Przyczyny, diagnostyka oraz zapobieganie wczesnej zamieralności zarodków u klaczy

ROLAND KOZDROWSKI, KORNELIA OMYŁA*

Katedra Diagnostyki i Nauk Klinicznych, Instytut Medycyny Weterynaryjnej,
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, ul. Gagarina 7, 87-100 Toruń;

*Dartbrook Equine Veterinary Clinic, Scone, Australia

Otrzymano 02.06.2020

Zaakceptowano 06.08.2020

Kozdrowski R., Omyła K.

Early embryonic death in mares: The causes, diagnosis and prevention

Summary

The aim of this study was to describe the most important causes of early embryonic death (EED) in mares, as well as diagnostic methods and possible prevention procedures. Ageing and subclinical endometritis are described and discussed in detail as the most important causes of EED in mares. EED is also discussed in relation to foaling heat breeding and the time of insemination or natural cover. Other causes of EED discussed in the study are progesterone deficiency due to primary corpus luteum dysfunction, mare's weight loss, chromosomal abnormality and abnormal embryonic vesicle fixation. Positive effects can be achieved through maintaining ideal body condition, diagnosis and treatment of subclinical endometritis, appropriate care of the mare in the postpartum period, avoiding mating those mares that may ovulate before the 10th day after delivery, as well as monitoring the genital tract after mating for persistent post-breeding induced endometritis. Administration of altrenogest should be reserved for those cases in which endometritis has been ruled out as the cause of EED.

Keywords: mare, early embryonic death, diagnosis, prevention

Okres zarodkowy u koni trwa przez pierwsze sześć tygodni ciąży, tj. do czasu, aż zarodek osiągnie szczyt pęcherzyka zarodkowego, redukcji ulegnie woreczek żółtkowy oraz rozpocznie się formowanie sznura pępowinowego (18). W pierwszym okresie ciąży można wyróżnić kilka istotnych etapów: 1) przejście zarodka w 5.-6. dniu od zapłodnienia w stadium moruli lub wczesnej blastocysty z jajowodu do macicy; 2) okres wewnątrzmacicznej migracji, w trakcie którego glikoproteinowa kapsuła umożliwia zachowanie sferycznego kształtu pęcherzyka zarodkowego, a woreczek żółtkowy odgrywa dominującą rolę w odżywianiu zarodka; 3) fiksacja pęcherzyka zarodkowego 16. dnia od zapłodnienia, czyli zakończenie wewnątrzmacicznej migracji; 4) orientacja pęcherzyka zarodkowego, czyli takie usytuowanie, w wyniku którego biegun pęcherzyka, w którym pojawi się zarodek, będzie znajdował się u dołu – proces ten zachodzi wkrótce po fiksacji; 5) formowanie kubków endometrialnych oraz dodatkowych ciałek żółtych po upływie pięciu tygodni od zapłodnienia (18).

W okresie zarodkowym utrata ciąży wiąże się z całkowitą resorpcją zarodka i przebiega bez towarzyszących objawów ogólnych, przy czym szczególnie krytyczne są pierwsze dwa-cztery tygodnie ciąży (6,

45, 60). Jeśli do śmierci zarodka dojdzie przed wytworzeniem kubków endometrialnych, wówczas w ciągu kilku dni klacz może wejść w ruję, jednak aktywność płciowa klaczy zostanie zahamowana, jeżeli śmierci zarodka towarzyszy uformowanie przetrwałego ciałka żółtego. Likwidacja ciałka żółtego przetrwałego w drodze podania PGF₂α lub jej analogów rozwiązuje problem. Niestety, utrata ciąży po uformowaniu kubków endometrialnych nie kończy ich funkcjonowania, co manifestuje się zaburzeniami w przebiegu cyklicznej aktywności płciowej, niejednokrotnie trwającymi nawet do końca sezonu rozrodczego. Z hodowlanego punktu widzenia sezon rozrodczy dla takiej klaczy jest stracony. Najszybciej w tych przypadkach klacz może zająć w ciążę dopiero w kolejnym sezonie rozrodczym. Sporadycznie utrata ciąży zachodząca po wykształceniu kubków endometrialnych może wiązać się z kontynuacją produkcji eCG trwającą dłużej niż wynosi typowy okres funkcjonowania kubków endometrialnych, co manifestuje się sięgającym nawet 30 miesięcy brakiem cyklicznej aktywności płciowej (52). Funkcjonowanie przetrwałych kubków endometrialnych może również prowadzić do zaburzeń owulacji, co przejawia się cyklicznym formowaniem krwotocznych nieowulujących pęcherzyków (10).

Najpewniejszą metodą diagnostyczną w takich przypadkach jest pomiar stężenia eCG oraz histeroskopia. Skuteczne metody likwidacji przetrwałych kubków endometrialnych nie są szczegółowo opracowane. Podejmowano próby laserowej ablacji przetrwałych kubków endometrialnych, a wlewy domaciczne kerozyny nie muszą być skuteczne (10, 47).

Utrata wczesnej ciąży w pewnych przypadkach może być rozpatrywana jako mechanizm adaptacyjny, mający na celu zahamowanie rozwoju zarodka obarczonego wadami genetycznymi (u koni bardzo rzadko rodzą się potworki). Do wczesnej zamieralności zarodków (WZZ) dochodzi również podczas spontanicznej redukcji ciąży bliźniaczej do pojedynczej na jej wczesnym etapie rozwoju, tj. wkrótce po fiksacji pęcherzyka zarodkowego. Częstotliwość spontanicznej redukcji w przypadku ciąży bliźniaczej jednoróżnej (pęcherzyki zarodkowe stykają się ze sobą) wynosi blisko 90% (18). Im większa jest dysproporcja wielkości stykających się ze sobą pęcherzyków zarodkowych, tym prawdopodobieństwo redukcji jest większe i zachodzi szybciej (18). Mechanizm spontanicznej redukcji polega prawdopodobnie na tym, że mniejszy, ulegający redukcji pęcherzyk zarodkowy kontaktując się z większym pęcherzykiem zarodkowym poprzez fragment ściany odpowiedzialny za transfer substancji odżywczych (warstwa unaczyniona, ułożona na biegunie pęcherzyka zarodkowego, w którym pojawi się zarodek), ma zaburzony proces odżywiania i doprowadza to do „śmierci głodowej” mniejszego z bliźniąt. Tymczasem większy pęcherzyk zarodkowy kontynuuje rozwój bez zakłóceń, bowiem kontaktuje się z mniejszym pęcherzykiem tą częścią ściany, która nie bierze bezpośredniego udziału w odżywianiu (nieunaczyniona, ułożona na biegunie przeciwnym do miejsca pojawienia się zarodka), a więc jego proces odżywiania nie ulega zaburzeniu (18). Prawdopodobnie podczas procesu orientacji w przebiegu ciąży bliźniaczej jednoróżnej pęcherzyki zarodkowe umiejscawiają się w stosunku do siebie tak, aby była możliwa naturalna redukcja jednego z nich. W przypadku stykających się ze sobą pęcherzyków zarodkowych o zbliżonej wielkości, w zależności od ich wzajemnej orientacji, może dojść do śmierci obydwu lub rozwój ciąży bliźniaczej będzie kontynuowany.

Niestety, straty ponoszone przez hodowców koni na tle WZZ są duże i w większości przypadków śmierć zarodka związana jest z nieprawidłowościami w zakresie funkcjonowania narządu płciowego. Szacuje się, że częstotliwość występowania WZZ waha się w zakresie od 2,6% do 24%, przy czym najczęściej jest notowana u klaczy powyżej osiemnastego roku życia i może przekraczać 30% ogółu ciąży (56). Celem opracowania jest przybliżenie diagnostyki, najważniejszych przyczyn oraz możliwych metod postępowania, mających na celu ograniczenie występowania WZZ u koni.

Diagnostyka

Rozpoznanie WZZ opiera się na wywiadzie oraz na stwierdzeniu utraty ciąży w kolejnym badaniu, pomimo pozytywnego wyniku pierwszego badania klaczy w kierunku żrebności. Pierwsze badanie klaczy w kierunku żrebności z wykorzystaniem techniki ultrasonograficznej rutynowo jest wykonywane po upływie dwóch tygodni od krycia/inseminacji, choć wykrycie pęcherzyka zarodkowego możliwe jest już od około 9. dnia po zapłodnieniu. Kolejne badanie często jest wykonywane 2-3 tygodnie później, co pozwala szczególnie monitorować przebieg wczesnej ciąży oraz dokumentować przypadki WZZ. Badanie ultrasonograficzne umożliwia również w niektórych przypadkach, szczególnie w okresie migracji pęcherzyka zarodkowego oraz w okresie okołofiksacyjnym, zaobserwowanie zmian, które mogą wskazywać na zbliżającą się utratę ciąży. Można do nich zaliczyć: nieregularny kształt pęcherzyka zarodkowego, wzrost echogeniczności pęcherzyka i/lub jego ściany oraz zachowaną mobilność pęcherzyka zarodkowego powyżej 16. dnia od owulacji. Również pęcherzyki zarodkowe, które są mniejsze od typowych pęcherzyków w danym dniu ciąży są bardziej podatne na resorpcję (6, 19, 37, 45). Średnia wielkość pęcherzyka zarodkowego w 13. dniu ciąży wynosi $12,4 \pm 1,8$ mm, w 14. dniu $15,8 \pm 4$ mm, a w 15. dniu $20,1 \pm 3$ mm (11). Jeżeli średnica pęcherzyka zarodkowego w okresie wewnątrzmacicznej migracji w danym dniu ciąży odpowiada wielkości pęcherzyka o dwa dni młodszego, wówczas można spodziewać się resorpcji zarodka (37). Ocena taka, z praktycznego punktu widzenia, obciążona jest dużym błędem i bez znajomości terminu owulacji jest zupełnie nieprzydatna. Podejrzenie zbliżającej się śmierci zarodka może także budzić brak lub małe rozmiary ciała żółtego, szczególnie, jeżeli towarzyszy temu nadmierny obrzęk *endometrium*, a w badaniu palpacyjnym macicy stwierdza się słabe jej napięcie. Brak zarodka w pęcherzyku zarodkowym po upływie 20 dni od owulacji, jak również brak akcji serca niesie ze sobą wysokie prawdopodobieństwo resorpcji (40, 56).

Wiek klaczy

Wpływ wieku klaczy na częstotliwość występowania WZZ jest istotny, co dobrze obrazują dane uzyskane z obserwacji przeprowadzonych na licznej grupie koni, w których wykazano, że straty zarodkowe w okresie 15.-35. dnia ciąży u klaczy w wieku 3-8 lat wynoszą 4,7%; w przedziale 9-13 lat – 13,8%; w przedziale 14-18 lat – 21,6%; a w wieku powyżej 18 lat sięgają 22,9% (36). Niemniej trudno jest wyznaczyć punkt krytyczny, po przekroczeniu którego prawdopodobieństwo wystąpienia WZZ istotnie wzrasta. Na podstawie cytowanych danych można przyjąć wiek 14 lat, choć niektórzy autorzy przesuwają tę granicę o kolejne cztery lata (41). Przenosząc 4-dniowe za-

rodki pozyskane z jajowodów klaczy młodych oraz starszych do młodych klaczy biorczyń odnotowano czternastego dnia istotne różnice w zakresie odsetka żrebności, tj. w 52% przypadków stwierdzono rozwój ciąży po transferze zarodków pozyskanych od klaczy młodych i w 23% przypadków stwierdzono rozwój ciąży po transferze zarodków pozyskanych od klaczy starszych (4). Oszacowano również, że u klaczy młodych śmiertelność zarodkowa w okresie od 4. do 14. dnia ciąży wynosi 9%, a u klaczy starszych aż 62% (4). Powyższe dane wskazują, że główną przyczyną strat zarodkowych u klaczy starszych są zaburzenia zachodzące w obrębie zarodków uniemożliwiające ich dalszy rozwój, bowiem transfer zarodków od klaczy starszych do młodych klaczy biorczyń, które nie miały chorób macicy, był mniej efektywny. Zaburzenia w rozwoju zarodków mogą bezpośrednio wynikać z nieprawidłowości w obrębie oocytów, np. zmian chromosomalnych, które nie utrudniają zapłodnienia, lecz uniemożliwią dalszy prawidłowy rozwój zarodka. Niestety, nie ma żadnych możliwości poprawy jakości oocytów, jednakże zauważono, że częstotliwość mnogich owulacji wzrasta u klaczy wraz z wiekiem (14). Można przypuszczać, że mnogiej owulacji towarzyszy wyższe prawdopodobieństwo, że przynajmniej jeden z oocytów będzie posiadał cechy umożliwiające rozwój prawidłowej ciąży. Być może jest to mechanizm adaptacyjny, gwarantujący klaczom możliwość wydawania potomstwa w zaawansowanym wieku. Takie założenie może być racjonalne, ponieważ w przypadku ewentualnego rozwoju ciąży bliźniaczej istnieje u koni wcześniej opisany mechanizm stosunkowo sprawnej spontanicznej redukcji ciąży mnogiej do pojedynczej.

Należy zaznaczyć, że wraz z wiekiem wzrasta również stopień zmian degeneracyjnych w obrębie *endometrium*, tj. *endometrosis* (53), co może prowadzić do zaburzeń w procesie odżywiania zarodka. Niestety, zmiany zwyrodnieniowe są nieodwracalne i również w tym przypadku możliwość ingerencji lekarskiej jest ograniczona. Proponowane metody postępowania w przypadku *endometrosis* nie są dobrze udokumentowane i należy podchodzić do nich z dużą rezerwą. Jednym ze sposobów mogą być domaciczne wlewy roztworu DMSO zawieszonego w płynie fizjologicznym (28). Trwają również prace nad zastosowaniem mezenchymalnych komórek macierzystych podawanych w formie infuzji domacicznych (30), jednak trzeba jeszcze poczekać na efekty i możliwości praktycznego wykorzystania tego typu terapii. W tym miejscu należy skomentować prawdopodobny wpływ cyst limfatycznych, których występowanie wzrasta wraz z wiekiem klaczy, na przebieg wczesnej ciąży. Ich obecność może zaburzać wewnątrzmaciczną migrację pęcherzyka zarodkowego, przez co wpływać negatywnie na proces matczynego rozpoznania ciąży (32). W przypadku fiksacji pęcherzyka zarodkowego w sąsiedztwie dużej cysty zaburzeniu może ulec pro-

ces jego odżywiania, a mechanizm ten jest zbliżony do „zagłodzenia” zarodka w przebiegu spontanicznej redukcji ciąży bliźniaczej (37). Wyniki części obserwacji klinicznych wskazują na negatywny wpływ cyst limfatycznych na przebieg wczesnej ciąży (35, 54), z kolei inne tego nie potwierdzają (16). Należy przypuszczać, że próba jednoczynnikowej analizy wpływu cyst limfatycznych na przebieg wczesnej ciąży wiąże się z możliwością uzyskiwania odmiennych wyników.

Zapalenie błony śluzowej macicy

Endometritis może wystąpić niezależnie od wieku klaczy, choć prawdopodobieństwo wystąpienia zapalenia błony śluzowej macicy jest większe u klaczy starszych, a przebieg podkliniczny choroby może nie być rozpoznany i przez to stanowić ważną przyczynę WZZ (13, 25, 27, 45). W wyniku toczącego się w obrębie *endometrium* procesu zapalnego dochodzi do wzrostu koncentracji $\text{PGF}_2\alpha$, co doprowadza do przedwczesnej luteolizy i w konsekwencji do utraty wczesnej ciąży (55, 58). Spadek stężenia progesteronu jest w większości przypadków skutkiem, a nie bezpośrednią przyczyną WZZ (22, 45), dlatego też należy uznać, że chorobowo zmienione środowisko macicy zaburza fizjologiczną interakcję między *endometrium* a zarodkiem. *Endometritis subclinica* może przebiegać bez akumulacji płynu w macicy i być nierozpoznane w trakcie rutynowego badania ultrasonograficznego narządu płciowego (17, 27). Podejrzenie choroby budzą nieefektywne krycia oraz incydenty WZZ. W celu rozpoznania *endometritis subclinica* należy pobrać wycinek *endometrium*, wymaz (szczoteczką lub wymazówką) lub popłuczyny z macicy i przeprowadzić w zależności od rodzaju pobranego materiału badanie histologiczne, cytologiczne oraz mikrobiologiczne (43, 51). Podkliniczne infekcyjne zapalenie błony śluzowej macicy stwierdzano aż u 1/4 potencjalnie zdrowych klaczy kierowanych do sztucznej inseminacji (49). U klaczy resorbujących zarodki odnotowano wzrost stężenia białek ostrej fazy (serum amyloid A oraz haptoglobiny), co może sugerować, że przyczyną wczesnej utraty ciąży jest *endometritis subclinica* (25). Niektóre badania nie potwierdzają jednak wiodącej roli zapalenia błony śluzowej macicy w patogenezie WZZ, choć w ramach tych badań stosunkowo często izolowano β -hemolityczne paciorkowce grupy C, w tym *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* z materiału pobranego z macicy klaczy z historią WZZ (15). *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*, bakteria bardzo często odpowiedzialna za wywołanie *endometritis*, może pod wpływem bliżej nierozpoznanych czynników penetrować do głębszych warstw *endometrium*, tworząc formy „uśpione”, co utrudnia ich identyfikację (46). Wykazano wyższą czułość diagnostyczną posiewu wykonanego bezpośrednio z wycinka *endometrium* niż posiewu wykonanego z materiału pobranego wymazówką (43), co można

tłumaczyć możliwością bytowania *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* pod warstwami nabłonka błony śluzowej macicy i dlatego ta metoda diagnostyczna powinna być szerzej stosowana, szczególnie w przypadkach, w których trudno jest ustalić przyczynę niepłodności, w tym resorpcji zarodków. Opracowano również pożywkę (bActivate), stosowaną w formie wlewu domacicznego, która aktywuje paciorkowce i ułatwia ich identyfikację (46). Obecność form uśpionych *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* może również determinować skuteczność antybiotykoterapii. Z uwagi na bytowanie bakterii w głębszych warstwach *endometrium* ogólne podawanie antybiotyków powinno być brane pod uwagę w pierwszej kolejności, a nie terapia miejscowa.

Okres poporodowy

Szybkie wznowienie aktywności płciowej umożliwia zażrebiecie klaczy już w ciągu pierwszych dwóch tygodni po porodzie. Dane dotyczące WZZ u klaczy krytych w rui źrebięcej nie są jednoznaczne (2, 7, 21, 31, 35, 36, 42, 60), a prawdopodobieństwo śmierci zarodka w tym okresie jest wypadkową wieku klaczy, kondycji, przebiegu porodu, stopnia involucji macicy, stanu zdrowotnego *endometrium* oraz jest zależne od terminu wystąpienia owulacji. Im prędzej dojdzie do pierwszej owulacji po porodzie, tym prawdopodobieństwo WZZ wzrasta, ponieważ im mniej czasu upłynie od porodu do zejścia zarodka do macicy, tym gorzej przygotowane jest jej środowisko do podtrzymania wczesnej ciąży. Płodność klaczy jest tym wyższa, im później wystąpi ruja źrebięcia (21), a klacze, które owulują przed upływem 10 dnia od porodu, są bardziej predysponowane do WZZ (29), choć niektóre badania nie potwierdzają takich zależności (35). Znając czynniki ryzyka WZZ można odstąpić od krycia w rui źrebięcej tych klaczy, które miały komplikacje porodu i okresu poporodowego, tj. udzielano im pomocy porodowej, doszło do zatrzymania błon płodowych i/lub poporodowego zapalenia macicy oraz odnotowano w badaniu palpacyjnym słabą reaktywność macicy, co może wskazywać na zaburzenia involucji tego narządu. Należy w tym okresie również podchodzić ostrożnie do prób zażrebiecia klaczy starszych. Monitorując przebieg rui źrebięcej i śledząc dynamikę wzrostu pęcherzyka dominującego, można odstąpić od prób zażrebiania tych klaczy, u których podejrzewana się możliwość wystąpienia owulacji przed upływem 10 dni od porodu. Z kolei zaleganie płynu w macicy w okresie rui źrebięcej może świadczyć o opóźnieniu involucji macicy i jest czynnikiem predysponującym do wystąpienia postanówkowego zapalenia błony śluzowej macicy, niemniej dane dotyczące wpływu płynu zalegającego w macicy w trakcie rui źrebięcej na płodność klaczy krytych w tym okresie nie są jednoznaczne (31, 34). Każdy przypadek, któremu towarzyszy obecność płynu w macicy w trakcie rui

źrebięcej, musi być rozpatrywany indywidualnie. Podejmując decyzję o kryciu/odstąpieniu od krycia w takich przypadkach należy wziąć pod uwagę ilość i stopień echogeniczności płynu zalegającego w macicy, wiek i kondycję klaczy, przebieg porodu i okresu poporodowego, a następnie w oparciu o przeprowadzone badania i dane uzyskane z wywiadu należy ocenić ryzyko wystąpienia *endometritis* i WZZ. Po kryciu/inseminacji w rui źrebięcej należy monitorować stan narządu płciowego, a w przypadku akumulacji płynu w macicy tok postępowania powinien być taki sam, jak w przypadku postanówkowego zapalenia błony śluzowej macicy. W rui źrebięcej nie zaleca się również inseminacji klaczy nasieniem mrożonym, ale można skrócić pierwszą fazę lutealną w drodze podania $\text{PGF}_2\alpha$ lub jej analogów i przez to przyspieszyć wystąpienie drugiej rui.

Termin krycia/inseminacji

Przyjmuje się, że oocyt koński zachowuje zdolność do zapłodnienia przez około 24 godz. od owulacji, lecz im później dojdzie do zapłodnienia, tym wyższe jest prawdopodobieństwo śmierci zarodka, co może wiązać się z narastającymi, zależnymi czasowo zaburzeniami zachodzącymi w oocyocie. Straty zarodkowe mogą wynosić aż 34% u klaczy inseminowanych po owulacji w porównaniu do 14% strat notowanych u klaczy inseminowanych przed owulacją (61). W jednym z badań odnotowano straty zarodkowe sięgające 34,6% u klaczy krytych 16-24 godz. po owulacji i aż 75% strat u klaczy krytych w przedziale 24-32 godz. po owulacji (38). Zauważono, że krycie oraz inseminacja nasieniem mrożonym przeprowadzone po owulacji wiążą się z wolniejszym wzrostem pęcherzyków zarodkowych (11), tak więc opóźnione zapłodnienie może wiązać się z wolniejszym tempem wzrostu zarodka, a mniejszy zarodek być może nie jest w stanie zahamować luteolizy. Z kolei po inseminacji nasieniem schłodzonym przeprowadzonej w okresie 24 godz. przed do 16 godz. po owulacji nie wykazano istotnych różnic w zakresie skuteczności zabiegu i częstotliwości WZZ (38). Również inseminacja klaczy nasieniem mrożonym wykonana w przedziale 6 godz. przed do 6 godz. po owulacji nie wpływa na częstotliwość WZZ (5). Co więcej, niektóre obserwacje wskazują, że inseminacja nasieniem mrożonym przeprowadzona do 15 godz. po owulacji nie wpływa na skuteczność zabiegu i WZZ (41). Są to istotne z praktycznego punktu widzenia dane, bowiem w przypadku inseminacji nasieniem mrożonym coraz częściej odchodzi się od badania klaczy w kierunku owulacji co 6 godz. na rzecz dwukrotnego badania na dobę (41). Jednakże należy pamiętać, że deponując nasienie po owulacji wzrasta prawdopodobieństwo rozwoju postanówkowego zapalenia błony śluzowej macicy, ponieważ wzrost stężenia progesteronu oraz zamknięcie szyjki prowadzą do osłabienia procesów

oczyszczania macicy (3, 20), dlatego, aby zmniejszyć prawdopodobieństwo wystąpienia WZZ, niektórzy autorzy zalecają przeprowadzenie w takich przypadkach profilaktycznej terapii w kierunku postanówkowego zapalenia błony śluzowej macicy (38, 41).

Niedostateczna produkcja progesteronu

Pierwotna dysfunkcja ciała żółtego, jako przyczyna WZZ, nie jest dobrze udokumentowana u klaczy (1, 22, 45, 56) i dotyczy opisu pojedynczych przypadków (8). Spadek stężenia progesteronu może być wynikiem luteolizy, u podłoża której leżą *endometritis* lub endotoksemia, zaburzenia w obrębie zarodka uniemożliwiające przekształcenie ciała żółtego cyklicznego w ciążowe oraz stres (12). Towarzyszący obecności pęcherzyka zarodkowego obrzęk *endometrium* w 15.-17. dniu ciąży może być spowodowany spadkiem koncentracji progesteronu (37). Zaobserwowano, że WZZ u części klaczy towarzyszy począwszy od czwartego dnia od owulacji spadek stężenia progesteronu (25). Z kolei inne badania wskazują, że w większości przypadków spadek stężenia progesteronu jest skutkiem, a nie przyczyną WZZ, bowiem nie odnotowywano poprzedzającego wystąpienie śmierci zarodka spadku stężenia progesteronu (22, 45). Tymczasem stosunkowo często klacze z historią WZZ, u których nie stwierdzono żadnej specyficznej przyczyny utraty ciąży, są suplementowane progesteronem lub jego pochodnymi (1, 56). To zagadnienie wymaga rozważenia kilku kwestii. Po pierwsze, aktywność biologiczną u koni wykazuje jedynie progesteron oraz syntetyczny altrenogest, z kolei inne pochodne progesteronu, takie jak: me-droksyprogesteron, hydroksyprogesteron, megestrol lub norgestomed, nie są u koni aktywne biologicznie (33). Po drugie, przyjmuje się, że stężenie progesteronu we krwi przekraczające 4 ng/ml we wczesnej ciąży jest wystarczające do jej utrzymania (8, 50). Po trzecie, przesłankami przemawiającymi za koniecznością podjęcia suplementacji gestagenami są spadek koncentracji progesteronu poniżej tej krytycznej wartości oraz słabe napięcie macicy i/lub nasilenie obrzęku *endometrium*, mobilność pęcherzyka zarodkowego po 16 dniu od zapłodnienia, istotnie mniejsza średnica pęcherzyka zarodkowego w danym dniu ciąży oraz trudności w stwierdzeniu ciała żółtego ciążowego. Po czwarte, ciągle pozostaje otwarte pytanie o termin rozpoczęcia suplementacji, natomiast jej zakończenie rekomendowane jest na około 100. dzień ciąży, a więc wówczas, kiedy łożysko staje się głównym źródłem gestagenów (12, 44). Najczęściej podaje się doustnie altrenogest w dawce 0,044 mg/kg/dobę (59), rozpoczynając terapię zaraz po pierwszym stwierdzeniu ciąży tj. od około 14. dnia, przy czym nie brak opinii, że suplementację należy rozpocząć już 3.-4. dnia po owulacji (12), jednakże tak szybkie rozpoczęcie terapii może przyczynić się do osłabienia procesów samooczyszczania macicy, przyspieszenia zamknięcia

szyjki, a przez to doprowadzić do postanówkowego zapalenia błony śluzowej macicy (12). Przy wczesnym rozpoczęciu suplementacji klacz powinna być zatem monitorowana w kierunku wystąpienia objawów postanówkowego zapalenia błony śluzowej macicy, a później w kierunku przebiegu ciąży i celowości kontynuacji terapii. Altrenogest podawany od szóstego dnia po owulacji nie ma negatywnego wpływu na efektywność inseminacji i na przebieg ciąży (59). Ponadto u klaczy starszych dochodzi do opóźnienia w rozwoju zarodka/płodu względem klaczy młodszych, a terapia altrenogestem niweluje te różnice (59).

Poprawę wskaźnika ciąży oraz ograniczenie strat zarodkowych można również uzyskać podając klaczom w okresie 8.-11. dnia od owulacji buserelinę (analog GnRH) w dawce 40 µg (48). Również inne badania wskazują na możliwy pozytywny wpływ analogów GnRH podawanych w fazie *diestrus* na przebieg wczesnej ciąży u klaczy (24, 40), choć nie jest znany mechanizm odpowiedzialny za ograniczenie strat zarodkowych po podaniu tych środków. Być może podanie w tym okresie analogu GnRH przeciwdziała regresji ciała żółtego, co umożliwia kontynuację rozwoju tych zarodków, które samodzielnie nie mogłoby zablokować luteolizy (48), przy czym wiadomo, że iniekcja analogu GnRH u klaczy w fazie lutealnej nie wpływa na produkcję progesteronu, ale doprowadza do wzrostu stężenia LH i FSH oraz perfuzji w obrębie ciała żółtego (9, 24).

Inne przyczyny WZZ

Warunki pielęgnacji, żywienia i utrzymania mogą również wpływać na przebieg wczesnej ciąży. Przykładowo, WZZ może stosunkowo często dotyczyć klaczy, u których w okresie wczesnej ciąży odnotowano spadek masy ciała (42). Wykazano, że spadek kondycji między 17. a 35. dniem po owulacji sprzyja resorpcji zarodków (35). Klacze z zaburzeniami genetycznymi są predysponowane do resorpcji zarodków, przy czym dane z wywiadu potwierdzające urodzenie źrebięcia nie muszą wykluczać subtelnych zaburzeń genetycznych klaczy (26). Również po kryciu niektórymi ogierami częściej może dochodzić do WZZ (2). W końcu ufixowanie pęcherzyka zarodkowego w miejscu atypowym, np. w pobliżu ujścia jajowodu lub w trzonie macicy, szczególnie w bliskości szyjki, predysponuje do WZZ (23, 37).

Na przebieg wczesnej ciąży wpływa wiele czynników, a odpowiednie przygotowanie klaczy do stanówki może ograniczyć częstotliwość występowania WZZ. Na pierwszy rzut oka wydaje się to trudne, szczególnie u klaczy starszych, jednakże utrzymywanie klaczy w dobrej kondycji, odpowiednia diagnostyka oraz leczenie *endometritis subclinica*, opieka nad klaczą w okresie poporodowym oraz unikanie krycia tych klaczy, u których do owulacji może dojść przed upływem 10. dnia od porodu, jak również monitoring narządu

plciowego po kryciu w kierunku postanówkowego zapalenia błony śluzowej macicy mogą przynieść wymierne efekty. Natomiast możliwość podawania altrenogestu należy w zasadzie zarezerwować do tych przypadków, w których wykluczono *endometritis* jako przyczynę WZZ.

Piśmiennictwo

- Allen W. R.: Luteal deficiency and embryo mortality in the mare. *Reprod. Dom. Anim.* 2001, 36, 121-131.
- Allen W. R., Brown L., Wright M., Wilsher S.: Reproductive efficacy of flat race and national Hunt Thoroughbred mares and stallions in England. *Equine Vet. J.* 2007, 39, 438-445.
- Avanzi B. R., Ramos R. S., Araujo G. H. M., Fioratti E. G., Trinca L. A., Dell'Aqua J. A., Oña C. M. M., Zahn F. S., Martin I., Alvarenga M. A., Papa F. O.: Fixed-time insemination with frozen semen in mares: is it suitable for poorly fertile stallions? *Theriogenology* 2015, 83, 1389-1393.
- Ball B. A., Little T. V., Weber J. A., Woods G. L.: Survival of day-4 embryos from young, normal mares and aged, subfertile mares after transfer to normal recipient mares. *J. Reprod. Fert.* 1989, 85, 187-194.
- Barbacini S., Gulden P., Marchi V., Zavaglia G.: Incidence of embryo loss in mares inseminated before or after ovulation. *Equine Vet. Educ.* 1999, 11, 251-254.
- Bergfelt D. R., Woods J. A., Ginther O. J.: Role of the embryonic vesicle and progesterone in embryonic loss in mares. *J. Reprod. Fert.* 1992, 95, 339-347.
- Camillo F., Marmorini P., Romagnoli S., Vannozzi I., Bagliacca M.: Fertility at the first post partum estrous compared with fertility at the following estrous cycles in foaling mares and with fertility in nonfoaling mares. *J. Equine Vet. Sci.* 1997, 17, 612-616.
- Canisio I. F., Beltaire K. A., Bedford-Guas S. J.: Premature luteal regression in a pregnant mare and subsequent pregnancy maintenance with the use of oral altrenogest. *Equine Vet. J.* 2013, 45, 97-100.
- Castro T., Oliveira F. A., Siddiqui M. A. R., Baldrighi J. M., Wolf C. A., Ginther O. J.: Stimulation of LH, FSH, and luteal blood flow by GnRH during the luteal phase in mares. *Theriogenology* 2016, 85, 740-746.
- Crabtree J. R., Chang Y., Mestre A. M.: Clinical presentation, treatment and possible causes of persistent endometrial cups illustrated by two cases. *Equine Vet. Educ.* 2012, 24, 251-259.
- Cuervo-Arango J., Aguilar J., Newcombe J. R.: 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.
- Daels P. E.: Progesterone therapy and pregnancy loss. *AAEP Annual Resort Symposium*. Rome, Italy, January 19-21, 2006.
- Darenius K.: Early foetal death in the mare. Histological, bacteriological and cytological findings in the endometrium. *Acta Vet. Scand.* 1992, 33, 147-160.
- Davies Morel M. C. G., Newcombe J. R., Swindlehurst J. C.: The effect of age on multiple ovulation rates, multiple pregnancy rates and embryonic vesicle diameter in the mare. *Theriogenology* 2005, 63, 2482-2493.
- Długolecka E., Tobolski D., Janowski T.: Endometrial histopathology, bacteriology and cytology outcomes in mares with early embryonic death (EED): a field study. *Pol. J. Vet. Sci.* 2019, 22, 377-384.
- Eils B. E., Scholl D. T., Paccamonti D. L., Causey R., Klimczak J. C., Corley J. R.: Prevalence of endometrial cysts and their effect on fertility. *Biol. Reprod. Mon.* 1995, 1, 527-532.
- Gajos K., Kozdrowski R., Nowak M., Siemieniuch M. J.: Altered secretion of selected arachidonic acid metabolites during subclinical endometritis relative to estrous cycle stage and grade of fibrosis in mares. *Theriogenology* 2015, 84, 457-466.
- Ginter O. J.: Equine pregnancy: physical interactions between the uterus and conceptus. *AAEP Proceedings* 1998, 44, 73-104.
- Ginther O. J., Bergfelt D. R., Leith G. S., Scraba S. T.: Embryonic loss in mares: incidence and ultrasonic morphology. *Theriogenology* 1985, 24, 73-86.
- Gutjahr S., Paccamonti D. L., Pycock J. F., Taverne M. A., Dieleman S. J., van der Weijden G. C.: Effect of dose and day of treatment on uterine response to oxytocin in mares. *Theriogenology* 2000, 54, 447-456.
- Ishi M., Shimamura T., Utsumi A., Jitsukawa T., Endo M., Fukuda T., Yamanoi T.: Reproductive performance and factors that decrease pregnancy rate in heavy draft horses bred at foal heat. *J. Equine Vet. Sci.* 2001, 21, 131-136.
- Irvine C. H. G., Sutton P., Turner J. E., Mevrick P. E.: Changes in plasma progesterone concentrations from days 17 to 42 of gestation in mares maintaining or losing pregnancy. *Equine Vet. J.* 1990, 22, 104-106.
- Jobert M. L., LeBlanc M. M., Pierce S. W.: Pregnancy loss rate in equine uterine body pregnancies. *Equine Vet. Educ.* 2005, 17, 163-165.
- Kanitz W., Schneider F., Hoppen H. O., Unger C., Nürnberg G., Becker F.: Pregnancy rates, LH and progesterone concentrations in mares treated with GnRH agonist. *Anim. Reprod. Sci.* 2007, 97, 55-62.
- Krakowski L., Krawczyk C. H., Kostro K., Stefaniak T., Novotny F., Obara J.: Serum levels of acute phase proteins: SAA, Hp and progesterone (P4) in mares with early embryonic death. *Reprod. Dom. Anim.* 2011, 46, 624-629.
- Lear T. L., Raudsepp T., Lundquist J., Brown S. E.: Repeated early embryonic loss in a thoroughbred mare with a chromosomal translocation [64,XX,t(2;13)]. *J. Equine Vet. Sci.* 2014, 34, 805-809.
- LeBlanc M. M., Causey R. C.: Clinical and subclinical endometritis in the mare: both threats to fertility. *Reprod. Dom. Anim.* 2009, 44 (suppl. 3), 10-22.
- Ley W. B., Bowen J. M., Sponenberg D. P., Lessard P. N.: Dimethyl sulfoxide intrauterine therapy in the mare: Effects upon endometrial histological features and biopsy classification. *Theriogenology* 1989, 32, 263-276.
- Loy R. G.: Characteristics of post-partum reproduction in mares. *Vet. Clin. North Am. Larg. Anim. Pract.* 1980, 2, 345-349.
- Mambelli L. I., Mattos R. C., Winter G. H. Z., Madeiro D. S., Morais B. P., Malschitzky E., Miglino M. A., Kerkis A., Kerkis I.: Changes in expression pattern of selected endometrial proteins following mesenchymal stem cells infusion in mares with endometrosis. *PLoS ONE* 2014, 9 (6).
- Malschitzky E., Schilela A., Mattos A. L. G., Garbade P., Gregory R. M., Mattos R. C.: Effect of intra-uterine fluid accumulation during and after foal-heat and of different management techniques on the postpartum fertility of thoroughbred mares. *Theriogenology* 2002, 58, 495-498.
- McDowell K. J., Sharp D. C., Grubaugh W., Thatcher W. W., Wilcox C. J.: Restricted conceptus mobility results in failure of pregnancy maintenance in mares. *Biol. Reprod.* 1988, 39, 340-348.
- McKinnon A. O., Lescum T. B., Walter J. H., Vasey J. R., Allen W. R.: The inability of some synthetic progestagens to maintain pregnancy in the mare. *Equine Vet. J.* 2000, 32, 83-85.
- McKinnon A. O., Squires E. L., Harrison L. A., Blach E. L., Shidler R. K.: Ultrasonographic studies on the reproductive tract of mares after parturition: effect of involution and uterine fluid on pregnancy rates in mares with normal and delayed first postpartum ovulatory cycles. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1988, 192, 350-353.
- Miyakoshi D., Shikichi M., Ito K., Iwata K., Okai K., Sato F., Nambo Y.: Factors influencing the frequency of pregnancy loss among Thoroughbred mares in Hidaka, Japan. *J. Equine Vet. Sci.* 2012, 32, 552-557.
- Morris L. H. A., Allen W. R.: Reproductive efficiency of intensively managed Thoroughbred mares in Newmarket. *Equine Vet. J.* 2002, 34, 51-60.
- Newcombe J. R.: Embryonic loss and abnormalities of early pregnancy. *Equine Vet. Educ.* 2000, 12, 88-101.
- Newcombe J. R., Cuervo-Arango J.: The effect of time insemination with fresh cooled transported semen and natural mating relative to ovulation on pregnancy and embryo loss rates in the mare. *Reprod. Dom. Anim.* 2011, 46, 678-681.
- Newcombe J. R., Cuervo-Arango J.: The relationship between the positive identification of the embryo proper in equine pregnancies aged 18-28 days and its future viability: a field study. *J. Equine Vet. Sci.* 2012, 32, 257-261.
- Newcombe J. R., Martinez T. A., Peters A. R.: The effect of gonadotropin-releasing hormone analog, buserelin, on pregnancy rates in horse and pony mares. *Theriogenology* 2001, 55, 1619-1631.
- Newcombe J. R., Paccamonti D., Cuervo-Arango J.: Reducing the examination interval of ovulation below 12 h does not improve pregnancy rates after post-ovulatory insemination with frozen/thawed semen in mares. *Anim. Reprod. Sci.* 2011, 123, 60-63.
- Newcombe J. R., Wilson M. C.: Age, body weight, and pregnancy loss. *J. Equine Vet. Sci.* 2005, 25, 188-194.
- Nielsen J. M.: Endometritis in the mare: a diagnostic study comparing cultures from swab and biopsy. *Theriogenology* 2005, 64, 510-518.
- Ousey J. C.: Periparturient endocrinology in the mare and foetus. *Reprod. Dom. Anim.* 2004, 39, 222-231.
- Papa F. O., Lopes M. D., Alvarenga M. A., Meira C., Luvizotto M. C. R., Langoni H., Ribeiro E. F., Azedo A. E., Bomfin A. C. D.: Early embryonic death in mares: clinical and hormonal aspects. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.* 1998, 35, 170-173.

46. Petersen M. R., Skive B., Christoffersen M., Lu K., Nielsen J. M., Troedsson M. H. T., Bojesen A. M.: Activation of persistent *Streptococcus equi* subspecies zooepidemicus in mares with subclinical endometritis. *Vet. Microbiol.* 2015, 179, 119-125.
47. Podico G., Canisso I. F., Roady P. J., Austin S. M., Carossino M., Balasuriya U., Ellerbrock R. E., Lima F. S., Ferreira-Dias G., Douglas R. H.: Uterine responses and equine chorionic gonadotropin concentrations after two intrauterine infusions with kerosene post early fetal loss in mares. *Theriogenology* 2020, 147, 202-210.
48. Pycock J. F., Newcombe J. R.: The effect of the gonadotrophin-releasing hormone analog, buserelin, administered in diestrus on pregnancy rates and pregnancy failure in mares. *Theriogenology* 1996, 46, 1097-1101.
49. Rasmussen C. D., Petersen M. R., Bojesen A. M., Pedersen H. G., Lehn-Jensen H., Christoffersen M.: Equine infectious endometritis – clinical and subclinical cases. *J. Equine Vet. Sci.* 2015, 35, 95-104.
50. Sharp D. C.: The early fetal life of the equine conceptus. *Anim. Reprod. Sci.* 2000, 60-61, 679-689.
51. Sikora M., Król J., Nowak M., Stefaniak T., Aubertsson G., Kozdrowski R.: The usefulness of uterine lavage and acute phase protein levels as a diagnostic tool for subclinical endometritis in Icelandic mares. *Acta Vet. Scand.* 2016, 58, 50.
52. Steiner J., Antczak D. F., Wolfsdorf K., Saville K., Brooks S., Miller D., Bailey E., Zent W.: Persistent endometrial cups. *Anim. Reprod. Sci.* 2006, 94, 274-275.
53. Szóstek A. Z., Siemieniuch M. J., Lukasik K., Galvão A. M., Ferreira-Dias G. M., Skarzynski D. J.: mRNA transcription of prostaglandin synthases and their products in the equine endometrium in the course of fibrosis. *Theriogenology* 2012, 78, 768-776.
54. Tannus R. J., Thun R.: Influence of endometrial cysts on conception rate of mares. *Zentralbl. Veterinarmed. A* 1995, 2, 275-283.
55. Troedsson M. H. T.: Uterine clearance and resistance to persistent endometritis in the mare. *Theriogenology* 1999, 52, 461-471.
56. Vanderwall D. K.: Early embryonic loss in the mare. *J. Equine Vet. Sci.* 2008, 28, 691-702.
57. Vanderwall D. K., Squires E. L., Brinsko S. P., McCue P. M.: Diagnosis and management of abnormal embryonic development characterized by formation of an embryonic vesicle without embryo in mares. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 2000, 217, 58-63.
58. Vanroose G., de Kruif A., Van Soom A.: Embryonic mortality and embryo-pathogen interactions. *Anim. Reprod. Sci.* 2000, 60-61, 131-143.
59. Willman C., Schuler G., Hoffmann B., Parvizi N., Aurich Ch.: Effects of age and altrenogest treatment on conceptus development and secretion of LH, progesterone and eCG in early-pregnant mares. *Theriogenology* 2011, 75, 421-428.
60. Woods G. L., Baker C. B., Baldwin J. L., Ball B. A., Bilinski J., Cooper W. L., Ley W. B., Mank E. C., Erb H. N.: Early pregnancy loss in broodmares. *J. Reprod. Fert.* 1987, suppl. 35, 455-459.
61. Woods J., Bergfelt D. R., Ginther O. J.: Effects of time of insemination relative to ovulation on pregnancy rate and embryonic-loss rate in mares. *Equine Vet. J.* 1990, 22, 410-415.

Adres autora: prof. dr hab. Roland Kozdrowski, ul. Gagarina 7, 87-100 Toruń; email: roland.kozdrowski@umk.pl