávky byly v těkajících parách dusíku. V těch se ponechají 7-8 minut a poté se ponoří do tekutého dusíku ve skladovacím kontejneru (LOUDA, 2009). Důležitá je náležitá evidence a popis vlastních pejet. Je vhodné vkládat celou šarži do goblet, které jsou zvenčí popsané, a umožňuje to snadnou identifikaci inseminačních dávek, aniž by musely být vyndávány mimo tekutý dusík a tím hrozilo jejich znehodnocení.

Pejety se rozmrazují ve vodní lázni při teplotě 38 °C (LOUDA, 2009, GAMČÍK, 1992). PUGH doporučuje rozmražení při teplotě 33 - 35 °C. K inseminaci se používají dávky, u kterých aktivita po rozmražení dosahuje 40 % a více (LOUDA, 2009, GAMČÍK, 1992). Po rozmrazení je třeba použít dávku do 10 - 15 minut (PUGH, 2002).

Vlastní inseminace

Vaginální inseminace začíná důslednou očistou a dezinfekcí vulvy nejlépe jednorázovými papírovými utěrkami. Poté jsou rozevřeny stydké pysky a pod úhlem 45° zaveden inseminační katetr až na dorzální stěnu pochvy. Tímto se vyhneme nechtěnému poškození *orificium urethrae*. Semeno se evakuuje do blízkosti vnější branky děložního krčku. Použití spekula činí celý proces obzvláště pro začátečníka jednodušší a pro ovci bezpečnější. Inseminační dávka by měla obsahovat 4 – 3 x 10⁹ živých spermií s progresivním pohybem. Objem dávky je 0,5 – 1 ml. K vaginální inseminaci se používá čerstvé semeno a podle zkušeností technika dosahuje úspěšnost 15 – 30 % (PUGH, 2002). Výhodou této metody je její nenáročnost, bezpečnost a rychlost. Jako instrumentarium postačí sterilní jednorázový 450 mm dlouhý plastový katetr, na jehož konci je nasazena 2 ml stříkačka pomocí níž evakuujeme nasáté semeno (Obrázek 1).

Intracervikální inseminace vyžaduje nepoměrně větší zkušenosti, inseminační instrumentarium i čas strávený tímto úkonem. Ovce je fixována a má zvednutou zad'. Nejprve je zavedeno lubrikované spekulum. Přestože by nemělo docházet k přímému kontaktu lubrikačního gelu a spermií, přesto je vhodné použít gel, který není spermicidní. Postačuje 12 cm dlouhé spekulum. Někdy se používá přídatný zdroj světla pro lepší viditelnost. Vhodnější než klasické vaginální spekulum je upravené, kdy je namísto ramen tubus, který se nasadí na vnější branku děložního krčku. Přes spekulum je atraumaticky zaveden katetr do vnější branky děložního krčku co nejdále je to možné. Krček ovce je dlouhý 7-8 cm a je v něm 6 – 8 příčných řas, které kompletně uzavírají vstup do dělohy (Obrázek 2). Proto je semeno deponováno do kaudální části děložního krčku. Minimálně by se měl katetr zavést do hloubky nejméně 1-2 cm. Zavedení inseminační dávky o každých 10mm do krčku dělohy zvyšuje plodnost o 10 – 12 % (GAMČÍK, 1992). U starších zvířat, multiparních zvířat může být zavedení velice nesnadné. V tomto případě se doporučuje inseminovat na vnější branku děložního krčku. Jen u 5 – 8 % ovcí nelze zavést inseminační katetr do krčku dělohy vlivem nedostatečného vývoje. K inseminaci je možné použít katetr o tloušťce 12G. Inseminační dávka by měla obsahovat 1x10⁹ živých spermií s progresivním pohybem (PUGH, 2002). Koncepce je závislá od zkušenosti technika a pohybuje se mezi 35 – 50 % (PUGH, 2002).

Nejvyšší březost, ale také nejvyšší náročnost, je při intrauterinní inseminaci. Inseminace zmraženým semenem s uspokojivými výsledky není bez intrauterinní inseminace možná (MC KUSICK, 1998).

Laparotomický přístup je již dnes překonán a většina autorů ho zmiňuje spíše pro úplnost. Tento přístup je sice účinný, ale také poměrně drahý, instrumentálně náročný, vyžadující celkovou anestezii a v neposlední řadě také limitující počtem využití dané bahnice. To je překážka především pro laparotomické embryotransféry, kde je ze strany chovatele často požadováno opakování zákroku. (WULSTER-RADCLIFFE, 2004). Intrauterinní inseminace se dnes buď provádí přes děložní krček nebo pomocí laparoskopické soupravy (MC KUSICK, 1998).

Jak již bylo uvedeno výše, limitující je u intrauterinní inseminace vytváření děložního krčku, především jeho délka a zřasení. Principiálně existují 3 způsoby jak rozšířit děložní krček a tím jednodušší provedení inseminace (či přenosu embrya) do dělohy. První a nejméně využívanou metodou je povytažení děložního krčku do vulvy a následné zavádění instrumentů pod částečnou kontrolou zraku. Druhou je použití instrumentária respektujícího přirozenost děložního krčku a tím jeho snadnější překonání. Třetí možností je použití medikamentů, konkrétně $\text{PGF}_{2\alpha}$ (WULSTER-RADCLIFFE, 2004) či estradiol-17 β a oxytocin (WULSTER-RADCLIFFE, 1999).

Děložní krček je přirozeně zavřený i vlivem progesteronu. $\text{PGF}_{2\alpha}$ má známý účinek kromě luteolytické funkce také cervikorelaxační. Toho lze využít pro rozšíření děložního krčku kvůli transcervikální inseminaci. Jeho nespornou nevýhodu při embryotransféru právě jeho luteolytické funkce, protože je nevhodné ho používat při dilataci děložního krčku u přenosu embryí. Pro tyto účely je vhodnější použít způsob rozšíření popsáný v WULSTER-REDCLIFFEM v roce 1999. Aplikujeme nitrožilně 100 μg estradiolu-17 β a za 12 hodin také nitrožilně 400 UI oxytocinu. Poté jsou ovce inseminovány. Bylo prokázáno, že takovéto ošetření nemá vliv na žluté tělísko (a tudíž hladinu progesteronu) a je to metoda použitelná nejenom při umělé inseminaci, ale také při přenosu embryí.

WULSTER-RADCLIFFE ve svém experimentu m.j. porovnává použití jeho inseminačního katetru a laparotomie na schopnost pronikání spermií do děložního rohu a vejcovodu. Dospěl k závěru, že obě metody jsou v tomto parametru bez statistického rozdílu. Dále ale konstatuje, že je statistický rozdíl v procentu březosti po 30 dnech od inseminace ve prospěch laparotomické umělé inseminace.

Samotná transcervikální inseminace začíná zavedením lubrikovaného spekula do pochvy. Zpravidla při použití přídatného zdroje světla se nejprve zavede inseminační katetr používaný u skotu (Obrázek 3) do vnější branky děložního krčku. Tento poměrně široký

katetr dilatuje vnější branku děložního krčku, pak je vyjmut a zaveden tenčí inseminační katetr pro ovce. Ten má na svém konci malou kuličku, díky čemuž je pronikání přes děložní krček méně traumatické. Po proniknutí do dělohy se již aplikuje inseminační dávka.

Pro laparoskopickou inseminaci je třeba provést u bahnic 24 hodin před zákrokem restrikcí krmení. Oproti intravaginální inseminaci je třeba po synchronizaci bahnic inseminovat později, zpravidla 54-60 hodin po vyjmutí progesteronových preparátů. Je to způsobeno kratší vzdáleností, kterou musejí spermie během svojí cesty k vajíčku absolvovat. Pro samotnou laparoskopii se ukládají bahnice do sklopné polohovací lavice, která je pod úhlem 30 ° - 45 ° sklopená hlavou dolů. Oboustranně se pomocí lokálního anestetika znecitliví oblasti 6 - 10 cm kranálně od vemene a 2 cm paramediálně od linea alba. Skalpelem se provedou 1 cm dlouhé kožní incize a poté je do levého řezu zaveden 7 mm velké trokar. Tímto trokarem je do břicha insuflován CO₂ a poté je používán jako optický port. Přes pravý řez je zaveden 5 mm trokar, který je využit jako pracovní kanál. Je-li třeba k lepší orientaci v břiše manipulovat s omentem či dokonce se střevem, přes pracovní port se použijí atraumatické kleště. Po lokalizaci děložních rohů se pracovním portem zavede inseminační instrument. To je jednoduchá trubička, na jejímž konci je tenká, asi 1 cm krátká jehla. Ta se zavede do děložního lumen přibližně 4 cm kranálně od děložní bifurkace. Pomocí tlaku vzduchu z nasazené stříkačky se aplikuje polovina inseminační dávky nejprve do jednoho děložního rohu a pak i do druhého. Při laparoskopické inseminaci je vyšší procento březích zvířat (40 %) než při transcervikální inseminaci (20 %) (MC KUSICK, 1998).

Podle zkušenosti provádějícího lékaře laparoskopická inseminace trvá 3-8 minut (PUGH, 2002).

Po provedení inseminace je vždy vhodné ještě 2 hodiny ponechat zvířata v kotci v klidu.

4.1.5 Superovulace a transfer embryí

K úspěšnému a komerčně žádanému zvládnutí embryotransferu předchází zvládnutí výše popsaných biotechnologií, především synchronizace a umělé inseminace. V České Republice neexistuje komerční nabídka čerstvých nebo mražených embryí, proto je přenos realizován především z vědeckých a pokusných důvodů.

Než dojde k samotnému přenosu embryí, je třeba učinit řadu kroků. Důležitý je vhodný výběr dárců a příjemců, provedení hormonální stimulace za účelem superovulace a

tudíž pokud možno co nejvyšší výtěžnosti embryí a oplození ovulovaných vajíček nejvhodnější metodou. Po samotném přenosu je nutná důkladná evidence a nahlášení do centrální evidence z důvodu nezaměnění biologické a náhradní matky.

Výběr dárců a příjemců

Výběr a příprava zvířat ovlivňují výsledek transferu embryí zásadním způsobem, Jen od zdravých zvířat s pravidelnou pohlavní činností lze očekávat pozitivní odpověď na hormonální stimulaci, oplození ovulovaných vajíček, dobrou kvalitu získaných embryí. U příjemců pak vyhovující zabřezávání, normální průběh gravidity a porod zdravých jehňat. Pro úspěch ET je velmi významná aktivní účast chovatele, spočívající v zajištění optimálních podmínek chovu, přesnou detekci a evidenci říjí a včasných přesunech zvířat.

Jako vhodné dárcce a příjemce vybíráme zvířata především celkově zdravá, v dobrém výživném stavu a v reprodukční kondici (Sun, 2010).

Na rozdíl od krav, nejsou mladé, jednorocní bahničky vhodné jako příjemci. Je-li to nezbytně nutné, je třeba alespoň dodržet kritérium váhy. Příjemce by měl mít alespoň 75 % váhy dospělého zvířete. Po příjemcích je požadován výrazný mateřský instinkt, zdravá mléčná žláza, vynikající stav reprodukčních orgánů. Nebývají to zvířata příliš geneticky cenná.

Dárce embryí jsou zvířata geneticky nejcennější. Je možné využívat mladá i starší zvířata. Nejvhodnějším věkem je 2-5 let (PUGH, 2002). Důležitá je správná činnost vaječnicků i hormonální profil.

Synchronizace dárců a příjemců.

K synchronizaci dárců a příjemců je možné využít jakýkoliv způsob popsany 4.2.1. Synchronizace říje a ovulace. Synchronizace mezi dárci a příjemci by měla být co nejpřesnější. Přestože asynchronie v délce až dvou dnů vykazuje ještě uspokojivé výsledky za předpokladu dřívější říje u dárcce (Rowson, 1966), obecně udávaná asynchronie je jeden den. Při využití gestagenů ve formě intravaginálních tělísek je vhodné vyjmutí u příjemců o 12 hodin dříve. (PUGH, 2002)

Superovulace dárců

Superovulace byla dlouhou dobu, stejně jako u skotu, limitujícím faktorem k většímu a komerčnějšímu využití ET. (Obrázek 4)

K superovulaci je využitelných několik hormonů.

Koňský sérový gonadotropin (eCG)

eCG se získává ze séra březích klisen mezi 40. – 130. dnem březosti. Biologický poločas rozpadu tohoto hormonu je 72 hodin. eCG stimuluje vaječníky a tím podporuje větší množství ovulací a uvolnění vajíček. Biologický účinek analogický jako folikuly-stimulující hormon (FSH) a luteinizační hormon (LH), s převahou FSH. Použitá dávka je 1000-1500 mezinárodních jednotek (UI) 48 hodin před vyndáním progesteronových implantátů. (PUGH, 2002). Dneska se eCG k superovulaci prakticky nevyužívá.

Folikuly-stimulující hormon (FSH)

FSH je glykoprotein vylučovaný předním lalokem hypofýzy pod vlivem gonadotropního hormonu (GnRH) vylučovaného hypothalamem. FSH stimuluje normální funkci pohlavních orgánů a sekreci pohlavních hormonů u samců a samic savců.

U samic během normálního pohlavního cyklu FSH stimuluje vývoj a dozrávání Graafových folikulů a vajíček. Folikuly reagují zvýšeným vylučováním estrogenů z buněk theca interna stěny folikulu, které uprostřed cyklu stimulují prostřednictvím zpětné vazby uvolňování LH z hypofýzy. Zvýšená exkrece estrogenů a LH z hypofýzy způsobuje rupturu folikulu a dochází k ovulaci.

Biologický poločas rozpadu FSH je pouhých 6 hodin, proto musí být aplikován při vyvolání superovulace 2x denně. Během 3-4 dnů se v sestupných dávkách aplikuje celkem 17-24 mg FSH (Doležel, 1997, Louda, 2009, Weiwei, 2011). Začátek podávání je 2 dny před ukončením progesteronové fáze. Opakované injekce jsou stres pro ovce a zvyšují pracnost a nákladnost celého procesu superovulace. Při redukci aplikace FSH do 3 dávek nedošlo ke snížení počtu získaných embryí oproti 6 aplikacím (Weiwei, 2011). FSH se k superovulaci jeví jako vhodnější než eCG, protože je od zvířat jím ošetřených vyšší výtežnost kvalitnějších embryí. FSH je dnes celosvětově rozšířen v několika preparátech. U nás se úspěšně využívají pro superovulaci u skotu dva: Pluset a Follicotropin. Follicotropin 40 UI prášek pro přípravu injekčního roztoku s rozpouštědlem je domácí výroby od firmy Bioveta. V současnosti není na trhu, uvažuje se o jeho opětovné výrobě. Pluset sice není u nás oficiálně v distribuci, přesto se na výjimku ÚSKVBL po splnění všech legislativních podmínek dováží. Jedná se o preparát, kde není obsažen pouze FSH, ale také luteinizační hormon (LH) v poměru 1:1. Aplikací exogenních gonadotropinů pomocí preparátů obsahujících FSH a LH a je možné

zvýšit počet ovulací. Předpokládá se, že aplikace exogenních gonadotropinů zvyšuje počet rostoucích folikulů a snižuje počet atretických folikulů. Pro účely superovulace je nutný správný poměr FSH/LH a správný léčebný režim. I když růst folikulů stimuluje FSH, prokázalo se, že pro mnohočetnou ovulaci je nutné minimální množství LH. Přestože poměr bioaktivit FSH/LH v přípravku PLUSET je 1:1, jeho účinek spočívá z důvodu krátkého poločasu porcinního LH primárně ve stimulaci folikulů. Ve světě je nejrozšířenější používaný preparát Folltropin – V. Jedná se o preparát se sníženým obsahem LH, protože více než 80 % LH je ničena při purifikaci.

Mimo reprodukční sezónu je vhodné kromě aplikace FSH také jednorázová dávka eCG (HUSEIN, 1998)

Zvýšení množství ovulovaných folikulů až o 60 % a zvýšení počtu jehňat až o 20 % je možno také dosáhnout aktivní imunizací proti 5 α -androstane-3 α , 17 β -diol. Jsou aplikovány dvě nebo tři vakcinační dávky v rozmezí 3 týdnů. Již po druhé vakcinaci dochází k výraznému poklesu androgenů a zvýšení FSH a LH. To ve svém důsledku vede k většímu množství ovulovaných folikulů. Někteří jedinci však reagují anovulatorním stavem na vaječnicích. (TETSUKA, 2001).

Inseminace pro účely ET

V případě, že je k oplodnění ovulovaných vajíček používán beran, je vhodné na jednoho berana připravit maximálně 2 superovulované bahnice (PUGH, 2002).

Při umělé inseminaci se zpravidla inseminuje 36 – 60 hodin po vyjmutí progesteronových implantátů. První inseminace se provede po 12-24 hodinách po spozorování říje (delší doba při laparoskopické inseminaci rozmraženým semenem), po 12-24 hodinách za příznaků trvání říje je vhodné neinseminovat (PUGH, 2002). U 10-15 % ovcí se po vyjmutí tampónů nedostaví říje s příznaky. I toto ovce však lze inseminovat a získat od nich přenosu schopná embrya (Louda, 2009).

Odběr embryí

Odběr, hodnocení a následný přenos patří mezi nejsložitější fáze celého ET, Odběr embryí je možno provést mezi 5-9 dnem po inseminaci (Obrázek 5). Většinou se odebírají embrya ve stáří 5-6 dní. Před odběrem je možné buď sonograficky, laparoskopicky nebo vizuálně (během laparotomie) vyšetřit vaječníky a podle počtu žlutých tělísek očekávat

množství vypláchnutých embryí. Zvláště při nácviku odběru je vhodné vědět úspěšnost odběru.

Vlastní odběr se provádí buď laparotomicky nebo laparoskopicky. Intracervikální odběr v podobě jak se znám např. u skotu není vhodný. Krom omezené možnosti zavedení dvojcestného katetru přes děložní krček je odrazující nemožnost manipulovat s dělohou. Určitá míra manipulace při naplňování a především vyprazdňování dělohy při výplachu je potřeba.

Laparotomie je nejstarší metoda, která se používala k výplachu embryí. Stejně jako při laparotomické inseminaci je její nevýhoda především v tvorbě jizvy v oblasti linea alba a větší riziko infekce dutiny břišní. To vše snižuje počet opakování odběru embryí. Naproti tomu je to metoda instrumentálně méně náročná. Bahnice je v celkové narkóze zavěšena hlavou dolu pod úhlem až 45 °. Řez dlouhý asi 7 cm je veden mediálně nebo paramediálně od linea alba, několik centimetrů před vemenem. Přes ránu je na sterilně připravené operační pole vytažen děložní roh. Dříve se kraniální polovina děložního rohu podvázala, dnes je možno k utěsnění lumen použít dvoucestný Foleyův katetr, přes který se poté děloha také vyplachuje (obrázek xyz). Po podvázání děložního rohu se zavede do lumen dělohy jehla o odpovídajícím průměru a ta je napojena na dvoucestnou soupravu. Hadička do sběrače je uzavřena a gravitačně se z nádoby s vyplachovacím roztokem nechá vtékat medium do děložního rohu. Po naplnění dělohy cca 20 ml se zastaví přívod a otevře se uzávěr na hadičce vedoucí do sběrné nádoby a děloha se mírně promasíruje. Toto se několikrát opakuje. Poté se to samé provede s druhým děložním rohem. Vytékající medium z dělohy je jímáno do sterilní nádoby. Druhý možný přístup k výplachu je podvázat dělohu přibližně 2 cm kraniálně od bifurkace. Do uterotubárního spojení, se zavede kovový katetr a děloha se podváže, takže se kraniální konec utěsní kolem katetru a výplachové medium může protékat pouze přes tento katetr. U podvazu blíže bifurkaci se zavede jehla s přívodem vyplachovacího média a na druhém konci je medium odváděno do sběrné nádoby. V této nádobě jsou vypláchnutá embrya nechána 2x20 minut sedimentovat. Kvůli zrychlení celého procesu a zjednodušení při hledání embryí v sedimentu, se dnes používají jednorázové mikrofiltry (obrázek 6). Vytékající medium prochází přes filtr, a tudíž skrz něj embrya neprojdou a zůstanou v malém množství vyplachovacího média na jedné straně filtru. Po dokončení výplachu se filtr rozdělá a embrya zůstanou v mističce, která vznikne. V té se také prohlíží pod stereomikroskopem a jsou odsud pipetovány do média k uchování.

Laparoskopický výplach embryí je instrumentálně ještě náročnější než laparoskopická inseminace. Zvíře se buď pouze v sedaci nebo v celkové narkóze zavěsí do lehátka. Hlava je sklopena dolů. 6 – 10 cm kraniálně paramediálně před vemenem se zavede za známek asepsy do dutiny břišní optický port. Přes tento trokar je nejprve do břicha insuflováno asi 2 litry CO₂ (Schiewe, 1984). Insuflace stájového vzduchu sebou nese riziko infekce. Poté je na druhé paramediální straně zavede pracovní trokar. Tím se do dutiny břišní zavedou atraumatické kleště. Ty slouží k zaškrcení dělohy po dobu naplňování děložního rohu vyplachovacím roztokem. Zároveň umožňují v případě potřeby manipulaci s dělohou. Přes druhý pracovní port se zavede jehla, která je napojena na dvojcestnou soupravu, na jejímž jednom konci je nádoba s vyplachovacím roztokem a na druhém konci sedimentační nádoba nebo mikrofiltr. Tato jehla se zavede do lumen děložního rohu a přes ní dochází k výplachu embryí.

Dříve si týmy pro odběr embryí připravovaly vyplachovací média samy. Dnes jsou k dispozici komerčně nejenom vyplachovací média (flushing media), ale také ke krátkodobému uchování (holding media) a ke zmrazování (freezing media) (obrázek 7). Teplota všech medií přicházejících do styku s embryem by měla být obdobná teplotě embrya, většinou 37 °C.

Celkový počet získaných embryí na jeden výplach je průměrně 6-10, podle způsobu superovulace (Pugh, 2002, Weiwei, 2011, Gonzales, 2000). Při laparotomickém získávání embryí je výtěžnost 80 %, při laparoskopii je o něco nižší – 75 % (Doležel, 1997).

Hodnocení embryí

Po samotném odběru jsou embrya vyhledána a posouzena. Při sedimentační metodě se nejprve musí nechat nádoba s výplaškem 20 minut ustát, poté odstranit supernatant a následně opět 20 minut nechat stát. Poté se opět odstraní přebytečný supernatant a ve zbylém roztoku se embrya vyhledají a přendají do uchovávacího roztoku (holding medium). Při sedimentaci i při prohlížení se pod laboratorní sklo (plast) umísťuje hřející destička, aby byla teplota roztoku 37 °C. Při použití mikrofiltru odpadá zdlouhavá sedimentace.

Hledání a posuzování embryí se děje pod stereomikroskopem za zvětšení od 10x do 40x. Práci ulehčí podélně šrafovaná petriho miska. Díky ní je přehled a systematičnost v prohlížení výplašku. Identifikovaná embrya jsou pomocí mikropipety nebo mikromanipulátoru přenášeny do malé petriho misky do uchovávacího roztoku (holding

medium). Na malou petriho misku si připravíme několik kapek media a do každé kapky přenášíme embrya podle kvality a dalšího využití. Do jedné kapky dáváme embrya vhodná k přenosu (případně samostatná kapka na embrya vhodná k zamrazení) a do druhé kapky jsou dávány embrya k přenosu nevhodná. Po prohlédnutí celého výplašku je roztok promíchán a po ustálení opětovně prohlednut. Po skončení vyhledávání jsou opětovně prohlednuta vyhledaná embrya a provedeny případné korekce ve vztahu ke kvalitě.

Embrya se podle kvality rozdělují do 4 skupin (Bari, 2003).

Stupeň I. (Excellent). Ideální embryo. Kulaté, symetrické, s buňkami jednotné velikosti, barvy a textury. Žádné viditelné defekty. Vývoj embrya odpovídá dnu výplachu po oplodnění. Blastomery jsou jasně viditelné a zóna pellucida je intaktní. 55 % embryí s přežitelností 76 %.

Stupeň II. (Good). Dobré embryo. Obsahuje drobné abnormality. Embryo může mít několik oddělených blastomer a/nebo malou dutinku v buněčné masě. Jeho tvar může být mírně nepravidelný. Zóna pellucida je neporušená. 36 % embryí s průměrnou přežitelností 74 %.

Stupeň III. (Fair). Embryo obsahuje tyto defekty: buněčný detritus, nepravidelný tvar, velmi světlou nebo velmi tmavou barvu a/nebo mírně poškozenou zónu pellucidu. Embryo obsahuje degenerované buňky, samostatně stojící buňky a dutinku. 7,5 % embryí s přežitelností 61 %.

Stupeň IV. (Poor). Špatné embryo. Stejně jako stupeň III. a k tomu zastavený vývoj a kompletně prasklá zóna pellucida. Embryo má velmi nepravidelný tvar, velké granule nebo dutiny v blastomerech. Do tohoto stupně patří všechna embrya s 8 a méně buňkami. Celkem 1,5 % embryí s přežitelností 37 %.

Poznámka autora: Při kontrole sedimentu po výplachu se také nacházejí neoplozené oocyty, proto je zastoupení jednotlivých stupňů v Bariho studii trochu vyšší než se ve skutečnosti podle počtu ovulovaných folikulů nachází.

K přenosu jsou nejvhodnější embrya stupně I. a II. K zamrazení se využívají pouze embrya stupně I.

Stejně jako u skotu, je možné embrya přenášet nejenom čerstvá, ale je možné je také zamrazit. Embrya se po vyhledání přepipetují do zmrazovacího media (freezing medium). Po

zmrazení v pejete se uchovávají v tekutém dusíku při teplotě -196 °C. Do pejety se embryo nasává do tzv. 5 sloupců. Nejdříve se nasaje medium, pak vzduch, dále prostřední sloupec media s embryem, následuje vzduch a nakonec zase medium. Pejeta se uzavře špuntíkem, na nějž je vhodné napsat potřebné iniciály k identifikaci embrya bez nutnosti povytáhnutí z tekutého dusíku. Pro proces mrazení a hlavně následného rozmrazení je důležitá volba kryoprotektiva. Dříve hojně využívaný glycerol, který se před přenesením musel z embrya odmítat, dnes nahrazuje etylenglykol. Etylenglykolu je lepší kryoprotektivum a rozmražená embrya vykazují menší míru morfologického poškození (Cocero, 2002). Ke zmrazování se využívá zmrazovacího přístroje, kterým musí být každý tým schválený pro produkci embryí vybaven. Volitelná je rychlost i doba zmrazování.

Bari (2003) porovnával přežití embryí podle stupně vývoje a jejich následný vývoj do 50 dne, kdy se provedla sonografická kontrola březosti a počtu vyvíjejících se plodů. Došel k následujícím závěrům. Velmi časná morula – 55 %, časná morula – 70 %, morula a blastocysta 75 %. Dále porovnával přežitelnost morul a blastocyst v závislosti jestli se jednalo o 5 nebo 6 denní embrya. Nejlépe vycházela 5 denní blastocysta s přežitelností 91 % (ale v celkovém vzorku vypláchlých embryí jich bylo jen 1,5 %), dále na stejno 75 % byla 5 denní morula (50 %) a 6 denní blastocysta (23 %) a nejméně přežívala 6 denní morula 69 % (celkem jich bylo 25,5 %).

Přenos embryí

Přenášeli-li se čerstvé embryo, je vhodné ho přenést co nejdříve. Není-li přeneseno embryo do 2 hodin, je dobré ho z vyplachovacího (flushing) media přenést a uchovávat v uchovávacím roztoku (holding medium) po dobu až 24 hodin. Přenos zmraženého embrya nevyžaduje jiný přístup než přenos čerstvého embrya. Rozmrazování se provádí ve vodní lázni při teplotě okolo 33 °C. Čas od rozmrazení do přenosu by neměl překročit 20-30 minut. Po rozmrazení před samotným přenosem by měla proběhnout kontrola identifikace přenášených embryí. Pejeta musí být signována alespoň číslem dárce, registrem pleménika (otce) a datem odběru. Doporučuje se zaznamenat i použité kryoprotektivum, protože v případě použití glycerolu je před samotným přenosem nutné embryo opláchnout v mediu a zbavit ho tak kryoprotektiva. Na petriho misce máme několik kapiček oplachovacího media (holding medium) a postupně embryo přepipetováváme z kapky do čisté kapky a tím ho zbavíme kryoprotektiva. Embrya vždy musí doprovázet protokol, na kterém je kromě výše zmíněných údajů také číslo schváleného týmu na odběr či produkci embryí a způsob mražení.

Embryo se přenáší do kraniální třetiny děložního rohu přístupem přes dorzální stěnu děložní. Do lumen dělohy se zavede dostatečně silná jehla, kterou se prostrčí teflonová kapilára nebo pejeta s nasátým embryem a pomocí pipety je pak embryo vytlačeno.

Přenos stejně jako odběr lze provádět buď laparotomicky nebo laparoskopicky.

Samotnému laparotomickému přenosu může předcházet sonografická nebo jiná kontrola vaječníků. Poté je ovce uvedena do celkové narkózy, uložena do operačního lehátka a naklopena hlavou dolů. Incize je provedena několik centimetrů mediálně nebo paramediálně před vemenem. Embryo se přenáší do ipsilaterálního děložního rohu vzhledem k výskytu žlutého tělíska na vaječnicích. U ovcí se přenáší pouze jedno embryo na příjemce (LI, 2008) Jiní autoři doporučují 2 embrya na příjemce (mají-li 2 žlutá tělíska) (PUGH, 2002, DOLEŽEL, 1997). Při laparotomickém přenosu se povytáhne děložní rok do rány a přenesse embryo. V literatuře je popsána i modifikace laparotomie stojící na rozhraní mezi laparotomií a laparoskopií. Jedná se o mini-laparotomii (LI, 2008). V celkové anestezii se provedou 2 incize, které odpovídají tloušťce operátérova ukazováčku. Vzdálené jsou od sebe asi 10 cm. Do levé incize se zasune levý ukazováček a do pravé incize pravý ukazováček. Tím se palpují vaječníky. Děložní roh, kde se nachází solidní žluté tělísko, je vtlačen do protilehlé incize. Zde se zavede embryo obdobně jako při laparotomii (LI, 2008).

Laparoskopický přenos embryí může probíhat v celkové narkóze nebo jenom v sedaci v kombinaci s lokální anestézií. Stejně jako při laparoskopické inseminace se paramediálně kraniálně před vemenem zavede optický port. Kontralaterálně od linea alba se zavede pracovní kanál. Po vizuální kontrole vaječníků a posouzení žlutého tělíska se do ipsilaterálního děložního rohu zavede embryo. Osvědčilo se použití tenké kapiláry, do níž bylo nasáto pomocí mikropipety embryo. Na tuto kapiláru byla osazena tenká jehla. Ta se zavede do lumen dělohy a tlakem na píst stříkačky nasazené na druhý konec kapiláry se embryo vytlačí z kapiláry do dělohy (Obrázek 8). Je možné také přenést embryo pomocí Cassa soupravy (inseminační katetr). Embryo je umístěno v 0,5 ml pejetě (Obrázek 9). Po zavedení do katetru se na konec umístí tenká jehla, kterou se pronikne do dělohy. Tento způsob je vhodný u one-step metody přenosu embrya, kdy je embryo zamrazeno v pejetě a jako kryokonzervant je použit etylenglykol, který se nemusí před přenosem odmívat.

LI (2008) porovnal procento březích zvířat po přenosu laparotomicky, mini-laparotomicky a laparoskopicky. Použil embrya kultivovaná in vitro, následně zmrazená. Největší úspěšnost vykazovala laparoskopie (47 %), pak mini-laparotomie (45 %) a nejmenší

laparotomie (39 %). Jiní autoři popisují úspěšnost v podobě březosti po přenosu zmražených embryí 30-70 % (SCHEIWE, 1990, NELLENSCHULTE, 1992). U čerstvě přenášených embryí je procento březosti vyšší – 60 až 80 % při přenosu 2 embryí (PUGH, 2002).

Přenos embryí podle současné legislativy může provádět pouze osoba odborně způsobilá. Po absolvování základního inseminačního kurzu nutného k inseminaci, následuje dvoudenní kurz přenosu embryí.

5. Závěr:

Reprodukční technologie u ovcí zatím v Českých podmínkách svoje širší uplatnění hledají. Literární rešerše daného tématu ukazuje, že je již shromážděn dostatek relevantních informací, ze kterých mohou čerpat i naši chovatelé a jiní odborníci.

Možné úskalí lze hledat v horší dostupnosti hormonálních preparátů. U tohoto problému se s ohledem na velikost trhu České republiky v dohledné době nedá očekávat zlepšení. Další problém pro chovatele, kteří by chtěli využívat tyto technologie, je v absenci subjektu, který by tyto služby komerčně a úspěšně nabízel chovatelské veřejnosti. Rozvoj biotechnologií může být bržděn ale třeba i faktem, že část ovcí je chována v ekologickém zemědělství, kde výše popisované metody, krom inseminace, nelze používat.

6. Přehled literatury:

Bari, F., Khalid, M., Haresign, W., Murray, A, Merrell, B. 2003. Factors affecting the survival of sheep embryos after transfer within a MOET program. *Theriogenology*. 59(5). 1265-1275.

Betteridge, K. J. 2003. A history of farm animal embryo transfer and some associated technique. *Animal reproductive science*. 79. 203-244.

Cocero, M. J., Moreno Diaz de la Spina, S., Aguilar, B. 2002. Ultrastructural Characteristics of Fresh and Frozen-Thawed Ovine Embryos Using Two Cryoprotectants. *Biology of Reproduction*, 66(5). 1244-1258.

Čunát, L. 2011. Rozvoj a využití biotechnologických metod v reprodukci malých přežvýkavců. Popis řešení projektu QH 81324. Brno, Rapotín. 18s.

Doležel, R., Kudláč, E. 1997. Veterinární gynekologie. Veterinární a farmaceutická univerzita Brno. Brno. 144 s. ISBN: 80-85114-04-6s.

Foote, R.H. 2002. The history of artificial insemination: Selected notes and notables. *Journal of Animal Science*. 80. 1-10.

Gamčík, P., Kozuplík, J.. 1992. Andrologia a umelá inseminácia hospodárskych zvierat. *Príroda*. Bratislava. 298s. ISBN: 80-07-00540-4.

Gonzalez-Bulnes, A., Santiago-Moreno, J., Cocero, M.J., Lopez-Sebastian, A. 2000. Effects of FSH commercial preparation and follicular status on follicular growth and superovulatory response in Spanish Merino ewes. *Theriogenology*. 54(7). 1055-1064.

Hegedúšová, Z., Čunát, L., Louda, F., Štolc, L., Vejnar, J. 2011. Využití inseminace v chovu ovčí. *Náš chov*. 71(1).

Horák, F. a kol. 2007. Ovce a jejich chov. Nakladatelství Brázda, s.r.o.. Praha. 304 s. ISBN: 80-209-0328-3.

Husein, M. Q., Bailey, M. T., Ababneh, M. M., Romano, J. E., Crabo, B. G., Wheaton J.E. 1998. Effect of eCG on the pregnancy rate of ewes transcervically inseminated with frozen-thawed semen outside the breeding season. *Theriogenology*. 49(5). 997-1005.

- Li, Q. Y., Guan, H., Hou, J., An, X. R., Chen, Y. F. 2008. Technical note: Transfer of Ovine Embryos through a Simplified Mini-laparotomy Technique. *Journal of Animal Science*. 86. 2324 – 2327.
- Louda, F., Hegedúšová, Z. 2009. Inseminace ovcí – intenzifikační faktor šlechtitelské práce. *Agrovýzkum Rapotín s.r.o.. Šumperk*. 37s. ISBN: 978-80-87144-12-1.
- Lymberopoulos, A.G., Amiridis G.S., Kühholzer B. 2001. Fertilization and embryo recovery rates in superovulated Chios ewes after laparoscopic intrauterine insemination. *Theriogenology*. 55(9). 1855-1862.
- McKusick, B.C., Thomas, D.L., Gottfredson, R.G., Zelinsky, R.D., Berger Y.M. 1998. A comparasion of transcervical and laparoscopic intrauterine arteficial insemination techniques on reproductive performance od ewes. 46th Annual Spooner Sheep Day Proceedings. 32-36p.
- Mitchell, J. R., Doak, G. A. 2004. *The Arteficial Insemination and Embryo Transfer of Dairy and Beef Cattle (including information pertaining to goats, Wheel, horses, swine, and other animals)*. Pearson Education. New Jersey. 387 p. ISBN:s 0-13-112278-9.
- Nellenschulte, E., Niernan, H. 1992. Collection and transfer of ovine embryos by laparoscopy. *Animal Reproduction Science*. 27 (4). 293-304.
- Pugh, D. G. 2002. *Sheep and Goat Medicine*. Saunders. Philadelphia. p. 468. ISBN: 978-0-7216-9052-0.
- Rowson, L. E. A., Moor, R. M. 1966. Embryo Transfer in the Sheep: the Significance of Synchronizing Oestrus in the Donor and Recipient Animals. *Journal of Reproduction and Fertility*. 11. 207-212.
- Sakanya, L. 2010. Development of trans-cervical arteficial insemination in sheep with special reference to anatomy of cervix. *Journal of Science Technology*. 17(1). 57-69.
- Santiago-Moreno, J., Gonzalez-Bulnes, A., Gomez-Brunet, A., Cocero, M. J., del Campo, A., Garcia-Garcia, R., Lopez-Sebastian, A. 2001. Procedure for Succesful Interspecific Embryo Transfer from Muflon (*Ovis Gmelini Musimon*) to Spanish Merino Sheep (*Ovis Aries*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicíně*. 32(3). 336-341.
- Schiewe, M. C., Bush, M., Stuart, L.S., Wildt, D.E. 1984. Laparoscopic embryo transfer in domestic sheep: A preliminary study. *Theriogenology*. 22(6). 675-682.

- Scheiwe, M. C., Rall, W. F., Stuart, L. S., Wildt, D. E. 1990. In situ straw dilution on ovine embryos following cryopreservation by conventional freezing or vitrification. *Theriogenology*. 33. 321.
- Sun, S. 2010. Effects of Environment on Gestation Ratio of Sheep Embryo Transfer and its Control Measures. *Journal of Agricultural Science*. 2. 234-238.
- Tetsuka, M., Nancarrow, C. D. 2001. Active Immunization Against 5 α -androstane-3 α , 17 β -diol Increases Ovulation Rate in Merino Ewes. *Journal of Reproduction and Development*. 47. 7-15.
- Ungerfeld, R., Forsberg, M., Rabianes, E. 2004. Overview of the response of anoestrous ewes to the ram effect. *Reproduction, fertility, and development*. 16(4). 479-490.
- Weiwei, W., Hanikezi, Mei, Y., Ping, G., Feng, W., Yuezhen, T., Xinming, X., Xuefeng, F., Haqifezi, Kechuan, T., Zhiqin, G. 2011. Effect of two follicle stimulating hormone (FSH) preparation and simplified superovulatory treatments on superovulatory response in Xinji-fine-wool sheep. *African Journal of Biotechnology*. 10(70). 15834-15837.
- Wildeus, S. 2000. Current concepts in synchronization of estrus: Sheep and goats. *Journal of Animal Science*. 77. 1-14
- Wulster-Radcliffe, M. C., Costine, B. A., Lewis, G. S. 1999. Estradiol-17 beta-Oxytocin-Induced Cervical Dilation in Sheep: Application to Transcervical Embryo Transfer. *Journal of Animal Science*. 77. 2587 – 2593.
- Wulster-Radcliffe, M. C., Wang, S., Lewis, G.S. 2004. Transcervical artificial insemination in sheep: effects of new transcervical artificial insemination instrument and traversing the cervix on pregnancy and lambing rates. *Theriogenology*. 62. 990-1002.
- Yaniz, J., Marti, J.I., Silvestre, M.A., Folch, J., Santolaria, P., Alabart, J.L., Lopez-Gatius, F. 2005. Effects of solid storage of sheep spermatozoa at 15 °C on their survival and penetrating capacity. *Theriogenology*. 64. 1844-1851.

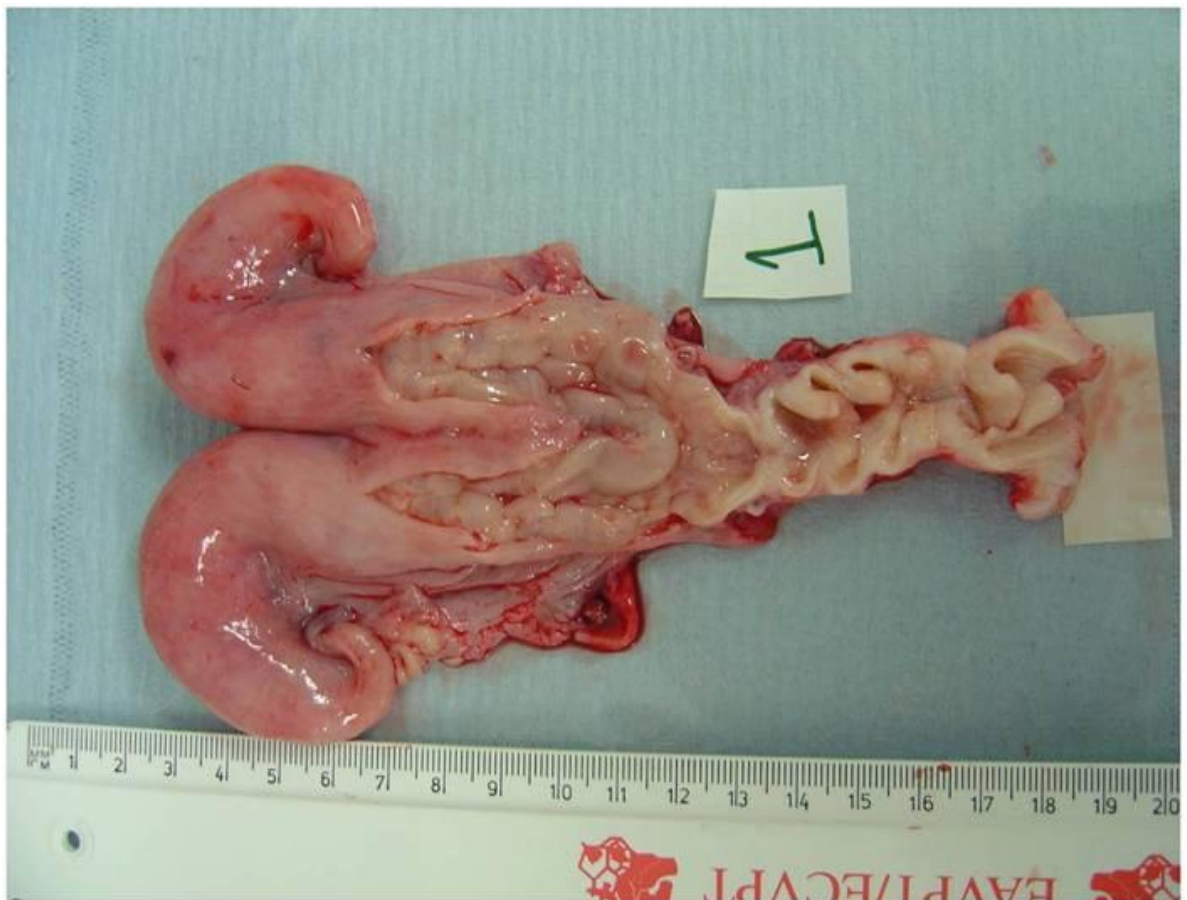
Internetové zdroje:

http://www.icarda.org/cac/fiber/files/pub_Eng_Embryo_Transfer_Guide.pdf

7. **Obrazová příloha:**



Obrázek 1: Injekční stříkačka, fyziologický roztok a plastový katetr – jednoduché inseminační instrumentarium (foto autor)



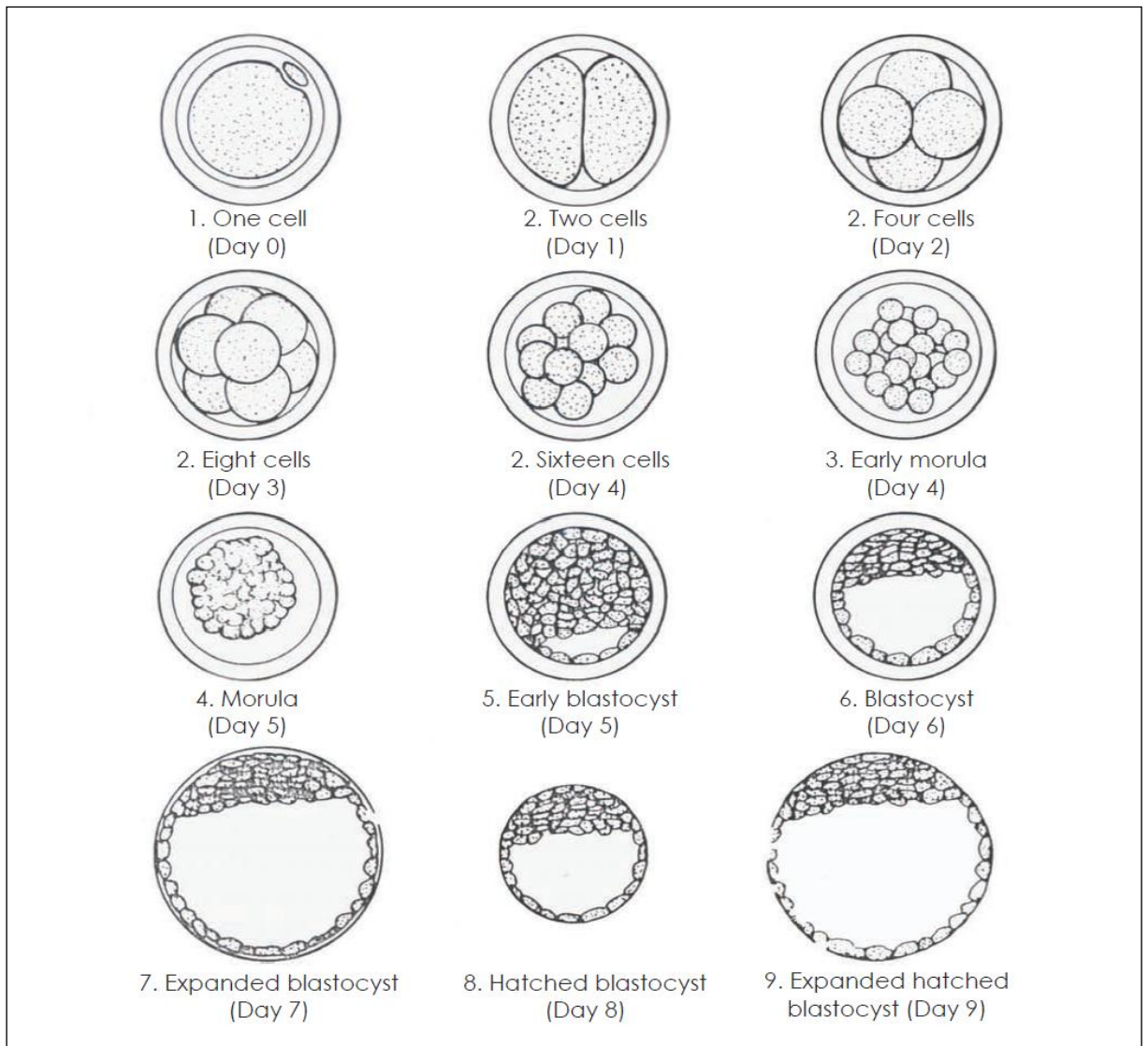
Obrázek 2: Děložní krček a děloha ovce (Sakanya, 2010)



Obrázek 3: Inseminační katetry (foto autor)

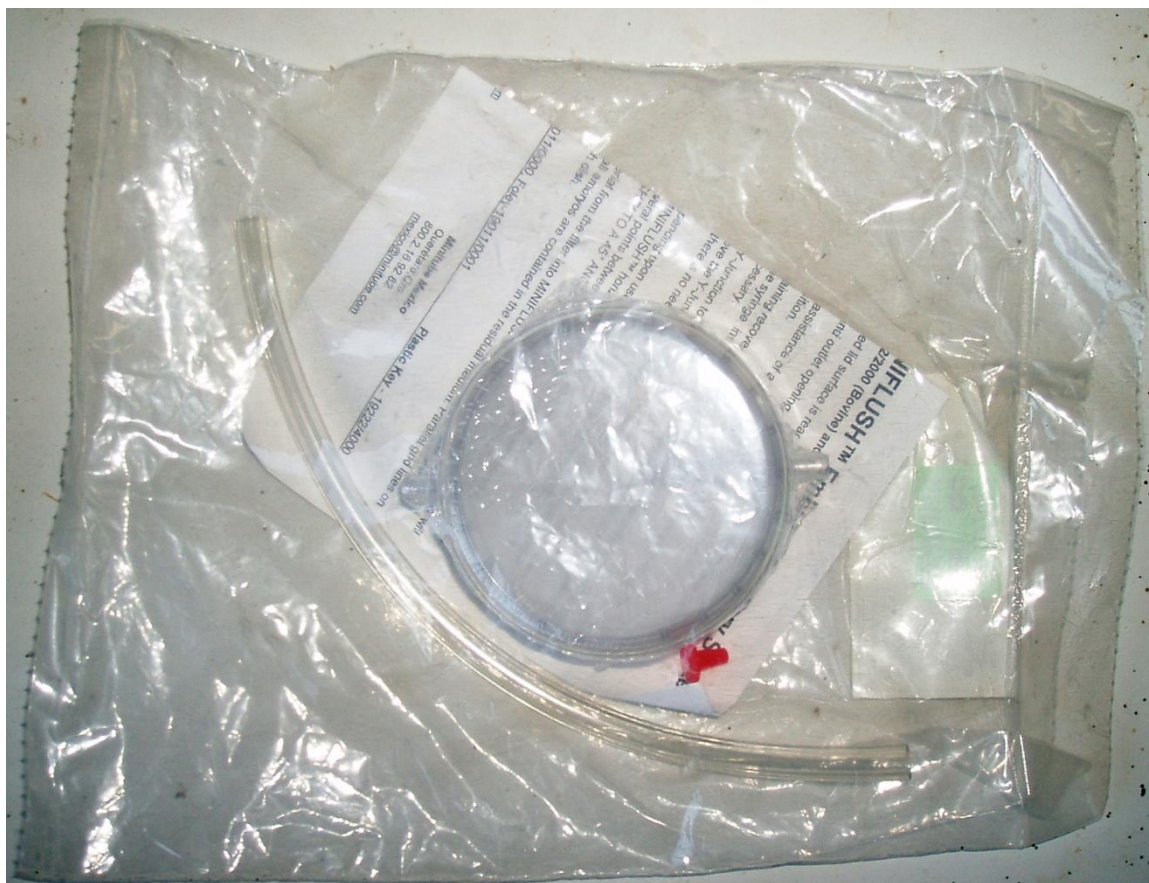


Obrázek 4: Děloha a vaječníky s mnohočetnou ovulací (dostupné z http://www.icarda.org/cac/fiber/files/pub_Eng_Embryo_Transfer_Guide.pdf)



Obrázek 5: Vývoj embrya prvních 9 dní po oplodnění (dostupné z

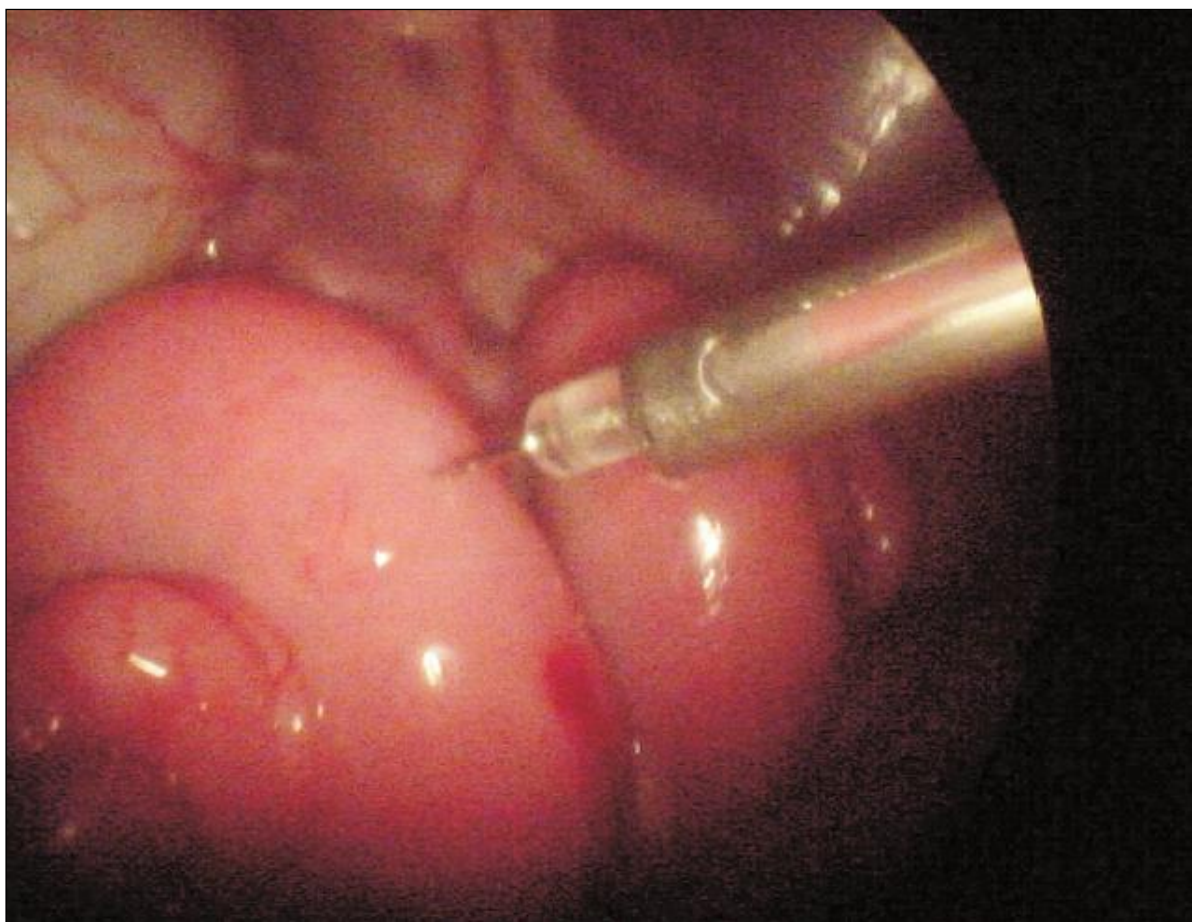
http://www.icarda.org/cac/fiber/files/pub_Eng_Embryo_Transfer_Guide.pdf)



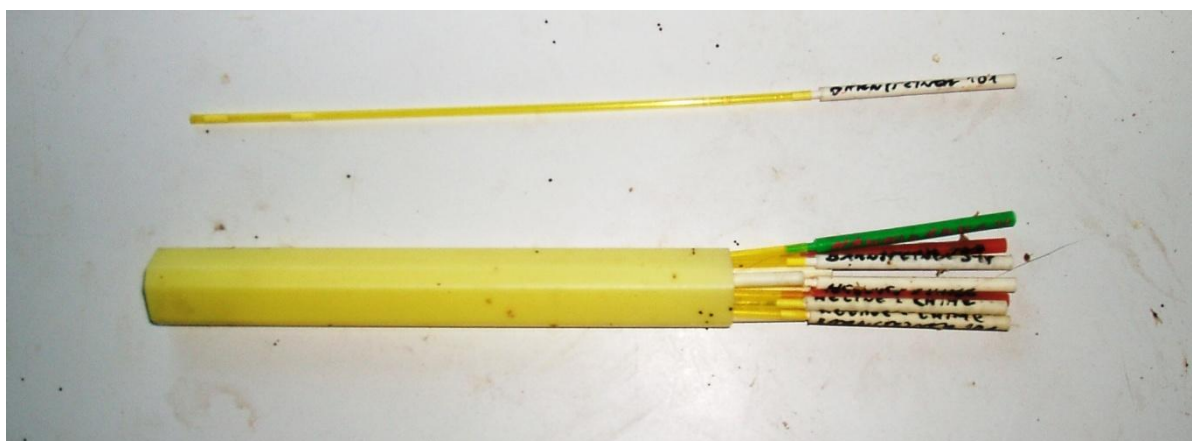
Obrázek 6: Mikrofiltr používaný při výplachu embryí (foto autor)



Obrázek 7: Media používaná při embryotransferu (foto autor)



Obrázek 8: Intrauterinní laparoskopická inseminace (dostupné z http://www.icarda.org/cac/fiber/files/pub_Eng_Embryo_Transfer_Guide.pdf)



Obrázek 9: Pejeta s embryem (foto autor)