

Paula Ritakari

Alkionsiirrot tammoilla

Lisensiaatin tutkielma

2014
Helsingin yliopisto
Eläinlääketieteellinen tiedekunta
Kliinisen tuotantoeläinlääketieteen osasto
Kotieläinten lisääntymistieteen oppiaine



Tiedekunta - Fakultet - Faculty Eläinlääketieteellinen tiedekunta		Osasto - Avdelning - Department Kliinisen tuotantoeläinlääketieteen osasto	
Tekijä - Författare - Author Paula Ritakari			
Työn nimi - Arbetets titel - Title Alkionsiirrot tammoilla			
Oppiaine - Läroämne - Subject Kotieläinten lisääntymistiede			
Työn laji - Arbetets art - Level Kirjallisuuskatsaus		Aika - Datum - Month and year 4/2014	Sivumäärä - Sidoantal - Number of pages 42
Tiivistelmä - Referat - Abstract Alkionsiirtojen avulla on mahdollista lisätä geneettisesti arvokkaiden naaraseläinten jälkeläismäärää ja menetelmää on sovellettu onnistuneesti tuotantoeläimillä. Hevosmaailmassa alkionsiirrot ovat kuitenkin vielä melko harvinaisia. Alkionsiirtoon turvaututaan useimmiten hedelmällisyshoidon tapaan tilanteissa, joissa vanha tai arvokas tamma ei itse pysty viemään tiineyttä loppuun ja se tulee kysymykseen myös silloin, jos nuori tamma halutaan saada siitoskäyttöön mahdollisimman varhain tai jos tamman kilpailu-uraa ei haluta keskeyttää siitoskäytön vuoksi. Alkioiden pakastamismenetelmien kehittyminen mahdollistaisi niin ikään laajemman kansainvälisen hevoskaupan sekä geneettisen materiaalin säilömisen. Alkionsiirto on mahdollista läheisten sukulaislajien kesken, mikä mahdollistaa menetelmän käytön uhanalaisten lajien säilyttämisen edistämiseksi. Alkionsiirtoa voidaan käyttää apuna myös orin hedelmällisyyden arvioinnissa sekä tamman lisääntymiselimistön patologian tutkimuksessa. Toistaiseksi alkionsiirtomenetelmien suosiota rajoittaa alkioiden huono saatavuus, koska tammoille soveltuvaa superovulaatiomenetelmää ei vielä ole onnistuttu kehittämään. Myös alkioiden säilytykseen liittyy useita ongelmia. Hevosen alkion erikoinen rakenne kapseliseen vaikeuttaa kylmänsuoja-aineiden kulkeutumista alkion sisälle. Varhaisemman kehitysvaiheen alkioit kestävät pakastamista suurempia alkioita paremmin, mutta alkionhuuhtelutulokset ovat heikompia silloin, kun alkioita huuhdellaan varhaisempana ajankohtana. Alkionsiirron onnistumisen kannalta on tärkeää päästä valitsemaan siirrettäväksi laadukkaita ja hyväkuntoisia alkioita. Alkioita on perinteisesti arvosteltu mikroskoopin avulla morfologisin perustein sekä erilaisilla värjäysmenetelmillä, mutta myöhemmin mukaan on tullut myös alkion DNA:n tutkimisen mahdollisuus polymeraasiketjureaktio- eli PCR-menetelmällä. Tämä liseniaatin tutkielma on kirjallisuuskatsaus, jonka tavoitteena on selvittää lukijalle alkionsiirtoprosessin eri vaiheet sekä valottaa tekijöitä, jotka vaikuttavat alkionsiirron onnistumiseen.			
Avainsanat - Nyckelord - Keywords Hevonen, alkionsiirto			
Säilytyspaikka - Förvaringställe - Where deposited Eläinlääke- ja elintarviketieteiden (EE) -talon Oppimiskeskus			
Työn johtaja (tiedekunnan professori tai dosentti) ja ohjaaja(t) - Instruktor och ledare - Director and Supervisor(s) Terttu Katila			

SISÄLLYSLUETTELO

I JOHDANTO	1
II KIRJALLISUUSKATSAUS	3
1 YLEISTÄ	3
1.1 Historia	3
1.2 Nykytilanne	3
1.3 Käyttömahdollisuudet	3
1.4 Alkionsiirrot Suomessa	4
2 TAMMOJEN VALINTA	4
2.1 Luovuttajan valinta	5
2.2 Vastaanottajien valinta	6
3 KIIMOJEN SYNKRONOINTI	7
4 SUPEROVULAATIO	9
4.1 Aikaisemmin käytettyjä menetelmiä	10
4.2 Hevosen aivolisäkeuute (EPE)	10
4.3 Hevosen FSH	12
4.4 Alkioiden elinvoimaisuus	12
4.5 Siirtymävaiheessa olevat tammat	13
5 ALKIONSIIRTOTEKNIikka	13
5.1 Alkion huuhtelu	13
5.2 Huuhtelutulokseen vaikuttavia tekijöitä	14
5.3 Alkion etsiminen	15
5.4 Alkion siirtoajankohta	16
5.5 Alkion siirtäminen ei-kirurgisella menetelmällä	16
5.6 Alkion siirtäminen kirurgisella menetelmällä	18
6 ALKION ARVOSTELU	18
6.1 Hevosen alkion normaali kehitys	19
6.2 Alkion morfologinen arvostelu	20
6.3 DAPI-värjäys	22
6.4 Biopsia ja sukupuolen määrittäminen	22
7 ALKION KYLMÄSÄILYTYS	22
7.1 Jäähdyttäminen	22

7.2 Pakastaminen	23
7.3 Pakastamisen onnistumiseen vaikuttavia tekijöitä	23
7.3.1 Alkion koko ja kehitysaste	23
7.3.2 Jääkiteiden muodostuminen	25
7.3.3 Kylmänsuoja-aineet	25
7.3.4 Pakastamisen apuaineet	26
7.4 Sulattaminen	27
7.5 Vitrifikaatio	27
7.6 Alkion vaurioituminen kylmäkäsittelyn aikana	29
III POHDINTA	31
LÄHTEET	32

I JOHDANTO

Alkionsiirtojen avulla on mahdollista lisätä geneettisesti arvokkaiden naaraseläinten jälkeläismäärää ja menetelmää on sovellettu onnistuneesti tuotantoeläimillä. Hevosmaailmassa alkionsiirrot ovat kuitenkin vielä melko harvinaisia eikä niiden tekeminen ole taloudellisesti kannattavaa. Monissa maissa hevosten alkionsiirron tuloksena syntyneiden varsojen rekisteröintiä tai kilpailuoikeuksia on rajoitettu. Myös luovuttajattaman kilpailemista alkionsiirtoprosessin aikana voidaan rajoittaa. Eniten tutkimusta alkionsiirtoihin liittyen on tehty Argentiinassa, Brasiliassa ja Yhdysvalloissa. Suomi puolestaan oli Pohjoismaista ensimmäinen, jossa tehtiin onnistunut hevosen alkionsiirto ja täällä ovat syntyneet myös ensimmäiset sukupuolimääritetyistä alkioista saadut varsat.

Alkionsiirtoon turvaututaan useimmiten tilanteissa, joissa vanha tai arvokas tamma ei itse pysty viemään tiineyttä loppuun ja se tulee kysymykseen myös silloin, jos nuori tamma halutaan saada siitoskäyttöön mahdollisimman varhain tai jos tamman kilpailu-uraa ei haluta keskeyttää siitoskäytön vuoksi. Alkioiden pakastaminen mahdollistaisi niin ikään laajemman kansainvälisen hevoskaupan sekä geneettisen materiaalin säilyttämisen pitkiksi ajoiksi. Alkionsiirto on mahdollista läheisten sukulaislajien kesken, mikä mahdollistaa menetelmän käytön uhanalaisten lajien, kuten przewalskinhevosen, säilyttämisen edistämiseksi. Alkionsiirtoa voidaan käyttää apuna myös orin hedelmällisyyden arvioinnissa sekä tamman lisääntymiselimistön patologian tutkimuksessa.

Toistaiseksi alkionsiirtomenetelmien suosiota rajoittaa alkioiden huono saatavuus, koska tammoille soveltuvaa superovulaatiomenetelmää ei vielä ole onnistuttu kehittämään. Pienet alkiomäärät rajoittavat jossakin määrin myös tutkimusten luotettavuutta. Myös alkioiden säilytykseen liittyy useita ongelmia. Hevosen alkion erikoinen rakenne kapseliseineen vaikeuttaa kylmänsuoja-aineiden kulkeutumista alkion sisälle. Varhaisemman kehitysvaiheen alkioit kestävät pakastamista suurempia alkioita paremmin, mutta alkionhuuhtelutulokset ovat heikompia silloin, kun alkioita huuhdellaan varhaisempaan ajankohtana. Alkionsiirron onnistumisen kannalta on tärkeää päästä valitsemaan siirrettäväksi laadukkaita ja hyväkuntoisia alkioita. Alkioita on perinteisesti arvosteltu mikroskoopin avulla morfologisin perustein sekä erilaisilla

värjäysmenetelmillä, mutta myöhemmin mukaan on tullut myös alkion DNA:n tutkimisen mahdollisuus polymeerasiketjureaktio- eli PCR-menetelmällä.

Tämä lisensoitun tutkielma on kirjallisuuskatsaus, jonka tavoitteena on selvittää lukijalle alkionsiirtoprosessin eri vaiheet sekä valottaa tekijöitä, jotka vaikuttavat alkionsiirron onnistumiseen.

II KIRJALLISUUSKATSAUS

1 YLEISTÄ

1.1 Historia

Ensimmäiset onnistuneet alkionsiirrot hevoseläimillä tekivät Allen ja Rowson vuonna 1972 käyttäen kirurgista menetelmää hevosella ja aasilla. Syntyneet jälkeläiset olivat muuli ja muuliaasi. Kaksi vuotta myöhemmin raportoitiin ensimmäisestä ei-kirurgisen alkionsiirron tuloksena syntyneestä hevosjälkeläisestä (Oguri ja Tsutsumi 1974). Hevosten alkionsiirrot tulivat kaupallisesti saataville noin kymmenen vuotta myöhemmin (katsaus Kraemer 2013). Aluksi alkionsiirtotekniikan kehitys oli hidasta, vastaanottajattammojen tiinehtymistulokset olivat melko huonoja eikä luovuttajattammoja saatu ovuloimaan useampaa munasolua kerralla (Allen ja Rowson 1975).

1.2 Nykytilanne

Myöhemmin alkionsiirrossa käytettävät tekniikat ovat kehittyneet ja todennäköisyys tiinehtymiselle ei-kirurgisen alkionsiirron jälkeen on kasvanut. Myös rotujärjestöjen suhtautuminen on muuttunut suopeammaksi, esimerkiksi quarterhevostammoille voidaan nykyään rekisteröidä useampi kuin yksi jälkeläinen vuodessa, mikä on osaltaan johtanut alkionsiirtojen suosion lisääntymiseen (katsaus Allen 2005). Alkionsiirtotoimintaa harjoitetaan eniten Argentiinassa, Brasiliassa ja Yhdysvalloissa.

1.3 Käyttömahdollisuudet

Alkionsiirto mahdollistaa geneettisesti hyvien tammayksilöiden tehokkaamman jalostuskäytön, kun yhdeltä luovuttajattamalta on mahdollista saada useita varsoja saman siitoskauden aikana. Alkiohuuhtelusta ei ole todettu olevan luovuttajattamalle haittaa, joten alkioita voidaan huuhdella kilpailukäytössä olevilta tammoilta samoin kuin nuorilta tammoilta, jotka eivät vielä itse pystyisi kantamaan varsaa. Nuori tamma saadaan tällöin jalostuskäyttöön yhtä siitoskautta aikaisemmin. Alkionsiirtoa voidaan

myös käyttää hedelmällisyyshoitona tammalle, joka on hedelmällinen, mutta ei itse pysty ylläpitämään tiineyttä, tai vanhalle tammalle jolle tiineys ja synnytys olisivat jo terveystriski. Menetelmien kehittyessä on kuitenkin syytä miettiä, tuleeko lisääntymisongelmista kärsivää tammaa ylipäätään käyttää jalostukseen, jos on mahdollista että ongelmat ovat periytyviä. Useissa maissa hevosia rekisteröivät tahot ovat rajoittaneet alkionsiirron tuloksena syntyvien varsojen kilpailuoikeuksia sekä kieltäneet luovuttajatamman kilpailemisen alkionsiirtoprosessin aikana. Alkionsiirtojen rajoittaminen ja taloudelliset syyt rajoittavat toistaiseksi menetelmän suosion kasvua.

1.4 Alkionsiirrot Suomessa

Maa- ja metsätalousministeriö valvoo hevosten alkionsiirtotoimintaa Suomessa ja sitä varten on anottava lupa. Lisäksi luovuttajatammat on ilmoitettava Maa- ja metsätalousministeriölle ennen alkioden keräämistä. Suomen Hippoksen alkionsiirtosääntö on ollut voimassa vuodesta 2007 alkaen. Sen mukaan alkionsiirrot ovat sallittuja suomenhevosilla keskenään ja lämminverisillä keskenään. Kaikki alkionsiirron tuloksena syntyneet suomenhevosvarsat saavat ravikilpailuoikeuden, mutta lämminverisillä myönnetään kilpailuoikeus ainoastaan yhdelle varsalle siitoskautta kohden (Suomen Hippos ry 2007). Ratsuhevosilla ja poneilla ei ole rajoituksia alkionsiirron suhteen Suomessa. Taloudellisista syistä alkionsiirtotoimintaa on toistaiseksi harjoitettu Suomessa vain vähän. Suomessa on tehty alkionsiirtoja 1980-luvulta alkaen ja vuoteen 2008 mennessä täällä oli syntynyt 39 alkionsiirtovarsaa.

2 TAMMOJEN VALINTA

Alkionsiirtoprosessi alkaa sopivan luovuttajatamman ja vastaanottajien valinnalla. Kaikille tammoille tulee tehdä kliininen yleistutkimus sekä kohdun ja munasarjojen ultraäänitutkimus. Tammojen kiimat synkronoidaan siten, että ne ovuloivat sopivana ajankohtana. Luovuttajatamma siemennetään ja alkiot huuhdellaan 7-8 vuorokauden kuluttua ovulaatiosta. Kaikkien tammojen munasarjatoimintaa on seurattava tiheästi ultraäänitutkimuksin, koska huuhtelun oikea ajankohta ja kiimojen synkronoinnin onnistuminen vaikuttavat olennaisesti alkionsiirron onnistumiseen.

2.1 Luovuttajan valinta

Luovuttajatammaksi kannattaa valita tamma, jonka katsotaan kilpailumenestyksensä tai muiden geneettisten ominaisuuksiensa vuoksi olevan jalostuksellisesti arvokas. Tamman tulee olla hyvässä fyysisessä kunnossa ja sillä tulee olla säännöllinen kiimakierto. Alkionsiirto mahdollistaa nuoren tai kilpailevan tamman jalostuskäytön sekä voi toimia hedelmällisyshoitona tammalle, joka ei muuten ole pystynyt tuottamaan jälkeläisiä (katsaus Squires ym. 1999). Luovuttajatamman korkea ikä ja huono lisääntymishistoria vaikuttavat huuhdeltujen alkioiden määrään ja laatuun heikentävästi (Vogelsang & Vogelsang 1989). Alkioita saadaan todennäköisemmin huuhdeltua sellaiselta tammalta, jolla on ollut ongelmia tiineyden ylläpitämisessä, verrattuna tammaan joka on toistuvasti uusinut kiimansa siemennysten jälkeen.

Fyysisen rasituksen vaikutusta alkionhuuhtelutuloksiin on tutkittu viime aikoina paljon. Mortensen ym. (2009) totesivat fyysisen rasituksen vaikuttavan negatiivisesti follikulaariseen kehitykseen ja ovulaatioon sekä huuhdeltujen alkioiden määrään ja laatuun. Säännöllisessä rasituksessa olevat tammot ovuloivat pienempiä follikkeleita ja aika prostaglandiinin antamisesta ovulaatioon on pidentynyt. Mahdollisia syitä tähän ovat muun muassa lämpöstressi sekä stressin seurauksena erittyvät glukokortikoidit (Mortensen ym. 2009). Kyseisessä tutkimuksessa tammoja rasitettiin kuumassa ja kosteassa ympäristössä, jossa niiden ruumiinlämpö nousi rasituksen aikana 2,0 °C ja 30 minuuttia rasituksen jälkeen oli edelleen 1,8 °C koholla. Toisaalta Pessoa ym. (2011) ovat saaneet varsin lupaavia alkionhuuhtelutuloksia kilpailukäytössä olevilla quarterhevostammoilla (Taulukko 1). Ympäristö molemmissa tutkimuksissa oli melko samanlainen, mutta jälkimmäisessä tutkimuksessa tammojen ruumiinlämpö nousi vain 1,8 °C ja tammot palautuivat rasituksesta nopeammin, ruumiinlämpö 30 min suorituksen jälkeen oli enää 0,5 °C koholla. Tämä voi viitata siihen, että kyseiset tammot olivat fyysisesti paremmassa kunnossa ja tottuneet päivittäiseen rasitukseen, jolloin siitä ei aiheutunut niille ylimääräistä stressiä, joka voisi vaikuttaa tiinehtyvyyteen heikentävästi (Pessoa ym. 2011).

Taulukko 1. Fyysisen rasituksen vaikutus alkiohuuhteluiden onnistumiseen (Mortensen ym. 2009, Pessoa ym. 2011).

	Alkiohuuhteluiden määrä	Alkioiden määrä	Alkioiden löytymisprosentti %
Fyysisessä rasituksessa olevat tammat (Mortensen ym. 2009)	32	11	34
Siitostammat (Mortensen ym. 2009)	35	22	63
Fyysisessä rasituksessa olevat tammat (Pessoa ym. 2011)	138	105	76
Siitostammat (Pessoa ym. 2011)	657	466	71

2.2 Vastaanottajien valinta

Alkionsiirron onnistumisen kannalta luovuttajattammaa tärkeämmässä asemassa on vastaanottajattammaan huolellinen valinta ja käsittely. Vastaanottajan tulee olla varsonut aikaisemmin, sopivan kokoinen, hyvä käsitellä, iältään mieluiten kolmesta kymmeneen vuotta, ja sillä tulee olla hyvin kehittynyt utare. Lisäksi vastaanottajalla ei saa olla muutoksia kohdussa eikä munasarjoissa ja sillä tulee olla normaali kiimakierto (katsaus Squires ym. 1999). Ei-sykloivia tammoja voidaan käyttää vastaanottajina, mikäli niille aloitetaan progesteronihoito 5-8 vuorokautta ennen alkion siirtämistä. Tämä on hyödyllistä etenkin siitoskauden alussa, kun sykloivia vastaanottajia on vasta vähän saatavilla. Progesteronihoidettujen, ei-sykloivien tammojen kiimaa ei tarvitse synkronoida (Carnevale ym. 2000).

Vastaanottajana voidaan käyttää myös progesteronilla hoidettua tammaa, jonka munasarjat on poistettu. Progesteronihoitoa tulee tällöin jatkaa noin kolmen kuukauden

ajan, jotta tiineys etenisi normaalisti. Hinrichs ym. (1985) aloittivat ovariektomoitujen tammojen progesteronihoidon 5 vuorokautta ennen alkioden siirtämistä ja jatkoivat sitä 100. tiineysvuorokauteen asti annoksella 300 mg/vrk. Ovariektomoiduilla tammoilla saadut tiineystulokset ovat olleet yhtä hyviä kuin intakteilla vastaanottajattammoilla (Hinrichs ym. 1985, McKinnon ym. 1988). Ovariektomoituja tammoja käytettäessä vastaanottajien kiimoja ei tarvitse seurata ja jokaista luovuttajattammaa kohden riittää näin ollen yksi vastaanottaja.

Ihanteellista on, että vastaanottajattamma olisi suunnilleen samankokoinen kuin alkion luovuttaja. Mikäli vastaanottaja on luovuttajaa huomattavasti pienempi, sikiö kärsii lopputiineyden aikana ravinnon ja tilan puutteesta, mistä johtuen syntyvä varsa on epäkypsä ja tavallista pienempi. (Allen ja Pashen 1984, Allen ym. 2002). Toisaalta vastaanottajattaman ollessa liian suuri, voi syntyvä varsa olla huomattavan isokokoinen ja kärsiä aikuisiällä ylipainosta (Allen ym. 2004). Tamman koko ei kuitenkaan vaikuta varsan IGF-1-konsentraatioihin ja on olemassa viitteitä siitä, että mikäli tamman koko on rajoittanut varsan kasvua kohdussa, varsa pystyisi kasvamaan nopeammin syntymän jälkeen ja saavuttamaan aikuisiällä sen koon, minkä se olisi muutenkin saavuttanut (Wimel ym. 2014).

3 KIIMOJEN SYNKRONOINTI

Luovuttajattaman kiimakierron on hyvä olla 1-2 vuorokautta edellä vastaanottajaa, mutta tuoreita alkioita käytettäessä ovulaatioiden tarkka synkronointi ei ole tarpeen. Allen ja Rowson (1975) osoittivat, että vastaanottajien tiinehtyminen on parhaimmillaan silloin, kuin vastaanottajattamat ovat enintään yhden päivän edellä tai kolme päivää jäljessä luovuttajattamasta. Myöhemmin on kuitenkin todettu, että yhtä hyviä tiineystuloksia voidaan saada vaikka vastaanottaja olisi jopa 5 päivää luovuttajasta jäljessä (Jacob ym. 2012). Camargo ym. (2013) saivat niinkään yhtä hyviä tuloksia vastaanottajan ollessa 0-4 vuorokautta jäljessä. Suuremmilla alkionsiirtotoimintaa harjoittavilla laitoksilla on käytössään usein kokonainen vastaanottajattamien lauma, jossa kiimoja seurataan säännöllisesti eikä kiimojen synkronointi ole tarpeen.

Sykloivilla tammoilla kiimojen synkronointi onnistuu parhaiten siten, että luovuttajalle annetaan lihaksensisäisesti prostaglandiini F2 α :aa tai sen synteettistä analogia, kuten kloprostenolia, ja vastaanottajat saavat saman käsittelyn 1-2 vuorokautta myöhemmin. Prostaglandiini-injektion voi antaa 5-15 päivää ovulaation jälkeen. Ennen käsittelyä tulee ultraäänitutkimuksella varmistaa, että kaikki tammot ovat diestrusvaiheessa, niillä on toimiva keltarauhanen ja että niiden munasarjoissa ei ole preovulatorisia follikkeleita. Vaihtoehtoisesti kiimojen synkronointiin voidaan käyttää 9-10 päivän pituista, suun kautta annosteltavaa progestageenikuuria, esimerkiksi allyylitrenbolonia tai progesteroni-injektioita. Myös tässä vaihtoehdossa luovuttajatamman lääkitseminen aloitetaan 1-2 vuorokautta ennen vastaanottajia. Kuurin viimeisenä päivänä sekä luovuttajalle että vastaanottajille annetaan prostaglandiini-injektio, jolla aiheutetaan munasarjoissa mahdollisesti olevan keltarauhasen luteolyysi (katsaus Allen 2005).

Kiiman aikana kaikkien tammojen munasarjatoimintaa seurataan päivittäin ultraäänitutkimuksin. Luovuttajatamma siemennetään yleensä 1-2 päivää ennen ovulaatiota tuoreella, jäähdytetyllä tai pakastetulla spermalla (katsaus Squires ym. 1999). Siemennys voidaan tehdä myös postovulatorisesti, mutta alkionhuuhtelutulosten on todettu olevan sitä huonompia, mitä pidempi aika ovulaatiosta on kulunut siemennykseen. Postovulatorista siemennystä käytettäessä alkio on kehityksessään noin vuorokauden jäljessä verrattuna preovulatoriseen siemennykseen, mikä tulee huomioida alkionhuuhteluajankohdan valinnassa (Huhtinen 1999). Mikäli siemennyksen jälkeen ultraäänitutkimuksessa todetaan nestettä kohdussa, tammaa hoidetaan oksitosiinilla, prostaglandiinilla ja tarvittaessa tehdään kohtuhuuhdeltu (katsaus Squires ym. 1999). Kun luovuttajatamma on todettu ovuloineen, annetaan vastaanottajatammoille hCG- tai GnRH-injektio kahden vuorokauden kuluttua (katsaus Allen 2005). Neljäntenä tai viidentenä päivänä ovulaatiosta vastaanottajille tehdään ultraäänitutkimus, jossa tarkastetaan että niillä on toimiva keltarauhanen ja että kohdussa ei ole nestettä. Myös kohdun ja kohdunkaulan tonus arvioidaan rektaalisesti (katsaus Squires ym. 1999).

Progesteronia tai altrenogestiä käytetään yleisesti tiineyden tukemiseen ensimmäisen tiineyskolmanneksen aikana ja sitä voidaan käyttää myös alkion vastaanottajille. Progesteronin tiineyttä ylläpitävästä vaikutuksesta ei kuitenkaan ole olemassa luotettavaa tutkimustietoa (Allen 2001).

Taulukko 2. Meklofenaamihapon ja asynkronisaatioasteen vaikutus tammojen tiinehtyvyyteen (Wilsher ym. 2006)

Asynkronisaatioaste	Meklofenaamihapolla hoidetut tammot	Hoitamattomat kontrollit
+ 2 vrk	90 % (9/10)	80 % (8/10)
+ 3 vrk	80 % (8/10)	20 % (2/10)
+ 4 vrk	63 % (5/8)	13 % (1/8)
+ 5 vrk	38 % (3/8)	0 % (0/8)

Märehtijöillä on todettu prostaglandiinisynteesi-inhibiittorin eli tulehduskipulääkkeen käytön inhiboivan luteolyysiä, jolloin luovuttajan ja vastaanottajien asynkronisaatioaste voi olla suurempi. Normaalissa tamman kiimakierrossa endometriumin oksitosiinireseptoreiden herkkyys lisääntyy, minkä seurauksena 10-11 vuorokautta ovulaation jälkeen käynnistyy oksitosiinivälitteinen prostaglandiinin tuotanto, joka johtaa luteolyysiin (Goff ym. 1987). Alkion vaellus kohdun limakalvolla saa aikaan luteostaasin vähentämällä endometriumin normaalia, syklistä prostaglandiinisynteesiä (Kindahl 1982). Alkion täytyy siten olla läsnä kohdussa viimeistään kymmenentenä päivänä ovulaation jälkeen voidakseen välittää antiluteolyyttisen signaalin. Wilsher ym. (2006) tutkivat meklofenaamihapon käyttöä prostaglandiinisynteesin inhibiittorina vastaanottajatammoilla, jotka olivat ovuloineet 2-5 vuorokautta ennen luovuttajaa, ja totesivat sen parantavan tammojen tiinehtyvyyttä, kuitenkin siten, että tiineystulokset olivat sitä heikompia, mitä suurempi luovuttajan ja vastaanottajan asynkronisaatioaste oli (Taulukko 2). Hoidetut tammot saivat meklofenaamihappoa 1 g/vrk alkaen yhdeksännestä päivästä ovulaation jälkeen ja päättyen seitsemäntenä päivänä alkionsiirron jälkeen. Meklofenaamihapolla ei kuitenkaan otodettu olevan tammalla antiluteolyyttistä vaikutusta, koska tyhjäksi jääneillä tammoilla luteolyysi tapahtui normaalisti, vaan se tukee tiinehtymistä toistaiseksi tuntemattomalla mekanismilla (Wilsher ym. 2006).

4 SUPEROVULAATIO

Tammalla superovulaation aikaansaaminen on haastavaa verrattuna muihin kotieläinlajeihin. Tämä johtuu muun muassa siitä, että hevosen gonadeissa on

vähemmän eCG-reseptoreita kuin muilla lajeilla. Lisäksi hevosen munasarjaa peittävä tunica albuginea estää follikkeleiden ovuloitumisen muualta kuin ovulaatiokuopan kautta, joten vaikka follikkeleita olisi useita, kaikki eivät mahdu ovulaatiokuoppaan samanaikaisesti ja vain lähimpänä ovulaatiokuoppaa sijaitsevat follikkelit pääsevät ovuloitumaan (katsaus Allen 2005). Suomessa ei ole käytössä myyntiluvallista valmistetta, joka soveltuisi superovulaation aikaansaamiseen hevosilla. Niinpä Suomessa alkiot ovat peräisin yksittäin ovuloivista tammoista.

4.1 Aikaisemmin käytettyjä menetelmiä

Superovulaatiota on yritetty aikaansaada useilla erilaisilla hormonikäsittelyillä. eCG-injektiot eivät aiheuta tammoilla superovulaatiota edes suurina pitoisuuksina (Allen 1982). Normaalisti sykloivilla tammoilla myöskään kahdesti päivässä toistetut GnRH-injektiot eivät aiheuta superovulaatiota (Squires ym. 1989a), mutta siirtymävaiheessa olevilla tammoilla on saatu aikaan useita ovulaatioita käyttämällä GnRH:ta tai sen agonistia (Ginther ja Bergfelt 1990). Dominoivan follikkelin erittämä inhibiini vähentää follikkeleita stimuloivan hormonin (FSH) eritystä. Tammojen immunisoinnilla inhibiiniä vastaan on saatu aikaan kaksinkertainen määrä ovulaatioita hoitamattomiin tammoihin verrattuna (McKinnon ym. 1992).

Sian FSH:lla on saatu aikaan 15,-1,8 ovulaatiota kiimakiertoa kohden. Tammojen vaste kyseiselle hormonille on kuitenkin hyvin vaihteleva, joten oikean annoksen löytäminen kullekin tammalle on haastavaa. (Fortune ja Kimmich 1983). Hevosen aivolisäkeuute EPE on todettu sian FSH:ta tehokkaammaksi, Squires ym. (1986) osoittivat EPE:n aikaansaavan 2,2 ovulaatiota, kun sian FSH:lla saatu tulos oli 1,6 ovulaatiota kiimakiertoa kohti.

4.2 Hevosen aivolisäkeuute (EPE)

Suurin osa tutkijoista on käyttänyt Guilloun ja Combarousin (1983) menetelmää, jossa kilosta hevosen aivolisäkkeitä saadaan valmistettua 6 g EPE:tä, joka sisältää 6-10 % luteinisoivaa hormonia (LH) ja 2-4 % FSH:a. Woods ja Ginther (1983) ovat raportoineet saaneensa EPE:llä hoidetuilla tammoilla keskimäärin 3,0 ovulaatiota kiimakiertoa kohden. Myöhemmin Squires ym. (1987) saivat aikaan keskimäärin 3,8

ovulaatiota ja 2,0 huuhdeltua alkioita kiimakiertoa kohden EPE-käsitellyillä tammoilla. Useissa muissa tutkimuksissa on niin ikään saatu kahdesta neljään ovulaatiota ja noin kaksi huuhdeltua alkioita kiimakiertoa kohden, mikä osoittaa EPE:n olevan varsin kilpailukykyinen hoito superovulaation aikaansaamisessa.

Useimmilla tammoilla on yksi follikkelialto kiimakiertoa kohden. EPE-hoito tulee ajoittaa follikkeliallon alkuvaiheeseen ennen dominoivan follikkelin valikoitumista, mikä useimmiten tarkoittaa viidestä seitsemään vuorokautta ovulaation jälkeen. Woods ja Ginther (1983) totesivat, että päivinä 15-19 ovulaation jälkeen annettu EPE-hoito oli tehokkaampi kuin päivinä 19-23 annettu, tuloksina näissä oli 2,9 ovulaatiota ja 1,3 ovulaatiota kiimakiertoa kohden. Myöhemmin Dippert ym. vertasivat päivänä 5 ja päivänä 12 aloitettujen EPE-hoitojen vaikutuksia ja tuloksena oli, että ovulaatioita saatiin enemmän niillä tammoilla, joiden hoito oli aloitettu viidentenä päivänä ovulaatiosta. Pierson ja Ginther (1990) ovat todenneet yhteyden follikkeleiden koon ja EPE-vasteen välillä siten, että eniten suuria preovulatorisia follikkeleita saatiin silloin, kun EPE-hoito aloitettiin suurimman follikkelin ollessa halkaisijaltaan 15-20 mm. Parhaan tuloksen saavuttamiseksi EPE-hoito kannattaa aloittaa follikkelien ollessa kooltaan alle 25 mm.

EPE:tä annosteltiin pitkään hoidettaville tammoille vain kerran päivässä, kunnes todettiin, että tammoilla, jotka saivat EPE-injektion kahdesti päivässä, ovulaatioita saatiin 7,1 ja alkioita 3,5 kiimakiertoa kohden, verrattuna kerran päivässä hoidettuihin tammoihin, joilla vastaavat luvut olivat 2,4 ja 1,6 (Alvarenga ym. 2001). Scoggin ym. (2002) jatkoivat annosvasteiden tutkimista tammoilla ja saivat eniten ovulaatioita (4,7) niillä tammoilla, joille annettiin EPE:tä 25 mg kahdesti päivässä, mutta eniten alkioita (2,6) saatiin tammoista, joita hoidettiin pienemmällä 12,5 mg:n annoksella kahdesti päivässä. Nämä tutkimukset ovat vahvistaneet sen, että EPE:llä saadaan paras teho, kun sitä annostellaan kahdesti päivässä.

EPE:n tehoa on yritetty lisätä käyttämällä GnRH-analogia ennen hoidon aloittamista, kuten ihmisten hedelmöityshoidoissa, tavoitteena vähentää tamman omaa LH-tuotantoa. Tästä ei kuitenkaan ole todettu olevan hyötyä hevosilla (Dippert ym. 1992, Scoggin ym. 2002).

4.3 Hevosen FSH

Nykyään on kaupallisesti saatavilla puhdas hevosen aivolisäkeuutteesta valmistettu FSH-valmiste. Muun muassa Niswender ym. (2003) ovat tutkineet valmisteen sopivaa annostasoa. Annoksella 25 mg kahdesti päivässä saatiin aikaan enemmän preovulatorisia follikkeleita, mutta suuri osa niistä jäi ovuloitumatta. Pienemmällä annoksella 12,5 mg kahdesti päivässä saatiin aikaan 3,4 ovulaatiota kiimakiertoa kohti, kun käytettiin lisäksi hCG-valmistetta preovulatoristen follikkelien muodostumisen jälkeen. Ohjeeksi valmisteen kaupalliseen käyttöön on siten valittu 12,5 mg kahdesti päivässä. Tehtyjen tutkimusten perusteella on todettu, että hevosen FSH:lla saadaan aikaan yhtä paljon ovulaatioita ja huuhdeltuja alkioita kuin käyttämällä EPE:tä.

Kuten muillakin superovulaatiohoidoissa käytetyillä valmisteilla, myös hevosen FSH:lla saavutettu vaste on hyvin vaihtelevaa. Pääsääntöisesti nuoret, säännöllisen kiimakierron omaavat tammavastaavat hyvin hevosen FSH:iin, mutta vanhoilla tammoilla vaste on vaihtelevampi. Liian pienellä annoksella ei saada vastetta, mutta mikäli annos on liian suuri, seurauksena voi olla munasarjojen hyperstimulaatio, jolloin osa follikkeleista luteinisoituu tai kehittää follikulaarikystan. On esitetty, että liian suuri FSH-annos aiheuttaa tammoilla LH-pitoisuuden nousun, mistä seuraa progesteronitason nousu ja ovulaation aikaistuminen, vaikka follikkelit eivät vielä ole kypsiä (Briant ym. 2004).

4.4 Alkioiden elinvoimaisuus

Ensimmäisten tutkimustulosten perusteella uskottiin, että superovulaation seurauksena saatavat alkiot olisivat vähemmän elinvoimaisia kuin luonnollisesti ovuloivilla tammoilla (Woods ja Ginther 1983). Squires ym. (1987) kuitenkin saivat yhtä hyviä tiinehtymistuloksia superovulaation ja luonnollisen ovulaation tuloksena syntyneillä alkioilla. Myöhemmin on myös osoitettu, että superovuloineilta ja luonnollisesti ovuloineilta tammoilta kerätyt alkiot kehittyivät samalla tavalla, kun niitä kasvatettiin 10 päivän ajan *in vitro* (Dippert ym. 1994).

4.5 Siirtymävaiheessa olevat tammot

Hevonen on kausilisääntyjä, joten suurimmalla osalla tammoista ei ole lainkaan kiimakiertoja talvikuukausina. Keväällä tammot käyvät läpi siirtymävaiheen, jonka aikana munasarjatoiminta käynnistyy ja follikulaariset aallot alkavat. Hevostalouden kannalta on edullista, että tammojen kiimakerrot käynnistyvät mahdollisimman aikaisin keväällä. Sekä EPE:tä että hevosen FSH:a on käytetty siirtymävaiheen tammoilla aikaansaamaan superovulaatiota. Siirtymävaiheen tammoilla, joilla suurin follikkeli on yli 25 mm halkaisijaltaan, voidaan ovulaatiota nopeuttaa jopa 39,5 vuorokaudesta 7,6 vuorokauteen käyttämällä eFSH:ta annoksella 12,5 mg kahdesti päivässä enintään 15 vuorokauden ajan (Niswender ym. 2004).

5 ALKIONSIIRTOTEKNIikka

5.1 Alkion huuhtelu

Alkiohuuhtelu tehdään tavallisesti seitsemäntenä tai kahdeksantena päivänä ovulaatiosta (Iuliano ym 1985). Huuhtelussa käytetään kaksisuuntaista Foley-katetria, joka viedään vaginan kautta kohdunkaulan läpi noin 5 cm kohdun sisäpuolelle. Katetrin mansetti täytetään ilmalla tai steriilillä suolaliuoksella ja vedetään katetria kevyesti taaksepäin, jolloin se tukkii kohdunkaulan kohdunpuoleisen pään. Kohtuun lasketaan 1-2 litraa lämmitettyä huuhtelunestettä, jonka annetaan virrata ulos kohdusta lämmitettyyn mittalasiin. Huuhtelun onnistumiseksi 93-98 % käytetystä nesteestä tulee saada ulos kohdusta. Kohdun tyhjenemistä voidaan avustaa painelemalla sitä peräsuolen kautta (Imel ym. 1981). Huuhtelu toistetaan tavallisesti kolme kertaa ja viimeisellä huuhtelukerralla tammalle annetaan laskimonsisäisesti oksitosiinia, joka saa kohdun supistumaan ja tehostaa siten sen tyhjenemistä (Jasko 2002). On myös esitetty, että alkioiden saanti on parempi, jos huuhtelunesteen annetaan olla kohdussa kolmen minuutin ajan, ennen kuin se lasketaan ulos (Hinrichs 1990).

5.2 Huuhtelutulokseen vaikuttavia tekijöitä

Alkiohuuhtelun onnistumiseen vaikuttaa olennaisesti huuhtelun ajankohta, tavallisesti kuudentena päivänä ovulaatiosta suoritettussa huuhtelussa alkioiden saanti on vähäisempää kuin 7-8 vuorokautta ovulaation jälkeen. Jacob ym. (2012) vertasivat alkioiden saantia ennen ovulaatiota siemennetyiltä tammoilta huuhdeltaessa päivinä 6-10 ja totesivat alkioiden löytymisen olevan vähäisempää päivänä 6 verrattuna myöhempään huuhteluajankohtiin (Taulukko 3). Myös siemennysajankohta tulee huomioida alkiohuuhtelun suunnittelussa – mikäli luovuttajattamma on siemennetty ovulaation jälkeen, tulee huuhteluajankohdankin olla myöhäisempi. Luovuttajattaman korkea ikä on myös syy viivästyttää huuhtelua, koska alkion siirtyminen munanjohtimesta kohtuun voi vanhalla tammalla olla normaalia hitaampaa.

On myös esitetty, että siemennysajankohdalla olisi suurempi vaikutus alkioiden saantiin kuin huuhtelupäivällä (Taulukko 4.) ja että postovulatorinen siemennys heikentäisi huomattavasti alkioiden saantia (Huhtinen 1999, Eldridge-Panuska ym. 2005). Yksi mahdollisuus on, että postovulatorisen siemennyksen tai astutuksen jälkeen alkio viettää pidemmän ajan munanjohtimessa ja siirtyy kohtuun myöhemmin kuin preovulatorisen siemennyksen tuloksena syntynyt alkio. On myös mahdollista, että siittiöiden kapasitaatioon kuluvan ajan vuoksi hedelmöittyminen tapahtuu tavallista myöhemmin postovulatorisesti siemennettäessä. Suositeltavaa olisikin huuhdella postovulatorisesti siemennetyt tammot vasta 7,5-8 vuorokauden kuluttua ovulaatiosta (Huhtinen 1999, Cuervo-Arango ym. 2009).

Taulukko 3. Huuhteluajankohdan vaikutus alkioiden löytymisprosenttiin preovulatorista siemennystä käytettäessä (Jacob ym. 2012).

Huuhtelupäivä	Alkioiden löytymisprosentti
6	42 % (16/39)
7	61 % (159/262)
8	66 % (285/434)
9	59 % (39/66)
10	56 % (5/9)

Taulukko 4. Alkionhuuhtelupäivän ja siemennysajankohdan vaikutus alkioiden saantiin (Eldridge-Panuska ym. 2005).

Huuhteluajankohta	6. vuorokausi, preovulatorinen siemennys	7.-8. vuorokausi, preovulatorinen siemennys	6.-8. vuorokausi, postovulatorinen siemennys
Kiimakiertoja	32	37	17
Huuhdeltuja alkioita per ovulaatio	28/36 (78 %)	30/48 (62 %)	8/23 (35 %)
Alkioiden halkaisija μm	140-250	150-1150	150-175

Suomessa ei toistaiseksi ole saatavilla kaupallista valmistetta, joka soveltuisi superovulaation aikaansaamiseen hevosilla, joten useimmilta tammoilta saadaan huuhdeltua vain yksi alkio kiimakiertoa kohti. Vanhat ja huonon lisääntymishistorian omaavat tammot tuottavat vähemmän alkioita kuin muut. Huonon hedelmällisyyden syynä voivat olla patologiset muutokset munasarjoissa ja kohdussa sekä korkeampi risti varhaisille alkiokuolemille (McKinnon & Squires 1988). Myös sperman laadulla on vaikutus alkiohuuhtelun onnistumiseen siten, että tuoretta spermaa käytettäessä tammoilta saadaan huuhdeltua enemmän alkioita kuin pakastespermaa käytettäessä (Squires ym. 1999). Onnistuneita alkiohuuhteluita on pystytty tekemään 18,8 vuorokauden välein (Iuliano 1988). Siitoskauden aikana on mahdollista aikaansaada 6-8 tiineyttä yhden luovuttajatamman alkioista (McKinnon & Squires 1988).

5.3 Alkion etsiminen

Mikäli alkion huuhtelussa ei ole käytetty suodatinta, huuhtelunesteen annetaan seistä mittalaseissa 15-30 minuutin ajan, jolloin alkio laskeutuu lasin pohjalle painovoiman vaikutuksesta. Mittalaseista imetään suurin osa nesteestä pois, ja pohjalle jäävä sakka tutkitaan mikroskoopilla käyttäen 12-15 -kertaista suurennosta. Mikäli alkiohuuhtelussa käytetään suodatinta, alkioit jäävät siihen. Tavallisesti seitsemäntenä päivänä suoritettussa huuhtelussa alkioita löydetään enemmän (n. 75 %) kuin kuudentena päivänä tehdyssä (60-65 %) (Iuliano ym. 1985, Squires ym. 1985). Kuudentena päivänä huuhdellut alkioit ovat luonnollisesti pienempiä, joten on esitetty, että ne helpommin hukkuvat huuhtelun tai mikroskopoinnin yhteydessä. On myös mahdollista, että alkio ei

vielä ole saapunut kohtuun tai se on rakenteeltaan niin tiivis, ettei sen huuhteleminen kohdusta onnistu (Squires ym. 1985).

5.4 Alkion siirtoajankohta

Synkronoituihin vastaanottajattamoihin siirretään tavallisesti 6-8 vuorokauden ikäinen alkio. Otollisin siirtoikä alkioille on 7 vuorokautta (Jacob ym. 2012). Camargo ym. (2013) saivat parhaat tiinehtymistulokset alkioilla, joiden koko oli välillä 400-1199 µm ja jotka olivat kehitysasteeltaan blastokystejä tai laajentuneita blastokystejä. Pienemmillä ja kehittymättömämmillä moruloilla ja varhaisilla blastokysteillä tulokset olivat huonompia. Tiinehtymistulosten on todettu olevan parhaimmat silloin, kun alkionsiirto tehdään 3-5 päivää vastaanottajan ovulaation jälkeen (tiinehtymisprosentti 65 %) verrattuna 6-8 päivää ovulaation jälkeen (tiinehtymisprosentti 56 %). Mikäli vastaanottajan ovulaatiosta oli kulunut vasta kaksi päivää, tiinehtyminen oli selvästi huonompaa (33 %). Tiineysprosentit 60. päivänä ovat olleet yhtä hyviä riippumatta siitä, onko alkio siirretty kolmantena vai kahdeksantena päivänä ovulaatiosta (Jacob ym. 2012).

5.5 Alkion siirtäminen ei-kirurgisella menetelmällä

Alkion siirtämiseen on olemassa viisi vaihtoehtoista tapaa, joista kaksi luokitellaan kirurgisiin ja kolme ei-kirurgisiin tapoihin. Nykyään käytetään eniten ei-kirurgista transkervikaalista menetelmää, jossa alkio siirretään kohdunkaulan läpi kohtuun käyttäen keinosiemennyskapillaaria tai olkisiemennyslaitetta. Keinosiemennyskapillaari sisältää 2,5-3,0 ml alkionsiirtonestettä ja alkio sijaitsee kapillaarin neste- ja ilmapatsaiden välissä, jotta sen liike olisi mahdollisimman vähäistä. Kapillaaria voidaan käyttää siirtoon sellaisenaan tai kohtunäytteenottolaitteen suojuksella peitettynä. Siirtäjän käsi suojataan rektaalikäsineellä ja steriilillä leikkauskäsineellä ja kapillaari työnnetään vaginan ja cervixin läpi kohtuun. Alkio siirretään kohdun runko-osaan (Imel ym. 1981). Olkisiemennyslaitteessa käytettävä olki sisältää alkion ja 0,5 ml siirtonestettä. Laite viedään vaginan kautta kohdunkaulan läpi kohtuun joko toisella kädellä peräsuolen kautta avustaen tai manuaalusesti vaginan kautta ja suunnataan sen jälkeen toiseen kohdunsarveen, johon alkio sitten asetetaan. Toimenpide on teknisesti

haastava ja vaatii suorittajaltaan paljon kokemusta, mutta parhaimmillaan tällä menetelmällä saavutetaan 75-85 %:n tiinehtymistulos (Jasko 2002).

Edellä mainituissa transkervikaalisissa siirtomenetelmissä riskinä on kohdun kontaminoituminen vaginan normaalimikrobistolla. Transkervikaalisessa siirrossa on mahdollista käyttää apuna Polanskyn vaginoskooppia ja Velsellumin pihtejä, joilla kohdunkaula vedetään suoraksi ja sen läpi ohjataan alkionsiirtopipetti kohdunsarveen. Siirtoon tarvitaan tällöin kolme ihmistä, yksi jokaista instrumenttia käyttämään, mutta siirto on tällöin helpompi tehdä hygieenisesti ja vastaanottajien tiinehtymisprosentti on jopa yli 90 (katsaus Allen 2005).

Alkio voidaan siirtää ei-kirurgisesti myös tähystämällä kyljen kautta tai käyttäen pitkää neulaa, joka ohjataan sokkona vaginan anteriorisen seinämän läpi kohdunsarveen. Nämä menetelmät eivät kuitenkaan ole laajemmassa käytössä, koska ne ovat työläitä ja tiinehtymisprosentti on huonompi kuin muita menetelmiä käytettäessä (katsaus Allen 2005).

On esitetty, että transkervikaalinen alkionsiirto aiheuttaa vastaanottajatamassa subkliinisen endometriitin ja lisääntyneen prostaglandiinin erityksen, mikä voi johtaa luteolyysiin noin yhdellä kolmanneksella tammoista ja heikentää siten tiinehtymistuloksia alkionsiirto-ohjelmissa. Tulehdusvasteen aiheuttajaksi on epäilty alkiota itseään, alkionsiirrossa käytettäviä nesteitä, kohdun mikrobikontaminaatiota tai kohdunkaulan mekaanista ärsytystä. Koblichke ym. (2008) tutkivat tulehduskipulääkkeiden, meklofenaamihapon ja fluniksiinimeglumiinin, vaikutusta tulehdusvasteen ennaltaehkäisyssä. Vastaanottajatamoihin siirretyt alkiot huuhdeltiin takaisin neljä vuorokautta siirron jälkeen ja samalla kohdusta otettiin biopsia. He totesivat tulehduskipulääkkeen käytön alentavan prostaglandiinin eritystä ja tulehdusmuutoksia kohdussa. Tulehduskipulääkkeen käyttö ei aiheuttanut histologisia muutoksia alkioille, joten sen käytöllä pystytään parantamaan vastaanottajien tiinehtyvyyttä (Koblichke ym. 2008).

5.6 Alkion siirtäminen kirurgisella menetelmällä

Kirurgisessa menetelmässä alkio siirretään kohdunsarveen joko yleisanestesiassa ventraalisen, linea albaan tehdyn laparotomiaviillon kautta tai paikallispuudutuksessa kylkiviillon kautta. Linea alba kautta siirrettäessä ovulaation puoleinen kohdunsarvi vedetään taaksepäin leikkaushaavaan ja kohdunsarveen tehdään viilto leikkaavaa neulaa käyttäen. Alkio siirretään viillon kautta kohtuun pasteuripipettiä käyttäen minkä jälkeen kohtu ja linea alba suljetaan. Tiinehtymistulokset tällä menetelmällä ovat olleet viidenkymmenen prosentin luokkaa (Imel ym. 1981, Allen 1982, Squires ym. 1985)

Vaihtoehtoisessa menetelmässä vastaanottajattama rauhoitetaan ja nälkäkuoppaan tehdään paikallispuudutuksessa 15-20 cm pituinen viilto, jonka kautta kohdunsarvi vedetään näkyville ja siihen tehdään viilto leikkaavalla neulalla. Alkio siirretään kohtuun käyttäen pasteuripipettiä, minkä jälkeen kohtu ja kylkiviilto suljetaan. Kylkiviiltotekniikalla on saavutettu parempia tuloksia kuin ventraaliviiltoa käytettäessä, jopa 72 % (Iuliano ym. 1985). Kirurgisten menetelmien etuna on hygieenisuus, mutta korkeiden kustannusten ja eläinten hyvinvointiin liittyvien ongelmien vuoksi ei-kirurgiset menetelmät ovat kuitenkin syrjäyttäneet kirurgiset käytännön praktiikassa.

6 ALKION ARVOSTELU

Alkioiden laatu ja kehitysaste vaikuttaa niiden pakastuksenkestävyyteen sekä vastaanottajan tiinehtymisen todennäköisyyteen, minkä vuoksi alkiot tavallisesti arvostellaan ennen ja jälkeen kylmäsäilytyksen ja kehityskelvottomat alkiot hylätään (Slade ym. 1984). Alkioiden arvostelu mahdollistaa myös erilaisten pakastus- ja sulatusmenetelmien vertailemisen keskenään. Alkion laatua arvioidaan yleisesti sen morfologian perusteella. Muita tapoja alkion elinkelpoisuuden tutkimiseen ovat alkion viljely ja kehittymien in vitro, fluoresoivien aineiden metabolian tutkiminen, 4',6'-diamidino-2-fenylindolivärijäys (DAPI), alkion metabolian testaaminen ja konfokaalimikroskopia. Biopsian avulla on mahdollista tutkia alkion DNA:ta PCR-menetelmää käyttäen.

6.1 Hevosen alkion normaali kehitys

Hevosen alkio saapuu kohtuun viidentenä tai kuudentena päivänä ovulaatiosta. Sen halkaisija on tällöin 150-200 µm ja sitä ympäröi yhtenäinen zona pellucida. Alkio on tässä vaiheessa morula- tai varhaisessa blastokystivaiheessa. Morula muodostuu noin 32:sta blastomeerista ja se kasvaa solujen jakautuessa, jolloin perivitelliinitila kapenee ja blastomeerit yhdistyvät zona pellucidaan. Alkion keskelle muodostuu nesteontelo ja sisäsolumassa trofoblastien järjestäytyessä alkion ulkokerrokseen, jolloin alkion sanotaan muuttuvan morulasta blastokystiksi (Seidel 1996). Blastokystivaiheessa zona pellucidan sisäpuolelle alkaa muodostua läpikuultava, kova ja elastinen glykoproteiini-kapseli (Betteridge 1989). Kapselin merkitystä ei täysin tunneta, mutta on esitetty että kapseli

1. Suojaa alkioita myometriumin supistuksilta sen vaeltaessa ympäri kohdun lumenia 6.-17. tiineysvuorokautena. Alkion vaellus kohdussa välittää endometriumin kautta antiluteolyttisen signaalin, mikä on tärkein tiineyden tunnistamissignaali hevosella (Ginther 1983).
2. Osallistuu todennäköisesti alkion implantaatioon (Oriol ym. 1993, Stout ym. 2005).
3. On välttämätön alkion normaalille kehitykselle in vivo. Eräissä tutkimuksissa viideltätoista alkioita poistettiin kapseli, eikä yksikään alkioista aikaansaanut tiineyttä vastaanottajassa. Kapselin kehittyminen on myös olennaisesti alkion kehitysvaiheeseen liittyvä tapahtuma – alkio ei pysty kasvattamaan itselleen uutta kapselia jos alkuperäinen poistetaan (Stout ym. 2005).

Kapselin sisäpuolelta verhoaa trofoblastisolujen muodostama kalvo. Sisäsolumassan erilaistumattomissa soluissa on ulokkeita, jotka yhdistävät sisäsolumassan soluja ja trofoblasteja toisiinsa. Trofoblastit ovat muodoltaan pylväsmäisiä ja niiden pinnalla on lukuisia mikrovilluksia. Lisäksi ne sisältävät runsaasti mitokondrioita ja vesikkeleitä. Sitä mukaa kun alkio kasvaa, sisäsolumassan solut alkavat kerääntyä toiseen päähän rakkula-alkion onteloa (Wilson ym. 1987). Kapselin muodostuessa zona pellucida vähitellen ohenee, mikä johtaa lopulta alkion kuoriutumiseen zona pellucidasta kuudennen vuorokauden aikana (Stout ym. 2005). Alkion läpimitta on kuudentena vuorokautena ovulaatiosta noin 0,20 mm, seitsemäntenä noin 0,49 mm ja

kahdeksantena noin 1,18 mm (Imel ym. 1981, Iuliano ym. 1985). Tämän jälkeen alkio kasvaa nopeasti 18. tiineysvuorokauteen asti.

6.2 Alkion morfologinen arvostelu

Alkioiden morfologiaa tutkitaan stereomikroskoopilla käyttäen 15-80 -kertaista suurennosta. Tutkimus on edullinen ja helppo toteuttaa, mutta sen tarkkuus ei aina ole riittävä ja sitä joudutaan täydentämään muilla tutkimusmenetelmillä. Alkion mikroskopointia voivat vaikeuttaa alkion sisällä esiintyvät rasvapisarot, jotka saattavat värjäytyä tummiksi (Poitras ym 1994).

Morfologisessa arvostelussa on tärkeää, että alkio kehittyy aikataulun mukaisesti. Kehitysvaiheen arvioinnissa kiinnitetään huomiota erityisesti alkion muotoon, kokoon ja sen sisäsolumassan sijaintiin sekä ontelon kokoon. Lisäksi tarkastellaan onko zona pellucida yhä havaittavissa ja missä vaiheessa kapselin muodostuminen on (Wilson ym. 1987). Alkion laatua heikentäviä tekijöitä ovat irronneiden ja degeneroituneiden solujen määrä, alkion sisältä löydetty vieraat organismit ja alkion kutistuminen (Woods ym. 1986).

Slade ym. (1984) kehittivät ensimmäisen luokitusjärjestelmän hevosen alkiolle. Tutkimuksessa alkio arvosteltiin ennen pakastamista ja sulatuksen jälkeen. Lisäksi niiden elinvoimaisuus testattiin *in vitro* tai *in vivo* synkronoituihin vastaanottajattamoihin siirrettyinä. *In vitro* -ryhmän alkio todettiin kehityskelpoiseksi, mikäli ne pystyivät viljelyssä saavuttamaan seuraavan kehitysvaiheen ja degeneroituneiksi, mikäli niissä oli havaittavissa degeneraation merkkejä ja eivät pystyneet kehittymään seuraavalle kehitysvaiheelle. Lisäksi arvioitiin alkioiden zona pellucidassa tai kapselissa olevat vauriot sekä pyknoottisten tumien määrä. *In vivo* -ryhmässä vastaanottajattamoihin siirrettiin ne alkio, jotka sulatuksen jälkeen saivat arvosanaksi 3 tai enemmän. Slade ym. (1984) totesivat yhteyden alkion morfologisen laadun ja tiinehtymisen todennäköisyyden välillä. Tutkimuksessa alkiolle annettiin arvosanat yhdestä viiteen seuraavasti:

1. Erinomainen
2. Hyvä
3. Tyydyttävä

4. Huono
5. Degeneroitunut tai kuollut

Morfologiset arvosteluperusteet olivat seuraavat:

1. Blastomeerien yhdistyminen toisiinsa. Irralliset tai heikosti järjestäytyneet blastomeerit olivat merkki viivästyneestä kehityksestä tai degeneraatiosta.
2. Blastomeerit alkion ulkopuolella. Mikäli yli alkioista työntyi ulos useita blastomeereja (yli 5), sitä pidettiin degeneroituneena.
3. Alkion väri. Mitä vaaleampi, sen parempi arvosana.
4. Alkion pallomainen muoto. Epäsäännöllisen muotoisia alkioita pidettiin epänormaaleina.
5. Zona pellucidan tai kapselin vauriot.
6. Perivitelliinitilan täytyminen sisäsolumassalla. Pakastaminen voi johtaa alkion kutistumiseen, jolloin se täyttää pienemmän alueen perivitelliinitilasta.

Myöhemmin McKinnon ja Squires (1988) kehittivät nykyään yleisessä käytössä olevan arvosteluasteikon, jonka pääkohdat on esitetty taulukossa 5.

Taulukko 5. Alkion morfologinen arvostelu (McKinnon & Squires 1988).

Alkion arvosana	Morfologinen kuvaus
1 Erinomainen	Alkio on symmetrinen ja sen solut ovat tasalaatuisia kooltaan ja väriltään.
2 Hyvä	Alkiossa on pieniä virheitä: irrallisia trofoblasteja, yksittäisiä ulostyöntyviä blastomeerejä tai se on muodoltaan epäsymmetrinen.
3 Välttävä	Alkiossa on selviä vaurioita, jotka eivät ole vakavaksi luokiteltavia: degeneroituneita soluja, ulostyöntyviä blastomeerejä tai sen blastoseele on litistynyt.
4 Huono	Alkiossa on vakavia vaurioita, esimerkiksi litistynyt blastoseele, degeneroituneita soluja, lukuisia ulostyöntyviä blastomeerejä. Alkiomassa näyttää kuitenkin elävältä.
5 Hedelmöittymätön tai kuollut	Alkio on täysin degeneroitunut tai kyseessä on hedelmöittymätön munasolu.

6.3 DAPI-värjäys

DAPI on väriaine, joka sitoutuu kuolleiden solujen DNA:han, kun käytetään tarpeeksi pieniä pitoisuuksia. Värjäamisen jälkeen alkio altistetaan UV-valolle ja lasketaan fluoresoivien eli kuolleiden solujen lukumäärä mikroskoopin avulla. DAPI-värjäystä on sovellettu muun muassa 6-7 vuorokauden ikäisten alkoiden elinkykyisyyden arvioimiseen (Huhtinen ja Bredbacka 1996) ja soluvaurioiden arvioimiseen halkaistuissa alkioissa (Huhtinen ym. 1995). DAPI-värjäyksen ei ole todettu aiheuttavan haittaa alkoiden elinkelpoisuudelle ja se tarjoaa mahdollisuuden tarkempaan alkion arvosteluun kuin perinteinen morfologinen luokittelu (Huhtinen 1999).

6.4 Biopsia ja sukupuolen määrittäminen

Alkiosta on mahdollista ottaa biopsia ennen sen siirtämistä vastaanottajaan, mikä mahdollistaa muun muassa alkion sukupuolen määrittämisen ja eräiden perinnöllisten sairauksien havaitsemisen PCR-menetelmällä (Peippo ym. 1995, Huhtinen ym. 1997b). Ensimmäiset sukupuolimääritetyistä alkioista syntyneet varsat ovat syntyneet Suomessa (Huhtinen ym. 1997b). Biopsia otetaan mikropipetillä. Sopivan restriktioentsyymin hevosen sukupuolen määrittämiseen löysivät ensimmäisinä Peippo ym. (1995) ja ensimmäisen onnistuneen biopsian hevosen alkioista ottivat Huhtinen ym. (1997b), mutta biopsioituilla alkioilla saavutetut tiineystulokset olivat tuolloin vielä heikkoja. Alkio on nykyään mahdollista biopsioida ja säilyttää sitä 32 °C:ssa 7-10 tunnin ajan ennen siirtoa ilman että alkion elinvoimaisuus tai tiinehtymistulokset heikkenevät (Herrera ym. 2014). Tällöin on mahdollista siirtää ainoastaan haluttuja ominaisuuksia edustavat alkioit vastaanottajiin.

7 ALKION KYLMÄSÄILYTYS

7.1 Jäähdyttäminen

Alkioita voidaan jäähdyttää ja säilyttää + 4 °C:ssa useiden tuntien, jopa vuorokauden ajan, mikä mahdollistaa alkoiden kuljettamisen vastaanottajattamien luokse siirtämistä varten. Jäähdytetyillä alkioilla on saatu yhtä hyviä tiinehtymistuloksia kuin

tuoreilla alkioilla (Cook ym. 1989). Moussa ym. (2004) tutkivat + 5 °C:ssa säilytettyjen alkioiden elinkykyisyyttä. Alkiot arvoitettiin DAPI- ja TUNEL-värjäyksellä eli kuolleiden ja varhaisapoptoottisten solujen määriä arvioitiin ennen kylmäsäilytystä sekä 6 tunnin ja 24 tunnin kylmäsäilytyksen jälkeen. Ensimmäisten kuuden tunnin aikana alkioissa ei tapahtunut merkittäviä muutoksia, mutta vuorokauden ajan säilytetyissä alkioissa kuolleiden solujen määrä oli huomattavasti lisääntynyt. Kuolleiden solujen määrä lisääntyi suhteellisesti enemmän alle 400 µm alkioilla kuin sitä suuremmilla alkioilla (Moussa ym. 2004).

7.2 Pakastaminen

Yamamoto ym. (1982) onnistuivat ensimmäisinä maailmassa saamaan aikaan elävän varsan pakastetusta alkioista. Alkion pakastamisella saavutetaan monia etuja alkionsiirto-ohjelmissa. Vastaanottajattammojen kiimoja ei tarvitse tällöin synkronoida, koska alkio on sulatettavissa ja siirrettävissä milloin tahansa. Pakastaminen mahdollistaa myös alkioiden säilyttämisen hyvinkin pitkään jolloin alkioita on myös mahdollista kuljettaa siirrettäväksi eri puolille maailmaa. Hevosen alkion pakastaminen on osoittautunut haastavaksi verrattuna muiden lajien alkioihin. Alkion pakastusprosessi koostuu seuraavista vaiheista:

1. Alkion käsittely kylmänsuoja-aineilla
2. Hidas jäähdyttäminen alle -30 °C lämpötilaan sellaisissa olosuhteissa, joissa alkion solut dehydroituvat eli solunsisäinen neste siirtyy solunulkoiseen tilaan
3. Alkion siirtäminen nestetyppeen ja säilyttäminen -196 °C lämpötilassa
4. Alkion lämmittäminen takaisin fysiologiseen lämpötilaan
5. Kylmänsuoja-aineiden poistaminen alkioista

7.3 Pakastamisen onnistumiseen vaikuttavia tekijöitä

7.3.1 Alkion koko ja kehitysaste

Hevosen alkioiden pakastaminen kuljetusta ja säilytystä varten on perinteisesti ollut haastavaa. 1980- ja 1990-luvuilla Yamamoto ym. (1982) ja useat muut tutkijat pakastivat 6-8 vuorokauden ikäisiä alkioita käyttäen alun perin nautan alkioille suunniteltuja pakastamistekniikoita ja kylmänsuoja-aineita, mutta tiinehtymisprosentit

olivat melko heikkoja. Näissä tutkimuksissa kuitenkin huomattiin pakastamisen onnistuvat paremmin silloin, kun pakastettavat alkiot olivat halkaisijaltaan alle 300 µm. Syyksi on esitetty mm. suurten alkioiden pienempää pinta-alan ja tilavuuden suhdetta ja suurempaa blastoseelea, minkä vuoksi kylmänsuoja-aineet läpäisevät alkion solut hitaammin sekä lisäys- että poistovaiheessa (Seidel 1996). Myös kapselin on epäilty heikentävän kylmänsuoja-aineiden pääsyä alkioon. Brittany ym. (2012) tutkivat alkion kapselin läpäisevyyttä 1,4 M ja 3,4 M glyserolille. Tutkimus osoitti, että alle 600 µm alkiolla, joilla ei vielä ole täysin kehittyntä kapselia, glyserolin läpäisevyys oli parempi (3,6 %) kuin yli 600 µm alkiolla, joita peittää täysin kehittynyt kapseli (0,4 %). Glyserolin, etyleeniglykolin ja fysiologisen suolaliuoksen imeytymisen kapselin läpi on todettu olevan lineaarista, mikä viittaa siihen, että imeytymismekanismi on monimutkaisempi kuin yksinkertainen diffuusio. Kehittyneemmillä alkiolla kylmänsuoja-aineen läpäisevyyteen vaikuttavat heikentävästi todennäköisesti myös sisäsolumassan rakenne, endodermin muodostuminen ja akvaporiniit. (Gillard Kingma ym. 2011).

Hevosen alkio siirtyy munanjohtimesta kohtuun verrattain myöhään, yleensä aikaisintaan viidennen vuorokauden lopussa. Jotta alkiot olisivat kokonsa puolesta soveltuvia pakastamiseen, ne tulee kerätä 6 vuorokautta sen jälkeen, kun luovuttajan on todettu ovuloineen ultraäänitutkimuksessa tai 8 vuorokautta sen jälkeen, kun luovuttaja on saanut hCG-injektion, koska hCG aiheuttaa ovulaation tavallisesti 36-38 tunnin kuluessa. Pienillä pakastetuilla alkiolla saadut tiinehtymistulokset ovat olleet lähes yhtä hyviä kuin pakastamattomia alkiota siirrettäessä (Squires ym. 1989b, Hochi ym. 1996).

Alkiohuuhtelussa kuitenkin löydetään vähemmän alkiota silloin kun huuhtelu tehdään kuudentena päivänä verrattuna seitsemänteen tai kahdeksanteen päivään ovulaatiosta (Iuliano ym. 1988). Tämän vuoksi on yritetty kehittää menetelmiä, joilla myös suurempien alkioiden pakastaminen saataisiin onnistumaan. Maclellan ym. (2002) ovat yrittäneet kapselin liuottamista trypsiinillä sekä alkion solukalvojen suojaamista sytokalasiini B:llä, mutta nämä eivät lisänneet alkioiden elinvoimaisuutta pakastamisen jälkeen. Mikäli kapseli poistetaan kokonaan, pakastettu alkio ei pysty jatkamaan normaalia kehitystä sen jälkeen, kun se on siirretty vastaanottajaan (Stout ym. 2005). Barfield ym. (2009) kokeilivat suurikokoisten blastokystien kuivattamista ennen pakastamista. Alkiota kuivatettiin sakkaroosiliuoksessa kahden minuutin ajan, jolloin

alkioiden tilavuus pieneni 45 prosentilla. Kyseisellä alkioiden kuivattamismenetelmällä ei kuitenkaan saavutettu parempia tiineystuloksia kuin kontrolliryhmän alkioilla, joita ei kuivatettu. Tässä tutkimuksessa alkioita jäähdytettiin 0,5 °C minuutissa, mutta todellisuudessa suuret, halkaisijaltaan yli 450 µm alkiot voisivat hyötyä hitaammasta jäähdytysnopeudesta, jolloin myös niiden dehydraatioaika ennen jäätymistä olisi pidempi. McLellan ym. (2002) jäähdyttivät suuria hevosen alkioita ensin 0,3 °C minuutissa -30 °C lämpötilaan saakka ja sen jälkeen 0,1 °C minuutissa, saavuttaen noin 40 % tiinehtymisprosentin.

7.3.2 Jääkiteiden muodostuminen

Alkion pakastamisessa käytetään pieniä kylmänsuoja-ainepitoisuuksia ja alkioita jäähdytetään maltillisesti noin 0,3-0,5 °C minuutissa, jotta solut kuivuisivat asianmukaisesti eikä solunsisäisiä jääkiteitä pääsisi muodostumaan (Squires ym. 1989b). Jääkiteet aiheuttavat mekaanisia vaurioita alkion soluille ja pahimmassa tapauksessa alkion kuoleman. Kun alkio vietään pakastusnesteeseen ja alhaiseen lämpötilaan, vedestä alkaa muodostua jääkiteitä solujen väliseen tilaan, jolloin käytetyn pakastusnesteen konsentraatio on suurempi kiteiden ympärillä ja hyperosmoottinen neste imee solunsisäistä vettä pois alkioista. Liian nopea jäähdytys johtaa solunsisäisten jääkiteiden muodostumiseen ja liian hidas puolestaan johtaa hyperosmoottisten olosuhteiden aiheuttamiin soluvaurioihin. Nesteen jäätyminen indusoidaan lämpötilan ollessa -6 °C koskettamalla olkea nestemäiseen tyypeen kastetulla instrumentilla, jotta jään muodostuminen tapahtuisi mahdollisimman nopeasti ja tasaisesti ja välttyään kiteiden muodostumiselta (Seidel 1996).

7.3.3 Kylmänsuoja-aineet

Alkioiden suojaamiseksi pakastusnesteissä käytetään kylmänsuoja-aineita, joiden vaikutusmekanismeja ei täysin tunneta, mutta niiden on esitetty muun muassa alentavan pakastusnesteen jäätympistettä ja muuttavan muodostuvan jään koostumusta. Suoja-aineet eivät saa muodostaa kiteitä alkion jäätyessä. Kylmänsuoja-aineista eniten tutkittuja ovat glyseroli, etyleeniglykoli, propyleeniglykoli ja dimetyylisulfoksidi, jotka imeytyvät solujen sisään (Seidel 1996). Eläviä varsoja on syntynyt glyserolilla ja etyleeniglykolilla käsitellyistä alkioista. Parhaiten hevosen alkioiden pakastamiseen

soveltuu glyseroli, vaikka senkin on todettu aiheuttavan vaurioita pakastettaville alkioille (Wilson ym. 1987). Glyserolia käytettäessä alkion jäähdytysnopeuden on oltava riittävän hidas. Lisäksi voidaan käyttää solunulkoisia kylmänsuoja-aineita kuten sakkaroosia tai albumiinia.

Solunsisäiset kylmänsuoja-aineet kannattaa annostella vähitellen, koska ne aiheuttavat alkion solujen hetkellisen kutistumisen solunsisäisen nesteen siirtyessä solunulkoiseen tilaan konsentraatiogradientin suuntaisesti. Konsentraatioero kuitenkin tasoittuu pian kylmänsuoja-aineen päästessä solujen sisään jolloin solut palautuvat alkuperäiseen kokoonsa (Seidel 1996). Kylmänsuoja-aineilla on myös havaittu olevan toksisia vaikutuksia alkion soluille. Huhtinen ym. (1997a) totesivat, että mitä vähemmän alkio kutistuu kylmänsuoja-aineiden lisäämisen aikana, sitä paremmat mahdollisuudet sillä on jatkaa kehitystään sulattamisen jälkeen. Yleisesti ottaen varhaisemmassa kehitysvaiheessa olevat alkiot kutistuvat vähemmän kuin suuremmat alkiot.

Bass ym. (2003) tutkivat metanolin käyttöä suurten, 300-1000 μm alkioden kylmänsuoja-aineena. Alkioita pidettiin ensin 8 % metanolissa viiden minuutin ajan ja siirrettiin sen jälkeen 48 % metanoliin. Metanolin todettiin penetroituvan alkion soluihin yhtä hyvin kuin glyserolin, saavuttaen 1,5 M molariteetin verrattuna glyserolin 1,36 M molariteettiin. Metanolissa alkiot kutistuivat hieman vähemmän ($76 \pm 8 \%$) kuin glyserolissa ($57 \pm 6 \%$), mutta alkioden elinvoimaisuudessa tai tiinehtymistuloksissa ei ollut merkittävää eroa ryhmien välillä.

7.3.4 Pakastamisen apuaineet

Apuaineita käyttämällä pyritään pienentämään alkioille toksisten suoja-aineiden pitoisuuksia. Glutamiinin on todettu tehostavan DMSO:n ja propyleeniglykolin alkioita suojaavia vaikutuksia. On esitetty, että glutamiini suojaa ja stabiloi alkion solukalvojen proteiinirakenteita (Kruuv ym. 1988). Sakkaroosia voidaan käyttää suojaamaan alkioita sulatusvaiheessa tapahtuvalta osmoottiselta turpoamiselta. Huhtinen ym. (1997a) ovat todenneet sakkaroosin käytön sulatusliuoksessa alentavan alkioissa tapahtuvien solukuolemien määrää. Tutkimuksessa arvioitiin alkion morfologista laatua ja kehityskelpoisuutta DAPI-värjäysmenetelmällä. Trehaloosin on todettu toimivan

etyleeniglykoliin yhdistettynä solunulkoisena kylmänsuoja-aineena yhtä hyvin tuloksin kuin sakkaroosin (Castanheira ym. 2004).

7.4 Sulattaminen

Alkiolle sopiva sulatusnopeus riippuu siitä, kuinka paljon vettä solujen sisään on jäänyt alkion jäätyyshetkellä sekä oljen koko ja lämmönjohtavuus. Mikäli jääkiteitä on päässyt muodostumaan pakastuksessa, niiden lämpölaajeneminen sulatuksen aikana voi aiheuttaa vakavia solunsisäisiä vaurioita. Tällaisessa tilanteessa alkion sulatuksen on tapahduttava nopeasti. Mikäli alkion solut ovat dehydroituneet asianmukaisesti pakastuksen aikana, tulee sulatus tehdä hitaasti. Sulattaminen tapahtuu käytännössä joko huoneenlämmössä ja/tai 35-37 –asteisessa vesihauteessa, esimerkiksi pitämällä olkea ensin 12 sekunnin ajan huoneenlämmössä ja sen jälkeen 12 sekuntia veteen upotettuna (Seidel 1996).

Kylmänsuoja-aineen poistaminen alkiosta tulee tehdä vaiheittain jotta välttyttäisiin osmoottisilta vaurioilta ja solujen turpoamiselta veden imeytyessä solujen sisään konsentraatiogradientin suuntaisesti. Suoja-aine voidaan laimentaa siirtämällä alkiota vähitellen pienenevän konsentraation omaaviin liuoksiin. Vaihtoehtoisesti kylmänsuoja-aineen poistamisessa voi hyödyntää esimerkiksi sakkaroosia, joka ei penetroidu solun sisälle ja aiheuttaa siten vastakkaisen konsentraatiogradientin kuin vesi, jolloin vesi imeytyy hitaammin alkion soluihin (Seidel 1996).

7.5 Vitrifikaatio

Vitrifikaatio on nopeampi ja taloudellisempi vaihtoehto alkion perinteiselle pakastamiselle, koska se ei edellytä ohjelmoitavaa jäähdytyslaitteistoa, joka kontrolloisi alkion hidasta jäätymistä. Vitrifikaatiossa alkiota altistetaan lyhyessä ajassa suurelle konsentraatiolle kylmänsuoja-ainetta, minkä jälkeen alkiota jäähdytetään ensin nestetyypen höyryssä ja sen jälkeen upotetaan nestetyyppeen. Vitrifikaatiossa alkion solunsisäisen nesteen viskositeetti kasvaa nopeasti, jolloin välttytään solunsisäisten kristalloidien muodostumiselta. Hochi ym. (1994) ovat raportoineet ensimmäisinä onnistuneista tiineyksistä vitrifioituilla alkioidilla. He vitrifioivat seitsemän morula- tai varhaisen blastokystivaiheen alkiota, joista viisi siirrettiin vastaanottajattamoihin.

Kaksi tiineyksistä kehittyi normaalisti 60. vuorokauteen asti. Toistaiseksi yhtään elävää varsaa ei ole syntynyt vitrifoidusta alkiosta.

Myös vitrifikaation onnistumiselle on edullista, että käsiteltävät alkiot ovat halkaisijaltaan alle 300 µm, koska kapselin on todettu hankaloittavan vitrifikaation onnistumista. Eldridge-Panuska ym. (2005) vertasivat eri kokoisten alkioiden vitrifikaatiokestävyyttä ja tuloksena oli enemmän alkiorakkuloita alle 300 µm alkiolla (4/6) verrattuna yli 300 µm alkioihin (0/3). Pienillä, vitrifoiduilla alkiolla on saatu lähes yhtä hyviä tiinehtymistuloksia kuin pakastamattomilla alkiolla (Carnevale ym. 2000).

Perinteistä olkea käytettäessä alkion jäähtymisnopeus on noin 2500 °C minuutissa, mutta ns. open pulled straw –oljessa (OPS) alkiot jäähtyy jopa 20 000 °C minuutissa (Moussa ym. 2005). OPS-menetelmässä käytetään olkea, jonka molemmat päät ovat avoimet ja se on keskeltä erittäin ohut. Oberstein ym. (2000) vertasivat keskenään perinteistä alkioiden pakastamista sekä vitrifikaatiota OPS-menetelmällä ja pakastussilmukalla käyttäen pieniä, alle 300 µm alkiota. Alkioiden morfologinen laatu arvioitiin ennen niiden pakastamista. Sulatuksen jälkeen alkiot arvosteltiin uudelleen morfologisesti, niiden solujen elävyyttä arvioitiin värjäämällä ja niitä viljeltiin 20 tunnin ajan. Tutkimuksessa ei todettu merkittäviä eroja käytettyjen menetelmien välillä. Myöhemmin Moussa ym. (2005) vertasivat perinteistä pakastamista ja OPS-vitrifikaatiomenetelmää keskenään ja totesivat niin ikään sulatettujen alkioiden olevan yhtä elinvoimaisia kummankin menetelmän jälkeen.

Taulukko 6. Alkion menettämän blastoseelenesteen määrän vaikutus tiinehtymisprosenttiin (Choi ym. 2011)

Menetetyn blastoseelenesteen määrä %	Tiinehtymisprosentti %
< 10	0 (0/3)
20-30	40 (2/5)
> 70	80 (4/5)

Choi ym. (2011) ovat vitrifioineet myös suuria, halkaisijaltaan jopa 650 μm , blastokystejä onnistuneesti siten, että alkiot on biopsioitu ennen vitrifiointia ja niiden sisällä oleva neste on joko päästetty valumaan ulos tai poistettu pipetin avulla (central aspiration technique). Mitä suurempi osuus blastoseelenesteestä saatiin poistumaan alkiosta, sitä parempia olivat myös tiinehtymistulokset (Taulukko 6). Aspiraatiotekniikalla käsitellyistä alkiosta saatiin poistettua jopa yli 70 % blastoseelen sisältämästä nesteestä. Tällöin blastokystin halkaisija pienenee ja kylmänsuoja-aineet pääsevät tehokkaammin vaikuttamaan alkiossa. Samassa tutkimuksessa verrattiin kahta eri kylmänsuoja-ainetta, etyleeniglykolia ja dimetyylisulfidioksidia, in vivo -kasvatettujen alkioiden vitrifioinnissa. Tiinehtymistulokset olivat parempia niillä alkiolla, jotka suojattiin etyleeniglykolilla.

7.6 Alkion vaurioituminen kylmäkäsittelyn aikana

Alkion solut eivät ole biologisesti aktiivisia alle $-130\text{ }^{\circ}\text{C}$:ssa, joten ne eivät vaurioidu pitkänkään $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$:ssa nestetypessä tapahtuvan säilytyksen aikana. Pakastaminen ja sulattaminen puolestaan aiheuttavat alkion soluille vahinkoa. Mikäli alkio jäähtyy liian nopeasti, sen solut eivät ehdi kunnolla dehydroitua ja solunsisäiseen veteen muodostuu jääkiteitä. Kiteet aiheuttavat mekaanisia vauriota solunsisäisille rakenteille varsinkin sulatuksen aikana. Jos alkiota jäähdytetään liian hitaasti, on riskinä solujen liiallinen kuivuminen, jolloin solunsisäinen neste konsentroituu ja voi aiheuttaa proteiinien denaturaatiota (Lehn-Jensen 1986). Edellä mainittujen vaurioiden ehkäisemiseksi pakastusprosesseissa käytetään kylmänsuoja-aineita.

Wilson ym. (1987) tutkivat alkioiden morfologiaa glyserolialtistuksen ja pakastamisen jälkeen. Ilman pakastamistakin tapahtuva glyserolille altistuminen aiheutti muutoksia alkion sisäsolumassan solujen mitokondrioihin ja solunsisäisiin rasvapisaroihin. Glyserolikäsittelyn ja pakastamisen jälkeen mitokondrioissa havaittuja muutoksia olivat sisäkalvojen yhteensulautuminen, ulkokalvojen taittuminen sekä cristojen paksuuntuminen.

Hendriks ja Stout (2010) ovat verranneet suurten (yli 300 μm) ja pienten (alle 300 μm) alkioiden vaurioitumista pakastamis- ja vitrifikaatioprosessien aikana. He totesivat perinteisen pakastamismenetelmän olevan vähemmän haitallinen sekä suurille että

pienille alkioille. Kumpikin menetelmä aiheutti alkioille muun muassa solukuolemia ja mitokondrioiden toiminnan muuttumista. Suurilla alkioilla soluista degeneroitui 57 ± 14 % pakastamisen jälkeen ja 75 ± 16 % vitrifikaation jälkeen, pienillä alkioilla vastaavat luvut olivat 21 ± 9 % ja 30 ± 13 %. Vitrifikaatiossa käytettävät kylmänsuoja-aineet ovat mahdollisesti toksisempia alkioille kuin pakastamisessa käytettävät ja niiden konsentraatiot ovat suurempia. Vitrifikaatiossa on myös suurempi mahdollisuus sille, että alkio ehtii altistua kylmänsuoja-aineille pidempään kuin on suositeltu. Toisaalta vitrifikaatiossa käytetyt kylmänsuoja-aineet eivät lyhyessä ajassa ehdi imeytyä alkion soluihin yhtä hyvin kuin tavalliset kylmänsuoja-aineet, mikä osaltaan lisää alkion solujen vaurioitumista (Hendriks & Stout 2010).

III POHDINTA

Jotta alkionsiirtotoiminta saataisiin hevosilla kannattavaksi ja pystyttäisiin kehittämään tehokkaita, kaupallisia alkionsiirtomenetelmiä, tarvitaan vielä lisää tutkimusta liittyen useisiin alkionsiirtoprosessin vaiheisiin. Hevosten alkionsiirroilla ei toistaiseksi saavuteta taloudellista voittoa, mikä osaltaan hankaloittaa rahoituksen saamista tutkimustoimintaan.

Toimivan superovulaatiomenetelmän kehittäminen mahdollistaisi jälkeläismäärän lisäämisen geneettisesti arvokkaasta tammayksilöstä ja vähentäisi tarvittavien alkiohuuhteluiden määrää. Tamman munasarjan erityisen rakenteen vuoksi hevosella ei kuitenkaan todennäköisesti koskaan ole mahdollista saada aikaan yhtä monta ovulaatiota kuin esimerkiksi naudalla, koska ovulaatiokuoppaan mahtuvien follikkelien määrä on rajallinen.

Hevosen alkion pakastuksenkestävyys on heikko verrattuna esimerkiksi naudan alkioihin. Sopivien kylmänsuoja-aineiden kehittäminen ja hevosen alkioille soveltuva pakastamisprosessi helpottaisivat alkionsiirtotoimintaa, koska pakastettuja alkioita siirrettäessä pärjätään yhdellä vastaanottajattamalla ja vältetään kiimojen synkronoinnilta. Pakastaminen mahdollistaisi myös geneettisen materiaalin säilyttämisen ja helpottaisi kansainvälistä hevossauppaa, koska alkion kuljettaminen on helpompaa ja edullisempaa kuin elävän hevosen, eikä siihen liity vastaavaa riskiä tarttuvien eläintautien leviämisestä.

Alkion tutkiminen biopsian avulla tarjoaa uusia mahdollisuuksia paitsi sukupuolimääritettyjen varsojen tuottamiseen, myös perinnöllisten sairauksien diagnosointiin ja tutkimiseen.

LÄHTEET

Allen WR. Embryo transfer in the horse. Teoksessa: Adams CE, Mammalian egg transfer. CRC Press, Boca Raton, FL 1982: 135-154.

Allen WR. Luteal deficiency and embryo mortality in the mare. *Reprod Dom Anim* 2001, 36: 121-131.

Allen WR. The development and application of the modern reproductive technologies to horse breeding. *Reprod Dom Anim* 2005, 40: 310-329.

Allen WR, Rowson LEA. Surgical and non-surgical egg transfer in horses. *J Reprod Fertil* 1975, 23: 525-530.

Allen WR, Pashen RL. Production of monozygotic (identical) horse twins by embryo micromanipulation. *J Reprod Fertil* 1984, 71: 607-613.

Allen WR, Wilsher S, Turnbull C, Stewart F, Ousey J, Rosedale PD, Fowden A. Influence of maternal size on placental, fetal and postnatal growth in the horse: I Development in utero. *Reproduction* 2002, 123: 445-453.

Allen WR, Wilsher S, Tiplady C, Butterfield RM. The influence of maternal size on pre- and postnatal growth in the horse: III Postnatal growth. *Reproduction* 2004, 127: 67-77.

Alvarenga MA, McCue PM, Bruemmer J, Neves Neto JR, Squires EL. Ovarian superstimulatory response and embryo production in mares treated with equine pituitary extract twice daily. *Theriogenology* 2001, 56: 879-887.

Barfield JP, McCue PM, Squires EL, Seidel Jr GE. Effect of dehydration prior to cryopreservation of large equine embryos. *Cryobiology* 2009, 59: 36-41.

Bass LD, Denniston DJ, Maclellan LJ, McCue PM, Seidel Jr GE, Squires EL. Methanol as a cryoprotectant for equine embryos. *Theriogenology* 2004, 62: 1153-1159.

Betteridge KJ. The structure and function of the equine capsule in relation to embryo manipulation and transfer. *Equine Vet J* 1989, 8: 92-100.

Camargo CE, Weiss RR, Kozicki LE, Duarte MP, Duarte MCG, Lunelli D, Weber S, de Abreu RA. Some factors affecting the rate of pregnancy after embryo transfer derived from the brazilian jumper horse breed. *J Equine Vet Sci* 2013, 33: 924-929.

Carnevale EM, Ramirez RJ, Alvarenga MS, Vanderwall DK, McCue PM. Factors affecting pregnancy rates and early embryonic death after equine embryo transfer. *Theriogenology* 2000, 54: 965-979.

Castanheira PN, Amaral DCG, Vasconcelos AB, Arantes RME, Stahlberg R, Lagares MA. Cryopreservation of equine embryos by vitrification. 6th Int. Symp. Equine embryo transfer, Rio de Janeiro, Brazil, 2004: 50-52.

Choi YH, Velez IC, Riera FL, Roldán JE, Hartman DL, Bliss SB, Blanchard TL, Hayden SS, Hinrichs K. Successful cryopreservation of expanded equine blastocysts. *Theriogenology* 2011, 76: 143-152.

Cook VM, Squires AO, McKinnon AO, Bailey J, Long PL. Pregnancy rates of cooled, transported equine embryos. *Equine Vet J* 1989, 8: 80-81.

Cuervo-Arango J, Aguilar J, Newcombe JR. Effect of type of semen, time of insemination relative to ovulation and embryo transfer on early equine embryonic vesicle growth as determined by ultrasound. *Theriogenology* 2009, 71: 1267-1275.

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.

Dippert KD, Jasko DJ, Seidel Jr GE, Squires EL. Fertilization rates in superovulated and spontaneously ovulating mares. *Theriogenology* 1994, 41: 1411-1423.

Eldridge-Panuska WD, Caracciolo de Brienza V, Seidel Jr GE, Squires EL, Carnevale EM. Establishment of pregnancies after serial dilution or direct transfer by vitrified equine embryos. *Theriogenology* 2005, 63: 1308-1319.

Gillard Kingma SE, Thibault ME, Betteridge KJ, Schlaf M, Gartley CJ, Chenier TS. Permeability of the equine embryonic capsule to ethylene glycol and glycerol in vitro. *Theriogenology* 2011, 76: 1540-1551.

Ginther OJ. Mobility of early equine conceptus. *Theriogenology* 1983, 19: 603-611.

Ginther OJ, Bergfelt DR. Effect of GnRH treatment during the anovulatory season on multiple ovulation rate and on follicular development during the ensuing pregnancy in mares. *J Reprod Fertil* 1990, 88: 119.

Goff AK, Pontbriand D, Sirios J. Oxytocin stimulation of plasma 15-keto-13,14-dihydroprostaglandin F₂ α during the oestrous cycle and early pregnancy in the mare. *J Reprod Fert* 1987, 35: 253-260.

Guillou F, Combarous Y. Purification of equine gonadotropins and comparative study of their acid-dissociation and receptor-binding specificity. *Biochim Biophys Acta* 1983, 755: 229-236.

Hendriks WK, Stout TAE. Slow-freezing is less damaging to equine embryos than is vitrification. *Anim Reprod Sci* 2010, 121: 279-280.

Herrera C, Morikawa MI, Bello MB, von Meyeren M, Eusebio Centeno J, Dufourq P, Martinez MM, Llorente J. Setting up equine embryo gender determination by preimplantation genetic diagnosis in a commercial embryo transfer program. *Theriogenology* 2014, 81: 758-763.

Hinrichs K. A simple technique that may improve the rate of embryo recovery on uterine flushing in mares. *Theriogenology* 1990, 33: 937-942.

Hinrichs K, Sertich PL, Cummings MR, Kenney RM. Pregnancy in ovariectomized mares achieved by embryo transfer: A preliminary study. *Equine Vet J* 1985, 3: 74-75.

Hochi S, Fujimoto T, Braun J, Oguri N. Pregnancies following transfer of equine embryos cryopreserved by vitrification. *Theriogenology* 1994, 42: 483-488.

Hochi S, Maruyama K, Oguri N. Direct transfer of equine blastocysts frozen-thawed in the presence of ethylene glycol and sucrose. *Theriogenology* 1996, 46: 1217-1224.

Huhtinen M. Viability of equine embryos with special reference to manipulation and insemination timing. University of Helsinki, 1999. Väitöskirja. 66 s.

Huhtinen M, Bredbacka P. Non-surgical transfer of 4'-6'-diamidino-2-phenylindole-stained equine embryos. *Agricultural and food science in Finland* 1996, 5: 535-540.

Huhtinen M, Bredbacka P, Kotilainen T. Non-surgical transfer of 4'-6'-diamidino-2-phenylindole-stained equine demi-embryos treated with cytochalasin B and nocodazole. *Biol Reprod Mono* 1995, 1: 325-328.

Huhtinen M, Lagneaux D, Koskinen E, Palmer E. The effect of sucrose in the thawing solution on the morphology and mobility of frozen equine embryos. *Equine Vet J* 1997a, 25: 94-97.

Huhtinen M, Peippo J, Bredbacka P. Successful transfer of biopsied equine embryos. *Theriogenology* 1997b, 48: 361-367.

Imel KJ, Squires EL, Elsdon RP, Shideler RK. Collection and transfer of equine embryos. *J Am Vet Med Ass* 1981, 179: 987-992.

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.

Jacob JCF, Haag KT, Santos GO, Oliveira JP, Gastal MO, Gastal EL. Effect of embryo age and recipient asynchrony on pregnancy rates in a commercial equine embryo transfer program. *Theriogenology* 2012, 77: 1159-1166.

Jasko DJ. Comparison of pregnancy rates following non-surgical transfer of day 8 equine embryos using various transfer devices. *Theriogenology* 2002, 58: 713-716.

Kindahl H, Knudsen O, Madej A, Edqvist LE. Progesterone, prostaglandin F₂ α , PMSG and oestrone sulphate during early pregnancy in the mare. *J Reprod Fert* 1982, 32: 353-359.

Koblischke P, Kindahl H, Budik S, Aurich J, Palm F, Walter I, Kolodziejek J, Nowotny N, Hoppen HO, Aurich C. Embryo transfer induces a subclinical endometritis in recipient mares which can be prevented by treatment with non-steroid anti-inflammatory drugs. *Theriogenology* 2008, 70: 1147-1158.

Kraemer, DC. A history of equine embryo transfer and related technologies. *J Equine Vet Sci* 2013, 33: 305-308.

Kruuv J, Glofcheski DJ, Lepock JR. Protective effect of L-glutamine against freeze-thaw damage in mammalian cells. *Cryobiology* 1988, 25: 121-130.

Lehn-Jensen H. Cryopreservation of bovine embryos. A/S Carl Fr. Mortensen, Copenhagen, 1986, 184: 17-20.

Maclellan LJ, Carnevale EM, Coutinho da Silva MA, McCue PM, Seidel Jr GE, Squires EL. Cryopreservation of small and large equine embryos pre-treated with cytochalasin-B and/or trypsin. *Theriogenology* 2002, 58: 717-720.

McKinnon AO, Squires EL. Morphologic assesment of the equine embryo. *J Am Vet Med Assoc* 1988, 192: 401-406.

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* 1988, 29: 1055-1063.

McKinnon AO, Brown RW, Pashen RL, Greenwood PE, Vasey JR. Increased ovulation rates in mares after immunisation against recombinant bovine inhibin α -subunit. *Equine Vet J* 1992, 24: 144-146.

Mortensen CJ, Choi YH, Hinrichs K, Ing NH, Kraemer DC, Vogelsang SG, Vogelsang MM. Embryo recovery from exercised mares. *Anim Reprod Sci* 2009, 110: 237-244.

Moussa M, Tremoleda JL, Duchamp G, Bruyas JF, Colenbrander B, Bevers MM, Daels PF. Evaluation of viability and apoptosis in horse embryos stored under different conditions at 5 °C. *Theriogenology* 2004, 61: 921-932.

Moussa M, Bersinger I, Doligez P, Guignot F, Duchamp F, Vidament M, Mermillod P, Bruyas JF. In vitro comparisons of two cryopreservation techniques for equine embryos: Slow-cooling and open pulled straw (OPS) vitrification. *Theriogenology* 2005, 64: 1619-1632.

Niswender KD, Alvarenga MA, McCue PM, Hardy QP, Squires EL. Superovulation in cycling mares using equine follicle stimulating hormone (eFSH). *J Equine Vet Sci* 2003, 23:497-500.

Niswender KD, McCue PM, Squires EL. Effect of purified equine follicle stimulating hormone on follicular development and ovulation in transitional mares. *J Equine Vet Sci* 2004, 24: 337-339.

Oberstein N, O'Donovan MK, Bruemmer JE, Lane M, Seidel Jr GE, Carnevale EM, Squires EL. Cryopreservation of equine embryos by OPS, cryoloop or conventional slow cooling methods. 5th Int. Symp. Equine embryo transfer, Saari, Finland, 2000: 51.

Oguri N, Tsutsumi Y. Non-surgical egg transfer in mares. *J Reprod* 1974, 41: 313-320.

Oriol JG, Sharom FJ, Betteridge KJ. Developmentally regulated changes in the glycoproteins of the equine embryonic capsule. *J Reprod Fertil* 1993, 99: 653-664.

Peippo J, Huhtinen M, Kotilainen T. Sex diagnosis of equine preimplantation embryos using the polymerase chain reaction. *Theriogenology* 1995, 44: 619-627.

Pessoa MA, Cannizza AP, Reghini MFS, Alvarenga MA. Embryo transfer efficiency of quarter horse athletic mares. *J Equine Vet Sci* 2011, 31:703-705.

Pierson RA, Ginther OJ. Ovarian follicular response of mares to an equine pituitary extract after suppression of follicular development. *Anim Reprod Sci* 1990, 22: 131-144.

Poitras P, Guay P, Vaillancourt D, Zidane N, Bigras-Poulin M. In vitro viability of cryopreserved equine embryos following different freezing protocols. *Can J Vet Res* 1994, 59: 235-241.

Scoggin CF, Meira C, McCue PM, Carnevale EM, Nett TM, Squires EL. Strategies to improve ovarian response to equine pituitary extract in cyclic mares. *Theriogenology* 2002, 58: 151-164.

Scott BR, Carwell DB, Hill RA, Bondioli KR, Godke RA, Gentry GT. Evaluation of capsule permeability in the equine blastocyst. *Equine Vet J* 2012, 32: 795-798.

Seidel GE. Cryopreservation of equine embryos. *Vet Clin North Am Equine Pract* 1996, 12: 85-99.

Slade NP, Takeda T, Squires EL, Elsdon RP. Development and viability of frozen-thawed equine embryos. *Theriogenology* 1984, 21: 263.

Squires EL, Garcia RH, Ginther OJ. Factors affecting the success of equine embryo transfer. *Equine Vet J* 1985, 3: 92-95.

Squires EL, Garcia RH, Ginther OJ, Voss JL, Seidel Jr GE. Comparison of equine pituitary extract and follicle stimulating hormone for superovulating mares. *Theriogenology* 1986, 26: 661-670.

Squires EL, McKinnon AO, Carnevale EM, Morris RP, Nett TM. Reproductive characteristics of spontaneous single and double ovulating mares and superovulated mares. *J Reprod Fertil* 1987, 35: 399-403.

Squires EL, Rowley HR, Nett TM. Comparison of pulsatile versus constant release of GnRH for superovulation in mares. *J Anim Sci* 1989a, 65: 391-392.

Squires EL, Seidel Jr GE, McKinnon AO. Transfer of cryopreserved equine embryos to progesterin-treated ovariectomized mares. *Equine Vet J* 1989b, 8: 89-91.

Squires EL, McCue PM, Vanderwall D. The current status of equine embryo transfer. *Theriogenology* 1999, 51: 91-104.

Stout TA, Meadows S, Allen WR. Stage-specific formation of the equine blastocyst capsule is instrumental to hatching and to embryonic survival in vivo. *Anim Reprod Sci* 2005, 87: 269-281.

Vogelsang SG, Vogelsang MM. Influence of donor parity and age on the success of commercial embryo transfer. *Equine Vet J* 1989, 8: 71-73.

Wilsher S, Kolling M, Allen WR. Meclofenamic acid extends donor-recipient asynchrony in equine embryo transfer. *Equine Vet J* 2006, 38: 428-432.

Wilson JM, Caececi T, Potter GD, Kraemer DC. Ultrastructure of cryopreserved horse embryos. *J Reprod Fertil* 1987, 35: 405-417.

Wimel L, Peugnet PM, Reigner F, Chaffaux S, Sandersen C, Serteyn D, Chavatte-Palmer P. Postnatal growth after between-breeds embryo transfer in horses. *J Equine Vet Sci* 2014, 34: 230.

Woods GL, Ginther OJ. Induction of multiple ovulations during the ovulatory season in mares. Theriogenology 1983, 20: 347-355.

Woods GL, Hillman RB, Schlafer DH. Recovery and evaluation of embryos from normal and infertile mares. Cornell Vet 1986, 76: 386-394.

Yamamoto Y, Oguri N, Tsutsumi Y, Hachinohe Y. Experiments in the freezing and storage of equine embryos. J Reprod Fertil 1982, 32: 399-403.

Suomen Hippos ry. Alkionsiirtosääntö.
[http://www.hippos.fi/jalostus_ja_nayttelyt/jalostusohjesaannot/alkionsiirtosaanto_\(sh_ja_lv\)](http://www.hippos.fi/jalostus_ja_nayttelyt/jalostusohjesaannot/alkionsiirtosaanto_(sh_ja_lv)), haettu 19.2.2014, päivitetty 22.8.2007.