



Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

**Fakulteten för veterinärmedicin
och husdjursvetenskap**
Institutionen för anatomi, fysiologi och biokemi

Embryotransfer på häst

Möjligheter och problematik

Mirielle Melani Johansson

*Uppsala
2017*

Veterinärprogrammet, examensarbete för kandidatexamen

Delnummer i serien: 2017:59

Embryotransfer på häst – Möjligheter och problematik

Embryo transfer in the horse – Possibilities and problems

Mirielle Melani Johansson

Handledare: Elisabeth Persson, SLU, Institutionen för anatomi, fysiologi och biokemi

Examinator: Eva Tydén, SLU, Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

Omfattning: 15 hp

Nivå och fördjupning: grund nivå, G2E

Kurstitel: Självständigt arbete i veterinärmedicin

Kurskod: EX0700

Program: Veterinärprogrammet

Utgivningsort: Uppsala

Utgivningsår: 2017

Serienamn: Veterinärprogrammet, examensarbete för kandidatexamen

Delnummer i serie: 2017:59

Elektronisk publicering: <http://stud.epsilon.slu.se>

Nyckelord: Embryotransfer, reproduktionsbiologisk teknik, häst, ekvin, hälsorisker, etik

Key words: Embryo transfer, assisted reproductive technology, horse, equine, health risks, ethics

Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för anatomi, fysiologi och biokemi

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

Sammanfattning	1
Summary	2
Inledning.....	3
Material och metoder	3
Litteraturoversikt.....	4
Stoets reproduktion.....	4
Reproduktionsorganens anatomi.....	4
Brunstcykeln	6
Tidig embryonalutveckling	6
Bakgrund till embryotransfer på häst	6
Historik	6
Användningsområden	7
Lagar och regler i Sverige.....	7
Genomförande och metoder för embryotransfer	8
Brunstsynkronisering och befruktning.....	8
Urspolning och embryoåterfinning	9
Icke-kirurgisk metod	9
Kirurgisk metod	9
Faktorer och begränsningar för framgångsrik embryotransfer.....	9
Överföringsmetod	9
Superovulation	10
Embryokvalité.....	10
Donator- och mottagarkvalité	11
Spermiiekvalité	12
Hälsorisker i samband med embryotransfer	12
Diskussion	13
Litteraturförteckning	16

SAMMANFATTNING

Denna litteraturstudie syftar till att beskriva bakgrund och metodik för embryotransfer (ET) på häst samt att redogöra för faktorer som är nödvändiga för ett lyckat resultat. Dessutom belyses problematik av olika slag, både gällande begränsningar för framgångsrik utveckling av metoden och brister i befintliga studier. Etiska aspekter och eventuella hälsorisker för både ston och avkomma är ytterligare några perspektiv som kommer behandlas.

ET är en reproduktionsbiologisk teknik som har använts på häst i över 40 år. Tekniken innebär att embryon samlas från ett donatorsto i ett tidigt stadium för att sedan överförs till ett mottagarsto som får genomgå resterande del av dräktigheten samt förlossning. Detta koncept används för att gener ska kunna föras vidare från ston som av olika anledningar inte kan bli mödrar själva. Det kan exempelvis tillämpas på äldre, subfertila ston, vilket från början var syftet när metoden etablerades. I dagsläget är det dock mest populärt att använda det för att avla på ston som samtidigt ska kunna fortsätta tävla eller för att ett sto ska kunna få flera avkommor under ett år. En viktig fördel med ET är att embryon många gånger kan importeras/exporteras istället för levande djur, vilket jämförelsevis utgör färre hälsorisker. Det finns därmed många bra användningsområden för ET men samtidigt förekommer skepticism och det är inte alla rasförningar som tillåter tekniken utan restriktioner.

För att genomföra ET krävs flera veterinära åtgärder, exempelvis brunstsynchronisering, urspolning av livmodern för insamling av embryon och själva överföringen till mottagarstoet, vilken utförs med antingen en kirurgisk eller icke-kirurgisk metod. I Sverige är det endast tillåtet med icke-kirurgisk överföring och det är även i lagstiftningen reglerat vilka typer av hormoner som får användas för att synkronisera brunsten mellan donator- och mottagarsto.

Många faktorer behöver vara optimala för framgångsrik ET. Kvalitén på ingående ston, spermier och embryon är några exempel som påverkar resultatet. Det finns även flera begränsningar och en av de viktigaste är att det är svårt att inducera superovulation på ston. Detta innebär att varje donatorsto oftast avger ett eller två embryon per ägglossning vilket därmed inte lämnar stort utrymme för misstag.

Det finns många aktuella forskningsområden för att ytterligare kunna utveckla användningen av ET, vilket tycks pågå för fullt. Dock finns vissa brister i den forskning som hittills gjorts, framför allt gällande hälsoeffekter för ston och avkomma. Hur hästarna påverkas långsiktigt av denna teknik jämfört med om traditionell avel hade använts är både intressant och viktigt att ta reda på och därför efterlyses mer sådan forskning.

SUMMARY

The aims of this literature study are to describe background and methods for embryo transfer (ET) in horses and to portray important factors for a successful result. In addition, the study will also illustrate possible deficits and problems in the studies available and for success of the method, but also in a perspective of ethics and potential health risks for both mares and offspring.

ET is an assisted reproductive technology which has been used in horses for over 40 years. It involves early collection of embryos from donor mares followed by transfer to recipient mares that carries it for the rest of the pregnancy and through parturition. This concept is used to receive offspring from mares that for some reason cannot be mothers themselves. It can, for example, be used in old, subfertile mares, which was the initial purpose of the technique. However, the main use today is to allow breeding of mares that can continue competing or to get several offspring from the same mare in one year. One important benefit with ET is that embryos can be imported/exported instead of living animals, which comparatively involves fewer health risks. Thereby ET is very useful, but some skepticism is expressed and not all breed registries are willing to allow the technique without restrictions.

To perform ET, many veterinary procedures are required, for example oestrus synchronization, flushing of the uterus to collect embryos and the transfer to a recipient mare, which can be done with two different methods: surgical or non-surgical. In Sweden, only the non-surgical transfer is allowed and there are also regulations of which kind of hormones that can be used to achieve oestrus synchronization between donor and recipient mare.

To acquire a successful result from ET, there are many factors that have to be optimal. The quality of the mares, spermatozoa and embryos are some examples that affects the outcome. There are also several limitations and one of the biggest is that it is very hard to induce super-ovulation in horses. This implies that only one or two embryos can be collected from each donor per ovulation, which does not leave much room for mistakes.

There are many current areas of research to further develop ET, which appears to be under way. However, there seems to be some deficits in available research, in particular concerning potential health risks for both mares and offspring. How the horses are affected by ET in a long-term perspective compared to traditional breeding is both interesting and important, why that kind of research is wished for.

INLEDNING

Det finns många olika reproduktionsbiologiska tekniker, det vill säga metoder för assisterad befruktning, för både djur och människa (Squires *et al.*, 1999). Några exempel på detta är artificiell insemination (AI), *in vitro* fertilisering (IVF) eller "provörorsbefruktning", intracytoplasmatisk spermie-injektion (ICSI) och embryotransfer (ET). Denna litteraturstudie kommer att beskriva det sistnämnda med fokus på djurslaget häst.

ET per definition innebär egentligen endast själva överföringen av embryon, men begreppet används ofta för att inkludera samtliga procedurer som utförs (exempelvis embryoproduktion, urspolning och överföring) och det är även så det kommer att användas i denna uppsats. Vid ET överförs embryon från ett hondjur till ett annat som får agera surrogatmoder. Embryon som används kan antingen vara *in vivo*- eller *in vitro*-producerade men denna litteraturstudie begränsas till *in vivo*-producerade embryon.

ET började användas på häst på 70-talet (Oguri & Tsutsumi, 1974) och har sedan dess haft en snabb utveckling i vissa avseenden och långsam i andra, vid jämförelse med andra djurslag, sammanfattar Kraemer (2013). Det finns flera betydelsefulla fördelar med användning av ET där den främsta och mest eftersträvade är möjligheten att kunna föra högpresterande stons gener vidare utan att tvingas avbryta deras tävlingskarriär (Squires, 2016). En annan viktig fördel med ET är att embryon många gånger kan importeras/exporteras istället för levande djur, vilket jämförelsevis utgör färre hälsorisker. Trots flera fördelar förekommer dock även visst motstånd. Exempelvis beskrivs det i en svensk artikel om ET att det finns skeptiker som anser att det inte är etiskt försvarbart att reformera det naturliga och de påstår även att steget från ET till kloning och genmanipulation är ytterst litet (Gyllensten, 2009).

Denna litteraturstudie syftar till att beskriva bakgrund och metodik för ET på häst samt att redogöra för faktorer som är nödvändiga för ett lyckat resultat. Dessutom belyses problematik av olika slag, både gällande begränsningar för framgångsrik utveckling av metoden och brister i befintliga studier. Etiska aspekter och eventuella hälsorisker för både ston och avkomma är ytterligare några perspektiv som kommer behandlas.

MATERIAL OCH METODER

Denna litteraturstudie har främst baserats på vetenskapliga artiklar som sökts fram via databaserna Web of Science, Google Scholar, PubMed, Primo och Scopus. Följande sökord användes huvudsakligen i olika kombinationer vid litteratursökningen:

- "Embryo transfer"
- Equine OR horse* OR mare* OR filly OR fillies
- "Health risk" OR "health issues" OR unhealthy OR hazard* OR complication*
- Superovulation OR "multiple ovulation"

Även relevanta referenser från artiklarna som först hittades har använts. Utöver vetenskapliga artiklar har även lagtexter och reglementen studerats. Lagtexterna kommer från Jordbruksverkets hemsida och reglementena hittades på olika rasföreningars hemsidor.

Texten under rubriken ”Stoets reproduktion” har till största del skrivits med hjälp följande böcker:

- Equine Breeding Management and Artificial Insemination (Bergfelt, 2000)
- Veterinary Anatomy of Domestic Mammals (König & Liebich, 2014)
- Domestic Animal Embryology (Hyttel *et al.*, 2010)
- Reproductive Biology of the Mare (Ginther, 1992)

Även ”Compendium on equine reproduction” (Dalin & Malmgren, 2010) och mastersavhandlingen ”Development and permeability of equine blastocysts” (Scott, 2008) användes till detta avsnitt.

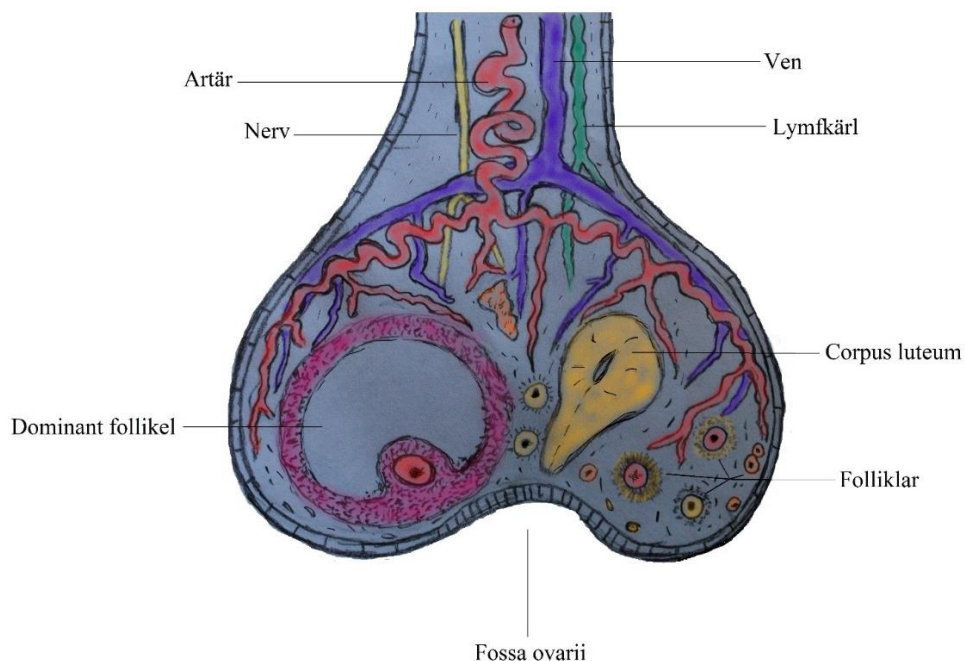
LITTERATURÖVERSIKT

Stoets reproduktion

Reproduktionsorganens anatomi

Ovariet

Hästens två ovarier (äggstockar) är cirka 8–12 centimeter stora, betydligt större än hos många andra domesticerade djurslag. Förutom storleksmässigt utmärker sig ovariet hos häst även på andra sätt. Bland annat är de njurformade och har en regelbunden yta, medan övriga domesticerade arter istället har ovarier med ellipsoid form och en yta täckt av utbuktande folliklar (äggblåsor) och corpora lutea (guldkroppar). Förklaringen är att hästens ovarium är inverterat, där folliklar och corpora lutea utgör ett centralt beläget parenkym, vilket omges av en rikligt vasculariserad bindväv som motsvarar medulla hos andra djurslag (se Figur 1). Denna inverterade form uppstår först runt puberteten, innan dess är strukturen på ovariet mer likt andra djurslags. På ovariets ventrala sida finns en inbuktning som kallas för fossa ovarii (ovulationsgropen) och det är där ovulationen (ägglossningen) sker.



Figur 1. Schematisk bild av stoets ovarium (modifierad efter König & Liebich, 2014).

Tuba uterina

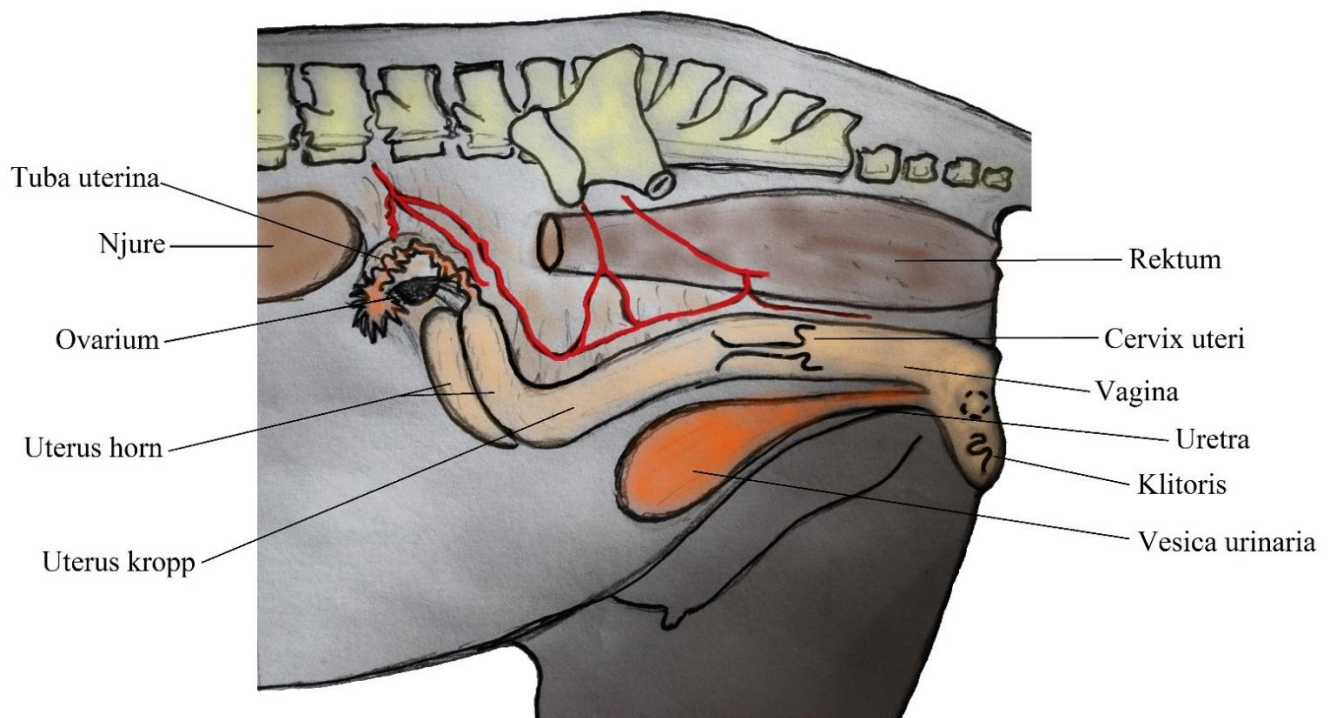
Tuba uterina (äggledaren) fångar vid ovulation upp oocyter (äggceller) från fossa ovarii och utgör en transportväg till uterus (livmodern), förutsatt befruktning av oocyten, vilken oftast sker i tuba uterinas ampulla. Betäckning/inseminering måste ske inom ungefär 12 timmar efter ovulation då det visat sig att chansen för dräktighet därefter minskar. En unik egenskap hos häst är att obefruktade oocyter aldrig tar sig till uterus, utan behålls i tuba uterinas isthmus för att långsamt brytas ned. Det tar ungefär sex dagar för oocyten att transporteras från ovariet, via befruktning i tuba uterina, till uterus (Oguri & Tsutsumi, 1974; Squires, 2016).

Uterus och cervix uteri

Stoets uterus är belägen delvis i pelviskaviteten och delvis i den abdominala kaviteten (se Figur 2). Den är relativt säckig och består av en stor kropp från vilken två åtskilda horn utgår kranialt. Kroppen är något kortare i förhållande till hornen och mynnar kaudalt i cervix uteri (livmoderhalsen), vilken utgör en barriär till uterus. Cervix är relativt kort och kan enkelt palperas transrektalt. Genom cervix går en kanal, canalis cervicis, vilken består av mucosala veck som bildar ett longitudinellt mönster. Cervix uteri har kaudalt mot vagina portio vaginae (livmodertappen) som omges av ett ringformigt, vallgravsliknande utrymme - fornix vaginae (slidvalvet). Cervix är normalt tätt slutet men kan vidgas vid betäckning och förlossning.

Vagina

Vagina (slidan) är hos häst relativt lång och uppbyggd av en tunn vägg som är mycket töjbar. Den är till största del retroperitonealt belägen (i bäckenhålan) men är längst kranialt beklädd av bukhinna, liksom hela cervix.



Figur 2. Schematisk bild av stoets reproduktionsorgan (modifierad efter König & Liebich, 2014).

Brunstcykeln

Brunstcykeln hos häst varar i ungefär 21–22 dagar och induceras av ökad dagslängd, vilket innebär att aktiviteten har en geografisk variation. I Sverige pågår den från vår till höst, medan vinterhalvåret generellt sett är anovulatoriskt (utan ägglossning). Under brunstcykeln utvecklas ovariets folliklar (follikulogenes) som under brunsten ovulerar varefter corpus luteum bildas och, om dräktighet uteblir, sedan bryts ned (luteolys).

Det är vanligast med två perioder av follikulogenes under en brunstcykel och det är den första perioden som leder till ovulation omkring 12 dagar senare. Ungefär 6–7 dagar innan ovulation blir en follikel dominant och ovulerar så småningom, medan övriga folliklar degenererar. Under den andra follikulogenesen är det vanligast att samtliga folliklar degenererar men ibland sker ytterligare en ovulation under diöstrus eller tidig dräktighet, vilket är unikt för häst.

Brunsten utgör 5–7 dagar av brunstcykeln och startar då mogna folliklar börjar utsöndra ökande mängder östrogen, vilket får stoet att bli sexuellt mottagligt.

Ovulationen sker oftast ett till två dygn innan brunstens slut och follikelns stigma (där den spricker) riktas alltid mot fossa ovarii. Efter ovulation omvandlas den kollapsade follikeln till en corpus luteum, vilket tar cirka tre dagar. Corpus luteum är aktiv i ungefär två veckor vid utebliven dräktighet, för att sedan brytas ned i luteolysen.

Tidig embryonalutveckling

Vid befruktning i ampulla bildas en zygot som under följande tre dygn, på sin väg mot uterus, delar sig och når en storlek av cirka 10 celler. Följande dagar fortsätter embryots delningar och utveckling till en morula. Vid ungefär dag sex efter ovulation uppkommer en vätskefylld kavitet i morulan – blastocoel – vilken då blir en tidig blastocyst. Det är blastocysten som når uterus och väl där bildar den ett acellulärt glykoprotein-hölje mellan trofoblasten och zona pellucida. Därefter expanderar blastocysten och kläcks ur zona pellucida. Vid detta stadium har det gått ungefär sju dagar från ovulation och embryot består av flera tusen celler. Höljet som bildas runt blastocysten kallas kapsel, vilken omger och skyddar embryot till omkring dag 21 efter ovulation. Denna kapsel bildas endast hos häst och ett fåtal andra djurslag.

Så snart embryot anländer till uterus börjar det röra sig runt i hela organet, vilket är en viktig process för “maternal recognition of pregnancy”, det vill säga att modern upptäcker embryots existens. Det måste ske innan dag 14 efter ovulation för att luteolys ska förhindras. Embryot är vid denna tidpunkt sfäriskt och vätskefyllt. Runt dag 15–17 efter ovulation fixeras embryot som då slutar röra sig och runt dag 40 efter ovulation påbörjas placentabildning. Totalt är hästens dräktighetsperiod ungefär 335–342 dagar lång (cirka 11 månader).

Bakgrund till embryotransfer på häst

Historik

ET etablerades på häst på 1970-talet, ungefär 20 år efter att det började användas på nötkreatur och så länge som 80 år efter den allra första överföringen på däggdjur, vilket utfördes på kanin (Texas A&M University, 2009; Kraemer, 2013). Den första studien om en lyckad ET på häst

publicerades år 1974 av de japanska forskarna Oguri och Tsutsumi. Deras försök resulterade i fyra föl, framavlade med en icke-kirurgisk metod som utvecklats år 1965 för ET på nötkreatur. Studien baserades på 20 hästar av olika raser från vilka det återfanns 18 blastocyster. Av dessa 18 blev sex mottagarston dräktiga och slutligen föddes som nämnt fyra avkommor. Det dröjde drygt 10 år från att ET påvisats möjligt på häst innan det började användas kommersiellt, enligt sammanfattning av Kraemer (2013).

Hästar hade dock redan två år innan Oguris och Tsutsumis studie använts till ET då de korsats med åsnor för att avla fram hybrider (Allen & Rowson, 1972), enligt beskrivning av Kraemer (2013). Då användes istället en kirurgisk metod (flanksnitt) för överföring mellan häst och åsna.

Användningsområden

År 2015 utfördes det, globalt sett, cirka 21 000 ET:s på häst varav 16 stycken gjordes i Sverige (Perry, 2015). Användningen har ökat progressivt från att ET började användas kommersiellt på 1980-talet (Squires, 2016). Efterfrågan skiljer sig över världen och i vissa länder är det snarare regel än undantag att använda denna avelsmetod. USA, Argentina, Australien och Brasilien är de länder som använder det mest frekvent. I USA används det framför allt till rasen American Quarter Horse, i Argentina främst till polohästar och i Brasilien till alla typer av sporthästar (Squires, 2016). Även rasmässigt skiljer sig efterfrågan och för vissa raser är det inte tillåtet alls, till exempel inom fullblodsaveln (Gyllensten, 2009). Dock har det på senare år blivit allt mer accepterat av de flesta rasföreningar, vilka ofta tillåter registrering av obegränsat antal avkommor framavlade genom ET, summerar Squires och McCue (2016). Även kompromisser förekommer, exempelvis hos de svenska travhästarna som kan få dispens för användning i vissa specifika situationer (Svensk Travsport, 2017a).

Det initiala användningsområdet för ET var att möjliggöra dräktighet på subfertila, ofta äldre ston (Squires, 2016). Idag används det dock främst till framgångsrika eller lovande ston för att kunna föra deras gener vidare samtidigt som de fortsatt kan tävla (Squires *et al.*, 1999; Squires, 2016). En trolig anledning är att ET är relativt kostsamt och det blir därmed mest lönsamt att använda "genetiskt överlägsna" ston som kan lämna värdefulla avkommor.

ET ger även möjligheten att avla fram fler avkommor från ett sto per år, dock är det som nämnt inte alla rasföreningar som tillåter registrering av flera avkommor från samma sto under ett år (Squires, 2016). Fler användningsområden för ET är exempelvis för ston som på grund av icke-reproduktionsmässiga förändringar gör det ogenomförbart för dem att genomgå en fullständig dräktighet (Coutinho da Silva, 2008).

Lagar och regler i Sverige

Lagstiftning

ET får i Sverige endast utföras med icke-kirurgisk metod (SJVFS 2010:12).

Läkemedel med östrogen eller gestagen effekt är tillåtet att tillföras av veterinär vid brunstsynchronisering och vid förberedande av donatorer och mottagare vid ET. Östradiol 17- β och dess esterliknande derivat får dock inte tillföras och inte heller läkemedel som har en depåeffekt eller karenstid som överstiger 15 dygn (SJVFS 2013:42).

Rasbestämmelser

Svenska varmblodiga hästar (SWB) som avlats fram med ET får registreras i stamboken utan restriktioner, enligt sakkunnig¹ på Swedish Warmblood Association.

Svenska varmblodiga travhästar som avlats fram med ET får endast registreras i stambokens huvudsektion under förutsättningen att det skett enligt de särskilda bestämmelser för dispens som fastställts av Svensk Travsport (2017a). De särskilda bestämmelserna säger exempelvis att donatorstoet måste vara i livet vid överföringen och att hon inte får tävla under tiden mottagarstoet är dräktigt. Endast ett föl per sto och år får registreras och om flera föl fötts under samma år i annat land är det endast det förstfödda som tillåts tävla i Sverige. Överföring måste ske transcervikalt och användning av frysta embryon är inte tillåtet (Svensk Travsport, 2017b).

Hästar som avlats fram med ET får inte registreras som galopphästar (Svensk Galopp, 2016).

Genomförande och metoder för embryotransfer

Det finns olika metoder för ET: kirurgiska och icke-kirurgiska, vilka syftar på vilket sätt embryot överförs till mottagarstoet (Squires *et al.*, 1999). Innan detta kan utföras måste dock flera andra steg ha genomförts, vilka beskrivs nedan.

Brunstsynchronisering och befruktning

Oavsett överföringsmetod krävs brunstsynchronisering mellan donator- och mottagarsto för att de ska vara i ungefär samma fas vid överföringen (Gyllensten, 2009). I Sverige är det som nämnts tillåtet att tillföra vissa hormoner för att åstadkomma brunstsynchronisering (SJVFS 2013:42) och hormoner som brukar användas är exempelvis GnRH-analoger, prostaglandin F_{2α}, humant koriongonadotropin och progestagener (Tormalm, 2007). När stona väl brunstar ska donatorn befruktas, vilket antingen görs genom naturlig betäckning eller inseminering av färsk, kyld eller fryst sperma (Gyllensten, 2009).

Ofta förbereds flera mottagarston till ett och samma donatorsto eftersom det kan vara svårt att få en exakt synchronisering mellan individerna (Raz *et al.*, 2011; Squires, 2016). Det blir mer kostsamt, men fler valmöjligheter av mottagare ger samtidigt en större chans till lyckad ET. Jämfört med nötkreatur krävs inte lika exakt synchronisering på häst (Squires *et al.*, 1999; Raz *et al.*, 2011). En asynkroni där mottagarstoet ovulerar en dag före och upp till tre dagar efter donatorn har visats fungera ungefär lika bra.

Med hjälp av ultraljudsundersökning kan tidpunkt för ovulationen upptäckas (Squires, 2016). Det är viktigt att veta för beräkning av när embryot når fram till uterus (cirka sex dagar efter ovulation), där det kan samlas in för överföring.

¹ Emma Thorén Hellsten, avelsledare på SWB:s avelsförening. Via mailkontakt 2017-03-02

Urspolning och embryoåterfinning

En tid efter befruktningen görs en eller flera urspolningar av uterus, vilket innebär att en vätska som är specifikt framställd för ändamålet sprutas in i uterus och återsamlas sedan med förhoppning om att få med embryon (Gyllensten, 2009). Vätskan genomsöks, efter att ha filtrerats, med hjälp av mikroskop för att återfinna och samla in embryon som kan överföras till mottagarstoet.

Vilken dag som urspolningen utförs varierar mellan 6–10 dagar efter ovulation (Squires *et al.*, 1999). Vanligast är dock att det utförs vid dag 7–8 om embryot ska överföras färskt eller kylas, eftersom det visats ge bäst återfinnings-resultat. Vid frysning av embryon utförs det däremot redan vid dag sex efter ovulation, eftersom äldre embryon har sämre överlevnad vid frysning (Squires *et al.*, 1999; Squires, 2016).

Icke-kirurgisk metod

Den icke-kirurgiska metoden innebär antingen en transcervikal (som vid insemination) eller en transvaginal (via punktion) överföring av embryot till mottagarstoet (Squires *et al.*, 1999; Texas A&M University, 2009). I Sverige är det, enligt ovan, endast tillåtet med icke-kirurgisk överföring av embryon (SJVFS 2010:12).

Vid transcervikal överföring placeras embryot i en inseminations-pipett eller ett strå som kopplas till en injektionsspruta, vilken innehåller luft (Texas A&M University, 2009). Detta laddas i en ET-pistolett som manuellt leds genom vagina och cervix in i uterus, där luften i sprutan används för att trycka ut embryot i uterus kropp. Vid transvaginal överföring kommer istället ET-pistoletten att punktera först vagina, i fornix, och sedan uterus vägg för att placera embryot i uterus horn eller kropp (Carnevale *et al.*, 2000; Kraemer, 2013). Utrustning och könsorgan manövreras vid båda alternativen genom rektumväggen för att embryot med säkerhet ska hamna rätt utan att kroppsvävnad skadas (Texas A&M University, 2009; Kraemer, 2013).

Kirurgisk metod

Vid den kirurgiska metoden görs ett flanksnitt och punktion av uterus vägg för placering av embryot direkt i ena uterushornet (Squires *et al.*, 1999; Carnevale *et al.*, 2000).

Faktorer och begränsningar för framgångsrik embryotransfer

Resultatet som erhålls vid ET varierar på grund av flera olika faktorer, av vilka vissa utvalda beskrivs nedan.

Överföringsmetod

Vid lyckad överföring har äldre studier visat att icke-kirurgiska metoder ger en relativt hög men något varierande dräktighetsprocent på 50–75% (Squires *et al.*, 1999). Den kirurgiska metoden ger en mer konstant dräktighetsprocent på 65–75%. Det är dock mer populärt med icke-kirurgisk överföring jämfört med kirurgisk (Morel, 2008), då den är mer användarvänlig för veterinärer som inte utför ET speciellt ofta (Squires *et al.*, 1999). Däremot är det enklare att hålla en god sterilitet vid kirurgisk överföring (Morel, 2008) och det finns således både för- och nackdelar med båda metoderna.

Superovulation

En av de största begränsningarna för ekvin ET är att det i dagsläget inte finns någon tillgänglig kommersiell teknik/behandling för att framkalla superovulation på häst, sammanfattar Squires och McCue (2016). Superovulation innebär att multipla folliklar ovulerar vid samma tillfälle hos en individ vilket för ET skulle möjliggöra potentiell återfinning av fler än ett embryo per urspolning (Squires & McCue, 2007; Squires, 2016). I nuläget baseras varje tillfälle för embryoinsamling på att återfinna oftast ett eller ibland två embryon (Raz *et al.*, 2011; Panzani *et al.*, 2014). Chansen för att återfinna ett embryo hos ett singel-ovulerande sto är 50–70%, summerar Squires och McCue (2016), en siffra som skulle öka avsevärt om superovulation möjliggjordes, anser Squires och McCue (2007). Detta skulle öka dräktighetsprocent och minska kostnader vid ET, enligt Squires *et al.* (1999).

Flera olika behandlingsmetoder har testats för att inducera superovulation (Raz *et al.*, 2011). Den som verkar mest lovande är administrering av ekvint follikelstimulerande hormon (eFSH), det vill säga ekvint hypofys-extrakt (EPE) renat från luteiniserande hormon (LH). Vid behandling har antalet ovulationer ökat hos donatorston och fler embryon har kunnat återfinnas. Dock finns endast begränsat med studier ännu och det krävs mer underlag innan denna metod kan börja användas kommersiellt.

På grund av avsaknaden av metod för att inducera superovulation är ston med spontan multipel ovulation mycket eftertraktade som donatorer vid ET (Panzani *et al.*, 2014). Det har visat sig att vissa raser har större benägenhet till spontan superovulation än andra, till exempel är det betydligt vanligare hos varmblodiga hästar jämfört med ponnyer (Squires *et al.*, 1999).

Embryokvalité

Färska och kylda embryon

Vid ET är det vanligast att färska embryon överförs direkt (inom några timmar) eller att de transporteras kylda för att sedan överföras till ett mottagarsto (Squires, 2016). Kylda embryon överförs normalt mellan 12 och 30 timmar efter insamling från donatorn (Squires *et al.*, 2003).

Att kyla ekvina embryon har varit möjligt sedan sent 1980-tal och beskrevs först av Carnevale *et al.* (1987). Kylning får utvecklingen hos embryot att gå långsammare, vilket möjliggör transport av embryot innan det måste överföras till mottagarstoet (Carnevale *et al.*, 2000). Embryot kyls till cirka 5° Celsius i ett odlingsmedium och kan sedan transporteras i en passiv kyl-anordning, vanligen en Equitainer (Squires *et al.*, 2003).

Inga skillnader i dräktighetsprocent har påvisats mellan färska, direktöverförda, och kylda, transporterade embryon (Carnevale *et al.*, 2000; Squires *et al.*, 2003).

Kryopreservation av embryon

Enligt siffror från 2016 är det i dagsläget endast 2–5 % av alla embryon som återfinns vid ET som kryopreserveras, det vill säga fryses (Squires, 2016). Detta är en väldigt låg procent jämfört med ET på nötkreatur, där frysning används till 60 %. En anledning till att frysning inte används lika frekvent på häst är att det är svårt att åstadkomma superovulation hos dem, vilket är praxis på nötkreatur (Squires & McCue, 2007; Squires, 2016). Med fler tillgängliga embryon skulle

intresset för frysning av embryon kunna öka. Dock erhålls något lägre dräktighetsprocent med frysta embryon jämfört med färska och kylda, vilket även det är en stor anledning till låg efterfrågan (Squires, 2016).

En annan faktor som är problematisk med frysning av embryon är att den måste utträttas innan embryot blivit maximalt 300 mikrometer i diameter för att åstadkomma en acceptabel dräktighetsprocent (Squires, 2016; Squires & McCue, 2016). Embryon som är större än så har visat sig ha en dålig överlevnad och forskarna har flera teorier kring vad som kan orsaka detta. Det de kommit fram till är att embryon vid denna storlek ersätter zona pellucida mot den acellulära kapseln, som är mindre genomtränglig och att de har en större volym blastocoel-vätska. Dessa egenskaper försvårar inträngning av frysskyddsmedel i embryot, vilket därför ofta dör av frysskador vid kryopreservering. Därför samlas embryon för frysning redan vid dag sex istället för dag 7–8, som vid användning av färska och kylda embryon. För att kunna beräkna när embryon måste samlas in, innan de blir för stora, krävs ultraljudsundersökningar flera gånger dagligen under en period för att upptäcka exakt tidpunkt för ovulation, vilket är både kostsamt och tidskrävande.

För att öka flexibiliteten vid frysning har manipulation av embryon som är >300 mikrometer börjat utföras (Squires, 2016; Squires & McCue, 2016). Detta för att de ska få liknande egenskaper som mindre/yngre embryon och därmed kunna överleva kryopreservering. Den metod som verkar mest lovande är att tömma embryot på blastocoel-vätska och ersätta den med frysskyddsmedel, vilket har gett i princip samma dräktighetsprocent som med mindre embryon. Dock har detta endast kunnat genomföras med dyr och komplicerad utrustning och används därmed inte kommersiellt ännu.

Trots flera nackdelar har frysning av embryon även många fördelar (Squires, 2016; Squires & McCue, 2016). Till exempel kan det eventuellt reducera kostnaderna eftersom det inte skulle krävas flera mottagarston för en donator, då överföringen till mottagaren kan vänta tills hon är i rätt fas av brunstcykeln. Andra fördelar är att import och export av embryon underlättas och utgör färre hälsorisker jämfört med att frakta levande djur. Det möjliggör även lagring av embryon under en längre tid innan de överförs, exempelvis om en ung donator ska utvärderas prestationsmässigt innan beslutet om hon ska användas till avel tas.

Donator- och mottagarkvalité

Egenskaper både hos donator- och mottagarston har visat sig ha betydelse för hur hög dräktighetsprocent som erhålls vid ET (Carnevale *et al.*, 2000), det vill säga huruvida embryot överlever eller ej efter överföringen till mottagarstoet.

Bättre resultat har setts vid användning av yngre ston, både som donator och mottagare (Carnevale *et al.*, 2000; Panzani *et al.*, 2014). Ofta är dock syftet för användningen av ET just äldre, subfertila ston, vilket därmed kan ge ett sämre resultat (Squires *et al.*, 1999; Squires, 2016). En anledning till högre dräktighetsprocent hos yngre ston är att äldre ston oftare har patologiska uterina förändringar, vilket även är den vanligaste anledningen till nedsatt fertilitet hos ston (Carnevale, 2008). Detta beror på att uterus är mer mottaglig för inflammation och degenerativa förändringar hos äldre individer. Det har även påvisats att fertiliteten generellt försämras med

stigande ålder (Carnevale *et al.*, 2000). Dessutom utvecklas embryon hos äldre ston långsammare och transporten från ovariet till uterus är fördröjd (Squires *et al.*, 1999), vilket associeras till en högre risk för embryodöd och således en lägre dräktighetsprocent (Panzani *et al.*, 2014).

I en intervju med de ET-erfarna svenska veterinärerna Ann och Anders Gånheim förklarar de att donatorstoet bör vara i god kondition för att ett lyckat resultat ska erhållas (Gyllensten, 2009). Dock är det kontroversiellt huruvida aktivitet på hög nivå, vilket förekommer i många hästsporter, påverkar dräktighetsprocenten eller ej, enligt Panzani *et al.* (2014).

Squires *et al.* (1999) påpekar att många faktorer bör beaktas vid val av ston till ET, till exempel dess reproduktionshistoria och fertilitet. Fölets potentiella värde är dessutom något som väger tungt eftersom ET är relativt kostsamt att genomföra. Det är även viktigt att kontrollera rasförningars bestämmelser innan beslutet att använda ET tas. Samma studie beskriver kriterier för det "optimala mottagarstoet" enligt följande:

- Ålder: 3–10 år
- Vikt: 400–500 kg
- Temperament: Vänligt
- God juverutveckling
- Normal brunstcykel
- Utan ovariella eller uterina abnormaliteter

Det framhålls även att hanteringen av mottagarstoet är en essentiell faktor för ett bra resultat.

Spermiekvalité

En god spermiekvalité har visats vara viktig för lyckat resultat vid ET (Squires *et al.*, 1999; Panzani *et al.*, 2014). Vid jämförelse av färsk, kyld och fryst sperma påvisar flera studier att färsk sperma varit det bästa alternativet för möjligheten att återfinna embryon hos donatorstoet.

Hälsorisker i samband med embryotransfer

Det finns väldigt få studier publicerade som nämner något om hälsorisker i samband med ET. Dock har en studie av Carnevale *et al.* (2005) påvisat att det för donatorstoet kan innebära en risk vid upprepade inseminationer och embryoinsamlingar. Studien baserades på ett tjugotal ston som under en avelssäsong fick genomgå sju stycken insemineringar och embryoinsamlingar för att sedan undersökas med avseende på cytologi, odling, akut inflammation och kronisk inflammation. Resultatet påvisade via biopsi från endometriet en ökad prevalens för kronisk inflammation, vilken inte kunde associeras till ökat antal infektiösa organismer i uterus. Inseminationer och embryoinsamlingar är retande för uterus som går i försvar, vilket resulterar i en inflammatorisk reaktion. Slutsatsen blev därför att den kroniska inflammationen berodde på de upprepade ingreppen.

DISKUSSION

Denna litteraturstudie har beskrivit bakgrund och metodik för ET på häst samt redogjort för nödvändiga faktorer för att åstadkomma ett lyckat resultat. Dessutom har brister och problematik belysts ur olika perspektiv. I följande del kommer reflektioner utifrån det presenterade materialet att göras.

En av de största begränsningarna i nuläget för ytterligare utveckling av ET på häst är avsaknaden av möjlighet att inducera superovulation, enligt Squires och McCue (2016). Detta gör tekniken relativt opålitlig, eftersom risken är stor att inget embryo återfinns. Även då ett embryo samlats in behöver många faktorer vara optimala för att proceduren ska lyckas, men utan ett embryo är det förstås helt omöjligt. Att hästägare inte vågar satsa på konceptet är därför förståeligt då det innebär relativt höga utgifter utan försäkran om lyckat resultat.

Anledningen till att superovulation är svårt att inducera beskrivs olika i olika studier (Squires & McCue, 2007; Raz *et al* 2011). Enligt vissa är hästens unika ovarium orsaken. De menar att eftersom ovulationen är begränsad till fossa ovarii finns det inte tillräckligt med plats för flera folliklar att ovulera samtidigt. Andra anser att detta är en missuppfattning.

En annan trolig orsak till varför ET inte är lika populärt på häst som på exempelvis nötkreatur är att människans inställning till djurslagen ofta är av olika art. Generellt sett har vi ofta en mer emotionell relation till våra sport- och sällskapsdjur än till produktionsdjuren, vilka snarare blir objektifierade. Precis som det är glädjefyllt att följa sina vänner och släktingar som är havande kan många säkerligen känna glädje av att erfara dräktighet och förlossning hos sina hästar, vilka ofta klassas som "familjemedlemmar". Hur fortplantningen genomförs på djur vars huvudsyfte är att förse oss med föda är för många kanske inte lika viktigt.

Något som skulle kunna utgöra ett argument både för och emot användning av ET är att uppväxten ser väldigt olika ut beroende på stoets beteende mot fölungen. Endast bra gener för viss typ av fysisk prestation ger inte nödvändigtvis en framgångsrik avkomma, även om en fin stamtavla ger goda förutsättningar. Även uppfostran är troligen av stor betydelse och det är därför viktigt att välja ett mottagarsto med goda modersegenskaper. Dock kan det likväl vara så att donatorstoet skulle ha varit en betydligt bättre moder än mottagarstoet. Det gäller att göra en avvägning om vad som är viktigast - att stoet ska få tävla vidare eller att uppväxten blir optimal för fölet, om det valet finns. Som sagt skulle detta argument även kunna vara till fördel för användning av ET, där ett sto av fin härkomst kanske har ett dåligt modersbeteende. I det fallet vore det kanske bättre för fölet att uppfostras av ett mottagarsto.

Avel innebär en planerad befruktning för att erhålla önskvärda egenskaper hos avkomman, vilket även är fallet vid ET. Som nämnts finns dock exempel på rasföreningar som skiljer på traditionell avel och ET och ibland används argumentet om selektionen av individer emot ET. Det kan tyckas vara motsägelsefullt eftersom samma metod används vid all typ av avel. Dock förekommer många gånger en mer extrem selektion vid ET, vilket förmodligen ofta beror på de höga kostnaderna för processen. Hittas sätt för att reducera kostnaderna kan troligtvis fler individer inkluderas utan stor ekonomisk insats för djurägarna.

Vid all typ av selektion av vilka individer som ska föra sina gener vidare blir självklart aveln smalare och den genetiska mångfalden mindre. ET skulle dock även kunna bidra till bredare avel eftersom det möjliggör transport av embryon både inom och mellan länder. Detta är framför allt en stor fördel för raser av mindre populationer, för att motverka inavel. Vid jämförelse med import och export av levande djur är smittskyddet bättre vid transport av embryon och utgör, enligt Squires (2016), färre hälsorisker. Dessutom är det rent praktiskt enklare att transportera embryon jämfört med levande djur, då deras behov inte behöver tillgodoses i lika stor utsträckning. Ännu större flexibilitet för transport av ekvina embryon skulle sannolikt uppnås om kryopreservation utvecklades ytterligare.

Från början var tanken att denna litteraturstudie skulle fokusera på hälsorisker vid ET, både för inblandade ston och avkomman. Det visade sig dock endast finnas ett mycket begränsat utbud av publicerad forskning inom detta område, vilket tycks märkligt med tanke på att det krävs vävnadsmanipulerande och/eller -retande ingrepp vid utförandet. Över lag har det varit svårt att hitta forskning som talar emot användning av ET. De negativa aspekterna som nämns i de artiklar vilka ingår i denna litteraturstudie fokuserar främst på praktiska begränsningar i utförandet snarare än nackdelar av själva användandet, exempelvis hälsorisker och etiska aspekter.

Den enda originalartikeln som hittats som nämnt något om hälsorisker är skriven av Carnevale *et al.* (2005), vilken beskriver en ökad prevalens av kronisk inflammation i uterus hos donatorston. Studien avslutades dock innan utvärdering kunde göras av eventuella långtidseffekter som den kroniska inflammationen skulle kunna ha på uterus funktion.

Gällande hälsorisker för avkommor som tillkommit via ET har inga studier kunnat hittas alls. Det vore intressant att se mer forskning som under en längre period följer både ston och avkommor som använts till och tillkommit via ET. En annan aspekt i sammanhanget är att det även kan tänkas uppkomma biverkningar från hormonbehandlingar inför brunstsynkronisering, vilket även det utgör en hälsorisk i samband med ET. Det är dock inget som fokus lagts på i denna uppsats då det ansågs vara en helt egen frågeställning.

Det kan även tänkas att vissa procedurer som genomförs vid ET skulle kunna orsaka epigenetiska förändringar, exempelvis att embryot i det tidiga stadiet byter livmodermiljö. Hur detta påverkar avkomman i förhållande till om den skulle genomgått hela fosterperioden i den biologiska moderns livmoder är svårt att forska på, men samtidigt en intressant aspekt i det hela. Peugnet *et al.* (2016) sammanfattar till exempel experimentella studier där ston av olika storlek användes till ET och livmodermiljön visades då ha konsekvenser för fölens tillväxt och utveckling. Den nya tekniken där större/äldre embryon manipuleras genom att blastocoel-vätska byts ut mot frysskyddsmedel för att förbättra kryopreservation skulle även det eventuellt kunna ha konsekvenser för avkomman, men inga studier har gått att finna om det.

Gällande etiska aspekter nämner Gyllensten (2009) i sin artikel att skeptiker anser att ET ligger nära både kloning och genmanipulation och därför inte är etiskt försvarbart att använda. ET skiljer sig dock från båda dessa metoder på många sätt och jämförelsen är inte helt befogad.

Haugan (2013) förklarar att ET kan innebära en ökad stress för djuren till följd av de veterinära åtgärder som krävs, vilket kan anses vara onödigt att utsätta dem för. Faktumet att embryot

många gånger inte överlever efter de processer ET:n innebär är även det ett etiskt dilemma. Är det rätt att människan tar sig friheten att riskera livsdugliga embryon endast för att deras tävlingsston ska ha en fortsatt karriär?

Konklusionerna som dragits efter detta arbete är att ET utvecklats till det bättre på många sätt under de senaste decennierna. Det blir allt mer populärt och det finns många aktuella forskningsområden för att förbättra tekniken ytterligare. Det som dock saknas och efterlyses är mer forskning som belyser hälsorisker i samband med ET, både ur kortsiktigt och långsiktigt perspektiv. Dessutom bör den etiska diskussionen lyftas fram tydligare då den är viktig för att beakta välfärd för djuren vid ET och inte bara fokusera på kvantitativa resultat, vilket är det som befintliga artiklar oftast har gjort.

LITTERATURFÖRTECKNING

- Allen, W.R. & Rowson, L.E.A. (1972). Transfer of ova between horses and donkeys. In: Proc., 7th Int. Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination. Germany, Munich, 1972, 484–487.
- Bergfelt, D.R. (2000). Anatomy and Physiology of the Mare. I: Samper, J.C. (red), *Equine Breeding Management and Artificial Insemination*. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 141–164.
- Carnevale, E.M. (2008). Clinical considerations regarding assisted reproductive procedures in horses. *Journal of Equine Veterinary Science*, 28: 686–690.
- Carnevale, E.M., Squires, E.L. & McKinnon, A.O. (1987). Comparison of Ham's F10 with CO₂ or Hepes buffer for storage of equine embryos at 5° C for 24 H. *Journal of Animal Science*, 65: 1775–1781.
- Carnevale, E.M., Beisner, A.E., McCue, P.M., Bass, L.D. & Squires, E.L. (2005). Uterine changes associated with repeated inseminations and embryo collections in mares. I: Brokken, T.D. (red), Proceedings of the 51st Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners (AAEP). Seattle, Washington, USA, 3-7 December, 202-203.
- Carnevale, E.M., Ramirez, R.J., Squires, E.L., Alvarenga, M.A., Vanderwall, D.K. & McCue, P.M. (2000). Factors affecting pregnancy rates and early embryonic death after equine embryo transfer. *Theriogenology*, 54: 956–979.
- Coutinho da Silva, M.A. (2008). When should a mare go for assisted reproduction? *Theriogenology*, 70: 441-444.
- Dalin, A.-M. & Malmgren, L. (2010). Compendium on equine reproduction [internet material]. Uppsala: Swedish University of Agricultural Sciences, Department of Clinical Sciences
- Föreskrifter om verksamhet med ägg och embryon från nötkreatur, hästdjur, svin, får och get (2010). Jönköping. (SJVFS 2010:12)
- Föreskrifter om läkemedel och läkemedelsanvändning (2013). Jönköping. (SJVFS 2013:42)
- Ginther, O.J. (1992). *Reproductive Biology of the Mare*. 2 uppl. Wisconsin: Equiservices.
- Gyllensten, J. (2009). Kan vi hitta den perfekta tävlingshästen med hjälp av embryotransfer? <https://www.yumpu.com/sv/document/view/14046942/grupp-hopphastklubben/8> [2017-03-31]
- Haugan, A. (2013) *Equine embryo transfer*. <https://prezi.com/a0mkpz1rn8xo/equine-embryo-transfer/> [2017-03-18]
- Hyttel, P., Sinowatz, F., Vejlsted, M. & Betteridge, K. (2010). *Essentials of Domestic Animal Embryology*. Edinburgh: Elsevier, Ch. 6 & 9.
- Kraemer, D.C. (2013). A history of equine embryo transfer and related technologies. *Journal of Equine Veterinary Science*, 33: 305–308.
- König, H.E., Plendl, J. & Liebich, H.-G. (2014). Female genital organs. I: König, H.E. & Liebich, H.-G. (red), *Veterinary Anatomy of Domestic Mammals*. 6. uppl. Stuttgart: Schattauer GmbH, 429–450.
- Morel, M.C.G.D. (2008). Embryo Transfer in the Mare. I: Morel, M.C.G.D. (red), *Equine Reproductive Physiology, Breeding and Stud Management*. 3. uppl. Wallingford: CAB International. Tillgänglig: ProQuest Ebook Central. [2017-03-31]

- Oguri, N. & Tsutsumi, Y. (1974) Non-surgical egg transfer in mares. *Journal of Reproduction and Fertility*, 41: 313–320.
- Panzani, D., Rota, A., Marmorini, P., Vannozzi, I. & Camillo, F. (2014). Retrospective study of factors affecting multiple ovulations, embryo recovery, quality, and diameter in a commercial equine embryo transfer program. *Theriogenology*, 82: 807–814.
- Perry, G. (2015). *Statistics of embryo collection and transfer in domestic farm animals*. http://www.iets.org/pdf/comm_data/IETS_Data_Retrieval_2015_V2.pdf [2017-03-28]
- Peugnet, P., Robles, M., Wimel, L., Tarrade, A. & Chavatte-Palmer, P. (2016). *Theriogenology*, 86: 99–109
- Raz, T., Carley, S.D., Green, J.M. & Card, C.E. (2011). Evaluation of two oestrus synchronization regimens in eFSH-treated donor mares. *The Veterinary Journal*, 188, 105–109.
- Scott, B.R. (2008). *Development and permeability of equine blastocysts*. MSc-thesis. Austin State University.
- Svensk Galopp (2016). *Registrerings- och licensreglemente 2016 (RegRG)*. https://www.svenskgalopp.se/polopoly_fs/1.527578!/menu/standard/file/regrg2016.pdf [2017-02-25]
- Svensk Travsport (2017a). *Registreringsreglemente 2017*. https://www.travsport.se/polopoly_fs/1.571!/menu/standard/file/registreringsreglemente.pdf [2017-02-25]
- Svensk Travsport (2017b). *Ansökan att utföra embryotransfer*. https://www.travsport.se/polopoly_fs/1.598125!/menu/standard/file/ansokan%20om%20embryotransfer%20sto.pdf [2017-03-17]
- Squires, E.L. (2016). Breakthroughs in equine embryo cryopreservation. *Elsevier*, 32: 415–424.
- Squires, E.L. & McCue, P.M. (2007) Superovulation in mares. *Animal Reproduction Science*, 99: 1–8.
- Squires, E.L. & McCue, P.M. (2016). Cryopreservation of equine embryos. *Journal of Equine Veterinary Science*, 41: 7–12.
- Squires, E.L., McCue, P.M. & Vanderwall, D. (1999). The current status of equine embryo transfer. *Theriogenology*, 51: 91–104.
- Squires, E.L., Carnevale, E.M., McCue, P.M. & Bruemmer, J.E. (2003). Embryo technologies in the horse. *Theriogenology*, 59: 151–170.
- Texas A&M University (2009). *An overview of embryo transfer in horses*. https://www.exodusbreeders.com/PDF_equine/EmbryoFlushingAndTransport/2009TexasA&MEmbryoOverview.pdf [2017-03-18]
- Tormalm, I. (2007). *Effekt på östralcykeln hos ston tillförda GnRH-analogen deslorelin (Ovuplant)*. Uppsala: Sveriges lantbruksuniversitet, Veterinärprogrammet (Examensarbete 2006:7).