

## Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society

Vol 51, No 1 (2000)



**Embryo transfer in the mare was introduced 30 years ago.**

*P. YPSILANTIS (Π. ΥΨΗΛΑΝΤΗΣ)*

doi: [10.12681/jhvms.15654](https://doi.org/10.12681/jhvms.15654)

Copyright © 2018, P YPSILANTIS



This work is licensed under a [Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).

### To cite this article:

YPSILANTIS (Π. ΥΨΗΛΑΝΤΗΣ) P. (2018). Embryo transfer in the mare was introduced 30 years ago. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*, 51(1), 32–40. <https://doi.org/10.12681/jhvms.15654>

## Η μεταφορά εμβρύου στη φοράδα

Π. Υψηλάντης

**ΠΕΡΙΛΗΨΗ.** Η μέθοδος της μεταφοράς εμβρύου στη φοράδα εφαρμόστηκε για πρώτη φορά πριν από 30 χρόνια. Με την εφαρμογή της βελτιώνεται σημαντικά ο ρυθμός αναπαραγωγής, δημιουργούνται μοντέλα μελέτης θεμάτων φυσιολογίας και παθολογίας της αναπαραγωγής, ενώ προάγεται η γενετική βελτίωση του είδους. Η μέθοδος περιλαμβάνει τα ακόλουθα στάδια: 1) Επιλογή των φοράδων δότη και δέκτη εμβρύου. 2) Πρόκληση πολλαπλής ωοθυλακιορρηξίας στη φοράδα-δότη. Δεν έχει αναπτυχθεί ακόμη ένα αποτελεσματικό σχήμα που να εφαρμόζεται στην πράξη. 3) Συγχρονισμός των οίστρων των φοράδων δότη και δέκτη. Οι δέκτες χρησιμοποιούνται συνήθως κατά την αναπαραγωγική περίοδο, μπορούν ωστόσο να χρησιμοποιηθούν και κατά τον άνοιτρο, μετά από χειρουργική αφαίρεση των ωοθηκών τους ή ακόμη και χωρίς να έχει συγχρονιστεί ο οίστρος τους με εκείνον του δότη, μετά από κατάλληλη αγωγή. 4) Τεχνητή σπερματέγχυση της φοράδας-δέκτη. 5) Συλλογή, εκτίμηση και έκπλυση του εμβρύου. Για τη συλλογή του εμβρύου εφαρμόζεται συνήθως μη χειρουργική και σπάνια χειρουργική μέθοδος. Η εκτίμηση του εμβρύου περιλαμβάνει τον προσδιορισμό του εξελικτικού σταδίου ανάπτυξης του σε σχέση με την ημέρα συλλογής και την εκτίμηση της ποιότητάς του. Η έκπλυση του εμβρύου γίνεται με διαδοχική διόδου από τρεις αραιώσεις υγρού καλλιέργειας. 6) Μεταφορά του εμβρύου στη μήτρα της φοράδας-δέκτη. Εφαρμόζονται χειρουργικές μέθοδοι (λαπαροτομή διαμέσου της λευκής γραμμής, λαπαροτομή διαμέσου του κενώνου, λαπαροσκοπική και διακολπική μέθοδος) ή μη χειρουργική μέθοδος (τεχνικές του ακάλυπτου και του καλυμμένου καθετήρα) διαμέσου του τραχήλου.

**Λέξεις ευρετηγίας:** Μεταφορά εμβρύου, φοράδα

**ABSTRACT.** Ypsilantis P. Embryo transfer in the mare. *Bulletin of the Hellenic Veterinary Medical Society 2000, 51(1):32-40.* Embryo transfer in the mare was introduced 30 years ago.

*Κλινική Μαιευτικής και Τεχνητής Σπερματέγχυσης, Τμήμα Κτηνιατρικής Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης.*

Ημερομηνία υποβολής: 14.09.99  
Ημερομηνία εγκρίσεως: 27.01.2000

Its application improves the reproduction rate, creates experimental models for the study of physiology and pathology of reproduction, while it promotes genetic improvement of the species. The method includes the following stages: 1) Selection of the donor and recipient mares. 2) Induction of multiple ovulation in the donor-mare. A reliable method that could be applied commercially has not been developed yet. 3) Synchronization of donor and recipient mares' estrus. Recipients are usually used during the breeding season, but can be used during anestrus or after surgical removal of their ovaries as well. Non-synchronized recipients may also be used after proper treatment. 4) Artificial insemination of the donor mare. 5) Collection, evaluation and washing of the embryo. Embryo is usually collected by non-surgical and rarely surgical methods. Embryo evaluation involves the assessment of its developmental stage in relation with the day of selection and its quality evaluation. Embryo washing is accomplished by its successive passage through three different dilutions of culture medium. 6) Embryo transfer in the uterus of the recipient mare. Surgical (midventral laparotomy, flank laparotomy, laparoscopic and transvaginal method) or non-surgical (unguarded and guarded methods) transcervical methods are used.

### ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η μέθοδος της μεταφοράς εμβρύου έχει αναπτυχθεί σημαντικά και βρίσκει εφαρμογή, εδώ και αρκετά χρόνια, τόσο στα παραγωγικά ζώα όσο και στα ζώα εργαστηρίου. Ωστόσο, η τεχνολογία της μεταφοράς εμβρύου στη φοράδα δεν αναπτύχθηκε σε παρόμοιο βαθμό, αφού ο συντηρητισμός της κοινωνίας των εκτροφών ίππων σε συνδυασμό με ορισμένα τεχνικά προβλήματα και κάποιες ιδιαιτερότητες της φυσιολογίας του αναπαραγωγικού συστήματος των ζώων αυτών αποτέλεσαν τροχοπέδη στην εξέλιξη της μεθόδου και τη διεύρυνση της πρακτικής εφαρμογής της.

Η πρώτη αναφορά επιτυχημένης χειρουργικής μεταφοράς εμβρύου σε ιπποειδή έγινε από τους Allen και Rowson το 1972<sup>1</sup>. Δύο χρόνια αργότερα, οι Oguri και Tsutsumi ανακοίνωσαν την επίτευξη των πρώτων κυοφοριών μετά από διατραχηλική μεταφορά εμβρύου φοράδας<sup>2</sup>.

## ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Η εφαρμογή της μεθόδου της μεταφοράς εμβρύου στον ίππο προσφέρει σημαντικά οφέλη στους εκτροφείς του είδους. Συγκεκριμένα, δίνεται η δυνατότητα α) παραγωγής απογόνων από εκλεκτές φοράδες-δότες, ακόμη και μεγάλης ηλικίας, οι οποίες δεν είναι σε θέση να κνοφορήσουν, β) ταχείας παραγωγής απογόνων από ζώα υψηλού γενετικού δυναμικού, γ) χρησιμοποίησης νεαρών φοράδων, ηλικίας 2 ετών, ως δότες εμβρύων, γεγονός που επιτρέπει τη χρήση στην αναπαραγωγή ζώων, ένα χρόνο νωρίτερα απ' ό,τι συνήθως, δ) απόκτησης απογόνων από φοράδες με προβλήματα γονιμότητας, όπως π.χ. πρώιμους εμβρυϊκούς θανάτους, ε) συλλογής εμβρύων και αποστολής τους σε απομακρυσμένους σταθμούς μεταφοράς εμβρύου και στ) χρησιμοποίησης φοράδων ως δωτών εμβρύων, κατά την περίοδο που λαμβάνουν μέρος σε ιπποδρομίες, αγώνες υπερπήδησης εμποδίων, επιδείξεις κτλ., χωρίς να αναστέλλονται οι αγωνιστικές τους δραστηριότητες.

Η εφαρμογή της μεταφοράς εμβρύου στη φοράδα μπορεί επίσης να συμβάλει σημαντικά στη διάσωση των γηγενών ελληνικών φυλών ίππου, όπως π.χ. των πόνου της Σκύρου. Ήδη, η μέθοδος έχει χρησιμοποιηθεί για τη διάσωση φυλών άγριων ιπποειδών (μεταφορά εμβρύων ίππου Πρεβάλσκι και ζέβρας Γκραντ σε φοράδες πόνου)<sup>3</sup>.

Η μεταφορά εμβρύου μεταξύ συγγενικών ειδών ιπποειδών χρησιμοποιείται ως μέσο έρευνας προβλημάτων αναπαραγωγής. Με τη μεταφορά εμβρύου όνου σε φοράδα-δέκτη επιτυγχάνονται μοντέλα μελέτης της αντιγονικής ασυμβατότητας μεταξύ μητρικών και εμβρυϊκών ιστών<sup>4</sup>, των εμβρυομητρικών αλληλεπιδράσεων, καθώς και των εμβρυϊκών θανάτων ανοσολογικής αιτιολογίας<sup>5</sup>.

Ακόμη, η μεταφορά εμβρύου ίππου, σε συνδυασμό με τεχνικές διχοτόμησης του εμβρύου, χρησιμοποιείται για την παραγωγή μονοζυγωτικών διδύμων<sup>6,7</sup>, η χρήση των οποίων μειώνει σημαντικά τον αριθμό των πειραματοζώων που απαιτούνται για την εκτίμηση των αποτελεσμάτων μιας έρευνας.

Η μεταφορά εμβρύου συμβάλλει στη γενετική βελτίωση του ίππου, δεδομένου ότι δίνει τη δυνατότητα επίσπευσης της διαδικασίας επιλογής γεννητόρων με βάση τις αποδόσεις των απογόνων τους (progeny test). Μπορεί να ελεγχθεί, σε σύντομο χρονικό διάστημα, η γονιμότητα του σπέρματος επιβητόρων, καθώς και τα αποτελέσματα ερευνητών σχετικών με τη συντήρησή του<sup>8,9</sup>.

Είναι σαφές ότι με τη μεταφορά εμβρύου στη φοράδα, και στα ιπποειδή γενικότερα, βελτιώνεται ο ρυθμός αναπαραγωγής τους με σημαντικά οφέλη και προωθείται ουσιαστικά η διερεύνηση θεμάτων φυσιολογίας και παθολογίας της αναπαραγωγής, καθώς και γενετικής βελτίωσης των ζώων αυτών.

## ΣΤΑΔΙΑ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Η μεταφορά εμβρύου στη φοράδα περιλαμβάνει τα α-

κόλουθα στάδια : 1) επιλογή των φοράδων δότη και δέκτη εμβρύου, 2) πρόκληση πολλαπλής ωοθυλακιορρηξίας στη φοράδα-δότη, 3) συγχρονισμός των οίστρων των φοράδων δέκτη και δότη, 4) τεχνητή σπερματέγχυση της φοράδας-δότη, 5) συλλογή, εκτίμηση και έκπλυση του εμβρύου και 6) μεταφορά του εμβρύου στη μήτρα της φοράδας-δέκτη.

### 1. Επιλογή των φοράδων δότη και δέκτη εμβρύου

Κατά την επιλογή μίας φοράδας ως δότη εμβρύου λαμβάνονται υπόψη το κόστος της διαδικασίας, τυχόν περιορισμοί εγγραφής του πουλαριού που θα γεννηθεί στους γενεαλογικούς καταλόγους της φυλής, η πιθανή αξία του πουλαριού, η χιλιομετρική απόσταση που χωρίζει τη φοράδα από τον επιβήτορα που θα προσφέρει το σπέρμα του, η ηλικία της (κυμαίνεται από 2 έως 17 έτη, αλλά προτιμώνται ζώα από 2 έως 8 ετών<sup>10</sup>), το αναπαραγωγικό ιστορικό της και η κατάσταση του γεννητικού της συστήματος. Το ζώο θα πρέπει να έχει ιστορικό φυσιολογικών ωοθηκικών κύκλων. Η κατάσταση του γεννητικού συστήματος ελέγχεται με ψηλάφηση, κολποσκόπηση και υπερηχογραφία<sup>11</sup>. Επιπλέον λαμβάνεται υλικό από το ενδομήτριο για κυτταρολογική<sup>12</sup>, μικροβιολογική<sup>13</sup> και ιστολογική εξέταση<sup>14</sup>. Θα πρέπει να επιλέγονται ζώα με φυσιολογικό ενδομήτριο<sup>15</sup>.

Κατά την επιλογή μίας φοράδας ως δέκτη εμβρύου λαμβάνονται υπόψη η ηλικία (3 έως 10 ετών), το σωματικό βάρος (400-550 kg), η σωματική διάπλαση γενικά, καθαώς και η διαμόρφωση της περινεϊκής χώρας και των μαστών ειδικότερα (οι οποίες θα πρέπει να είναι καλές), η συμπεριφορά (θα πρέπει να είναι ευάγωγη), το αναπαραγωγικό ιστορικό και η κατάσταση του γεννητικού της συστήματος. Προτιμώνται φοράδες που είτε είναι νεαρές και δεν έχουν οχευτεί είτε έχουν ιστορικό φυσιολογικών κνοφοριών και τοκετών, αρκεί να έχουν παρέλθει 2 τουλάχιστον μήνες από τον τελευταίο τοκετό<sup>16</sup>. Η φοράδα-δέκτης θα πρέπει να παρουσιάζει φυσιολογικούς ωοθηκικούς κύκλους, ενώ, κατ' εξαίρεση, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ωοθηκεκτομημένες φοράδες, όπου εφαρμόζεται ανάλογη μέθοδος συγχρονισμού των οίστρων δέκτη-δότη<sup>17-19</sup>. Η εξέταση του γεννητικού συστήματος γίνεται όπως και για την επιλογή των φοράδων-δωτών. Επιλέγονται ζώα που δεν παρουσιάζουν κάποιο πρόβλημα που θα επηρέαζε την ομαλή εξέλιξη της εγκυμοσύνης.

Σε ό,τι αφορά την αναλογία των σωματικών μεγεθών δέκτη - δότη, ορισμένοι ερευνητές υποστηρίζουν ότι θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη, δεδομένου ότι επηρεάζει το μέγεθος του νεογέννητου<sup>20</sup>, ενώ άλλοι έχουν αντίθετη άποψη<sup>21</sup>.

### 2. Πρόκληση πολλαπλής ωοθυλακιορρηξίας στη φοράδα-δότη

Ο ρυθμός αναπαραγωγής στον ίππο περιορίζεται σημαντικά από το μικρό αριθμό ωοθυλακιορρηξιών ανά ωοθηκικό κύκλο (κατά κανόνα μία και σπάνια δύο) και την

αδυναμία της μήτρας της φοράδας να φέρει βιώσιμα δίδυμα έμβρυα. Η πρόκληση πολλαπλής ωοθυλακιορρηξίας στο δότη, με επακόλουθο την αύξηση του αριθμού των παραγόμενων εμβρύων ανά ωθητικό κύκλο, και η μεταφορά των εμβρύων σε ισάριθμους δέκτες θα πρόσφερε λύση στο πρόβλημα. Ωστόσο, δεν είναι απόλυτα ξεκαθαρισμένη η σχέση του αριθμού των παραγόμενων εμβρύων ανά ωθητικό κύκλο με το ποσοστό των κυοφοριών. Ορισμένοι ερευνητές αναφέρουν ότι το ποσοστό κυοφοριών από μεταφορά εμβρύων που συλλέγονται μετά από φυσική διπλή ωοθυλακιορρηξία ή πρόκληση πολλαπλής ωοθυλακιορρηξίας, δε διαφέρει από εκείνο μετά από μεταφορά εμβρύου που προέρχεται από απλή ωοθυλακιορρηξία<sup>22</sup>, ενώ άλλοι αναφέρουν ότι είναι μικρότερο<sup>23-24</sup>.

Οι προσπάθειες πρόκλησης πολλαπλής ωοθυλακιορρηξίας στη φοράδα δεν είχαν, μέχρι σήμερα, ικανοποιητικά αποτελέσματα. Η χορήγηση ιπτείου χοριακής γοναδοτροπίνης (CEG,) στη φοράδα δεν οδήγησε σε πολλαπλή ωοθυλακιορρηξία, λόγω της αποκλειστικά ωχρινότροπου δράσης που ασκεί στο ζώο αυτό<sup>25,26</sup>. Η χορήγηση εκχυλίσματος υπόφυσης ίππου (EPE) αύξησε σε 2-4 τον αριθμό των ωοθυλακιορρηξιών ανά ωθητικό κύκλο, όχι όμως και τον αριθμό των συλλεγόμενων εμβρύων. Συγκεκριμένα, χορηγούνταν καθημερινά 40 mg EPE, ενδομυϊκά, από την 5η ημέρα μετά την ωοθυλακιορρηξία (p.o.) μέχρι τη διαπίστωση δύο τουλάχιστον ωοθυλακίων διαμέτρου  $\geq 35$  mm, οπότε εγχέονταν 3.300 IU ανθρώπινης χοριακής γοναδοτροπίνης (hCG) ενδομυϊκά, ενώ την 5η και την 6η ημέρα π.ο. εγχέονταν 10 mg προσταγλανδίνης F<sub>2α</sub> (PGF<sub>2α</sub>), ενδομυϊκά<sup>30</sup>. Η χορήγηση παρασκευάσματος χοίρειας ωοθυλακιοτρόπου ορμόνης (FSH-P) δεν είχε επίσημα αξιόλογα αποτελέσματα<sup>29,31</sup>. Ένα σχήμα που δοκιμάστηκε ήταν η χορήγηση 5 mg PGF<sub>2α</sub>, ενδομυϊκά την 5η και 6η ημέρα π.ο. και 8, 16 ή 32 mg FSH, ενδομυϊκά, κάθε 12 ώρες, από την 6η ημέρα μέχρι τη διαπίστωση ωοθυλακίου με διάμετρο  $\geq 40$  mm. Ένα άλλο σχήμα περιλάμβανε τη χορήγηση PGF<sub>2α</sub> την 3η, 4η, 5η και 6η ημέρα και FSH, κάθε 12 ώρες, από την 3η ημέρα μέχρι τη διαπίστωση ωοθυλακίου με διάμετρο  $\geq 40$  mm. Τέλος, η ανοσοποίηση των φοράδων έναντι της ανασταλτικής οδήγησε σε πολλαπλή ωοθυλακιορρηξία, όχι όμως και σε αύξηση του αριθμού των συλλεγόμενων εμβρύων<sup>32,33</sup>.

Με δεδομένο ότι δεν έχει αναπτυχθεί, ακόμη, ένα αξιόπιστο σχήμα πρόκλησης πολλαπλής ωοθυλακιορρηξίας στη φοράδα, η μέθοδος δεν εφαρμόζεται στην πράξη, παρά μόνο σε ερευνητικό επίπεδο.

### 3. Συγχρονισμός των οίστρων των φοράδων δέκτη και δότη

Ένας από τους σημαντικότερους παράγοντες για την επιτυχή μεταφορά εμβρύου στη φοράδα, είναι η αντιστοιχία της λειτουργικής κατάστασης της μήτρας της φοράδας-δέκτη με την ηλικία του εμβρύου που θα δεχτεί. Κατά συνέπεια, θα πρέπει να συγχρονίζεται ο οίστρος του δέκτη

με εκείνον του δότη. Όταν η ωοθυλακιορρηξία του δέκτη πραγματοποιείται 1 ημέρα πριν έως και 3 ημέρες μετά από εκείνη του δότη, επιτυγχάνονται τα υψηλότερα ποσοστά κυοφοριών<sup>34-36</sup>.

Όπου υπάρχει δυνατότητα τήρησης μεγάλου αριθμού φοράδων-δεκτών για την εφαρμογή ενός προγράμματος μεταφοράς εμβρύου, επιλέγεται η φοράδα της οποίας ο οίστρος διαπιστώνεται ότι είναι συγχρονισμένος με εκείνον του δότη. Σε αντίθετη περίπτωση, συγχρονίζονται οι οίστροι τους μετά από ορμονική αγωγή. Οι φοράδες-δέκτες χρησιμοποιούνται συνήθως κατά την αναπαραγωγική περίοδο, μπορούν ωστόσο να χρησιμοποιηθούν και κατά τον άνοιτρο, μετά από χειρουργική αφαίρεση των ωοθηκών τους ή ακόμη και χωρίς να έχει συγχρονιστεί ο οίστρος τους με εκείνον του δότη, μετά από κατάλληλη αγωγή.

#### α) Συγχρονισμός των οίστρων φοράδων κατά την αναπαραγωγική περίοδο

##### i) Χορήγηση προσταγλανδίνης F<sub>2α</sub> ή συνθετικού αναλόγου της

Η πιο απλή μέθοδος πρόκλησης οίστρου, σε φοράδες σε δίοιστρο, είναι η εφάπαξ χορήγηση 5 mg PGF<sub>2α</sub>, ενδομυϊκά ή συνθετικού αναλόγου της, όπως π.χ. κλοπροστενόλης στη δόση των 250 μg, ενδομυϊκά οπότε προκαλείται ωχρινόλυση εντός 3 έως 5 ημερών<sup>37</sup>. Η αγωγή είναι αποτελεσματική από την 5η ημέρα π.ο..

Για το συγχρονισμό των οίστρων φοράδων, σε οποιοδήποτε στάδιο του ωθητικού κύκλου, εφαρμόζεται το ακόλουθο σχήμα: χορηγούνται δύο δόσεις PGF<sub>2α</sub> ή συνθετικού αναλόγου της, με διαφορά 14-15 ημερών, ενώ 5 ημέρες μετά τη 2η χορήγηση εγχέονται 2000-2500 IU hCG, ενδοφλέβια<sup>40</sup>. Η ωοθυλακιορρηξία πραγματοποιείται 6-9 ημέρες μετά από τη 2η έγχυση PGF<sub>2α</sub> ή 72 ώρες μετά από την έγχυση hCG<sup>41</sup>.

##### ii) Χορήγηση GnRH ή συνθετικού αναλόγου της

Η ενδομυϊκή χορήγηση απελευθερωτικού παράγοντα γοναδοτρόπων ορμονών (GnRH) ή συνθετικού αναλόγου του, όπως π.χ. της buserelin, προκαλεί στη φοράδα έκκριση ωχρινότροπου ορμόνης (LH). Η χορήγηση αρχίζει από τη 2η ημέρα του οίστρου ή μόλις διαπιστωθεί ωοθυλάκιο διαμέτρου  $\geq 35$  mm και επαναλαμβάνεται κάθε 12 ώρες, οπότε προκαλείται ωοθυλακιορρηξία  $45,6 \pm 15,2$  ώρες μετά την πρώτη έγχυση<sup>42</sup>. Αν και η μέθοδος είναι αρκετά αποτελεσματική, έχει το μειονέκτημα ότι απαιτούνται τουλάχιστον 4 εγχύσεις. Η τοποθέτηση υποδόριων εμφυτευμάτων GnRH, μπορεί να αποδειχτεί στο μέλλον πρακτική λύση<sup>43</sup>.

##### iii) Χορήγηση προγεσταγόνων

Το προγεσταγόνο altrenogest μπορεί να χρησιμοποιηθεί για το συγχρονισμό των οίστρων στο ακόλουθο σχήμα: τοποθετούνται ενδοκολπικά για 8 ημέρες σπόγγιοι ε-

μποτισμένοι με 0,5 g altrenogest. Μόλις αφαιρεθούν, χορηγείται PGF<sub>2α</sub> ή συνθετικό ανάλογο της με αποτέλεσμα την πρόκληση οίστρου 3,8±1,0 ημέρες αργότερα. Έξι ημέρες μετά από τη χορήγηση προσαγλανδίνης, μπορεί να εγχυθεί hCG, οπότε προκαλείται ωοθυλακιορρηξία 96 ώρες αργότερα.<sup>44,45</sup> Εναλλακτικά, το altrenogest μπορεί να χορηγηθεί per os, στη δόση των 0,044 mg/kg Σ.Β./ημέρα για 15 ημέρες. Ο οίστρος και η ωοθυλακιορρηξία προκαλούνται 3,4±1,9 και 8,8±2,2 ημέρες μετά το τέλος της αγωγής, αντίστοιχα<sup>46</sup>.

#### iv) Χορήγηση συνδυασμού προγεστερόνης - οιστραδιόλης

Ένα ορμονικό σχήμα συγχρονισμού οίστρων με καλά αποτελέσματα είναι το ακόλουθο: χορηγούνται 150 mg προγεστερόνης και 10 mg οιστραδιόλης-17β ενδομυϊκά, καθημερινά για 10 ημέρες, ενώ την τελευταία ημέρα, χορηγείται PGF<sub>2α</sub>. Η ωοθυλακιορρηξία πραγματοποιείται 10-12 ημέρες μετά το τέλος της αγωγής<sup>47</sup>. Αν και επιτυγχάνεται ικανοποιητικός συγχρονισμός των οίστρων, η μέθοδος είναι χρονοβόρα.

#### β) Συγχρονισμός των οίστρων φοράδων κατά τον άνοιτρο

Προσπάθειες για συγχρονισμό των οίστρων φοράδων σε άνοιτρο, με συνδυασμό ορμονικής αγωγής και τεχνητής ρύθμισης της φωτοπεριόδου δεν είχαν καλά αποτελέσματα<sup>45,48</sup>. Έχει προταθεί η χρησιμοποίηση φοράδων-δεκτών σε άνοιτρο, εφόσον χορηγείται σε αυτές altrenogest, per os, καθημερινά ώσπου η συγκέντρωση της προγεστερόνης στο αίμα να υπερβεί τα 4 ng/ml ορού<sup>49</sup>.

#### γ) Χρησιμοποίηση ωοθηκεκτομημένων δεκτών

Το υψηλό κόστος διατήρησης μεγάλου, πολλές φορές, αριθμού φοράδων ως πιθανών δεκτών, λόγω της ύπαρξης δυσκολιών συγχρονισμού των οίστρων τους, αποτελεί ένα σημαντικό ανασταλτικό παράγοντα για την εφαρμογή ενός προγράμματος μεταφοράς εμβρύου. Για την αντιμετώπιση αυτού του προβλήματος έχει προταθεί η χρησιμοποίηση ωοθηκεκτομημένων φοράδων δεκτών. Έτσι, μπορούν να αφαιρεθούν χειρουργικά οι ωοθήκες τους και να χορηγούνται 300 mg προγεστερόνης σε ελαιώδες έκδοχο την ημέρα, ενδομυϊκά για 5 ημέρες πριν από τη μεταφορά του εμβρύου<sup>17</sup> ή 22-25 mg altrenogest την ημέρα, per os για 6-7 ημέρες πριν από τη μεταφορά<sup>18,19</sup>. Η αγωγή αυτή θα πρέπει να συνεχίζεται μέχρι την 100η-150η ημέρα της εγκυμοσύνης, οπότε τη διατήρηση της εγκυμοσύνης αναλαμβάνουν οι ορμόνες του πλακούντα<sup>50</sup>. Το ποσοστό κυοφοριών που επιτυγχάνεται από τους δέκτες που λαμβάνουν προγεστερόνη δε διαφέρει από εκείνο φοράδων δεκτών με ακέραιες ωοθήκες<sup>17</sup>.

#### δ) Χρησιμοποίηση μη συγχρονισμένων δεκτών

Η χρησιμοποίηση ως δεκτών, φοράδων, στις οποίες η ωοθυλακιορρηξία είχε συμβεί αρκετές ημέρες πριν από

εκείνη του δότη, είναι συνήθως ανεπιτυχής<sup>51</sup>. Ωστόσο, σε περιπτώσεις όπου η ωοθυλακιορρηξία στους δέκτες πραγματοποιείται 5-6 ημέρες μετά από εκείνη του δότη, η καθημερινή χορήγηση προγεσταγόνων από την ημέρα της ωοθυλακιορρηξίας μπορεί να αυξήσει το ποσοστό κυοφοριών<sup>51,52</sup>.

#### 4. Τεχνητή σπερματέγχυση του δότη

Διενεργείται τεχνητή σπερματέγχυση στο δότη με νοπό ή συντηρημένο με ψύξη ή κατάψυξη σπέρμα με σκοπό την παραγωγή εμβρύου για μεταφορά. Η σπερματέγχυση γίνεται εφόσον διαπιστωθεί ωοθυλάκιο με διάμετρο ≥35 mm και επαναλαμβάνεται κάθε δεύτερη ημέρα μέχρι την ωοθυλακιορρηξία. Όπου υπάρχει δυνατότητα μίας μόνο σπερματέγχυσης, αυτή μπορεί να διενεργηθεί 48 ώρες πριν έως και 12 ώρες μετά την ωοθυλακιορρηξία. Η τελευταία μπορεί να επισπευσθεί με τη χορήγηση 2000-2500 IU hCG, ενδοφλέβια, οπότε προκαλείται ωοθυλακιορρηξία 24-48 ώρες μετά την έγχυση<sup>53</sup>. Σε κάθε δόση σπέρματος θα πρέπει να περιέχονται τουλάχιστον 500x10<sup>6</sup> σπερματοζωάρια με προοδευτική κίνηση<sup>54</sup>.

Η τακτική ψηλάφηση και υπερηχογραφική διερεύνηση των ωοθηκών είναι καθοριστική για τον ακριβέστερο δυνατό προσδιορισμό του χρόνου ωοθυλακιορρηξίας. Ο τελευταίος είναι σημαντικός για την επιτυχία της σπερματέγχυσης, τον καθορισμό της ηλικίας του εμβρύου και τον έλεγχο του συγχρονισμού των οίστρων δέκτη-δότη. Η εξέταση θα πρέπει να επαναλαμβάνεται αρχικά καθημερινά και όταν πλησιάζει η ωοθυλακιορρηξία κάθε 8 ώρες.

#### 5. Συλλογή, εκτίμηση και έκπλυση του εμβρύου

##### Συλλογή του εμβρύου

Το γονιμοποιημένο ωάριο εισέρχεται στην κοιλότητα της μήτρας της φοράδας την 5η (στο στάδιο του μοριδίου) ή την 6η ημέρα μετά την ωοθυλακιορρηξία (στο στάδιο του μοριδίου ή της πρώιμης βλαστοκύστης)<sup>2,55,56</sup>. Συνήθως, η συλλογή του γίνεται την 7η ημέρα<sup>57</sup>, μπορεί όμως να γίνει και την 8η ή 9η. Ωστόσο, έμβρυα 9 ημερών είναι λιγότερο βιώσιμα κατά τη μεταφορά τους. Οι μέθοδοι συλλογής του εμβρύου είναι α) η μη χειρουργική και β) η χειρουργική.

##### α) Μη χειρουργική μέθοδος

Η μέθοδος συνίσταται στην έκπλυση της μήτρας, μετά από εισαγωγή σε αυτήν καθετήρα διαμέσου του τραχήλου, και την αναζήτηση στη συνέχεια του εμβρύου στο υγρό έκπλυσης. Για την έκπλυση μπορεί να χρησιμοποιηθεί i) ανοικτό ή ii) κλειστό κύκλωμα διακίνησης υγρών.

##### i) Ανοικτό κύκλωμα διακίνησης υγρών

Χρησιμοποιείται καθετήρας συλλογής εμβρύων από πολυαιθυλένιο τύπου Rusch 24 CH, διαμέτρου 8 mm ή τύπου Foley 30 French Gauge διπλής διόδου με αεροθάλαμο 30 ή

75 ml (ανάλογα με το μέγεθος του ζώου) και μήκος 132 cm.

Το υγρό έκπλυσης αποτελείται από τον τροποποιημένο ορό Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS) (pH: 7-7,5, 280-290 mOsm) στον οποίο περιέχεται 1% ορός εμβρύου μόσχου (FCS) αδρανοποιημένος με θερμοότητα (56°Cx30 min) ή 1% βόεια οροαλβουμίνη (BSA). Κατά καιρούς, έχουν χρησιμοποιηθεί διαφορετικές συγκεντρώσεις FCS (1-5%)<sup>23,58,59</sup>, ενώ είναι δυνατόν ακόμη και να παραλειφθεί<sup>60</sup>. Επιπλέον, προστίθεται στον ορό 1 ml θειικής καναμυκίνης 1,25% / 1 lt DPBS. Εναλλακτικά, μπορεί να χρησιμοποιηθεί Ringer's Lactated Solution ως υγρό έκπλυσης<sup>60</sup>.

Η ποσότητα του υγρού, που συνήθως χρησιμοποιείται σε κάθε έκπλυση, είναι 1 lt<sup>61,62</sup>, αν και η χρήση 300-400 ml έχει επίσης καλά αποτελέσματα<sup>35</sup>. Οι Fleury και συν. πρότειναν τη χρήση 500, 250 και 250 ml για την 1η, 2η και 3η έκπλυση της μήτρας, αντίστοιχα<sup>63</sup>. Ωστόσο, η ποσότητα του υγρού έκπλυσης δε θα πρέπει να προκαθορίζεται, δεδομένου ότι είναι ανάλογη του μεγέθους της μήτρας του ζώου.

Το υγρό έκπλυσης, διοχετεύεται στη μήτρα, διαμέσου του καθετήρα, ώπου αυτή να πληρωθεί, και στη συνέχεια παροχετεύεται σε γυάλινο ογκομετρικό σωλήνα (κύλινδρο συλλογής) με τη βοήθεια της βαρύτητας. Η παροχέτευση υποβοηθείται με ήπιες μαλάξεις της μήτρας διαμέσου του απευθυμένου. Η διαδικασία της έκπλυσης επαναλαμβάνεται δύο φορές. Στη συνέχεια, το υγρό έκπλυσης μεταφέρεται στο εργαστήριο, όπου αναζητείται το έμβρυο.

Στο εργαστήριο, το υγρό έκπλυσης διηθείται σε φίλτρο με πόρους 75 μm το οποίο είναι τοποθετημένο στη βάση αποστειρωμένου δοχείου (δοχείο συλλογής εμβρύων) που φέρει στη βάση του έξοδο με διακόπτη ελέγχου ροής. Το έμβρυο συγκρατείται στους πόρους του φίλτρου. Το περιεχόμενο του δοχείου παροχετεύεται ώπου η στάθμη του υγρού να φτάσει σε ύψος 0,5 cm από το φίλτρο. Στη συνέχεια, το περιεχόμενο κενώνεται σε τρυβλίο Petri, όπου αναζητείται το έμβρυο. Η αναζήτηση γίνεται σε στερεοσκόπιο σε μεγέθυνση 15x, η οποία στη συνέχεια αυξάνει, υπό στείρες συνθήκες σε μονάδες οριζόντιας νηματικής ροής αέρα (Laminar Air Flow Units).

#### ii) Κλειστό κύκλωμα διακίνησης υγρών

Στο κλειστό κύκλωμα διακίνησης υγρών, το υγρό έκπλυσης περιέχεται σε πλαστικό περιέκτη (3-5 lt), ο οποίος είναι συνδεδεμένος, διαμέσου ελαστικού σωλήνα από πολυαιθυλένιο (σωλήνας παροχής), με το ελεύθερο άκρο του καθετήρα συλλογής εμβρύων. Στο ίδιο άκρο είναι συνδεδεμένος, μετά από παρεμβολή ελαστικού προσαρμοστή σε σχήμα "Y", δεύτερος ελαστικός σωλήνας (σωλήνας παροχέτευσης), ο οποίος καταλήγει απευθείας στο δοχείο συλλογής εμβρύων. Το υγρό έκπλυσης της μήτρας της φοράδας, που συνήθως χρησιμοποιείται, αποτελείται από φυσιολογικό ορό στον οποίο προσθέτονται 6% συμπλήρωμα υγρού έκπλυσης του Rob Pashen, τύπου 50X και 3% FCS.

Το υγρό έκπλυσης, διοχετεύεται στη μήτρα διαμέσου του σωλήνα παροχής και του καθετήρα, ώπου αυτή να πληρωθεί, ενώ στη συνέχεια παροχετεύεται διαμέσου του σωλήνα παροχέτευσης και διηθείται απευθείας από το φίλτρο συλλογής εμβρύων. Η έκπλυση επαναλαμβάνεται δύο φορές. Στο τέλος της διαδικασίας, διατηρείται η στάθμη του υγρού σε ύψος 0,5 cm από το φίλτρο, ενώ το δοχείο συλλογής εμβρύων αποσυνδέεται από το υπόλοιπο κύκλωμα και οδηγείται στο εργαστήριο για την αναζήτηση του εμβρύου.

Με την εφαρμογή του "κλειστού κυκλώματος" διακίνησης υγρών παρέχονται τα ακόλουθα πλεονεκτήματα: ελαχιστοποιείται η πιθανότητα επιμολύνσεων του υγρού έκπλυσης, μειώνεται η πιθανότητα προσκόλλησης του εμβρύου στην επιφάνεια των σωλήνων συλλογής και επισπεύδεται η διαδικασία ανεύρεσης του εμβρύου.

Μετά από τη διαδικασία συλλογής του εμβρύου, με οποιοδήποτε από τα παραπάνω κυκλώματα, χορηγείται στη φοράδα PGF<sub>2α</sub> ή συνθετικό ανάλογό της, προκειμένου να επιστρέψει το ζώο σε οίστρο και να αποφευχθεί η ελάχιστη πιθανότητα κυοφορίας από εξέλιξη εμβρύου που πιθανώς δε συλλέχθηκε.

Τα ποσοστά συλλογής εμβρύων που αναφέρονται σε σχετικές μελέτες ποικίλουν σημαντικά και επηρεάζονται από διάφορους παράγοντες. Οι κυριότεροι από αυτούς είναι η ημέρα συλλογής του εμβρύου (62%, 76%, 74% και 81% τις ημέρες 6η, 7η, 8η και 9η, αντίστοιχα<sup>55</sup>), η γονιμότητα και η ηλικία του δότη (34% για μεγάλης ηλικίας και μειωμένης γονιμότητας φοράδες έναντι 56% για νεαρές και υψηλής γονιμότητας φοράδες<sup>23</sup>), η γονιμότητα του σπέρματος που χρησιμοποιήθηκε για τη σπερματέγχυση του δότη, οι μέθοδοι επεξεργασίας του σπέρματος (78%, 62% ή 48% για σπέρμα αναραιώτο, αραιωμένο με αραιωτικό με βάση το αποβουτυρωμένο γάλα ή τα EDTA - λακτόζη, αντίστοιχα<sup>64</sup>), οι μέθοδοι συντήρησής του σπέρματος (65%, 50% και 59% για σπέρμα νωπό, συντηρημένο στους 20°C και 5°C, αντίστοιχα<sup>6</sup>), ο αριθμός των ωοθυλακιορρηξιών ανά ωοθηκικό κύκλο (53% για φοράδες με απλή ωοθυλακιορρηξία έναντι 106% για φοράδες με διπλή<sup>22</sup>), η ποσότητα του υγρού έκπλυσης (47% για 300-400 ml υγρού έκπλυσης/έκπλυση<sup>35</sup>, 64% για 500, 250 και 250 ml στην 1η, 2η και 3η έκπλυση, αντίστοιχα<sup>63</sup>) και ο τύπος κυκλώματος διακίνησης υγρών που επιλέγεται κατά τη συλλογή των εμβρύων (το κλειστό κύκλωμα υπερτερεί έναντι του ανοικτού<sup>43</sup>).

#### β) Χειρουργική μέθοδος

Η χειρουργική μέθοδος συλλογής εμβρύου στη φοράδα παρουσιάζει πολλές δυσκολίες και εγκυμονεί κινδύνους για το ζώο, γι' αυτό και η εφαρμογή της περιορίζεται σε ερευνητικό επίπεδο ή στη συλλογή εμβρύων πρώιμου εξελικτικού σταδίου (μορίδια) από τους ωαγωγούς. Εκτελεί-

ται οπισθομαφαλική λαπαροτομή κατά μήκος της λευκής γραμμής με το ζώο σε γενική αναισθησία. Η μέθοδος συνίσταται στην έκπλυση του σύστοιχου με την ωθήκη όπου έγινε η ωοθυλακιορρηξία ωαγωγού, με φορά από τον κώδωνα προς το κέρασ της μήτρας, και στην αναζήτηση του εμβρύου στο υγρό έκπλυσης. Για το σκοπό αυτό, εισάγεται γυάλινος κεκαμμένος σωλήνας διαμέτρου 8 mm, διαμέσου μικρής τρύπης, στο άκρο του κέρατος της μήτρας με κατεύθυνση προς τον ωαγωγό, όπου και συγκρατείται με κυκλωτήρη περιμετρική ραφή. Το ελεύθερο άκρο του σωλήνα καταλήγει σε γυάλινο αποστειρωμένο δοχείο συλλογής. Διαμέσου αμβλείας βελόνας 18 G, η οποία εισάγεται στο ωθηκικό άκρο του ωαγωγού με φορά προς το κέρασ της μήτρας ή διαμέσου πλαστικής προέκτασης η οποία εισάγεται από τον κώδωνα, διοχετεύονται με σύριγγα 30-50 ml υγρό έκπλυσης, τα οποία συλλέγονται από τον κεκαμμένο σωλήνα στο δοχείο συλλογής<sup>26,65</sup>. Στη συνέχεια, το υγρό έκπλυσης μεταφέρεται στο εργαστήριο για την αναζήτηση του εμβρύου. Το υγρό έκπλυσης που χρησιμοποιείται είναι όμοιο με εκείνο του "ανοικτού κυκλώματος" της μη χειρουργικής μεθόδου συλλογής εμβρύου.

### Εκτίμηση του εμβρύου

Η εκτίμηση του εμβρύου είναι καθοριστική για τη συνέχιση της διαδικασίας μεταφοράς του και περιλαμβάνει α) τον προσδιορισμό του εξελικτικού σταδίου ανάπτυξης του σε σχέση με την ημέρα συλλογής και β) την εκτίμηση της ποιότητάς του.

#### α) Προσδιορισμός του εξελικτικού σταδίου ανάπτυξης του εμβρύου

Οι McKinnon και Squires έχουν περιγράψει τη μορφολογία του φυσιολογικού εμβρύου κατά τα πρώτα στάδια της ανάπτυξης του<sup>66</sup>. Το έμβρυο που συλλέγεται για μεταφορά, θα πρέπει να βρίσκεται σε στάδιο ανάλογο με την ημέρα συλλογής του. Για την ασφαλή πρόβλεψη του σταδίου ανάπτυξης του εμβρύου κατά τη συλλογή του είναι απαραίτητος ο ακριβέστερος δυνατός προσδιορισμός του χρόνου της ωοθυλακιορρηξίας.

Το πρωιμότερο εξελικτικό στάδιο εμβρύου, το οποίο μπορεί να συλληχθεί από τη μήτρα της φοράδας είναι το μορίδιο, την 6η και σπάνια την 5η ημέρα p.o.. Την 6η ημέρα p.o. μπορεί επίσης να συλληχθεί και ως πρόωμη βλαστοκύστη, ενώ την 7η ως βλαστοκύστη ή διατεταμένη βλαστοκύστη. Όλα τα έμβρυα που συλλέγονται την 8η ή 9η ημέρα p.o. είναι διατεταμένες βλαστοκύστες<sup>67</sup>.

#### β) Εκτίμηση της ποιότητας του εμβρύου

Η εκτίμηση της ποιότητας του εμβρύου φοράδας γίνεται με βάση τα μορφολογικά του χαρακτηριστικά. Οι Slade και συν. περιέγραψαν ένα σύστημα κατάταξης των εμβρύων σε 5 κατηγορίες ποιότητας<sup>68</sup>. Οι παράμετροι που εκτιμώνται είναι ο αριθμός, το σχήμα, το χρώμα και το σμπάγες των βλαστομεριδίων, η παρουσία προεξεχόντων

ή εκφυλισμένων βλαστομεριδίων, το σχήμα και το μέγεθος του περιλεκιθικού χώρου, καθώς και η κατάσταση της διαφανούς ζώνης.

Τα έμβρυα που συλλέγονται από τις φοράδες είναι, κατά κανόνα, 1ης ή 2ης κατηγορίας και μόνον αυτής της ποιότητας θα πρέπει να χρησιμοποιούνται για να επιτυγχάνονται υψηλά ποσοστά κυοφοριών<sup>69</sup>.

### Έκπλυση του εμβρύου

Μετά την εκτίμησή του, το έμβρυο εμβαπτίζεται διαδοχικά σε 3 διαλύματα προοδευτικά μικρότερων αραιώσεων OCM ή άλλου υγρού καλλιέργειας, όπου παραμένει για 30 sec κάθε φορά. Τελικά, μεταφέρεται σε τρυβλίο Petri που περιέχει 3-5 ml OCM ή υγρό καλλιέργειας με την ακόλουθη σύσταση: 10 ml FCS, 90 ml PBS, 25 gr γλουταμίνη, 220 mg πυρουβικό νάτριο και 100 mg γλυκόζη / 100 ml υγρού καλλιέργειας. Εκεί, διατηρείται σε θερμοκρασία 37°C και σε σκοτεινό περιβάλλον μέχρι τη μεταφορά του στη μήτρα του δέκτη.

### 6. Μεταφορά του εμβρύου στη μήτρα της φοράδας-δέκτη

Η μεταφορά του εμβρύου στη μήτρα της φοράδας-δέκτη μπορεί να γίνει με την εφαρμογή μεθόδων α) χειρουργικών και β) μη χειρουργικής.

#### α) Χειρουργικές μέθοδοι

Το έμβρυο μεταφέρεται στην κοιλότητα της μήτρας μετά από παρακέντηση του τοιχώματός της με μία από τις ακόλουθες χειρουργικές μεθόδους: i) με λαπαροτομή διαμέσου της λευκής γραμμής, ii) με λαπαροτομή διαμέσου του κενεώνα, iii) λαπαροσκοπικά και iv) διακολπικά.

#### i) Μεταφορά του εμβρύου μετά από λαπαροτομή διαμέσου της λευκής γραμμής<sup>26,57</sup>

Η επέμβαση εκτελείται με το ζώο σε ύπτια κατάκλιση και υπό γενική αναισθησία. Μετά από λαπαροτομή διαμέσου της λευκής γραμμής, παρακεντάται το τοίχωμα της μήτρας με αμβλεία υποδερμική βελόνα 18 G και στη συνέχεια το έμβρυο μεταφέρεται, προστατευμένο στον αυλό γυάλινης πιπέτας, από το τρυβλίο Petri με το υγρό καλλιέργειας στην κοιλότητα της μήτρας. Στον αυλό της πιπέτας, το έμβρυο είναι τοποθετημένο μεταξύ στηλών αέρα και υγρού καλλιέργειας με σκοπό τη σταθεροποίησή του και την προστασία του από το εξωτερικό περιβάλλον. Μετεγχειρητικά, χορηγούνται αντιβιοτικά για 4 ημέρες.

Με τη μέθοδο αυτή είναι εύκολη η προσπέλαση στη μήτρα και επιτυγχάνεται υψηλό ποσοστό κυοφοριών. Ωστόσο, για την εφαρμογή της απαιτείται γενική αναισθησία και εξειδικευμένο προσωπικό, ενώ συγχρόνως είναι δαπανηρή, χρονοβόρα και όχι πάντοτε ακίνδυνη. Το ποσοστό κυοφοριών από την εφαρμογή της μπορεί να φτάσει και το 85-90%<sup>43</sup>.

ii) *Μεταφορά του εμβρύου μετά από λαπαροτομή διαμέσου του κενεώνα*<sup>37,64</sup>

Η επέμβαση εκτελείται με το ζώο σε όρθια θέση υπό ηρέμηση και τοπική αναισθησία. Εκτελείται λαπαροτομή μήκους 15-20 cm στον αριστερό κενεώνα και εξάγεται η άκρη του ομόπλευρου κέρατος της μήτρας. Ακολουθείται η ίδια διαδικασία με εκείνη που περιγράφηκε στη μεταφορά εμβρύου μετά από λαπαροτομή διαμέσου της λευκής γραμμής. Μετεγχειρητικά, χορηγούνται αντιβιοτικά για 4 ημέρες. Αναφέρεται ποσοστό κνοφοριών μέχρι 65%<sup>64</sup>.

iii) *Λαπαροσκοπική μεταφορά εμβρύου*<sup>70</sup>

Η μέθοδος αυτή αποτελεί παραλλαγή της μεθόδου της μεταφοράς εμβρύου μετά από λαπαροτομή διαμέσου του κενεώνα. Η επέμβαση εκτελείται με το δέκτη σε όρθια θέση υπό ηρέμηση και τοπική αναισθησία. Με τη βοήθεια ενδοσκοπίου, το οποίο εισάγεται στην κοιλιακή κοιλότητα διαμέσου του αριστερού συνήθως κενεώνα, το έμβρυο εισάγεται στην κοιλότητα της μήτρας, μετά από παρακέντησή της. Μετεγχειρητικά χορηγούνται αντιβιοτικά για 4 ημέρες. Έχει αναφερθεί ποσοστό κνοφοριών 43% επί μικρού όμως αριθμού μελετηθέντων ζώων (7 φοράδες).

iv) *Διακολπική μεταφορά εμβρύου*<sup>70</sup>

Η επέμβαση εκτελείται με το δέκτη σε όρθια στάση υπό ηρέμηση. Μετά από παρακέντηση της μήτρας, διαμέσου του κόλπου, το έμβρυο εισάγεται στην κοιλότητά της. Μετεγχειρητικά, καμία μέριμνα δε λαμβάνεται για το ζώο. Έχει αναφερθεί ποσοστό κνοφοριών 37,5% επί μικρού όμως αριθμού μελετηθέντων ζώων (8 φοράδες).

## β) Μη χειρουργική μέθοδος

Η μη χειρουργική μέθοδος μεταφοράς του εμβρύου συνίσταται στην τοποθέτηση του εμβρύου στην κοιλότητα της μήτρας με τη βοήθεια καθετήρα που εισάγεται σε αυτήν διαμέσου του τραχήλου, ενώ το ζώο συγκρατείται σε όρθια θέση.

Αρχικά, το έμβρυο αναρροφάται από το τρυβλίο Petri με το υγρό καλλιέργειας στο εσωτερικό πλαστικού σωληναρίου (straw) μεταξύ στηλών αέρα και υγρού καλλιέργειας. Στη συνέχεια, το πλαστικό σωληνάριο τοποθετείται στο εσωτερικό ειδικού καθετήρα μεταφοράς εμβρύου (Cassou embryo transfer gun) ή κοινού καθετήρα σπερματέγχυσης νωπού σπέρματος βοοειδών<sup>62,69,71</sup>. Αφού κενωθεί το απευθυμένο του δέκτη και γίνει αντισηψία της περινεϊκής χώρας και του έξω γεννητικού οργάνου του, ο καθετήρας εισάγεται στη μήτρα, διαμέσου του τραχήλου, είτε ακάλυπτος (unguarded method)<sup>62</sup> είτε καλυμμένος με αποστειρωμένη νάιλον θήκη (guarded method)<sup>72</sup>. Στη δεύτερη περίπτωση, η νάιλον θήκη ρήγνυται στο ύψος του μέσου του αυχενικού σωλήνα και στη συνέχεια προωθείται ακάλυπτος ο καθετήρας στην κοιλότητα της μήτρας. Εναλλακτικά, ο καθετήρας μεταφοράς εμβρύου, όταν μάλιστα

πρόκειται για καθετήρα σπερματέγχυσης, μπορεί να προφυλαχθεί στο εσωτερικό πλαστικής θήκης στειλεού λήψης εκκρίματος μήτρας (uterine culture instrument)<sup>69</sup>. Με τη χρήση καλυμμένων καθετήρων μεταφοράς εμβρύου, αποφεύγονται οι επιμολύνσεις από μικροοργανισμούς του κόλπου και του τραχήλου, ενώ δεν απαιτείται ιδιαίτερη μέριμνα για το ζώο. Το έμβρυο αποτίθεται στην κοιλότητα είτε του σώματος είτε ενός από τα κέρατα της μήτρας. Τόσο η εισαγωγή όσο και η απομάκρυνση του καθετήρα θα πρέπει να γίνονται με ιδιαίτερη προσοχή για να αποτραπεί ενδεχόμενος ερεθισμός του τραχήλου, που θα είχε ως αποτέλεσμα την έκκριση PGF<sub>2α</sub>.

Η μη χειρουργική μεταφορά εμβρύου, ως πιο πρακτική μέθοδος, προτιμάται από τους κτηνιάτρους που εκτελούν μικρό αριθμό μεταφορών κάθε χρόνο. Τα ποσοστά κνοφοριών από την εφαρμογή της παρουσιάζουν ωστόσο σημαντική διακύμανση, από 50% έως 75%<sup>35,67,73,74</sup>. Για την τεχνική του ακάλυπτου καθετήρα αναφέρονται ποσοστά κνοφοριών από 66% έως 75%<sup>24,75</sup>, ενώ για εκείνη του καλυμμένου καθετήρα από 54% έως 77%<sup>16,64</sup>. Από την άλλη πλευρά, η χειρουργική μεταφορά εμβρύου εφαρμόζεται από μεγάλους σταθμούς μεταφοράς εμβρύων φοράδας και τα ποσοστά κνοφοριών κυμαίνονται σε υψηλά επίπεδα, μεταξύ 65 και 75%<sup>69,74,76</sup>. Ωστόσο, και άλλοι παράγοντες, πέρα από τη μέθοδο μεταφοράς του εμβρύου, επηρεάζουν το ποσοστό κνοφοριών. Οι σημαντικότεροι είναι η ηλικία του δότη, ο αριθμός ωοθυλακιορρηξιών ανά ωοθηκικό κύκλο του δότη, η γονιμότητα του δότη και του δέκτη, ο βαθμός συγχρονισμού των οίστρων τους, η ηλικία, το μέγεθος, η ποιότητα και η μέθοδος συντήρησης του εμβρύου, καθώς και η εποχή που γίνεται η μεταφορά του εμβρύου.

## ΠΡΟΫΠΟΘΕΣΕΙΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΣΤΗΝ ΠΡΑΞΗ ΚΑΙ ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ ΤΗΣ ΣΤΗΝ ΕΛΛΑΔΑ

Για την ουσιαστική ανάπτυξη της μεθόδου μεταφοράς εμβρύου στη φοράδα, στην πράξη, είναι απαραίτητη, πέρα από τη βελτίωση των εφαρμοζόμενων τεχνικών, η παράλληλη πρόοδος και σε άλλους συναφείς τομείς της αναπαραγωγής του ίππου. Ειδικότερα, η βελτίωση των μεθόδων πρόκλησης πολλαπλής ωοθυλακιορρηξίας, διχοτόμησης του εμβρύου, in vitro γονιμοποίησης, αναρρόφησης ωαρίων από τις ωοθήκες, καθώς επίσης και κατάψυξης του εμβρύου μπορεί να συμβάλει προς την κατεύθυνση αυτή.

Σε ό,τι αφορά τον ελλαδικό χώρο, λαμβάνοντας υπόψη τα δεδομένα και τις ανάγκες που έχει προς το παρόν η ιπποτροφία στη χώρα μας, η σημαντικότερη ίσως προοπτική εφαρμογής της μεταφοράς εμβρύου φοράδας είναι εκείνη για τη διατήρηση των γηγενών ελληνικών φυλών ίππων, που απειλούνται με εξαφάνιση.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Allen WR and Rowson LEA. Transfer of ova between horses

- and donkeys. Proc 7th Int Cong Anim Reprod and AI, Munich, 6-9 June 1972, p.484-487
2. Oguri N and Tsutsumi Y. Non-surgical egg transfer in mares. *J Reprod Fertil* 1974, 41: 313-320
  3. Kydd J, Boyle MS, Allen WR. Transfer of exotic equine embryos to domestic horses and donkeys. *Equine Vet J* 1985, Suppl 3: 80-83
  4. Allen WR, Kydd J, Boyle MS, Antczak DF. Between-species transfer of horse and donkey embryos: A valuable research tool. *Equine Vet J* 1985, Suppl 3: 53-62
  5. Allen WR. Immunological aspects of the equine endometrial cup reaction and the effect of xenogeneic extraspecies pregnancy in horses and donkeys. *J Reprod Fertil* 1982a, Suppl 31: 57-94
  6. Allen WR and Pashen. Production of monozygotic (identical) horse twins by embryo micromanipulation. *J Reprod Fertil* 1984, 71: 607-613
  7. Skidmore JA, Boyle MS, Cran D, Allen WR. Micromanipulation of equine embryos to produce monozygotic twins. *Equine Vet J* 1989, Suppl 8: 126-128
  8. Francl AT, Amann RP, Squires EL, Pickett BW. Motility and fertility of equine spermatozoa in a milk extender after 2 or 24 hours at 20°C. *Theriogenology* 1987, 27: 517-526
  9. Amann RP and Pickett BW. An overview of frozen equine semen: Procedures for thawing and insemination of frozen equine spermatozoa. Colorado State Univ Exp Stat Anim Reprod Lab, Special Series Bull 33, 1984
  10. Vogelsang SG and Vogelsang MM. Influence of donor parity and age on the success of commercial equine embryo transfer. *Equine Vet J* 1989: Suppl 8, 71-72
  11. McKinnon AO and Carnevale EM. Ultrasonography. In: McKinnon AO and Voss JL (eds) *Equine Reproduction*. Lea and Febiger, Philadelphia, London, 1993, p.211-220
  12. Brook d. Uterine cytology. In: McKinnon AO and Voss JL (eds) *Equine Reproduction*. Lea and Febiger, Philadelphia, London, 1993, p.246-254
  13. Ricketts SW, Young A, Medici EB. Uterine and clitoral cultures. In: McKinnon AO and Voss JL (eds) *Equine Reproduction*. Lea and Febiger, Philadelphia, London, 1993, p.234-245
  14. Doig PA and Waelchi RO. Endometrial biopsy. In: McKinnon AO and Voss JL (eds) *Equine Reproduction*. Lea and Febiger, Philadelphia, London, 1993, p.225-234
  15. Kenney RM and Doig PA. Equine endometrial biopsy. In: Morrow DA (ed) *Current Therapy in Theriogenology 2*. Philadelphia, WB Saunders, 1986, p.723-729
  16. Wilson JM, Rowley MB, Rowley WK, Smith HA, Webb RL, Tolleson DR. Successful non-surgical transfer of equine embryos to post-partum mares. *Theriogenology* 1987, 27: 295 (Abstr)
  17. Hinrichs K, Sertich PL, Cummings MR, Kenney RM. Pregnancy in ovariectomized mares achieved by embryo transfer: A preliminary study. *Equine Vet J* 1985: Suppl 3, 74-75
  18. Hinrichs K, Sertich PL, Kenney RM. Use of altrenogest to prepare ovariectomized mares as embryo transfer recipients. *Theriogenology* 1986: 26, 455-460
  19. McKinnon AO, Squires EL, Carnevale EM, Hermetet MJ. Ovariectomized, steroid-treated mares as embryo transfer recipients and as a model to study the role of progestins in pregnancy maintenance. *Theriogenology* 1988b, 29: 1055-1063
  20. Tischner M and Klimczak. The development of Polish ponies after embryo transfer to large recipients. *Equine Vet J* 1989, Suppl 8: 62-63
  21. Shideler RK, Harrison LA, McKinnon AO, Squires EL. Influence of size of donor, sire and recipient on embryo transfer foals. Proc 11th Int Cong Anim Reprod and AI 1988, 2: 194a-194c
  22. Squires EL, McKinnon AO, Carnevale EM, Morris R, Nett TM. Reproductive characteristics of spontaneous single and double ovulating mares and superovulated mares. *J Reprod Fertil* 1987, Suppl 35: 399-403
  23. Douglas RH. Some aspects of equine embryo transfer. *J Reprod Fertil* 1982, Suppl 32: 405-408
  24. Sertich PL. Truncervical embryo transfer in performance mares. *JAVMA* 1989: 195, 940-944
  25. Ginther OJ. *Reproductive Biology of the Mare: Basic and Applied Aspects*. McNaughton and Gunn, Inc, Ann Arbor, 1979
  26. Allen WR. Embryo transfer in the horse. In: Adams CE (ed) *Mammalian egg transfer*. CRC Press, Florida, 1982b, p.126-154
  27. Lapin DR and Ginther OJ. Induction of ovulation and multiple ovulations in seasonally anovulatory mares with an equine pituitary extract. *J Anim Sci* 1977, 44: 834-842
  28. Woods GL and Ginther OJ. Induction of multiple ovulations during the ovulatory season in mares. *Theriogenology* 1983, 20: 347-355
  29. Squires EL, Garcia RH, Ginther OJ, Voss JL, Seidel GE Jr. Comparison of equine pituitary extract and follicle stimulating hormone for superovulating mares. *Theriogenology* 1986: 26, 661-669
  30. Dippert KD, Hofferer S, Palmer E, Jasko DJ, Squires EL. Initiation of superovulation in mares 5 or 12 days after ovulation using equine pituitary extract with or without GnRH analogue. *Theriogenology* 1992, 38 : 695-710
  31. Fortune JE and Kimmich TL. Purified pig FSH increases the rate of double ovulation in mares. *Equine Vet J* 1993, Suppl 15: 95-98
  32. McCue P. Induction of multiple ovulations in the mare by active immunization against inhibin. Proc. Society for Theriogenology 1992, p.101-107
  33. McKinnon AO, Brown RW, Pashen RL, Greenwood PE, Vasey JR. Increased ovulation rates in mares after immunisation against inhibin alpha-subunit. *Equine Vet J* 1992, 24: 144-140
  34. Oguri N and Tsutsumi Y. Nonsurgical transfer of equine embryos. *Arch Androl* 1980, 5: 108
  35. Vogelsang SG, Bondioli KR, Massey JM. Commercial application of equine embryo transfer. *Equine Vet J* 1985, Suppl 3: 89-91
  36. McKinnon AO, Squires EL, Voss JL. Factors affecting equine embryo transfer pregnancy rates. Proc Int Cong Anim Reprod and AI, Dublin 1988a, p. 177-179
  37. Douglas RH and Ginther OJ. Effect of prostaglandin F2 $\alpha$  on length of diestrus in mares. *Prostaglandins* 1972, 2: 265-268
  38. Holtan DW, Douglas RH, Ginther OJ. Estrus, ovulation and

- conception following synchronization with progesterone, prostaglandin F2 $\alpha$  and human chorionic gonadotropin in pony mares. *J Anim Sci* 1977, 44: 431-438
39. Hyland JH and Bristol F. Synchronization of oestrus and timed insemination of mares. *J Reprod Fertil* 1979, 27: 251-255
  40. Bristol F. Studies on estrous synchronization in mares. *Proc Soc Theriogenology* 1981: 258-264
  41. Palmer E and Jousset B. Synchronization of oestrus in mares with a prostaglandin analogue and hCG. *J Reprod Fertil* 1975, 23: 269-274
  42. Squires EL, Harrison LA, McKinnon AO, Voss JL. Use of hCG, GnRH agonist or prostaglandin analogue for induction of ovulation in mares. *Proc Int Cong Anim Reprod and AI, Dublin, 1988b*, p.460-462
  43. Allen WR. *Αδημοσίευτες παρατηρήσεις*, 1996
  44. Palmer E. Different techniques for synchronization of ovulation in the mare. *Proc Int Cong Anim Reprod and A I, Krakow, 1976*, p. 495-498
  45. Palmer E. Reproductive management of mares without detection of oestrus. *J Reprod Fertil* 1979, Suppl 27: 263-270
  46. Squires EL, Stevens WB, McGlothlin DE, Pickett BW. Effect of an oral progestin on the estrous cycle and fertility of mares. *J Anim Sci* 1979, 49: 729-735
  47. Loy RG, Permstein R, O'Canina D, Douglas RH. Control of ovulation in cycling mares with ovarian steroids and prostaglandin. *Theriogenology* 1981, 15: 191-197
  48. Taylor TB, Pemstein R, Loy RG. Control of ovulation in mares in the early breeding season with steroids and prostaglandin. *J Reprod Fertil* 1982, Suppl 32: 219-224
  49. Lagneaux D and Palmer E. Embryo transfer in anoestrous recipient mares: attempts to reduce altrenogest administration period by treatment with pituitary extract. *Equine Vet J* 1993; Suppl 15, 107-110
  50. Holtan DW, Squires EL, Lapin DL, Ginther OJ. Effect of ovariectomy on pregnancy in mares. *J Reprod Fertil* 1979, 32: 457-463
  51. Pool KF, Wilson JM, Webb GW, Kraemer DC, Potter GD, Evans JW. Exogenous hormone regimens to utilize successfully mares in dioestrus (Days 2-14 after ovulation) as embryo transfer recipients. *J Reprod Fertil* 1987, Suppl 35: 429-432
  52. Parry-Weeks LC and Holtan DW. Effect of altrenogest on pregnancy maintenance in unsynchronized equine embryo recipients. *J Reprod Fertil* 1987, Suppl 35: 433-438
  53. Palmer E. Induction of ovulation. In: McKinnon AO and Voss JL (eds) *Equine Reproduction*. Lea and Febiger, Philadelphia, London, 1993, p.344-347
  54. Pickett BW, Squires EL, McKinnon AO. Procedures for collection, evaluation and utilisation of stallion semen for artificial insemination. *Anim Reprod Lab Bull No 3*. Colorado State University, Fort Collins, 1987
  55. Oguri N and Tsutsumi Y. Non-surgical recovery of equine eggs, and an attempt at non-surgical egg transfer in horses. *J Reprod Fertil* 1972, 31: 187-195
  56. Betteridge KJ, Eaglesome MD, Mitchell D, Flood PF, Berialt R. Development of horse embryos up to twenty-two days after ovulation: observations on fresh specimens. *J Anat* 1982, 135: 191-209
  57. Squires EL, Cook VM, Voss JL. Collection and transfer of equine embryos. *Anim Reprod Lab Bull No 1*. Fort Collins, Colorado State Univ, 1985
  58. Bowen MJ, Salsbury JM, Bowen JM, Kraemer DC. Non-surgical embryo auto-transfer in the mare. *Equine Vet J* 1985, Suppl 3: 100-102
  59. Douglas RH, Bunnr PJ, Hershman S. Physiological and commercial parameters for producing progeny from subfertile mares by embryo transfer. *Equine Vet J* 1985, Suppl 3: 111-114
  60. Alvarenga MA, Landim FC e Alvarenga and Meira C. Modifications in the technique used to recover equine embryos. *Equine Vet J* 1993, Suppl 15: 111-112
  61. Douglas RH. Review of induction of superovulation and embryo transfer in the horse. *Theriogenology* 1979, 11: 33-45
  62. Imel KJ, Squires EL, Elsden RP, Shideler RK. Collection and transfer of equine embryos. *JAVMA* 1981, 179: 987-991
  63. Fleury JJ, Costa Neto JBF, Alvarenga MA. Results from an embryo transfer programme with Mangalara mares in Brazil. *Equine Vet J* 1989, Suppl 8: 73-74
  64. Squires EL, Imel KJ, Iuliano MF, Shodeler RK. Factors affecting reproductive efficiency in an equine embryo transfer programme. *J Reprod Fertil* 1982, 32: 409-414
  65. Allen WR and Rowson LEA. Surgical and non-surgical egg transfer in horses. *J Reprod Fertil* 1975, Suppl 23: 525-530
  66. McKinnon AO and Squires EL. Morphological assessment of the equine embryo. *J A V M A* 1988b, 192: 401-406
  67. McKinnon AO, Squires EL, Voss JL, Cook VM. Equine embryo transfer - a review. *Comp. Cont.Educ. Pract. Vet* 1988c, 10: 343-355
  68. Slade NP, Takeda EL, Squires EL, Elsden RP, Seidel GE Jr. A new procedure for the cryopreservation of equine embryos. *Theriogenology* 1985, 24: 45-58
  69. McKinnon AO and Squires EL. Equine embryo transfer. *Vet Clin North Am Equine Pract* 1988a, 4: 305-333
  70. Muller Z and Cunat L. Special surgical transfers of horse embryos. *Equine Vet J* 1993, Suppl 15: 113-115
  71. Meira C and Henry M. Evaluation of two non-surgical equine embryo transfer methods. *J Reprod Fertil* 1991, Suppl 44: 712-713
  72. Dowsett KF, Woodward RA, Bodero DAV. A study of nonsurgical transfer in the mare. *Theriogenology* 1989, 31: 631-642
  73. Riera FL, McDonough J. Commercial embryo transfer in polo ponies in Argentina. *Equine Vet J* 1993, Suppl 15: 116-119
  74. Squires EL, Seidel GE Jr. Collection and transfer of equine embryos. *Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory Bulletin No.11*. Fort Collins CO: Colorado State University, 1995, p.7-32
  75. Hinrichs K and Kenney RM. Effect of timing of progesterone administration on pregnancy rate after embryo transfer in ovariectomized mares. *J Reprod Fertil* 1987, Suppl 35: 439-443
  76. Iuliano MF, Squires EL, Cook VM. Effect of age of equine embryos and method of transfer on pregnancy rate. *J Anim Sci* 1985, 60: 258-263