

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE
FAKULTA AGROBIOLOGIE, POTRAVINOVÝCH A PŘÍRODNÍCH ZDROJŮ
KATEDRA VETERINÁRNÍCH DISCIPLÍN



Biotechnologické metody v reprodukci skotu

Bakalářská práce

Autor práce: Charlotte Rundová

Vedoucí práce: Ing. Jiří Šichtař, Ph. D.

© 2016 ČZU v Praze

ČESTNÉ PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci na téma „Biotechnologické metody v reprodukci skotu“ vypracovala samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 15. dubna 2016

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych touto cestou srdečně poděkovala svému vedoucímu práce Ing. Jiřímu Šichtařovi, Ph. D., který se mnou měl velkou trpělivost a byl mi velkou oporou.

Biotechnologické metody v reprodukci skotu

SOUHRN:

Bakalářská práce je zpracována formou literární rešerše a zabývá se tématem biotechnologických metod využívaných v současné době v reprodukci skotu. Popisovanými metodami jsou umělá inseminace, *in vitro* fertilizace a produkce embryí, embryotransfer.

Umělá inseminace je nejstarší, avšak chovateli stále upřednostňovanou metodou. Prvním krokem je odběr spermatu od vhodného býka. Provádí se zpravidla pomocí speciálně upravených umělých vagín. Odebraný ejakulát splňující požadované parametry se ředí, ošetřuje kryoprotektivy a plní do pejet o objemu 0,25 ml. Inseminace se provádí 8-12 hodin po odeznění říje.

Základním krokem *in vitro* fertilizace a produkce embryí je odběr oocytů, který je možný dvěma způsoby – *in vitro* (z poraženého zvířete) a *in vivo* (z živého zvířete). Výhodnější je druhý způsob, kdy máme možnost opakovaného odběru daného jedince pomocí neinvazivní transvaginální ultrazvukové punkce. Dílčí kroky *in vitro* fertilizace jsou zrání, oplození a kultivace. U všech třech zmíněných kroků je v dnešní době věnována pozornost především složení médií využívaných pro *in vitro* produkci embryí.

Poslední metodou je embryotransfer, kdy dochází k přenosu embryí získaných od dárkyně, do vybrané příjemkyně. Prvním krokem je právě výběr dárkyň a příjemkyň. U dárcovských jedinců se zohledňuje především genetický potenciál k produkci kvalitních embryí. U jedinců vybraných pro embryotransfer se následně provádí synchronizace říje za pomoci různých hormonálních preparátů, např. prostaglandiny, progesteron nebo progestiny. Tyto látky pracují na dvou principech – zkracování nebo prodlužování luteální fáze cyklu. Dalším krokem je superovulace dárce vedoucí k ovulaci velkého množství folikulů. Tím se zvyšuje šance na získání přenosuschopných embryí. K vyvolání superovulace se používá především FSH. Aplikace se provádí 8. - 12. den cyklu. Následně se dárkyně inseminují – 12, 24 a 36 hodin po nástupu estru. Embrya se získávají nechirurgickou cestou, a to výplachem děložních rohů inseminovaného dárce. Výplach se provádí dvojcestným Foleyovým katétrem. Během jednoho výplachu se zpravidla získá šest embryí požadované kvality, která mohou být přenesena do příjemkyně. Nejlepších výsledků je dosahováno při přenosu čerstvých sedmidenních embryí do děložního rohu.

KLÍČOVÁ SLOVA: umělá inseminace, superovulace, embryotransfer, *in vitro* fertilizace, skot

Biotechnological Methods in Reproduction of Cattle

SUMMARY:

The bachelor thesis is written in the form of literature review. The theme of the review is biotechnological methods that are currently used in the reproduction of cattle. Described methods are artificial insemination, *in vitro* fertilization and production of embryos, embryo transfer.

An artificial insemination is the oldest method but breeders still prioritize it. A necessary first step is semen collection from a suitable bull. Collection is performed with specially modified artificial vaginas. Removed ejaculate, which is appropriate, is diluted. After that, cryoprotectants are added and ejaculate is packed in straws. The volume of straw is 0,25 ml. Cows are inseminated 8-12 hours after estrus.

The basic step of *in vitro* fertilization and embryo production is an oocyte collection. There are two ways of oocyte collection – *in vitro* (from a slaughtered animal) and *in vivo* (from a live animal). The second way is better because there is a possibility of more frequent and non-invasive collection from one animal. Transvaginal ultrasound guided follicular aspiration is used for this purpose. Partial steps of *in vitro* fertilization are maturation, fertilization and cultivation. Nowadays, attention is directed to the composition of the culture media which are used for *in vitro* embryo production.

Embryo transfer is the last method. Embryos are transferred from the donor to the selected recipient. The first step is a selection of the donor and recipient. Genetic potential for the production of high quality embryos is the most important criterion for selection of the donors. Synchronization of estrus is carried out with different hormonal products in animals selected for embryo transfer. These products are e. g. prostaglandins, progesterone or progestins. There are two effects of used substances – shortening or lengthening of the luteal phase. Another step is a superovulation of the donor. This treatment leads to ovulation of a big amount of follicles. Chances for obtaining more transferable embryos are bigger. Superovulation is initiated with FSH. Application of FSH is performed by 8. – 12. day of estrus cycle. The following step is an insemination of the donor – 12, 24 and 36 hours after estrus detection. Embryos are obtained non-surgically from the inseminated donor by flushing of the uterine horns. Foley catheter is used for this flushing. Six embryos of required quality are usually obtained in one flushing. These embryos can be transferred to the recipient. The

best results are recorded in embryo transfer of the fresh 7-day embryos. They are usually transferred to the uterine horns.

KEYWORDS: artificial insemination, superovulation, embryo transfer, *in vitro* fertilization, cattle

OBSAH

1. ÚVOD	1
2. CÍL PRÁCE	2
3. LITERÁRNÍ PŘEHLED	3
3.1 UMĚLÁ INSEMINACE	3
3.1.1 Sperma	3
3.1.1.1 Odběr spermatu	3
3.1.1.2 Inseminační dávka	5
3.1.2 Proces umělé inseminace.....	6
3.1.2.1 Selekce krav pro inseminaci.....	6
3.1.2.2 Načasování umělé inseminace.....	7
3.1.2.3 Princip umělé inseminace.....	7
3.1.2.4 Výhody umělé inseminace	10
3.2 <i>IN VITRO</i> FERTILIZACE (IVF) A PRODUKCE EMBRYÍ (IVPE).....	10
3.2.1 Odběr oocytů	11
3.2.1.1 Odběr oocytů <i>in vitro</i>	11
3.2.1.2 Odběr oocytů <i>in vivo</i>	12
3.2.1.3 Kategorizace oocytů	14
3.2.2 Zrání oocytů.....	14
3.2.3 Oplození oocytů.....	15
3.2.4 Kultivace embryí	16
3.2.4.1 Hodnocení embryí	18
3.3 EMBRYOTRANSFER	23
3.3.1 Historie embryotransferu	23
3.3.2 Dílčí kroky embryotransferu	24
3.3.2.1 Selekce dárců a příjemců.....	24
3.3.2.2 Synchronizace pohlavního cyklu dárce a příjemce	25
3.3.2.3 Superovulace dárců	29
3.3.2.4 Inseminace dárců	35

3.3.2.5 Odběr embryí.....	36
3.3.2.6 Zpracování výplašku a hodnocení embryí.....	39
3.3.2.7 Přenos embryí.....	40
4. ZÁVĚR.....	42
5. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	43

1. ÚVOD

Problémy v oblasti reprodukce jsou v současnosti stále častější záležitostí, se kterou se potýká řada chovatelů skotu. Neplodnost a jiné nesnáze v reprodukci se mohou projevit jak na straně samce, tak i na straně samice. Pro chovatele znamenají veliké ztráty, a to zejména z hlediska finančního. Rozvoj biotechnologických metod přispívá k eliminaci či úplnému odstranění těchto problémů. Díky reprodukčním biotechnologiím vzrůstá šance na oplodnění a využití geneticky cenných jedinců, kteří se nemohou rozmnožovat přirozeným způsobem. Zároveň dochází ke snižování ztrát pro chovatele. Využívané metody jsou stále dokonalejší a zvyšuje se i jejich úspěšnost.

2. CÍL PRÁCE

Cílem práce je podat ucelený literární přehled o biotechnologických metodách využívajících se v současné době v reprodukci skotu.

3. LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 UMĚLÁ INSEMINACE

Umělá inseminace je biotechnologickou metodou, která bez pochyby měla největší vliv na chovy zvířat během posledních padesáti let (Hunter, 2003). Zároveň se jedná o jednu z nejstarších metod asistované reprodukce (Vinkler et Zajíc, 2009). Historie výzkumu umělé inseminace je více než dvě století stará a její využití pro komerční účely trvá zhruba 75 let (Vishwanath, 2003), a to od roku 1937 (Black et Whitehead, 2006). V těchto letech též vznikla první společnost pro umělou inseminaci skotu v Dánsku, a odtud se rychle rozšířila napříč Evropou a Spojenými státy (Durrant, 2009). Nicméně k významnějšímu rozvoji metod umělé inseminace došlo až po objevení Cassovy inseminační soupravy (Hunter, 2003).

Tato metoda je považována za hlavní prostředek rychlého šíření významných genů. Řada chovatelů mléčného skotu po celém světě ji volí jako možnost pro zlepšení genetické kvality svých chovů (Vishwanath, 2003). Umělá inseminace není omezena pouze na domestikovaná hospodářská zvířata, ale využívá se i v programech na záchranu ohrožených zvířat a samozřejmě i u člověka (Black et Whitehead, 2006). Existují tři stavební kameny určující použití této metody - jednoduchost, úspěšnost jejího provedení a relativní ekonomická výhodnost z hlediska ceny ejakulátu i samotné inseminace (Vishwanath, 2003).

3.1.1 SPERMA

3.1.1.1 Odběr spermatu

Prvním nezbytným krokem v procesu umělé inseminace je získat dostatečné množství životaschopných spermií od vybraného býka (Durrant, 2009). Zpravidla se využívají geneticky cenní býci dosahující vynikajících výsledků v reprodukci (Vishwanath, 2003). Odběry spermatu se začínají provádět u býků ve věku 12 měsíců. U mladších jedinců se ejakulát odebírá dvakrát denně po 2 dny v týdnu. Dospělý býk se pak odebírá taktéž dvakrát denně, ale 2-3 dny v týdnu (Black et Whitehead, 2006). Získaný ejakulát musí splňovat určité požadavky. K těmto požadavkům řadíme především objem ejakulátu, který není přesně stanoven, ale pohybuje se v rozmezí 3-12 ml. Striktně je naopak stanovena koncentrace a motilita spermií (Vinkler, 2009). Koncentraci určujeme na základě fotometrického vyšetření ejakulátu (Andersson et al., 2004) a její hodnota by měla být 700 000 spermií/mm³. Hodnota

motility musí být minimálně 70% spermií s progresivním pohybem. K dalším parametrům řadíme počet mrtvých a morfologicky změněných spermií či spermií s protoplazmatickou kapkou (Vinkler, 2009).

Existuje několik metod odběru ejakulátu. Tyto rozdělujeme na metody invazivní a neinvazivní. Objev obou druhů metod značně přispěl k usnadnění získávání spermií pro umělou inseminaci (Durrant, 2009). Ke dvěma základním způsobům získávání ejakulátu řadíme odběr elektroejakulací a odběr pomocí umělé vagíny. Častěji je využíván druhý způsob, tedy umělá vagína (Black et Whitehead, 2006). Touto cestou je býkovi umožněno naskočit na krávu za současného nasměrování jeho penisu do ústí umělé vagíny. Ejakulace tedy probíhá normálním přirozeným způsobem (Cole et Winters, 1939).



Pohlavní vydraždování býka



Ztopoření penisu značící vzrušení býka



Technik s připravenou umělou vagínou



Odklonění penisu do umělé vagíny a následný odběr

Obr. 1 <<http://arbl.cvmb.colostate.edu/hbooks/pathphys/reprod/semeneval/bull.html>>.



Obr. 2 Umělá vagína používaná pro odběr spermatu býků (dole)

<<http://www.vivo.colostate.edu/hbooks/pathphys/reprod/semeneval/collection.html>>.

3.1.1.2 Inseminační dávka

Vyšetřené ejakuláty, které odpovídají požadavkům pro umělou inseminaci, jsou co nejdříve po odběru naředěny (Vinkler, 2009). Proces ředění umožňuje získat větší množství inseminačních dávek z jednoho ejakulátu (Black et Whitehead, 2006). K ředění se používají komerční ředidla Tris (Verberckmoes et al., 2004) a Optidyl (Vinkler, 2009). Častěji se však využívá první zmiňované, tedy Tris, které je založeno na bázi vaječného žloutku (Verberckmoes et al., 2004). Žloutek by měl ochránit spermatické buňky od teplotního šoku po zmrazení (Black et Whitehead, 2006). Další důležitou komponentou ředidla je obsah 6% glycerolu (Seidel et Schenk, 2008). Glycerol je znám jako kryokonzervační činidlo (Vishwanath, 2003), které vyvolává nezbytně nutnou dehydrataci buněk zabraňující tvorbě ledových krystalků uvnitř této buňky, tzn. že ji chrání před poškozením při kryokonzervaci (Lopatářová, 2009).

Dalším krokem je plnění ejakulátu do polyvinylchloridových pejet o objemu 0,25 ml (Seidel et Schenk, 2008). Jedná se o tzv. Francouzskou metodu (Andersson et al., 2004). Plnění probíhá v automatických plničích. Pejety musí být předem označené, kvůli jejich pozdější identifikaci. Označení zahrnuje inseminační stanici, registrační číslo zařízení, datum odběru, jméno a registr pleménika (Vinkler, 2009). Každá pejeta obsahuje $10\text{-}15 \times 10^6$ spermií (Verberckmoes et al., 2004). Takto naplněné a zapečetěné pejety jsou následně skladovány po dobu 4-6 hodin při teplotě 5°C v chladničce (Black et Whitehead, 2006). Zde dojde k dokončení procesu ekvilibrace, tedy rozšíření a proniknutí kryoprotektiva do buněk, a

vychlazení pejet na 3°C (Vinkler, 2009). Po uplynutí tohoto intervalu jsou pejety umístěny do kontejnerů naplněných tekutým dusíkem o teplotě – 196°C, kde mohou být skladovány po delší časový úsek (Black et Whitehead, 2006).

Uchovávání ejakulátu ve zmraženém stavu znamená zpomalení či zastavení vývojových a metabolických procesů u spermatických buněk, jelikož buňky musejí být udržovány ve stavu pozastavených životních funkcí do doby jejich použití k fertilizaci (Vishwanath, 2003). Před použitím zmražené inseminační dávky, tedy před provedením inseminace, musí dojít k jejímu rozmražení (Verberckmoes et al., 2004). Jedná se o kritický bod procesu inseminace, kdy musejí být dodržena příslušná bezpečnostní opatření, aby nedošlo k poškození ejakulátu (Black et Whitehead, 2006). Rozmrazování probíhá ve vodní lázni po dobu 30s při teplotě 37°C (Seidel et Schenk, 2008). Po rozmrazení musí inseminační dávka obsahovat minimálně 30% spermií s progresivním pohybem. V opačném případě se celá šarže vyřazuje (Vinkler, 2009).

I přesto, že vyšších výsledků zabřezávání po umělé inseminaci se dosahuje při použití čerstvého ejakulátu, mnohem více se využívá chlazené či mražené sperma. Použitím zmrazeného spermatu totiž odpadá povinnost inseminovat ihned po jeho odběru (Durrant, 2009).

3.1.2 PROCES UMĚLÉ INSEMINACE

3.1.2.1 Selektce krav pro inseminaci

K inseminaci mohou být použity jak krávy s mléčnou užitkovostí, tak i krávy s užitkovostí kombinovanou. Podmínkou je dobrá tělesná kondice a viditelné příznaky říje (Verberckmoes et al., 2004). Detekce říje je specializovaná činnost, která vyžaduje přesné monitorování příznaků a je časově velmi náročná (Vishwanath, 2003). Mezi příznaky říje naznačující, že kráva vstupuje do estru, patří pozorovaná zvýšená aktivita, naskakování na ostatní členy stáda, popř. naskakování ostatních na daného jedince, a nakonec otok a zvlhčení vulvy (Black et Whitehead, 2006). Jedinci, u kterých byly příznaky estru pozorovány ráno, se inseminují večer. Zvířata s příznaky estru detekovanými večer jsou inseminováni následný den ráno (Verberckmoes et al., 2004).

3.1.2.2 Načasování umělé inseminace

Po úspěšné detekci říje můžeme přistoupit k samotné inseminaci (Black et Whitehead, 2006). Důležité je správně zvolit čas inseminace, který musí brát ohled na kapacitaci spermií v samičím pohlavním ústrojí. Zároveň musí být zvolen tak, aby byl dostatečně blízko ovulaci a předešlo se stárnutí spermií a vajíčka (Durrant, 2009). Vychází se z průměrné délky samotné říje, která je u skotu 12-18 hodin. Optimální doba pro provedení inseminace je tedy 8-12 hodin po odeznění příznaků říje, kdy dochází k ovulaci. V tuto dobu by se měl u krávy projevovat reflex svolnosti k páření. Kráva klidně stojí a zavádění inseminační soupravy by mělo být tedy snadné, jelikož je pootevřený děložní krček. Zavádění soupravy též usnadňuje vytékající cervikální hlen (Zajíc, 2009).

3.1.2.3 Princip umělé inseminace

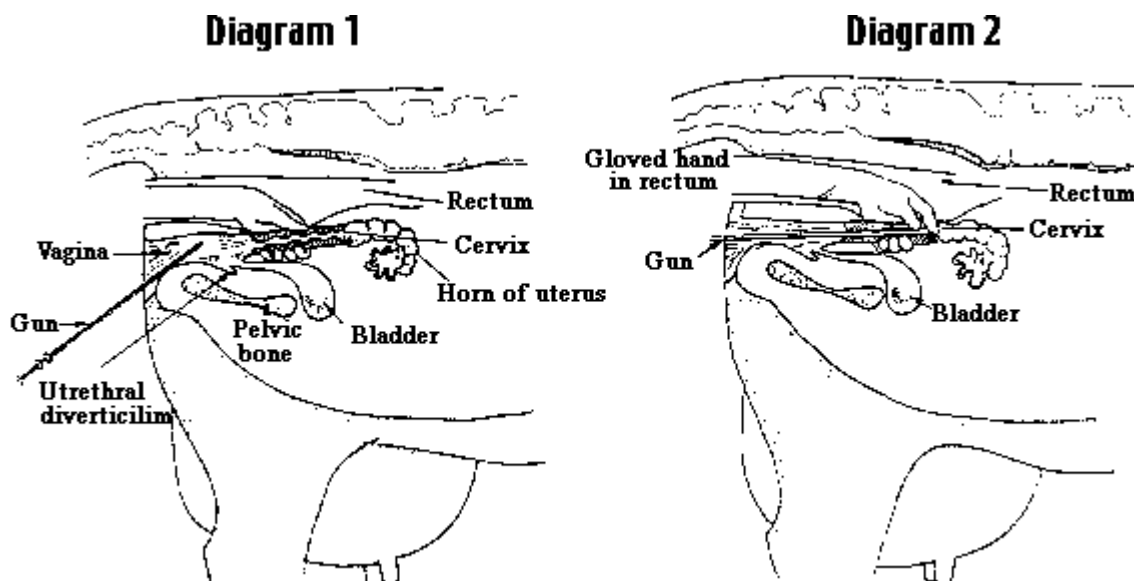
Fertilizační schopnost spermií je ovlivňována mnoha faktory. Mezi tyto faktory řadíme termín inseminace, kvalitu inseminační dávky, místo deponování spermatu a způsob provedení inseminace (Zajíc, 2009). V současnosti se k provádění inseminace nejběžněji používá Cassova inseminační soustava. Jedná se o rigidní nástroj, který napomáhá průchodu inseminační dávky skrze děložní krček až k místu její depozice. Skládá se ze dvou dlouhých plastových trubiček – vnější tuhé a vnitřní flexibilní s rigidním koncem. Uvnitř je umístěn katétr s inseminační dávkou. Na povrchu je soustava kryta plastovým pouzdem, které minimalizuje či odstraňuje nebezpečí přenosu infekčního agens skrze inseminační nástroj (Verberckmoes et al., 2004).



Obr. 3 Cassova inseminační souprava (Verbeckmoes et al., 2004).

Studie ukazují, že nejvyšší je procento zabřezávání při použití rekto-vaginální metody (Black et Whitehead, 2006), která se však dnes téměř nepoužívá. Dalšími metodami umělé inseminace jsou metoda rektální a vaginální. Nejpoužívanější je metoda rektální, kdy pod

úhlem 45° zavádíme dorzokraniálně jednou rukou inseminační soupravu do pochvy až k poševní klenbě. Druhou ruku zasuneme do rekta a uchopíme děložní krček. Pomocí malíčku nahmatáme *portio vaginalis uteri*, které nasměrujeme ke konci inseminační soupravy za jejího současného zavádění. Po proniknutí soustavy vnější brankou krčku děložního začneme pomocí kroutivých pohybů navlékat krček na soupravu. Tu zavádíme až na místo určené k depozici inseminační dávky (Zajíc, 2009).



Obr. 4 Rektální metoda umělé inseminace: diagram 1 – uchopení děložního krčku skrze rektum, diagram 2 – zavádění inseminační soupravy

<http://www.brahman.com.au/technical_information/reproduction/artificialBreeding.html>.

Konečným cílem životaschopných spermií je dosažení jedné nebo více gamet v oblasti oplození. Tato oblast samičí pohlavní soustavy je lokalizována v místě křížení ampule vejcovodu (rozšířená část vejcovodu, kde vajíčko čeká na spermie) a jeho krčku (Hunter, 2003). Chovy skotu využívající konvenčních metod umělé inseminace, které zahrnují depozici spermatu do těla děložního. V současnosti se místo depozice mění, a sice do děložních rohů (Verberckmoes et al., 2004). Tento typ inseminace označujeme jako hlubokou děložní inseminaci. Důvodem je lokalizace preovulačního rezervoáru spermií v místě spojení vejcovodu a dělohy (López-Gatius, 2000) a přiblížení se místu fertilizace (Verberckmoes et al., 2004). Inseminovat můžeme buď jeden (unikornuální inseminace) nebo oba (bikornuální inseminace) děložní rohy. Požadavkem pro inseminaci pouze jednoho děložního rohu je

rektální palpance toho vaječníku, na kterém probíhá ovulace (López-Gatius, 2000). U bikornuální inseminace deponujeme polovinu inseminační dávky do jednoho rohu a zbylou polovinu do druhého rohu až k jejich velkému zakřivení (Seidel et Schenk, 2008).

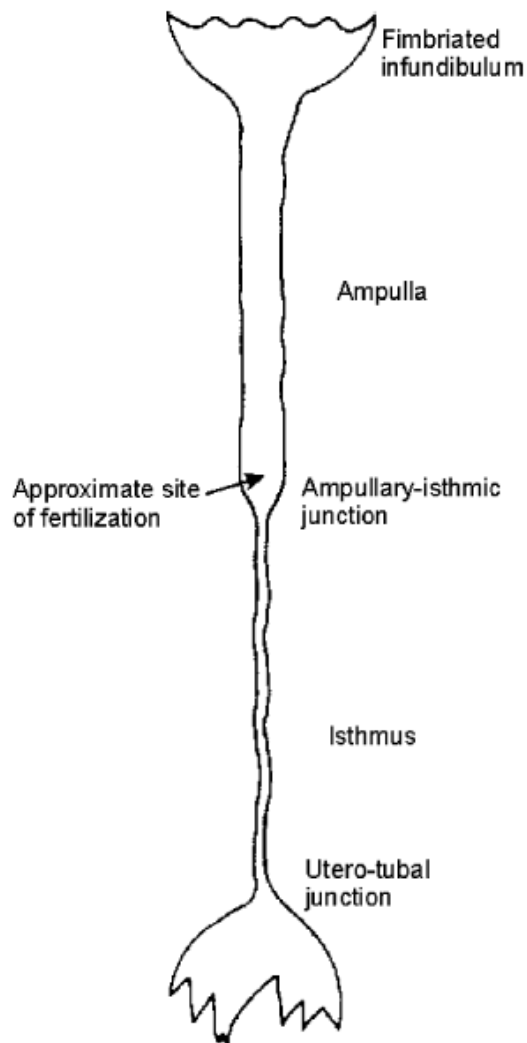


Fig. 1. Linear representation of a bovine fallopian tube to depict the thin-walled ampulla leading into the strongly muscular isthmus. The site of fertilisation—that is of successful gamete fusion—is in the region where ampulla and isthmus merge.

Obr. 5 Lineární znázornění vejcovodu skotu s tenkostěnnou ampulí vejcovodu vedoucí do silně osvaleného krčku. Místem fertilizace, kde úspěšně probíhá splnutí gamet, je oblast, kde se spojuje ampule s krčkem – označeno šipkou (Hunter, 2003).

3.1.2.4 Výhody umělé inseminace

Umělá inseminace se stala velkým přínosem pro šlechtění zvířat, a to využíváním geneticky cenných býků, tzv. zlepšovatelů (Zajíc, 2009), u nichž však dochází k neuspokojivým výsledkům v koncepci krav (Hunter, 2003). Veliký podíl má též na zlepšování zdravotního stavu zvířat, a to vlivem likvidace pohlavních nákaz, omezení a eradikace přenosných onemocnění a vlivem eliminace nositelů dědičně podmíněných vad (Zajíc, 2009). Další výhodou je redukce množství spermií v každé inseminační dávce (Hunter, 2003) či býků používaných k inseminaci a nutných pro udržení určité úrovně reprodukce ve stádech skotu. Všechny výše zmíněné výhody mají pozitivní vliv i na ekonomiku chovů (Zajíc, 2009).

3.2 *IN VITRO* FERTILIZACE (IVF) A PRODUKCE EMBRYÍ (IVPE)

In vitro fertilizace a produkce embryí jsou mezi biotechnologickými metodami považovány za velice důležité, především vzhledem k rapidně se zvyšujícímu genetickému pokroku v samičích liniích hospodářských zvířat (Vieira et al., 2014). Patří mezi alternativní biotechnologické metody produkce embryí, které jsou prováděny nejčastěji u skotu, a to hlavně u vysokoprodukčních krav, kde není možné využívání klasických konvenčních metod reprodukce (Lopatářová a kol., 2009). Důvodem může být sterilita jedince, ale i jiné okolnosti, kvůli kterým musí být zvíře vyřazeno z chovu (Galli et al., 1996). Neplodnost je často zapříčiněna ucpanými vejcovody, chronicky cystickými vaječníky nebo nepřítomností dělohy z důvodu jejího chirurgického odstranění (Hasler et al., 1997). Je to také jediný způsob, jak získat embrya od jedinců určených k porážce (Galli et al., 1996). Základní materiál ve formě oocytů od elitních plemenic může být získán jak z živých, tak i z poražených zvířat. To, do jaké míry je metoda úspěšná, pak závisí na mnoha faktorech. K těmto faktorům patří např. kvalita oocytů, média, postupy zrání a fertilizace oocytů, technika kultivace embryí a v neposlední řadě také celkový reprodukční stav zvířete. Zásadním cílem této metody je získat geneticky cenná embrya (Lopatářová a kol., 2009). Celý proces se skládá z několika částí, a to odběru oocytů a dokončení tří biologických fází - zrání (maturace), oplození (fertilizace), kultivace (Galli et al., 1996).

3.2.1 ODBĚR OOCYTŮ

Oocyty lze získat dvojím způsobem - *in vitro* a *in vivo*. Odběr oocytů *in vitro* je prováděn po porážce zvířete, kdežto u *in vivo* metody se jedná o odběr z živých dárců (Čech, 2009).

3.2.1.1 Odběr oocytů *in vitro*

Jedná se o metodu, kdy oocyty získáváme od zvířete až po jeho porážce odebráním vaječnicků (Galli et al., 1996). Vaječnky jsou okamžitě po vyjmutí transportovány do laboratoře v plastových izolovaných pytlích bez přidané tekutiny o teplotě 26 až 30°C. Po příjezdu do laboratoře následuje propláchnutí vaječnicků vodou z vodovodu o teplotě 28°C, a to čtyřikrát. Následně jsou vloženy po dobu pěti minut do vody obdobných vlastností, ale s přidavkem 1% roztoku Nolvasanu a čistícího roztoku (Hasler et al., 1997). Nolvasan řadíme do skupiny chlorhexidinových dezinfekčních prostředků. Jedná se o látky neeleptavé a nedráždivé (Kenyon et Meakin, 2005). Poté dochází k opětovnému propláchnutí vaječnicků vodou a uskladnění při okolní teplotě pohybující se mezi 23 až 27°C (Hasler et al., 1997). Dalším způsobem je transport při 37°C v Dulbecco médiu (Čech, 2009). Toto médium obsahuje zhruba dvakrát větší koncentraci aminokyselin a čtyřikrát větší koncentraci vitaminů, než je tomu u jiných podobných médií. Dalšími komponenty jsou dusičnan železitý, pyruvát sodný a některé doplňkové aminokyseliny, které nejsou vždy neesenciální. Originální složení média obsahuje 1,000 mg/L glukózy. U běžněji používaných variant se toto množství zvýšilo na 4,500 mg/L (ATCC Animal Cell Culture Guide – tips and techniques for continuous cell lines, 2014). Médium je též obohaceno o antibiotika (Čech, 2009).

Získání oocytů z vaječnicků může být v laboratorních podmínkách provedeno několika technikami. První, nejjednodušší z nich, je aspirace oocytů s folikulární tekutinou z folikulů. Velikost takto aspirovaných folikulů se pohybuje v průměru mezi 2-8 mm (Enright et al., 2000). Aspiraci provádíme pomocí tenké jehly a injekční stříkačky (Čech, 2009). Možné je též použití podtlakové aspirační pumpy Pioneer Pro-Pump, kde je jehla napojena na hadičku a ta dále na sběrnou nádobku, nejčastěji o objemu 50 ml, a samotnou pumpu (Hasler et al., 1997). Výsledkem aspirace je folikulární tekutina obsahující COC (kumulo-oocytární komplex), tedy oocyty obklopené kumulárními buňkami, které se prohlížejí pod stereomikroskopem a izolují kapilárními pipetami (Čech, 2009). Velice důležité je také získání COC komplexu čtyřikrát propláchnout v roztoku PBS (Phosphate Buffered Saline –

fosfátový pufr) doplněném o 36 µg/ml pyruvátu, 50 µg/ml gentamycinu 0,5 µg/ml BSA (Bovine Serum Albumine - hovězí sérový albumin) (Rizos et al., 2002).

Druhým způsobem získávání oocytů z vaječníků poražených dárců je preparace jednotlivých folikulů, jejich měření a mikroskopická disekce (naříznutí skalpelem). Takto získané COC komplexy vykazují excelentní kvalitu (Čech, 2009).

Další technikou je slicing. Zde využíváme systém rovnoběžně fixovaných žilettek k nařezávání povrchu vaječníků, ze kterého následně odtéká folikulární tekutina s COC za současného oplachování médiem do Petriho misky (Čech, 2009).

3.2.1.2 Odběr oocytů *in vivo*

In vivo metoda se vyznačuje získáváním oocytů od živých dárcovských zvířat. Výhodná je zejména proto, že je možné odběry opakovat a zvířata zvláštní hodnoty mohou být i nadále využívána v reprodukci (Galli et al., 2001). Nejprve byly používány značně invazivní a finančně náročné chirurgické operace typu laparotomie, kdy přístup k vaječníkům byl umožněn skrze *linea alba* či *fossa paralumbalis*. Z tohoto důvodu byly vyvinuty metody laparoskopické a ultrazvukové (Čech, 2009).

Laparotomické metody

Metodu laparotomickou lze provést dvěma způsoby. Jedním z nich je perforace břišní stěny pomocí dvou trokarů v místě pravé hladové jámy, což umožní manipulaci s vaječnky. Další způsob je transvaginální laparotomie, která je méně invazivní. Opět dochází k perforaci trokarem, tentokrát však klenby poševní a zavedení manipulačního setu. Tento set zahrnuje zdroj světla, endoskop a odsávací hadičku s punkční jehlou. Aby mohlo dojít k odsátí folikulů, musí být vaječnky manuálně nadzvednuty přes rektum do bezprostřední blízkosti endoskopu. Výhodou této metody je rychlé hojení perforované poševní klenby a relativně krátké časové intervaly mezi jednotlivými použitími (Čech, 2009).

Transvaginální ultrazvuková punkce

Nejběžněji používanou metodou pro odběr oocytů *in vivo* je transvaginální ultrazvuková punkce neboli OPU (ovum pick-up). Metoda je výhodná především z hlediska časté opakovatelnosti, a tudíž zvyšuje produkci *in vitro* embryí (Galli et al., 2001). Nejčastěji se procedura provádí jednou až dvakrát týdně, přičemž, jak bylo zmíněno výše, opakovatelnost je značně vysoká (Galli et al., 1996). Odběr oocytů dvakrát týdně zajišťuje jejich maximální

zisk a vhodnou kvalitu pro produkci embryí (Galli et al., 2001). Tímto způsobem můžeme punkci provádět po mnoho týdnů bez projevu vedlejších účinků ve zdravotním stavu nebo reprodukčních schopnostech zvířete (Galli et al., 1996). Prováděním této metody též působíme zvířeti jen minimální stres. Vhodným dárcem může být zvíře prakticky v jakémkoliv fyziologickém stavu a všech věkových kategorií, od dvouměsíčních telat po velmi staré jedince. Naopak dárce nevhodnými jsou zvířata, která překročila třetí až čtvrtý měsíc březosti, dále jedinci v poporodním období, u kterých ještě nedošlo k obnovení ovariální aktivity a zvířata s těžkou ovariální hypoplasíí. Výsledkem jednoho odběru je průměrně 8 až 10 oocytů, přičemž k přenosu jsou vhodné většinou jen dva (Galli et al., 2001).

Vybavení pro metodu ovum pick-up zahrnuje jednorázové duté jehly z nerezového materiálu, které se připojují za pomoci konektoru na silikonové hadičky. Skrze hadičky je též protažena nerezová ocelová trubička o délce 60 cm a průměru 6 mm, kde je následně jehla upevněna. Různé průměry hadiček, trubiček a spojovacích článků udržují rigidnost celého systému, a tudíž zabraňují vypadnutí jehly při jejím vytahování ven. Výše popsaný systém je napojen na převodník a upevněn do držáku. Rukojeť je uzpůsobena tak, aby operátor mohl bez problémů zavézt OPU zařízení do pochvy a to tak, že rukojeť má jemně opřenu o pravou stranu těla zvířete. Levá ruka zůstává volná pro manipulaci s jehlou. Celé zařízení je pak napojeno na sací pumpu, která vytváří vakuum. Chybět nesmí ani skenovací zařízení, na jehož obrazovce se zobrazují všechny funkční struktury (Bols et al., 1995).

Proces transvaginální ultrazvukové punkce je zahájen vpravením ultrazvukové sondy, která je pevně fixována v držáku, do pochvy a jejím upevněním v poševní klenbě laterálně od děložního krčku. Operátor dále musí *per rectum* přitlačit vaječník k sondě tak, aby mezi nimi byla jen poševní stěna (Čech, 2009). Všechny funkční struktury na vaječníku se poté zobrazují na výseči obrazovky ultrazvukového zařízení. Jakmile jsou na obrazovce zpozorovány jednotlivé folikuly, dochází postupně k jejich perforaci punkční jehlou skrze poševní stěnu (Gibbons et al., 1995). V průběhu tohoto procesu musí operátor postupně otáčet vaječník. Aspiraci folikulů zajišťuje speciální pumpa, která je zdrojem podtlaku. Tato pumpa je pomocí hadiček napojena na sběrnou nádobu, kde dochází k hromadění aspirovaných folikulů (Čech, 2009). Shromážděné oocyty jsou propláchnuty roztokem PBS obohaceným o 10% v/v NCS (Newborn Calf Serum - novorozenecké telecí sérum), 1% v/v penicilin-streptomycin a 25 U/ml heparinu (Gibbons et al., 1995).

3.2.1.3 Kategorizace oocytů

Získané oocyty jsou hodnoceny a kategorizovány pod stereomikroskopem. Rozdělujeme je do čtyř skupin, a to podle přítomnosti a množství kumulárních buněk, které vytvářejí vrstvy a obklopují oocyt. Důležitým kritériem je též jejich kvalita (Hashimoto et al., 1999).

Kategorie I zahrnuje oocyty obklopené čtyřmi a více vrstvami kumulárních buněk. Do kategorie II řadíme oocyty s jednou až třemi vrstvami kumulárních buněk (Hasler et al., 1995). Oocyty jak částečně, tak zcela obnažené, tedy bez kumulárních buněk, tvoří kategorii III (Hashimoto et al., 1999) a často jsou označovány jako nahé oocyty (Hasler et al., 1995). Poslední skupinou jsou oocyty, které prošly určitým stupněm expanze, tedy rozšířením kumulárních buněk. Patří sem též oocyty degenerované (Hashimoto et al., 1999) nebo s pyknotickými buňkami, které se vyznačují značným nahromaděním a kondenzací chromatinu. Tuto skupinu označujeme jako kategorii IV (Hasler et al., 1995). Četnost a síla vrstev kumulárních buněk závisí na velikosti a zdravotním stavu folikulů. Platí, že čím silnější vrstva, tím větší jsou šance na rozvoj oocytu v embryo (Sirard et al., 1996). K procesu zrání, oplození a následné kultivaci jsou vybírány oocyty kategorie I, II a IV, avšak bez přítomnosti pyknotických buněk (Hasler et al., 1995).

Kumulární buňky jsou subpopulací buněk granulózních. Plní významné funkce vzhledem k oocytům. Poskytují jim důležité nutriční látky podporující jejich růst a vývoj, účastní se formování *zony pellucidy* a *corony radiata*, podílí se na formování proteinů a kyseliny hyaluronové k tvorbě matrix, která je velice důležitá pro transport a zachycení spermií ve vejcovodech (Sirard et al., 1996).

3.2.2 ZRÁNÍ OOCYTŮ

Po ohodnocení a propláchnutí oocytů v médiu TALP přichází na řadu proces zrání. (Lopatářová, 2009). TALP médium je modifikovaný thyroïdní preparát obsahující 25 mM hydrogenuhličitanu sodného a 0,6% BSA, který slouží jako zdroj proteinů. Jeho další modifikace spočívá v obsahu různých množství energií, jejichž zdrojem jsou laktát sodný a pyruvát sodný (Gordon, 2003). Zrání neboli maturace oocytů je charakterizováno přeměnou primárního oocytu nacházejícího se v profázi I. meiotického dělení na oocyt sekundární, pro který je charakteristické haploidní množství chromozómů. Sekundární oocyt již také obsahuje

buněčnou výbavu nutnou pro oplození a raný embryonální vývoj. Hlavními změnami v průběhu zrání prochází jádro oocyty, cytoplasma a kumulární buňky (Lopatářová, 2009).

Oocyty získané odběrem z vaječníků jsou nejprve vloženy do propíracího média obsahujícího 10% kravského říjového séra (Lopatářová, 2009). Následně jsou přenášeny do zracího média. Většina laboratoří využívá jako zrací médium TCM 199 (Tissue Culture Medium 199 – tkáňové kultivační médium) (Galli et al., 1996). Jedná se o kompletně definované IVM médium, které je schopné podporovat zrání oocytů skotu za současné absence séra (Gordon, 2003). Do 0,5 ml TCM 199 se dále přidává 10% FCS (Fetal Calf Serum - fetální telecí sérum) a gonadotropiny (Galli et al., 1996). Nejčastěji používanými gonadotropiny jsou FSH (folikulostimulační hormon) a LH (luteinizační hormon) (Lopatářová, 2009). V médiu jsou dále obsaženy Earlovy soli a 2,2 g/L hydrogenuhličitanu sodného (Hasler et al., 1997). V médiu jsou oocyty kultivovány po dobu 24 hodin v řízené atmosféře biologického inkubátoru. Atmosféra je charakteristická teplotou 39°C, obsahem 5% CO₂ a maximální vlhkostí. Kultivace probíhá ve skupinách 20-30 oocytů (Lopatářová, 2009). Bylo prokázáno, že přidavek granulózových buněk a heparinu způsobuje vyšší rychlost vývoje oocytů a lepší kvalitu embryí (Galli et al., 1996). Maturace může probíhat v konvenčních CO₂ inkubátorech v Petriho miskách, čtyřjamkových nádobách nebo mikrokapkách krytých olejem (Galli et al., 2001).

3.2.3 OPLOZENÍ OOCYTŮ

Proces oplození neboli fertilizace je děj, kdy dochází ke splynutí rodičovských pohlavních buněk (gamet), které jsou haploidní, tedy nesou pouze jednu sadu chromozómů. Následně tak vzniká kvalitativně nový jedinec nesoucí diploidní počet chromozómů, tedy dvě sady (Lopatářová, 2009).

Po dokončení zrání za 22-24 hodin jsou oocyty přeneseny ze zracího média do speciálního média oplozovacího, a to minimálně 35-40 minut před přidáním spermatu. V médiu jsou obsaženy látky podporující kapacitaci a motilitu spermií (Lopatářová, 2009). Oplozovací médium nejčastěji sestává z modifikovaného TALP (fert-TALP) (Hasler et al., 1995). Často v něm najdeme též přídavek BSA bez mastných kyselin, kyseliny pyrohroznové, heparinu a gentamicinu (Blondin et al., 1997). Před samotným vložením oocytů do fertilizačního média musejí být dvakrát až čtyřikrát propláchnuty v PBS či TALP-HEPES a

následně i samotným oplozovacím médiem. Takto promyté oocyty jsou ve skupinách až padesáti kusů vloženy do nádob obsahujících 250 μ l oplozovacího média (Rizos et al., 2002).

K fertilizaci se nejčastěji používá komerčně zmražené sperma. Úprava koncentrace spermatu každého býka na vhodnou úroveň umožňuje použití až 90% plemeníků v procesu oplození. Dobré výnosy embryí však neposkytují všichni plemeníci (Galli et al., 1996). Sperma je nejčastěji konzervováno v pejetách. Rozmrazování probíhá po dobu 10 sekund při teplotě 39°C. Z takto rozmražených pejet je následně odebráno 100 μ l spermatu, které se tzv. podvrstvue v kónických zkumavkách pod 1 ml dalšího speciálního média, které má schopnost stimulovat kapacitační proces (Lopatářová, 2009). Pohyblivé spermie oddělujeme z ředidla, tedy kapaliny prodlužující životaschopnost spermií po dobu zmrazení, několika způsoby. Může být použito přímé vymývání, a to v případě, je-li v ejakulátu velmi vysoké procento agresivně se pohybujících spermií. Metoda „swim up“ neboli vyplavení je též velice běžná technika, avšak nedoporučuje se pro příliš viskózní ředidla (Galli et al., 1996). Spočívá v oddělení pohyblivých a nepohyblivých spermií aktivní migrací do média (Lopatářová, 2009). Nejvíce preferovanou metodou je centrifugace, která zajišťuje nejvyšší zisk pohyblivých spermií (Galli et al., 1996). Centrifugace probíhá v centrifugační trubici o objemu 15 ml, kde je rozmražené sperma navrstveno na nespojitý Percollův gradient. Percollův gradient se skládá z 2 ml 90% Percollu překrytého 2 ml 45% Percollu. Doba centrifugace je 20-30 minut při 700 x g. Po oddělení pohyblivých spermií následuje stanovení jejich koncentrace. Následně se ejakulát naředí na požadovaný objem a je přidán do oplozovacího média k oocytům (Hasler et al., 1995). Naředění by mělo být provedeno tak, aby výsledná koncentrace byla 1 000 000 aktivních spermií v 1 ml fertilizačního média (Lopatářová, 2009). Oplození oocytů probíhá 18-24 hodin při teplotě 39°C v atmosféře obsahující 5% CO₂ o maximální vlhkosti (Rizos et al., 2002). Oplozené oocyty oddělíme, dvakrát propláchneme v TALP, vortexujeme 2 minuty za účelem odstranění kumulárních buněk a umístíme do kultivačního média (Hasler et al., 1997).

3.2.4 KULTIVACE EMBRYÍ

Raný vývoj zárodka probíhající v podmínkách *in vitro* je proces, který se nazývá kultivace embryí. Jedná se o období od oplození vajíčka, kdy vzniká zygota, až po stádium moruly či blastocysty (Lopatářová, 2009).

Kultivační médium embryí je důležitým aspektem buněčných kultivací. Jedná se o definovaný roztok minerálních solí, které upravují pH a osmotický tlak, dále stopových prvků, aminokyselin, glukózy, pyruvátu a krevního séra. Často dochází k jejich obohacování o embryotrofní látky jako např. dezaktivované fetální telecí sérum nebo sérový albumin. K obohacování dochází proto, aby se *in vitro* kultivační podmínky embryí co nejvíce podobaly prostředí vejcovodu a dělohy. Využívá se též tzv. kokultivace se somatickými buňkami, což vede k lepší vývojové schopnosti embryí. Jako somatické buňky slouží např. kumulární buňky nebo epiteliální buňky vejcovodu. Využívají se též média bez somatických buněk, která obsahují jen látky produkované samotnými médii (peptidy, růstové faktory apod.) (Lopatářová, 2009). Konkrétním příkladem kokultivačního média je např. takové, které sestává z 0,5 ml TCM 199 s obsahem 10% FCS, 10 g/l BSA nebo Menezova B2 media obsahujícího 10% FCS na jedné vrstvě jaterních buněk potkana buvolího (BRLs) (Hasler et al., 1995).

Pro růst zygot může být použit jeden ze tří systémů. V prvním systému mohou být oplozené oocyty transportovány do vejcovodů dočasného příjemce (ovce, králík). Po 4-5 dnech, resp. 6 dnech po inseminaci, jsou embrya odebrána, roztříděna a následně mražena nebo transportována. Ve druhém systému jsou zygoty kultivovány spolu se somatickými buňkami (epiteliální buňky vejcovodu, granulózové buňky, jaterní buňky buvolů či potkanů) v roztoku TCM 199 nebo v roztoku B2 Menezo s 10% séra nebo 1% albuminového bovinního séra (BSA) při 38,5°C v 5% CO₂. Ve třetím systému jsou zygoty kultivovány v prostém médiu bez podpory somatických buněk. Prostým médiem se v tomto případě rozumí SOF (Synthetic Oviductal Fluid – syntetická vejcovodová tekutina) doplněná sérem nebo BSA a aminokyselinami. Inkubace je prováděna při 38,5°C v 5% CO₂ a 5% O₂ (Galli et al., 1996).

Prvním krokem v procesu kultivace je vložení oocytů, které byly krátce po oplození vortexingem zbaveny zbylých kumulárních buněk a spermií, do kultivačního média (Galli et al., 1996). Oocyty se v médiu překrývají parafinovým olejem a ukládají do inkubátoru. Kontrola rýhování se provádí po 24-48 hodinách. Do stadia moruly či blastocysty, tj. po dobu 7-8 dnů od začátku kultivace, jsou dále kultivována pouze dělicí se embrya (Lopatářová, 2009). V *in vitro* kultivačním systému probíhá produkce blastocyst hlavně 7. den po oplození (0. den je den oplození). U *in vivo* kultivačních systémů (např. vejcovod ovcí) dochází k formování blastocyst již 6. den (Galli et al., 1996). Následně jsou embrya buď zmrazována, nebo přenášena připraveným synchronizovaným příjemcům (Lopatářová, 2009). Bylo prokázáno, že embrya produkovaná *in vitro* mají daleko nižší schopnost vyvinout se úspěšně

ve stádium blastocysty než je tomu u jejich *in vivo* protějšků (Katska-Ksiazkiewicz et al., 2006).

3.2.4.1 Hodnocení embryí

Jedním z nejdůležitějších faktorů ovlivňujících úspěšnost a široké využití biotechnologických metod je hodnocení embryí před jejich mražením či přenosem k příjemci (Bó et Mapletoft, 2013). Všechna získaná embrya podléhají protokolární registraci, což znamená, že se stručně ohodnotí dle morfologických znaků, blíže se specifikuje jejich oplozenost, kvalita a stádium vývoje. To vše rozhoduje o jejich využití (Lopatářová, 2009). *In vitro* získaná embrya následně podléhají klasifikaci a třídění, a to v době, kdy má nastat jejich přenos (Hasler et al., 1995). Existuje velké množství různých metod využívaných k hodnocení embryí. Tyto metody zahrnují např. test vylučování barviva, měření enzymové aktivity či příjmu glukózy. Nejvyužívanější metody jsou založeny na morfologickém a morfometrickém hodnocení. Většina systémů hodnocení embryí závisí na subjektivním posouzení. Odborníci v oblasti transferu embryí postupují při jejich posuzování zejména dle pokynů stanovených IETS (Mezinárodní společnost pro embryotransfer) manuálem (Gordon, 2003). Tento manuál využívá standardizovaný kódovací systém, a to k popisu stádia vývoje a kvality embryí (Bó et Mapletoft, 2013).

Hodnocení embryí je prováděno pod stereomikroskopem při zvětšení 50-100x, přičemž embrya jsou umístěna v mělké misce. Velice nezbytné je oválet embrya na dně misky, abychom byli schopni vidět embrya a *zonu pellucidu* z různých perspektiv. Celkový průměr bovinního embrya se pohybuje mezi 150-190 μm . Průměr zahrnuje též tloušťku *zony pellucidy*, která je v rozmezí 12-15 μm . Průměr embrya se v průběhu vývoje prakticky nemění (Bó et Mapletoft, 2013).

Hodnocení stádia vývoje embryí

Vývojová stádia embryí dělíme na moruly (M), pozdní kompaktní moruly (PM), velmi časná blastocysty (VČB), časná blastocysty (ČB), pozdní expandované blastocysty (PB), klubající se blastocysty (KB) a blastocysty volné, tj. vyklubané (VB). Rozdělení do jednotlivých kategorií je závislé především na vývojovém stupni embrya (Lopatářová, 2009). Stádium vývoje je nejlepším ukazatelem životnosti embryí. Ideální embryo je kompaktní a kulovité. Blastomery jsou stejné velikosti, barvy a textury. Cytoplazma by neměla být zrnitá. Perivitelinní prostor je čistý, bez buněčných nečistot. *Zona pellucida* musí být jednotná, ani

prasklá, ani zhroucená. Na svém povrchu by neměla obsahovat žádný buněčný odpad (Bó et Mapletoft, 2013). Po odběru jsou embrya nejčastěji ve stádiu pozdních morul až expandovaných blastocyst, přičemž odběr se provádí 7 dní po inseminaci (Lopatářová, 2009).

V dnešní době se pro hodnocení vývojového stupně embryí používá číselný kód, který je v rozmezí 1-9. Číslem 1 označujeme neoplozený oocyt nebo embryo skládající se z jedné buňky. Číslem 9 pak označujeme expandovanou volnou blastocystu (Bó et Mapletoft, 2013).

První stádium je morula, která je označována jako stádium 3 (Bó et Mapletoft, 2013). Morula je charakteristická velikostí až 150 μm (Lopatářová, 2009). Jedná se o komplex složený nejméně z 16-ti buněk. Jednotlivé blastomery jsou těžko rozeznatelné jedna od druhé. Buněčná embryonální hmota zaujímá většinu perivitelinního prostoru (Bó et Mapletoft, 2013). Toto vývojové stádium dělíme na dva stupně. První stupeň je typický složením z buněk s jednotnou velikostí a hustotou. Druhý stupeň je naopak složen z buněk nepravidelné velikosti. Může též obsahovat oblasti nebuněčných zbytků (Hasler et al., 1995).

Stádium 4 je tzv. kompaktní morula (Bó et Mapletoft, 2013). Často je toto stádium označováno jako pozdní morula. Pozdní moruly jsou stejnoměrně zbarvené, vysoce kompaktní shluky buněk – blastomer, které mají tvar maliny (Lopatářová, 2009). Buněčná embryonální hmota zaujímá 60-70% perivitelinního prostoru (Bó et Mapletoft, 2013).

Vývojově vyšším stádiem je stádium časně blastocysty, kdy na embryu ještě není přítomna *zona pellucida* (Hasler et al., 1995). Časná blastocysta je označována jako stádium 5. Formuje se tekutinou naplněná dutina nebo blastocel (Bó et Mapletoft, 2013). Blastocel se v průběhu vývoje zvětšuje. Začínají se diferencovat embryonální buňky, tj. buňky lokalizované v zárodečném terčíku a buňky extraembryonální – buňky trofoblastu (Lopatářová, 2009). Embryo spolu s blastocelem zaujímá 70-80% perivitelinního prostoru. V počátcích je někdy těžké rozeznat vnitřní buněčnou hmotu a buňky trofoblastu. Celkový vzhled embrya připomíná pečetní prsten (Bó et Mapletoft, 2013).

Další vývoj je doprovázen zvětšováním dutiny a celého embryonálního útvaru. Dochází k vyplnění veškerého perivitelinního prostoru a formuje se *zona pellucida*. Toto stádium označujeme jako blastocystu, která je charakteristická velikostí až 190 μm (Lopatářová, 2009). Patrná je výrazná diference vnějšího trofoblastu a větší kompaktnost vnitřní buněčné hmoty. Embryo zaujímá většinu perivitelinního prostoru. V systému číselných kódů se blastocysta označuje jako stádium 6 (Bó et Mapletoft, 2013).

Stádium 7 je tzv. expandovaná blastocysta. Celkový průměr embrya se dramaticky zvětšuje. Současně dochází ke ztenčování *zony pellucidy*, a to přibližně na třetinu její tloušťky (Bó et Mapletoft, 2013).

Posledním stádiem je tzv. klubající se nebo vyklubaná blastocysta (Hasler et al., 1995). V tomto stádiu embrya buď teprve podstupuje proces klubání se, nebo už se kompletně zbavilo *zony pellucidy* (Bó et Mapletoft, 2013). *Zona pellucida* praská vlivem vysokého nitroblastického tlaku. Embryo má tak prostor pro aktivní opuštění vaječného obalu (Lopatářová, 2009). Vyklubaná blastocysta se označuje jako stádium 8 (Bó et Mapletoft, 2013).

Hodnocení kvality embryí

Kvalita embryí je důležitým prvkem úspěšnosti především v oblasti transferu embryí (Abe et al., 2002). Bovinní embrya získaná od superovulovaných krav jsou dle kvality rozdělena do čtyř skupin – vynikající/dobrá, uspokojivá, špatná a mrtvá/degenerovaná (Gordon, 2003). Toto rozdělení je založeno na morfologických charakteristikách jednotlivých embryí (Abe et al., 2002). K těmto charakteristikám řadíme barvu, tvar a velikost perivitelinního prostoru, množství degenerovaných buněk a množství a povahu váčků (Gordon, 2003). Jednotlivým skupinám přiřazujeme číselný kód v rozmezí 1-4 (Bó et Mapletoft, 2013). Embrya s vynikající a dobrou kvalitou vykazují nejvyšší míru březosti, zatímco špatná embrya naopak vykazují míru březosti nejnižší. Z toho vyplývá, že míra březosti může být celkem přesně předpovědána za pomoci kvality embryí (Abe et al., 2002).

Kód 1 zahrnuje skupinu vynikajících nebo dobrých embryí (Gordon, 2003). Tato embrya jsou ideální pro další využití (Abe et al., 2002). Velice dobře přežívají během procesů mražení/rozmrazování. Někteří odborníci je nazývají „mraženischopná embrya“. Jsou doporučována pro mezinárodní obchod (Bó et Mapletoft, 2013). Vyznačují se symetrií a kulovitým tvarem. Jednotlivé blastomery jsou uniformní ve velikosti, barvě a hustotě. Nepravidelnosti by měly být relativně minoritní a nejméně 85% embryonální hmoty by mělo být neporušené a životaschopné. *Zona pellucida* je hladká bez vydutých či rovných ploch (Gordon, 2003).

Kód 2 označuje embrya uspokojivé kvality (Gordon, 2003). Jsou charakteristická přítomností vytlačených blastomer a puchýřkovitostí (Abe et al., 2002). Dále se vyznačují mírnými nepravidelnostmi v celkovém průměru embryonální hmoty nebo ve velikosti, barvě či hustotě jednotlivých buněk. Minimálně 50% embryonální hmoty by mělo být neporušené.

Přežitelnost embryí v procesu mražení/rozmrazování je nižší. Často jsou označována jako „přenosuschopná embrya“ (Bó et Mapletoft, 2013).

Kód 3 zahrnuje embrya, která se vyznačují značnými problémy jako např. obsahem velkého množství váčků. Kvalita těchto embryí je špatná (Abe et al., 2002). Největší nepravidelnosti jsou ve tvaru nebo velikosti embryonální hmoty, dále pak v barvě a hustotě jednotlivých buněk. Nejméně 25% buněčného materiálu by měla být neporušená a životaschopná embryonální hmota (Gordon, 2003). Tato embrya nejsou schopna přežít proces mražení/rozmrazování (Bó et Mapletoft, 2013).

Kód 4 představuje poslední kvalitativní skupinu embryí - embrya mrtvá či degenerovaná. Do této skupiny spadají též mrtvé/degenerované oocyty a embrya tvořená jednou buňkou (Gordon, 2003). Embrya nejsou životaschopná a vyřazují se (Bó et Mapletoft, 2013).

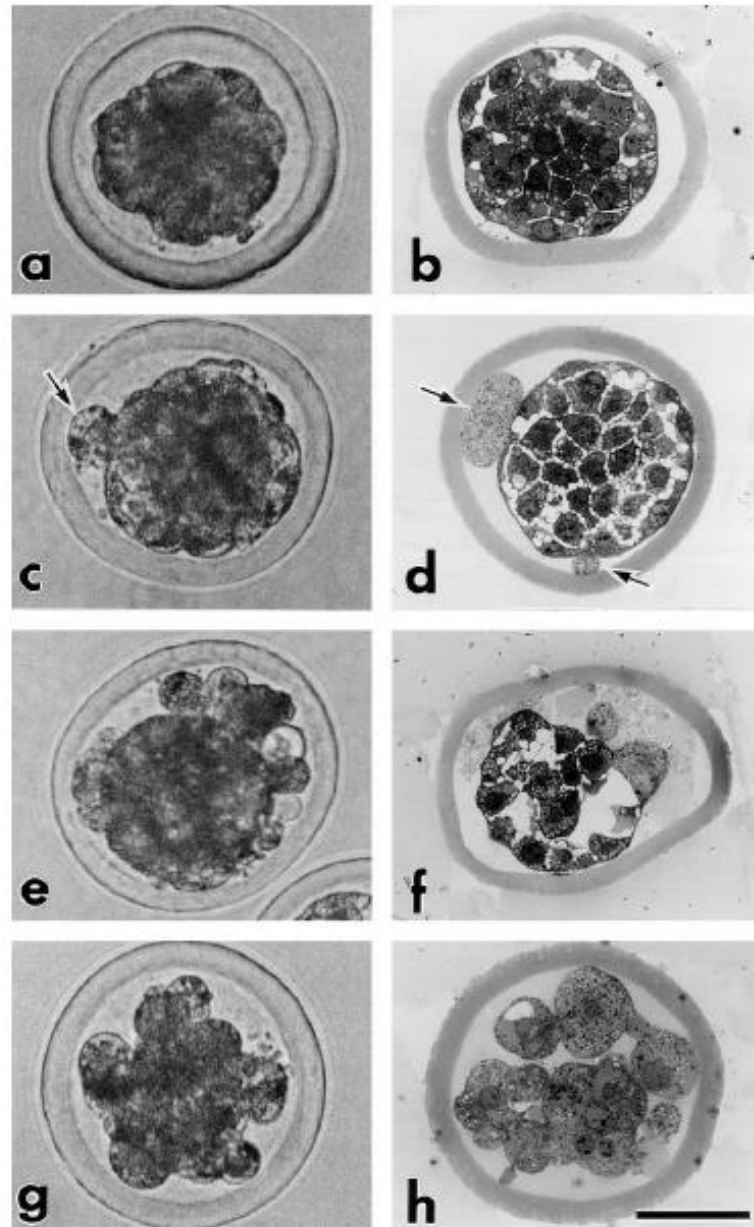


Fig. 1. Phase contrast micrographs (a, c, e, g) and light micrographs of semithin sections (b, d, f, h) of morula stage of bovine embryos collected from superovulated cows. (a, b) Excellent quality, (c, d) good quality (note extruded blastomeres; arrows), (e, f) poor quality (note some extruded blastomeres), (g, h) poor quality (note numerous extruded blastomeres). Bars 50 μ m.

Obr. 6 Fotografie z fázového kontrastního (a, c, e, g) a světelného (b, d, f, h) mikroskopu zobrazující vývojové stádium moruly bovinních embryí získaných sběrem od superovulovaných krav: a, b – vynikající kvalita, c, d – dobrá kvalita (přítomnost vytlačených blastomer, znázorněné šipkou), e, f – špatná kvalita (větší množství vytlačených blastomer), g, h – špatná kvalita (velké množství vytlačených blastomer) (Abe et al., 2002).

3.3 EMBRYOTRANSFER

Embryotransfer v chovech skotu se během posledních třiceti let zařadil k mezinárodnímu průmyslu (Hasler, 2001). Metoda je užitečná především u tohoto druhu hospodářských zvířat, a to kvůli jeho nízkým reprodukčním schopnostem a dlouhému generačnímu intervalu (Seidel et Seidel, 1991). Množství získaných a přenesených či zmrazených embryí se za rok pohybuje kolem 500 000 ks. Proces získávání a přenášení embryí se v dnešní době uskutečňuje v převážné většině nechirurgickými metodami (Hasler, 2001). Hlavní využití embryotransferu u skotu spočívá v získání většího množství potomstva od geneticky cenných plemenic (Vinkler et Lopatářová, 2009). Jinými slovy dochází k zesílení reprodukčních schopností cenných plemenic. Embryotransfer též umožňuje získat potomky od cenných krav, které se následkem zranění, nemoci či věku staly neplodnými. Další výhodou této biotechnické metody je umožnění importu a exportu chovných jedinců, což zvyšuje genetickou variabilitu chovů. V ideálním případě tato metoda uspokojuje jak genetické, tak i ekonomické cíle chovu současně (Seidel et Seidel, 1991).

Postup metody se skládá z několika na sebe navazujících a vzájemně se podmiňujících dílčích kroků. Tyto kroky zahrnují výběr donorů a recipientů, synchronizaci říjového cyklu donorů a recipientů, indukci superovulace u dárců, inseminaci dárců, vyhledávání, izolaci a klasifikaci embryí, odběr a přenos embryí (Vinkler et Lopatářová, 2009).

3.3.1 HISTORIE EMBRYOTRANSFERU

Širokou veřejností je uznáván názor, že první transfer savčích embryí zaznamenal a provedl Walter Heape v roce 1890. Přenesena byla dvě embrya angorského králíka (Selk, 2002). Embrya byla složená ze čtyř buněk (Mapletoft, 2013). Recipientem se stala inseminovaná belgická srna. Výsledkem byl smíšený vrh (Selk, 2002) čtyř belgických a dvou angorských králíčků (Mapletoft, 2013). Heapova technika zacházení s králíčími embryi zahrnovala jejich nabodnutí na špičku jehly a přenos recipientovi, přičemž mezi proces nabodnutí a přenosu nebylo zahrnuto umístění embryí do kultivačního média (Hasler, 2003).

K dalšímu výraznějšímu pokroku v dané oblasti a rozvoji komerčního embryotransferu došlo v raném období 70. let v Severní Americe (Hasler, 2003). Zasloužil se o to především Tim Rowson, kterému je přezdíváno otec zakladatel embryotransferu hospodářských zvířat (Mapletoft, 2013). V této době byl embryotransfer založen výhradně na chirurgickém odběru

a přenosu čerstvých embryí (Hasler, 2001). Odběr se prováděl pod celkovou anestézií, kdy se vedl řez středem břišní dutiny. Cílem bylo odhalit dělohu a vaječníky (Mapletoft, 2013).

V pozdním období 70. let byla objevena nechirurgická metoda odběru a transferu embryí, o kterou se zasloužil Peter Elsdén. Odběr embryí byl založen na výplachu dárce pomocí Foleyova katétru. Vyplachovací médium bylo zaváděno do dělohy tlakem, který byl způsoben gravitačním tokem a výplach byl shromažďován v odměrných válkách (Hasler, 2014).

U skotu došlo k prvnímu přenosu embryí v roce 1949. O dva roky později, tedy v roce 1951, se ve Wiskonsinu narodilo první tele, které bylo výsledkem embryotransferu (Seidel et Seidel, 1991). Ten byl proveden chirurgickou cestou. Přenášené pětidenní embryo bylo získáno na jatkách (Mapletoft, 2013).

3.3.2 DÍLČÍ KROKY EMBRYOTRANSFERU

3.3.2.1 Selektce dárců a příjemců

Selektce jedinců účastnících se embryotransferu je jedním z nejdůležitějších kroků, který rozhoduje o jeho úspěšnosti a přínosu. Dárce se obvykle stává zvíře vysoké genetické hodnoty. Příjemcem se naopak stává zvíře s podprůměrnou užitkovostí nebo takové, které je potomkem plemence mající užitkovost pod průměrem stáda (Vinkler, 2009).

Selektce dárců

Při výběru dárců se zohledňují dvě hlavní kritéria. Prvním kritériem je vysoká genetická kvalita, tzn. výběr jedinců, kteří přispívají ke splnění genetických cílů programu. Druhým kritériem je pravděpodobnost produkce velkého množství užitečných embryí (Seidel et Seidel, 1991).

Nejčastěji se dárkyněmi stávají krávy, jalovice jen v ojedinělých případech (Vinkler, 2009). Potencionální dárkyně by měla dosahovat maximálních reprodukčních výsledků, které jsou podmíněny jejím normálním reprodukčním traktem a plodností, poporodní historií a délkou cyklu. Cyklus by měl v ideálním případě trvat 18-24 dnů (Selk, 2002). Důležitým kritériem jsou též bezproblémové porody a minimálně dvě odpozorované říje. Zvíře by mělo být naprosto zdravé, bez orgánových onemocnění a krmeno vyrovnanou krmnou dávkou. Musejí být též omezeny vlivy způsobující stres zvířete, tj. vysoká teplota a vlhkost prostředí, hrubé zacházení, nevhodná manipulace a přeplněné prostory (Vinkler, 2009). V mnoha

případech se provádí cílená měření genetického potenciálu zvířete. Tato měření spočívají ve zjišťování mléčné produkce, složení mléka, rychlosti růstu, snadnosti telení či rezistence vůči různým chorobám (Seidel et Seidel, 1991).

Z výše zmíněného vyplývá, že nejúspěšnějším dárcem je zdravé, cyklující zvíře s vynikající reprodukční historií (Seidel et Seidel, 1991). Upřednostňují se jedinci mléčného skotu, jejichž hlavním rysem je produkce mléka přispívající k lepším reprodukčním schopnostem (Selk, 2002).

Selekce příjemců

Příjemcem se ve většině případů stávají jalovice, nejlépe prvotelky. Stáří jalovic by se mělo pohybovat v rozmezí 15-18 měsíců a jejich hmotnost mezi 350-380 kg. Též by u nich již měla být pozorována říje (Vinkler, 2009). Výhodou jalovic oproti kravám je jejich vysoká oplozeníschopnost. Jalovice také na rozdíl od krav nekojí, tudíž neprodukují mléko. Toto se stává výhodné z hlediska odpadající povinnosti kontroly a řízení dojení či porodů (Seidel et Seidel, 1991). Obecně platí, že vhodnost příjemce závisí na načasování estru a přítomnosti funkčního žlutého tělíska (Spell et al., 2001).

3.3.2.2 Synchronizace pohlavního cyklu dárce a příjemce

Hormonální manipulace s estrálním cyklem skotu je nedílnou součástí technologií embryotransferu. Obvykle hraje nezastupitelnou roli v různých aspektech produkce embryí, a to jak při výběru dárců oocytů, tak i při výběru příjemců embryí (Gordon, 2003). Přesná synchronizace pohlavního cyklu dárce a příjemce je limitujícím faktorem. Je velmi důležité, aby oba jedinci, účastníci se embryotransferu, byli ve stejné fázi ovariálního cyklu, a tudíž aby bylo u obou stejné děložní prostředí odpovídající stáří přenášeného embrya. Toto vede k bezproblémovému přijetí daného embrya dělohou a jeho normálnímu vývoji (Vinkler, 2009).

Synchronizace říje

Velmi častou a běžně používanou metodou v chovech skotu je synchronizace říje. Nejčastějšími důvody k provádění této metody jsou nízká úroveň detekce říje a potřeba synchronizace pohlavního cyklu dárce a příjemce v rámci embryotransferu (Doležel, 2009). Detekce říje je časově i pracovně velice náročná činnost. Často se stává zdrojem chyb v managementu reprodukce chovu a načasování inseminace (Roelofs et al., 2010). Synchronizace říje je jedním z pokročilých řídicích procesů chovu, který eliminuje lidské

chyby v managementu reprodukce (Islam, 2011). Díky synchronizačním protokolům též odpadá nutnost detekce říje (Looney et al., 2006). Cílem úspěšné synchronizace říje je přesné ovládní jejího počátku společně s vysokou plodností v synchronizovaných estrech (Driancourt, 2001).

Pro účely synchronizace říje se využívají četné hormonální preparáty, které obsahují prostaglandiny či jejich syntetické analogy, progesteron či progestiny (Murugavel et al., 2003). Tyto látky zlepšují využití příjemce skrze časový soulad ovulací (Looney et al., 2006). Reakce vaječnicků na exogenní stimulaci je podřízena jejich fyziologickému stavu v době zahájení synchronizace (Martínez et al., 2009). Strategie řízení estru jsou založeny především na kontrole životnosti žlutého tělíska pomocí prostaglandinů (Driancourt, 2001), které navozují luteolýzu (Jones et Lamb, 2008). Další využívanou strategií je ošetření progestiny (Driancourt, 2001). Úkolem těchto steroidních hormonů je zamezit estru, který následuje po přirozené nebo uměle vyvolané luteolýze, nebo ho oddálit (Jones et Lamb, 2008).

Farmakologická kontrola estru a jeho synchronizace je založena na dvou základních postupech. Prvním postupem je zkracování luteální fáze cyklu (Murugavel et al., 2003) a zároveň i životnosti žlutého tělíska navozením jeho regrese, tedy luteolýzy (Gordon, 2003). Opačným a zároveň druhým postupem je prodlužování luteální fáze cyklu (Murugavel et al., 2003) spolu s prodloužením životnosti žlutého tělíska (Gordon, 2003).

Zkracování luteální fáze estrálního cyklu je zajišťováno aplikací látek s luteolytickým účinkem, konkrétně $\text{PGF}_{2\alpha}$ a jeho analogů (Stötzel et al., 2012). Cílem aplikace je navodit regresi žlutého tělíska (Doležel, 2009). Účinek látky závisí na jejím podání ve správné fázi estrálního cyklu a citlivosti žlutého tělíska na $\text{PGF}_{2\alpha}$ v době aplikace (Skarzynski et al., 2008). Luteolytikum se dárčům aplikuje během superovulačního ošetření, tzn. že působením FSH již došlo k částečnému zrání folikulů (Vinkler, 2009). Říje se objevuje zpravidla 3 dny po ošetření $\text{PGF}_{2\alpha}$ (Martínez et al., 2009), proto se příjemcům aplikuje luteolytikum o 12-24 hodin dříve než dárčům. Zajistíme tak, že se říje dostaví u obou jedinců ve stejný den (Vinkler, 2009). Ošetření se provádí zpravidla pouze jednou, a to v případě, pokud je v této době na vaječniku přítomno plně funkční žluté tělísko (Murugavel et al., 2003).

Prodlužování luteální fáze či umělé vyvolání luteální fáze, jakožto druhý způsob synchronizace říje, spočívá v inhibici estru a ovulace. K tomuto účelu se aplikují progestiny a exogenní či syntetický progesteron. Tyto látky inhibují uvolňování LH a tím zabraňují finální

maturaci a ovulaci folikulů (Murugavel et al., 2003). Progesteron může též plně nahrazovat žluté tělísko (Gordon, 2003).

Folikulární ablace

Folikulární ablace je další používanou metodou v chovech skotu k synchronizaci říje, konkrétně folikulárních vln (Doležel, 2009). Možnost zvolit si dobu vyvolání vzniku folikulární vlny eliminuje opět potřebu detekce říje (Mapletoft et Bó, 2013).

Metoda folikulární ablace je založená na eliminaci supresivního efektu dominantního folikulu a tím uspíšeného nástupu vzniku nové folikulární vlny (Martínez et al., 2009). K odstranění dominantního folikulu se dříve využívala elektrokauterizace. V současnosti nejvíce využívanou metodou je transvaginální ultrazvukem vedená folikulární aspirace (Bó et al., 1995). Původní studie uvádí, že dochází k odstranění všech folikulů větších nebo rovných 5 mm. Dnes je však prokázáno, že stačí odstranit pouze dva největší folikuly. To postačí k tomu, abychom se ujistili, že došlo k odstranění folikulu dominantního. Folikulární ablace se ukázala jako vysoce efektivní. Nevýhodou však zůstává nutnost ultrazvukového zařízení a odborného personálu (Mapletoft et Bó, 2013).

Hormonální ošetření

Hormonální ošetření je směřováno k vyvolání luteinizace nebo atrézie folikulů přítomných v době ošetření na vaječnicích (Bó et al., 1995).

Progesteron

K synchronizaci vzniku folikulárních vln se s vysokou úspěšností používá progesteron (Driancourt, 2001). Funkcí progesteronu je potlačování růstu a zrání folikulů v závislosti na jeho dávce (Bó et al., 1995). Progesteron potlačuje zrání folikulů, jelikož negativní zpětnou vazbou inhibuje sekreci GnRH z hypotalamu. Pokud chceme provést úspěšnou synchronizaci u skupiny krav nacházejících se v náhodné fázi cyklu, je nezbytné, aby se délka doby ošetření shodovala s délkou přirozené luteální fáze. Ošetření tedy musí trvat nejméně 16 dní. Důvodem je nízká schopnost progesteronu ovlivnit životnost přirozeného žlutého tělíska. V některých případech se proto může stát, že žluté tělísko přetrvá i po ukončení ošetření progesteronem a vede k selhání synchronizace (Ball et Peters, 2007).

Nejvhodnějším způsobem aplikace progesteronu jsou tzv. inserty. Ty mohou být aplikovány buď do vagíny, nebo pod kůži. Intravaginální inserty jsou běžnější a řadíme sem PRID-Delta (progesterone-releasing intravaginal device), který obsahuje 1,55 g progesteronu

a CIDR (controlled internal drug release), obsahující 1,38g progesteronu (Ball et Peters, 2007).

GnRH/LH

GnRH je konvečním stimulatorem ovulace v synchronizačních postupech. Bylo však prokázáno, že je méně účinný než hypofyzární LH (Hesser et al., 2011). Tento hormon vyvolává zvýšení hladiny endogenního LH a ovulaci LH-dependentních folikulů. Jedná se o takové folikuly, jejichž velikost je větší než 8 mm (Driancourt, 2001). Aplikace GnRH/LH nabízí příležitost kontrolovat folikulární dění v průběhu estrálního cyklu (Martínez et al., 2009). Kromě ovulace největšího folikulu, který je přítomný v době ošetření, může GnRH/LH vyvolat též luteinizaci tohoto folikulu (Mapletoft et Bó, 2013). Ke vzniku nové folikulární vlny dochází 1,5-2 dny po ošetření. Je vyvolána právě ovulací největšího dominantního folikulu. Nicméně výsledkem každého podání GnRH/LH v náhodném stádiu estrálního cyklu vždy nemusí být ovulace (Martínez et al., 2009). Pro vznik nové folikulární vlny po podání GnRH/LH je však ovulace nezbytná. Objevuje se ve 44-54% případů u dojnic, v 56% případů u hovězích jalovic a v 60% případů u hovězích masných krav. Z důvodu příliš nekonzistentního intervalu mezi ošetřením GnRH/LH a vznikem folikulární vlny nemusí být tato metoda vždy vhodná pro superstimulaci. Též byla prokázána neuspokojivá produkce embryí po synchronizaci folikulárních vln pomocí těchto hormonů (Bó et Mapletoft, 2014).

Prostaglandiny

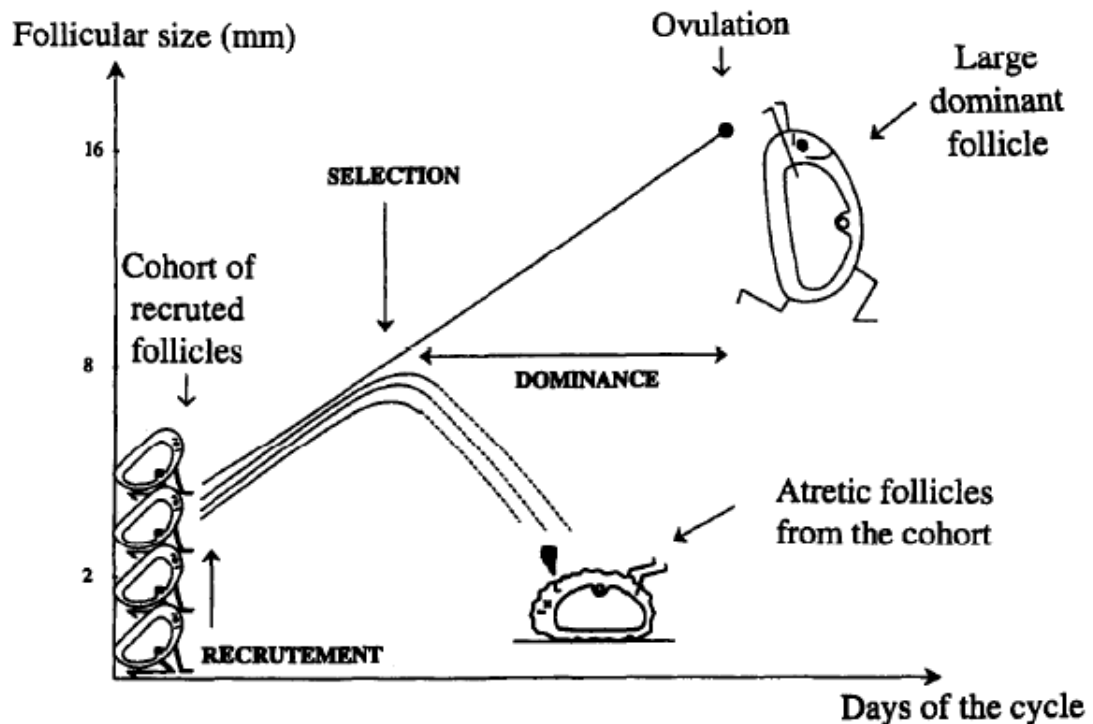
Prostaglandin $PGF_{2\alpha}$ či jeho syntetické analogy se aplikují zpravidla v luteální fázi pohlavního cyklu (Doležel, 2009). Délka intervalu mezi aplikací $PGF_{2\alpha}$ a ovulací závisí na stádiu vývoje dominantního folikulu přítomného v čase ošetření. Ovulace se objevuje nejčastěji 3 dny po tomto ošetření (Martínez et al., 2009). Cílem aplikace je navodit regresi žlutého tělíska. Se zánikem žlutého tělíska se začne snižovat hladina progesteronu v krvi. Též dochází k rychlému nárůstu dominantního folikulu, čímž dochází ke zvyšování hladiny estradiolu. Estradiol ovlivňuje pozitivní zpětnou vazbou hypotalamus a hypofýzu, a tím indukuje vznik LH vlny a následnou ovulaci (Doležel, 2009).

3.3.2.3 Superovulace dárců

Dynamika folikulárních vln

Vznik folikulů na vaječnicích skotu je dynamický sled uspořádaných událostí (Bó et al., 1995). Vaječnící skotu obsahují dvě různé skupiny folikulů. První z nich je skupina nerostoucích folikulů obsahující folikuly primordiální. Během reprodukčního života vstupují postupně tyto folikuly do rostoucí fáze a přeměňují se na folikuly primární. Druhou skupinu tvoří folikuly primární, sekundární a terciární, které již vykazují růstovou aktivitu (Kanitz, 2003). Růst gonadotropin-senzitivních folikulů během ovariálního cyklu a poporodního období anestrů má zřetelný vlnový charakter (Diskin et al., 2002). Vlna vývoje folikulů byla definována jako synchronní růst velkého množství folikulů (Bó et al., 1995).

Vývoj folikulů na vaječnicích je rozdělen do tří fází - recruitment, selekce a dominance. První fáze - recruitment, je charakteristická vstupem primordiálních folikulů do skupiny folikulů rostoucích. Klíčovým hormonem, který umožňuje recruitment a zároveň iniciaci folikulární vlny je FSH (Kanitz, 2003). Dále následuje selekce, která začíná již během recruitmentu (Bó et al., 1995). Během této fáze se postupně snižuje počet folikulů rekrutované skupiny, který pokračuje v růstu. Nakonec dojde k selekci jediného dominantního folikulu (Kanitz, 2003). Dominantní folikul dané folikulární vlny je větší než ostatní (Bó et al., 1995). Na konci fáze selekce dosahuje průměrné velikosti až 8,5 mm (Bó et al., 2002). Selekce dominantního folikulu probíhá během snižování koncentrace FSH (Diskin et al., 2002). Poslední fází ve vývoji folikulů je dominance. Folikul selektovaný v předchozí fázi je funkčně plně dominantní a stále roste (Kanitz, 2003). Dominantní folikul produkuje steroidní i nesteroidní látky, které negativně působí na růst podřízených folikulů, tzn. že tlumí jejich růstovou aktivitu či způsobuje jejich atrézii. Tyto látky též znemožňují vznik další folikulární vlny (Bó et al., 2002). Osudem dominantního folikulu je buď jeho rozvoj ve folikul ovulační, nebo podlehnutí atrézii, tedy zániku. K vyvolání ovulace dominantního folikulu je potřeba vysoká dávka LH (Kanitz, 2003).



Obr. 7 Vývoj folikulů na vaječnicích – stádium recruitmentu, selekce, dominance (Driancourt, 2001).

Jak bylo zmíněno výše, růst folikulů na vaječnicích má vlnový charakter. Stimulem pro růst nové vlny je přechodný nárůst hladiny FSH. Poté co růst dosáhne vrcholu, koncentrace FSH se opět sníží během několika dnů (Diskin et al., 2002). Vznik každé folikulární vlny je náhlý a na vaječniku roste současně asi dvacet, někdy i více, malých folikulů. Tyto folikuly o velikosti průměrně 4 mm jsou detekovány pomocí sonografie (Mapletoft et al., 2002). Zpočátku folikuly rostou stejným tempem. Následně dochází k rozdělení skupiny rostoucích folikulů na jediný dominantní folikul a skupinu folikulů podřízených (Diskin et al., 2002). Vlna vzniká v průběhu 1-2 dnů (Mapletoft et al., 2002). Vlastní životnost vlny je pak 7-10 dnů (Diskin et al., 2002). Každá vlna prochází různými vývojovými stádii, tj. vznik, deviace a dominance. Ve stádiu vzniku se folikulární vlna začíná objevovat na vaječniku. Deviace je charakteristická rozlišením dominantního folikulu a jemu podřízených folikulů. Stádium dominance je charakteristické rozvojem dominantního folikulu a potlačováním podřízených folikulů. Je zakončeno buď ovulací dominantního folikulu či jeho atrézií, tedy zánikem (Kanitz, 2003).

Folikulární vlny zůstávají neovulované do té doby, dokud nenastane luteolýza. Dominantní folikul, který je na vaječniku přítomný v době luteolýzy, se stává folikulem

určeným k ovulaci. Vznik nové vlny je tak odložen na den, kdy nastává ovulace (Mapletoft et al., 2002).

Většina estrálních cyklů skotu je složena buď ze dvou nebo tří folikulárních vln (Bó et al., 1995). Poměr zvířat s cyklem složeným ze dvou vln a cyklem složeným ze tří vln se liší ve výsledcích různých experimentů. Bylo prokázáno, že na počet folikulárních vln v cyklu má vliv výživa. U skotu, kterému je podáváno krmivo s nízkým poměrem energie, je vyšší míra výskytu cyklu se třemi folikulárními vlnami. Jinak je tomu u skotu, v jehož výživě převládá vyšší poměr energie. Tato zvířata jsou charakteristická cyklem složeným ze dvou folikulárních vln (Mapletoft et al., 2002). U cyklu složeného ze dvou folikulárních vln se vlna objevuje na vaječniku zpravidla v den ovulace (den 0), a pak den desátý. U cyklu složeného ze tří folikulárních vln se vlny objevují v den 0, 9 a 16 (Bó et al., 1995).

Metoda superovulace

Metoda superovulace se vyznačuje uměle vyvolaným růstem, zráním a ovulací velkého množství folikulů. Množství takto ovulovaných folikulů je daleko větší než počet folikulů uvolněných v průběhu přirozené říje (Čech, 2009). K stimulaci extenzivního rozvoje folikulů se používají různé hormonální preparáty, které se aplikují intramuskulárně či subkutánně (Selk, 2002). Nejběžněji aplikovanými preparáty jsou exogenní gonadotropiny (Čech, 2009). Mezi tyto preparáty řadíme především FSH nebo eCG (Hesser et al., 2011). Aplikace se nejčastěji provádí zhruba v polovině estrálního cyklu (Bó et Mapletoft, 2014). Oocyty získané v procesu superovulace by měli poskytovat vysokou schopnost oplození (Mapletoft et al., 2002) a pravděpodobnost zabřezávání, a to hlavně vzhledem k jejich využití v programech embryotransferu (Bó et Mapletoft, 2014). Cílem ošetření, které vede k vyvolání superovulace, je získat maximální množství přenosuschopných embryí (Mapletoft et al., 2002) a potomstvo od geneticky cenných plemen (Driancourt, 2001). Průměrně získáváme 6 takových embryí během jednoho sběru (Hesser et al., 2011).

Velice důležitým parametrem je odezva vaječníků na superstimulaci, tedy na ošetření gonadotropiny. Ovariální asynchronnost a variabilita v odezvě na jejich ošetření je limitujícím faktorem nejen pro superovulaci, ale i ostatní biotechnologické metody (Bó et al., 1995). Nejvíce je tímto problémem ovlivněn embryotransfer především z hlediska účinnosti a ziskovosti (Mapletoft et al., 2002). Existuje mnoho různých faktorů, které ovlivňují odezvu vaječníků na superstimulaci. Tyto faktory dělíme na vnitřní a vnější. K faktorům vnitřním řadíme hlavně ty, které souvisejí s fyziologickým stavem zvířete. Patří k nim např. věk,

plemeno, genetické rozdíly a stav vaječníků v době ošetření (Kafi et MgGowan, 1997). Vliv stavu vaječníků souvisí především s dostatečným množstvím gonadotropin-senzitivních folikulů přítomných na vaječniku v době ošetření (Driancourt, 2001). Tyto folikuly, též označované jako antrální, jsou totiž schopné pozitivní reakce na hormonální stimulaci. Dále se posuzuje přítomnost dominantního folikulu, který aktivně potlačuje růst jemu podřízených antrálních folikulů (Čech, 2009). Důležitý je také stav folikulární vlny (Driancourt, 2001). K faktorům vnějším pak patří roční období, výživa a použité hormonální prostředky (Kafi et MgGowan, 1997). U hormonálních preparátů hraje důležitou roli především dávka, trvání a čas podání a přídavek dalších hormonů (Mapletoft et al., 2002).

Hormonální preparáty používané k superovulaci

K vyvolání superovulace u skotu jsou používány tři různé typy gonadotropinů. Řadíme k nim gonadotropiny získané z extraktů hypofýz domestikovaných zvířat (Mapletoft et al., 2002). Jsou to gonadotropiny typu folikuly stimulujících hormonů neboli FSH. Nejčastěji se získávají extrakty z hypofýz prasat (pFSH) a ovcí (oFSH). Též může být použit rekombinantní bovinní FSH (rbFSH) (Čech, 2009). Dalším používaným preparátem je equinní choriový gonadotropin (eCG). Posledním preparátem je lidský menopauzální gonadotropin (hMG) (Mapletoft et al., 2002). Nejpracnější a finančně nejnáročnější částí superovulace je právě produkce a zavedení gonadotropinů, a to bez ohledu na to, který gonadotropin zvolíme pro její vyvolání (Hesser et al., 2011).

V praxi nejběžněji používaným preparátem je FSH (Čech, 2009). Hypofyzární extrakty však vždy obsahují kromě FSH i značná množství LH neboli luteinizačního hormonu. Poměr FSH/LH se v jednotlivých extraktech liší, stejně tak jako jejich aktivita, a ovlivňuje odezvu na superovulaci. Nižší poměr aktivit FSH/LH vyvolává sníženou ovulační odpověď. Hypofyzární extrakty se sníženou hladinou LH zlepšují odpověď na superovulaci u skotu. Se snižující se hladinou LH též narůstá množství získaných a přenosuschopných embryí. Naopak zvýšená hladina LH během superstimulace vyvolává předčasnou aktivaci oocytů (Bó et Mapletoft, 2014). Ze získaných poznatků vyplývá, že LH není pro superovulaci nezbytný a že kvalita embryí je vyšší spíše při použití preparátů čistého FSH (Mapletoft et al., 2002). Vlastnost, kterou posuzujeme jak u FSH, tak i u ostatních preparátů, je biologický poločas rozpadu (Čech, 2009). Poločas rozpadu FSH je velice krátký, a to pět hodin a méně (Mapletoft et al., 2002). Toto je jeho značnou výhodou např. oproti eCG. Výhody použití FSH též zahrnují snížení výskytu folikulárních cyst a více konzistentní výsledky. Díky krátkému poločasu rozpadu je vyžadována jeho opakovaná aplikace (Hesser et al., 2011).

Schémata aplikace jsou různá. Nejběžněji se používá série sestupných dávek, které jsou aplikovány dvakrát denně po dobu čtyř dnů ve dvanáctihodinových intervalech. Celková dávka FSH se různí, avšak nejčastěji dosahuje hodnoty 25 mg/aplikace (Čech, 2009).

Méně často se pro vyvolání superovulace používá eCG (Čech, 2009). Jedná se o glykoprotein vybavený jak účinkem FSH, tak i LH (Mapletoft et al., 2002). Je charakteristický prodlouženou biologickou aktivitou, která negativně ovlivňuje vývoj raných embryí (Hesser et al., 2011). Další negativní dopad dlouhodobého účinku eCG spočívá ve výskytu neovulovaných folikulů a pokračující stimulaci vaječnicků (Mapletoft et al., 2002). Z těchto důvodů je jeho použití méně obvyklé (Čech, 2009). Někdy se využívá anti-eCG injekce, která snižuje jeho aktivitu, a tudíž zmírňuje jeho negativní dopad (Hesser et al., 2011). Bylo prokázáno, že poločas rozpadu eCG u krav je až 40 hodin a v krevním oběhu setrvává více než 10 dní (Mapletoft et al., 2002). V dřívějších dobách bylo použití eCG běžným postupem. Čas aplikace byl vázán na přechod mezi luteální a folikulární fází, a to přibližně 16. den estrálního cyklu. V této době zvířata přirozeně prodělávají luteolýzu (Bó et Mapletoft, 2014). Aplikace eCG se provádí pouze v jedné dávce v množství od 2500 do 3500 IU, přičemž existuje možnost individuálního přizpůsobení (Čech, 2009). O 48 hodin později (19. – 20. den cyklu) následuje aplikace $\text{PGF}_{2\alpha}$ nebo estradiolu-17 β (Bó et Mapletoft, 2014). Použití estradiolu-17 β je však v Evropské unii zakázáno direktivou 2008/97/ES (Lane et al., 2008). Účinek $\text{PGF}_{2\alpha}$ /estradiolu-17 β spočívá v zajištění luteální regrese, vyvolání estru a v následných lepších výsledcích superovulace. Posledním krokem je aplikace hCG v množství 2000 IU (Bó et Mapletoft, 2014).

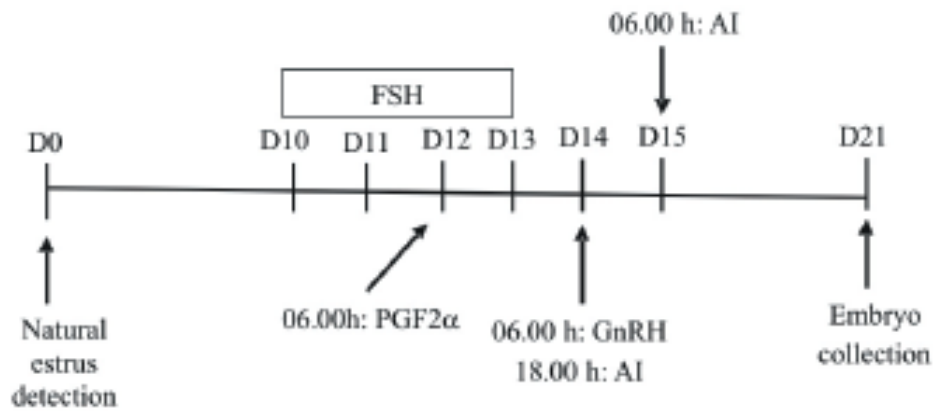
Obdobný způsob využití jako FSH má i lidský menopauzální gonadotropin (hMG), který se však používá spíše experimentálně. Důvodem jsou vysoké náklady s ním spojené. Pro aplikaci se používá dávka 1000 IU hMG (Čech, 2009). Výsledky superovulace za použití hMG jsou srovnatelné s výsledky superovulace vyvolané hypofyzárními extrakty (Bó et Mapletoft, 2014).

Současně nepoužívanější postup superovulace

Zahájení hormonální stimulace je úzce spjato s přítomností dostatečného množství malých antrálních folikulů na vaječnicích, které jsou schopny na tuto stimulaci pozitivně reagovat. Z tohoto důvodu je superovulace zahajována v době, kdy nastává růstová fáze folikulární vlny (Čech, 2009).

Ošetření gonadotropiny se obvykle začíná v polovině estrálního cyklu, tedy 8. - 12. den po ovulaci (Baruselli et al., 2006). V této době dochází na vaječniku ke vzniku druhé folikulární vlny (Mapletoft et Bó, 2013). K aplikaci FSH dochází tedy v den vzniku této vlny nebo den po jejím vzniku. Největší folikul této vlny je označován jako dominantní. Pokud je dominantní folikul na vaječniku přítomen i v době hormonální stimulace, zhoršuje výsledky superovulace. Důvodem je, že aktivně potlačuje růst jemu podřízených antrálních folikulů (Čech, 2009). Naopak jeho absence na začátku ošetření zvyšuje úspěšnost superovulace (Baruselli et al., 2006). Proto se různými způsoby provádí odstraňování dominantního folikulu a jeho supresivního účinku. Superstimulace je zahájena 1-2 dny po jeho odstranění (Martínez et al., 2009). Pro kvalitu neovulovaných folikulů a normální průběh superovulace je též velice důležitá přítomnost endokrinně aktivního žlutého tělíska, které zvyšuje koncentraci progesteronu v periferní krvi (Čech, 2009).

Existují dvě všeobecně přijaté metody provedení superovulace u skotu. Základem první a zároveň nejpoužívanější, metody je aplikace FSH ve formě osmi intramuskulárních injekcí dvakrát denně po dobu 4-5 dnů. Dávka FSH se pohybuje kolem 25 mg/aplikace (Hesser et al., 2011). Injekce FSH dvakrát denně je nutná z důvodu jeho krátkého poločasu rozpadu, a to 5 hodin a méně (Bó et Mapletoft, 2014). Nejběžnější je aplikace dle schématu 6, 6, 4, 4, 2, 2, 2 a 2 mg FSH v půldenních intervalech (Seidel et Seidel, 1991). $\text{PGF}_{2\alpha}$ je injektován 48 až 72 hodin po zahájení ošetření FSH (Mapletoft et al., 2002). Jeho aplikace se provádí současně s pátou nebo šestou injekcí FSH, což zhruba odpovídá 48-36 hodinám před očekávaným estrem, v množství 25 mg/aplikace (Hesser et al., 2011). $\text{PGF}_{2\alpha}$ je látka, která vyvolává luteolýzu. Estrus se objevuje za 36-48 hodin s ovulací začínající za 24-36 hodin (Mapletoft et al., 2002).



FSH - follicle-stimulating hormone; D - day; AI - artificial insemination.

Obr. 8 Schéma tradiční čtyřdenního superovulačního protokolu s použitím GnRH a provedení dvou inseminací – 14. a 15. den (Ferreira et al., 2014).

Tento přístup k superovulaci s sebou přináší i určité komplikace, které spočívají především v detekci estru. Detekce je důležitá hlavně z hlediska započetí hormonální stimulace. Problémy představuje i značná individuální variabilita ve výskytu sekundární folikulární vlny (Baruselli et al., 2006). Pro superovulaci je též nezbytné, aby byla všechna dárcovská zvířata v estru ve stejný čas, aby mohlo být zahájeno skupinové ošetření (Mapletoft et Bó, 2013).

Druhá metoda superovulace se dnes prakticky nepoužívá, ale je jednodušší než předešlá. Spočívá v intramuskulárním podání 1800-3000 IU (obvykle 2000 – 2500 IU) PMSG. Po 2-3 dnech následuje intramuskulární aplikace luteolytické dávky $PGF_{2\alpha}$. Za dalších 12-24 hodin následuje druhá injekce $PGF_{2\alpha}$ (Seidel et Seidel, 1991).

3.3.2.4 Inseminace dárců

Při inseminaci po superovulačním ošetření musíme respektovat některé odlišnosti říje. K těmto odlišnostem patří větší množství oocytů uvolněných během ovulace a celkově její delší časový průběh (Vinkler, 2009). U dárců musejí být pečlivě pozorovány příznaky estru. Méně zřetelné jsou právě u krav ošetřených superovulací. Doba, kdy je poprvé zaznamenán estrus, je doporučovaným ukazatelem pro inseminaci (Seidel et Seidel, 1991). Úspěšně používaným systémem je inseminace superovulovaných krav 12, 24 a 36 hodin po nástupu stálé tělesné teploty (Selk, 2002). Znamená to, že první inseminace se provádí 12 hodin po objevení se estru, tedy jeho počátečních příznaků. Reinseminace zvířete se provádí ve

dvanáctihodinových intervalech tak dlouho, dokud neodezní poslední příznaky říje (Vinkler, 2009).

Kritickým bodem embryotransferu je použité sperma, které by mělo být velice kvalitní s vysokým podílem normálních, pohyblivých spermií (Selk, 2002). Vzhledem k mnohonásobně vyššímu počtu ovulovaných oocytů je též třeba použít více spermatu. Čerstvé sperma je díky své delší životnosti v reprodukčním traktu samice nadřazenější vůči vyšší kvalitě spermatu mraženého (Seidel et Seidel, 1991). Doba přežitelnosti spermií, počet spermií s progresivním pohybem patří mezi kvalitativní ukazatele inseminační dávky a je na nich závislé množství použitých inseminačních dávek (Vinkler, 2009). Optimální množství spermií v čerstvém ejakulátu určeném k inseminaci je $10\text{-}50 \times 10^6$ (Seidel et Seidel, 1991). Místem vhodným pro deponování spermatu je tělo dělohy (Selk, 2002). Nepřehlédnutelným faktorem ovlivňujícím inseminaci je též správné zacházení se spermatem. Je velice důležité, aby inseminační technik dbal na hygienu, jelikož vlivem stresu způsobeného při superovulačním ošetření se stává reprodukční trakt samice velice senzitivní (Seidel et Seidel, 1991).

3.3.2.5 Odběr embryí

Před rokem 1976 byla většina bovinních embryí získávána chirurgickou cestou, a to buď laparotomií středové osy břišní dutiny, nebo bočním řezem, což bylo méně běžné (Seidel et Seidel, 1991). Dnes se využívá spíše cesta nechirurgická. Základy této metody položil Peter Elsdén (Hasler, 2014). Jedná se o celosvětově běžně používanou metodu získávání embryí (Richard et al., 2015).

Ve většině případů dochází k odběru embryí mezi šestým a osmým dnem po začátku estru, ten představuje den 0 (Seidel et Seidel, 1991). Odběr provádíme tehdy, když je většina embryí lokalizována v kraniální třetině děložního rohu, což je nejčastěji 7. den po inseminaci dárce (Vinkler, 2009). Tuhle dobou by mělo normálně se vyvíjející embryo dosahovat minimálně vývojového stádia rané blastocysty. Většina embryí však již bývá ve stádiu blastocysty, některá dokonce expandované blastocysty. Průměrně jsou odebrána čtyři embrya, někdy až šest, která jsou kvalitní a přenosuschopná (Galli et al., 2003).

Nechirurgická cesta odběru embryí

Odběr embryí nechirurgickou cestou spočívá ve výplachu dělohy či děložních rohů. Před samotným výplachem však musíme nejprve posoudit úroveň superovulace a využívání plemenice. Superovulaci posuzujeme na základě odečtení počtu žlutých tělísek přítomných na

vaječnicích (Vinkler, 2009). Jedná se o první velice důležitý krok, kdy palpací vaječníků *per rectum* odhadneme počet žlutých tělísek. Přesnější metodou je pak zjišťování žlutých tělísek za pomoci ultrasonografie (Seidel et Seidel, 1991). Za korektní odpověď na superovulační ošetření je považován výskyt pěti až šesti žlutých tělísek na jednom vaječniku (Richard et al., 2015), avšak pro uskutečnění odběru postačí přítomnost minimálně dvou až tří tělísek (Vinkler, 2009).

Před každou procedurou je též nutné odstranit výkaly z rekta a očistit oblast poševní hráze vodou a 70% ethanolem. Dříve, než započne samotný odběr embryí, obdrží každá kráva epidurální anestezii do kořene ocasu (Castro Neto et al., 2005). Doporučuje se injekční podání 5 ml sterilního 2% roztoku prokainu (Seidel et Seidel, 1991). Částečné znecitlivění konečníku a zevních genitálií by mělo při správné aplikaci anestetika nastoupit v průběhu 2-3 minut. Úplné uvolnění ohonu je pak ukazatelem účinku podaného anestetika (Vinkler, 2009). Anestezie se provádí kvůli snížení nepohodlí, tlumení případného tlačení a eliminaci peristaltiky (Castro Neto et al., 2005).

Základním nástrojem používaným pro nechirurgický výplach dárců je Foleyův katétr. Ten může být buď dvojcestný, nebo trojcestný. Upřednostňován je však katétr dvojcestný z důvodu vyšších průtokových vlastností (Seidel et Seidel, 1991). Výplach se provádí pouze jednou nebo opakovaně (Castro Neto et al., 2005). Prvním krokem je rozhrnutí stydkých pysků a zavedení katétru do pochvy. Následuje zavádění dále skrze děložní krček. Výplach dělíme dle umístění balónku Foleyova katétru na výplach těla dělohy nebo děložního rohu, přičemž častěji se využívá druhá možnost (Seidel et Seidel, 1991). Katétr je zpravidla vyztužen ocelovým mandrémem a uložen v ochranném krytu (Vinkler, 2009). Mandrén zajišťuje tuhost katétru při jeho průchodu děložním krčkem (Selk, 2002). K fixaci katétru slouží výše zmiňovaný balónek, který se plní potřebným množstvím vzduchu. Toto množství však nesmí poškozovat *endometrium* a *myometrium* (Vinkler, 2009). Obvykle se objem vzduchu v balónku pohybuje mezi 18-25 ml (Richard et al., 2015). Místem fixace je nejčastěji palpací zjistitelná bifurkace děložních rohů (Seidel et Seidel, 1991). Katétr se však zavádí 5-10 cm pod bifurkaci (Richard et al., 2015). Dále se připojuje k již zavedenému katétru Y-spojka s přítokovou a odtokovou hadičkou (Selk, 2002). Na přítokovou hadičku je napojena nádoba s vyplachovacím médiem a na odtokovou nádoba jímací (Vinkler, 2009). Ke každé z těchto hadiček je připojen peán pro regulaci toku vyplachovacího média (Selk, 2002). Nejpoužívanějším vyplachovacím médiem je DPBS (Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline). Jedná se o ředící látku poskytující vhodné prostředí pro zachování tonicity, životaschopnosti,

struktury a fyziologie *in vitro* (Castro Neto et al., 2005). Podle velikosti děložního rohu se jedna náplň pohybuje od 20-100 ml (Vinkler, 2009). Na jednoho dárce tedy připadá 1 l vyplachovacího média (Selk, 2002). Výplach se provádí opakovaně pomocí uzavřeného gravitačního systému (Vinkler, 2009). Tento systém využívá postupné přidávání a vylučování tekutiny gravitací (Selk, 2002).

Výhodou vyplachování děložních rohů je použití menšího objemu vyplachovacího média a zlepšení z hlediska počtu získaných embryí. Nevýhodou je naopak nutnost přemisťování katétru po vypláchnutí jednoho rohu do druhého (Seidel et Seidel, 1991).

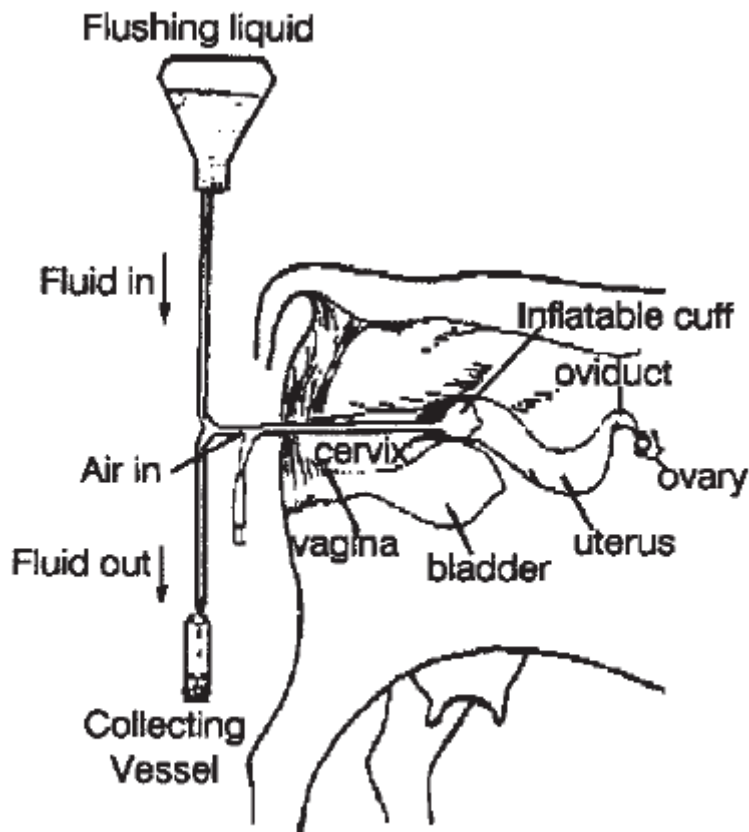


Figure 1. Diagram of the embryo flushing and recovery procedure.

Obr. 9 Diagram znázorňující výplach a postup získávání embryí (Selk, 2002).



Obr. 10 Dvojcestný Foleyův katétr pro výplach embryí

<<http://www.artminds.com.au/alpacas/embryo-transfer-in-alpacas.html>>.

3.3.2.6 Zpracování výplašku a hodnocení embryí

Výplašek obsahující embrya, který byl zachycen do jímací nádoby, necháme po dobu 30 minut sedimentovat při pokojové teplotě (Vinkler, 2009). Za tuto dobu klesnou všechna embrya na dno nádoby (Selk, 2002). Následuje jejich hodnocení pod stereomikroskopem při zvětšení 50x. Po zhodnocení jsou embrya umístěna do PBS s obsahem 10% tepelně inaktivovaného novorozeneckého telecího séra, kde probíhá jejich kultivace, opět při okolní teplotě (Hasler, 2001).

Získaná embrya jsou počítána a hodnocena dle kritérií IETS (Castro Neto et al., 2005). Klasifikace a hodnocení probíhá především na základě morfologického vzhledu (Richard et al., 2015). Opomenuta však nesmí být ani jejich kvalita. Ohodnocení embrya je důležité především z hlediska určení jeho potencionální úspěšnosti při přenosu do příjemkyně (Selk, 2002).

Embrya můžeme klasifikovat dle stupně vývoje do sedmi kategorií – morula (M), pozdní kompaktní morula (PM), velmi časná blastocysta (VČB), časná blastocysta (ČB), pozdní expandovaná blastocysta (PB), klubající se blastocysta (KB) a blastocysta volná (VB), tj. vyklubaná (Lopatářová, 2009). Typická skupina sedmidenních embryí odebíraných od

dárců odpovídá vývojově stupni 4 a 5, tedy časné blastocystě nebo pozdní expandované blastocystě (Hasler, 2014).

Dále klasifikujeme bovinní embrya získaná od superovulovaných krav dle kvality do čtyř skupin – vynikající/dobrá, uspokojivá, špatná, mrtvá/degenerovaná (Gordon, 2003). Pro přenos jsou požadována embrya kvality vynikající a uspokojivé (Hasler, 2014).

3.3.2.7 Přenos embryí

Bovinní embrya byla dříve prakticky výhradně přenášena chirurgickou cestou buď řezem ve střední linii břišní dutiny, nebo bočním řezem. Příjemce byl vždy pod celkovou anestézií. V dnešní době se upřednostňuje nechirurgická cesta přenosu (Gordon, 2003).

Výběr a příprava recipienta

Výběr příjemce je kritickým bodem, od kterého se odvíjí úspěch embryotransferu. Příjemci se stávají nejčastěji jalovice mléčného skotu (Looney et al., 2006). K přenosu se však mohou využít i krávy a úspěch se předpokládá u těch jedinců, kteří mají dobrou reprodukční historii, probíhají u nich snadné porody, mají dobrou mléčnou užitkovost, mateřské vlastnosti a tělesnou kondici (Selk, 2002). Nejdůležitějším faktorem je však synchronizace stádia říjového cyklu dárců a příjemce, přičemž se připouští asynchronnost +/- 1 den (Gordon, 2003).

Příprava příjemce na embryotransfer spočívá v jeho fixaci, očištění a dezinfekci vulvy a jejího okolí. Provádí se též epidurální anestezie ke znecitlivění rekta a zevních genitálií. K anestezii se používá 2% prokain v množství asi 5 ml (Vinkler, 2009).

Nechirurgická metoda přenosu embryí

Přenášení embryí nechirurgickou cestou je dnes velice preferovanou metodou. U skotu jsou embrya běžně přenášena do děložních rohů. Je to mnohem jednodušší, než kdyby byla přenášena do vejcovodu (Seidel et Seidel, 1991). Nejlepších výsledků v zabřezávání je dosahováno při použití čerstvých sedmidenních embryí s vynikajícím stupněm kvality (Gordon, 2003). Velice důležitou roli zde hrají též zkušenosti technika, který zákrok provádí. Jeho úkolem je jak určit stranu depozice embrya v rámci děložních rohů, tak i odhadnout stupeň traumatu způsobeného během přenosu (Looney et al., 2006).

Prvním nezbytným krokem je palpáce vaječníků za účelem výběru strany, kde probíhá ovulace (Seidel et Seidel, 1991). Na vybrané straně též musí být v době přenosu patrné žluté

tělisko (Hasler, 2001). Z výše uvedeného vyplývá, že embryo je deponováno do děložního rohu, který stranově odpovídá ovulujícímu vaječníku s aktivním žlutým tělískem (Selk, 2002), tzn. do poloviny děložního rohu ipsilaterálního k žlutému tělísku (Gordon, 2003).

Dalším krokem je zavedení zařízení pro embryotransfer skrze děložní krček. To se uskutečňuje během luteální fáze cyklu, kdy je bohužel krček méně otevřený (Seidel et Seidel, 1991). Zařízením pro vlastní přenos může být buď Cassova souprava nebo flexibilní katétr. Cassova souprava se využívá pro tzv. přímý přenos, kdy je embryo zachyceno v pejetě a pod rektální kontrolou je zaváděno transcervikálně do děložního rohu. Zde je z pejety vypuzeno tlakem na mandrén. Podobně je tomu u flexibilního katétru, který je vyztužen mandrénem. Po vyjmutí mandrénu se do katétru vsune kapilára s embryem a dochází k jeho deponování do děložního rohu (Vinkler, 2009).

Posledním krokem je vsunutí špičky přenosového zařízení do požadovaného děložního rohu (Selk, 2002). Tento krok musí být prováděn dostatečně rychle, ale zároveň jemně a bez rizika pozdějších následků či poškození (Seidel et Seidel, 1991).

4. ZÁVĚR

V předkládané bakalářské práci jsou zpracovány nejnovější poznatky o nejdůležitějších biotechnologických metodách využívaných v reprodukci skotu - umělá inseminace, *in vitro* fertilizace, *in vitro* produkce embryí a embryotransfer. Tyto v sobě zahrnují další velice důležité metody (např. synchronizace říje, superovulace, kryokonzervace atd.), bez nichž by jejich provedení nebylo možné. V posledních letech byl zaznamenán značný vývoj a zvýšení efektivnosti v oblasti reprodukčních biotechnologií. Nejstarší z těchto metod, avšak neustále používanou, je umělá inseminace. Předmětem zájmu v této oblasti je především inseminační dávka, její objem, koncentrace a motilita spermií ejakulátu, dále používaná ředidla a kryoprotektiva. Velice důležité je pro umělou inseminaci též místo deponování inseminační dávky. Nejvhodnějším místem depozice jsou děložní rohy, kdy dochází k přiblížení spermií k místu oplození. Další používanou metodou je *in vitro* fertilizace a produkce embryí. Výhodné je získávání oocytů pro *in vitro* fertilizaci od živých zvířat, tedy *in vivo*, jelikož mohou být k těmto účelům využívána opakovaně. Metodou samotného odběru oocytů je pak transvaginální ultrazvuková punkce, která je vysoce efektivní z hlediska množství odebraných oocytů, neinvazivní vůči zvířeti a působí mu jen minimální stres. Významným neustále studovaným a zlepšovaným prvkem, obzvláště pro *in vitro* produkci embryí, je složení kultivačních médií. Poslední biotechnologickou metodou, která je v této práci popsána, je embryotransfer. Zde je hlavním předmětem zájmu počet úspěšně získaných embryí nejvyšší kvality. Dá se říci, že během jednoho výplachu lze získat zhruba šest takových embryí. Sedmidenní embrya se přenášejí zpravidla nechirurgickou cestou do děložních rohů.

5. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Abe, H., Matsuzaki, S., Hoshi, H. 2002. Ultrastructural differences in bovine morulae classified as high and low qualities by morphological evaluation. *Theriogenology*. 57 (4). 1273-1283.

Andersson, M., Taponen, J., Koskinen, E., Dahlbom, M. 2004. Effect of insemination with doses of 2 or 15 million frozen-thawed spermatozoa and semen deposition site on pregnancy rate in dairy cows. *Theriogenology*. 61 (7-8). 1583-1588.

ATCC Animal Cell Culture Guide – tips and techniques for continuous cell lines [online]. Manassas. University Blvd. 2014 [cit. 2016-02-22]. Dostupné z <https://www.atcc.org/~media/PDFs/Culture%20Guides/AnimCellCulture_Guide.ashx>.

Ball, P. J. H., Peters, A. R. 2004. *Reproduction in cattle*. Blackwell Publishing. s. 242. ISBN: 1-4051-1545-9.

Baruselli, P. S., de Sá Filho, M. F., Martins, C. M., Nasser, L. F., Nogueira, M. F. G., Barros, C. M., Bó, G. A. 2006. Superovulation and embryo transfer in *Bos indicus* cattle. *Theriogenology*. 65 (1). 77-88.

Black, N., Whitehead, J. Artificial insemination of cattle [online]. 5th April 2006 [cit. 2016-02-15]. Dostupné z <<http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.590.2966&rep=rep1&type=pdf>>.

Blondin, P., Coenen, K., Guilbault, L. A., Sirard M.-A. 1997. IVF production of bovine embryos: Developmental competence is acquired before maturation. *Theriogenology*. 47 (5). 1061-1075.

Bó, G. A., Adams, G. P., Pierson, R. A., Mapletoft, R. J. 1995. Exogenous control of follicular wave emergence in cattle. *Theriogenology*. 43 (1). 31-40.

Bó, G. A., Baruselli, P. S., Moreno, D., Cutaia, L., Caccia, M., Tríbulo, L., Tríbulo, H., Mapletoft, R. J. 2002. The control of follicular wave development for self-appointed embryo transfer programs in cattle. *Theriogenology*. 57 (1). 53-72.

Bó, G. A., Mapletoft, R. J. 2013. Evaluation and classification of bovine embryos. *Animal Reproduction*. 10 (3). 344-348.

Bó, G. A., Mapletoft, R. J. 2014. Historical perspectives and recent research on superovulation in cattle. *Theriogenology*. 81 (1). 38-48.

Bols, P. E. J., Vandenheede, J. M. M., Van Soom, A., de Kruif, A. 1995. Transvaginal ovum pick-up (OPU) in the cow: A new disposable needle guidance system. *Theriogenology*. 43 (3). 677-687.

Castro Neto, A. S., Sanches, B. V., Binelli, M., Seneda, M. M., Perri, S. H., Garcia, J. F. 2005. Improvement in embryo recovery using double uterine flushing. *Theriogenology*. 63 (5). 1249-1255.

Cole, C. L., Winters, L. M. 1939. Artificial insemination in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*. 22 (2). 107-110.

Čech, S. 2009. Superovulace. In: Hofírek, B., Dvořák, R., Němeček, L., Doležel, R., Pospíšil, Z. (eds.). *Nemoci skotu*. Noviko a.s. Brno. s. 1058-1059. ISBN: 9708086542195.

Čech, S. 2009. Získávání oocytů. In: Hofírek, B., Dvořák, R., Němeček, L., Doležel, R., Pospíšil, Z. (eds.). *Nemoci skotu*. Noviko a.s. Brno. s. 1070-1071. ISBN: 9708086542195.

Diskin, M. G., Austin, E. J., Roche, J. F. 2002. Exogenous hormonal manipulation of ovarian activity in cattle. *Domestic Animal Endocrinology*. 23 (1-2). 211-228.

Doležel, R. 2009. Synchronizace říje. In: Hofírek, B., Dvořák, R., Němeček, L., Doležel, R., Pospíšil, Z. (eds.). *Nemoci skotu*. Noviko a.s. Brno. s. 1056-1058. ISBN: 9708086542195.

Driancourt, M. A. 2001. Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals. Implications for manipulation of reproduction. *Theriogenology*. 55 (6). 1211-1239.

Durrant, B. S. 2009. The importance and potential of artificial insemination in CANDES (companion animals, non-domestic, endangered species). *Theriogenology*. 72 (1). 113-122.

Enright, B. P., Lonergan, P., Dinnyes, A., Fair, T., Ward, F. A., Yang, X., Boland, M. P. 2000. Culture of *in vitro* produced bovine zygotes *in vitro* vs *in vivo*: Implications for early embryo development and quality. *Theriogenology*. 54 (5). 659-673.

Ferreira, J. E., Mello, M. R. B. D., Alves, P. A. D. P. M., Mello, R. R. C., Palhano, H. B. 2014. Effect of follicular wave synchronization on superovulatory response of Girolando embryo donors. *Revista Brasileira de Zootecnia – Brazilian Journal of Animal Science*. 43 (11). 568-572.

Galli, C., Crotti, G., Notari, C., Turini, P., Duchi, R., Lazzari, G. 2001. Embryo production by ovum pick up from live donors. *Theriogenology*. 55 (6). 1341-1357.

- Galli, C., Duchi, R., Crotti, G., Turini, P., Ponderato, N., Colleoni, S., Lagutina, I., Lazzari, G. 2003. Bovine embryo technologies. *Theriogenology*. 59 (2). 599-616.
- Galli, C., Lazzari, G. 1996. Practical aspects of IVM/IVF in cattle. *Animal Reproduction Science*. 42 (1-4). 371-379.
- Gibbons, J. R., Krisher, R. L., Carlin, S. K., Pearson, R. E., Gwazdauskas, F. C. 1995. In vitro embryo production after microinjection and ovarian dynamics following transvaginal follicular oocyte aspiration. *Theriogenology*. 43 (6). 1129-1139.
- Gordon, I. 2003. *Laboratory Production of Cattle Embryos*, 2nd Edition. CABI Publishing. s. 548. ISBN: 0851996663
- Hashimoto, S., Takakura, R., Kishi, M., Sudo, T., Minami, N., Yamada, M. 1999. Ultrasound-guided follicle aspiration: The collection of bovine cumulus-oocyte complexes from ovaries of slaughtered or live cows. *Theriogenology*. 51 (4). 757-765.
- Hasler, J. F. 2001. Factors affecting frozen and fresh embryo transfer pregnancy rates in cattle. *Theriogenology*. 56 (9). 1401-1415.
- Hasler, J. F. 2003. The current status and future of commercial embryo transfer in cattle. *Animal Reproduction Science*. 79 (3-4). 245-264.
- Hasler, J. F. 2014. Forty years of embryo transfer in cattle: A review focusing on the journal *Theriogenology*, the growth of industry in North America, and personal reminiscences. *Theriogenology*. 81 (1). 152-169.
- Hasler, J. F., Henderson, P. J., Hurtgen, Z. Q., Jin, A. D., McCauley, S. A., Neely, B., Shuey, L. S., Stokes, J. E., Trimmer, S. A. 1995. Production, freezing and transfer of bovine IVF embryos and subsequent calving results. *Theriogenology*. 43 (1). 141-152.
- Hasler, J. F., Hurtgen, P. J., Jin, Z. Q., Stokes, J. E. 1997. Survival of IVF-derived bovine embryos frozen in glycerol or ethylene glycol. *Theriogenology*. 48 (4). 563-579.
- Hesser, M. W., Morris, J. C., Gibbons, J. R. 2011. Advances in Recombinant Gonadotropin Production for Use in Bovine Superovulation. *Reproduction in Domestic Animals*. 46 (5). 933-942.
- Hunter, R. H. F. 2003. Advances in deep uterine insemination: a fruitful way forward to exploit new sperm technologies in cattle. *Animal Reproduction Science*. 79 (3-4). 157-170.
- Islam, R. 2011. Synchronization of Estrus in Cattle: A Review. *Veterinary World*. 4 (3). 136-141.

Jones, A. L., Lamb, G. C. 2008. Nutrition, synchronization, and management of beef embryo transfer recipients. *Theriogenology*. 69 (1). 107-115.

Kafi, M., McGowan, M. R. 1997. Factors associated with variation in the superovulatory response of cattle. *Animal Reproduction Science*. 48 (2-4). 137-157.

Kanitz, W. 2003. Follicular dynamic and ovulation in cattle – a review [online]. *Archiv Fur Tierzucht-Archives of Animal Breeding*. 46 (2). 187-198.

Katska-Ksiazkiewicz, L., Lechniak-Cieślak, D., Korwin-Kossakowska, A., Alm, H., Ryńska, B., Warzych, E., Sosnowski, J., Sender, G. 2006. Genetical and biotechnological methods of utilization of female reproductive potential in mammals. *Reproductive Biology*. 6 (1). 21-36.

Kenyon, R., Meakin, N. Disinfectant Solutions [online]. United States. Forum Bioscience Holdings Limited. 2005 [cit. 2016-02-22]. Dostupné z <<http://www.freepatentsonline.com/20070243597.pdf>>.

Lane, E. A., Austin, E. J., Crowe, M. A. 2008. Oestrous synchronisation in cattle – Current options following the EU regulations restricting use of oestrogenic compounds in food-producing animals: A review. *Animal Reproduction Science*. 109 (1-4). 1-16.

Looney, C. R., Nelson, J. S., Schneider, H. J., Forrest, D. W. 2006. Improving fertility in beef cow recipients. *Theriogenology*. 65 (1). 201-209.

Lopatářová, M. 2009. Konzervace embryí. In: Hofírek, B., Dvořák, R., Němeček, L., Doležel, R., Pospíšil, Z. (eds.). *Nemoci skotu*. Noviko a.s. Brno. s. 1066-1067. ISBN: 9708086542195.

Lopatářová, M. 2009. Maturace, fertilizace a kultivace. In: Hofírek, B., Dvořák, R., Němeček, L., Doležel, R., Pospíšil, Z. (eds.). *Nemoci skotu*. Noviko a.s. Brno. s. 1071-1072. ISBN: 9708086542195.

Lopatářová, M. 2009. Zpracování výplašku a hodnocení embryí. In: Hofírek, B., Dvořák, R., Němeček, L., Doležel, R., Pospíšil, Z. (eds.). *Nemoci skotu*. Noviko a.s. Brno. s. 1064. ISBN: 9708086542195.

Lopatářová, M., Čech, S., Havlíček, V. 2009. Produkce embryí v podmínkách *in vitro*. In: Hofírek, B., Dvořák, R., Němeček, L., Doležel, R., Pospíšil, Z. (eds.). *Nemoci skotu*. Noviko a.s. Brno. s. 1070-1073. ISBN: 9708086542195.

- López-Gatius, F. 2000. Site of semen deposition in cattle: A review. *Theriogenology*. 53 (7). 1407-1414.
- Mapletoft, R. J. 2013. History and perspectives on bovine embryo transfer. *Animal Reproduction*. 10. 168-173.
- Mapletoft, R. J., Bó, G. A. 2013. Innovative strategies for superovulation in cattle. *Animal Reproduction*. 10 (3). 174-179.
- Mapletoft, R., Steward, K., Adams, G. 2002. Recent advances in the superovulation in cattle. *Reproduction Nutrition Development*. 42 (6). 601-611.
- Martínez, M. F., Bó, G. A., Mapletoft, R. J. 2009. Synchronization of follicular wave emergence and ovulation for reproductive biotechnologies. *Proceedings of 1st Simpósio internacional de reprodução animal aplicada*. 26-55.
- Murugavel, K., Yániz, J. L., Santolaria, P., López-Béjar, M., López-Gatius, F. 2003. Prostaglandin based estrus synchronization in postpartum dairy cows: An update. *The International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine*. 1 (1). 51-65.
- Richard, C., Hue, I., Gelin, V., Neveux, A., Champion, E., Degrelle, S. A., Heyman, Y., Chavatte-Palmer, P. 2015. Transcervical collection of bovine embryo up to Day 21: An 8-year overview. *Theriogenology*. 83 (7). 1101-1109.
- Rizos, D., Ward, F., Duffy, P., Boland, M. P., Lonergan, P. 2002. Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development *in vitro* versus *in vivo*: Implications for blastocyst yield and blastocyst quality. *Molecular Reproduction and Development*. 61 (2). 234-248.
- Roelofs, J., López-Gatius, F., Hunter, R. H. F., van Eerdenburg, F. J. C. M., Hanzen, Ch. 2010. When is a cow in estrus? Clinical and practical aspects. *Theriogenology*. 74 (3). 327-344.
- Seidel Jr, G. E., Seidel, S. M. 1991. Training manual for embryo transfer in cattle. *FAO animal production and health paper*.
- Seidel Jr., G. E., Schenk, J. L. 2008. Pregnancy rates in cattle with cryopreserved sexed sperm: Effects of sperm numbers per inseminate and site of sperm deposition. *Animal Reproduction Science*. 105 (1-2). 129-138.
- Selk, G. 2002. Embryo transfer in cattle. Oklahoma State University.

Sirard, M. A., Blondin, P. 1996. Oocyte maturation and IVF in cattle. *Animal Reproduction Science*. 42 (1-4). 417-426.

Skarzynski, D. J., Ferreira-Dias, G., Okuda, K. 2008. Regulation of Luteal Function and *Corpus Luteum* Regression in Cows: Hormonal Control, Immune Mechanisms and Intercellular Communication. *Reproduction In Domestic Animals*. 43 (2). 57-65.

Spell, A. R., Beal, W. E., Corah, L. R., Lamb, G. C. 2001. Evaluating recipient and embryo factors that affect pregnancy rates of embryo transfer in beef cattle. *Theriogenology*. 56 (2). 287-297.

Stötzel, C., Plöntzke, J., Heuwieser, W., Röblitz, S. 2012. Advances in modeling of the bovine estrous cycle: Synchronization with PGF2 α . *Theriogenology*. 78 (7). 1415-1428.

Verberckmoes, S., Van Soom, A., De Pauw, I., Dewulf, J., Vervaeke, Ch., de Kruif, A. 2004. Assessment of a new utero-tubal junction insemination device in dairy cattle. *Theriogenology*. 61 (1). 103-115.

Vieira, L. M., Rodrigues, C. A., Castro Netto, A., Guerreiro, B. M., Silveira, C. R. A., Moreira, R. J. C., Sá Filho, M. F., Bó, G. A., Mapletoft, R. J. 2014. Superstimulation prior to the ovum pick-up to improve *in vitro* embryo production in lactating and non-lactating Holstein cows. *Theriogenology*. 82 (2). 318-324.

Vinkler, A. 2009. Odběr embryí. In: Hofírek, B., Dvořák, R., Němeček, L., Doležel, R., Pospíšil, Z. (eds.). *Nemoci skotu*. Noviko a.s. Brno. s. 1063-1064. ISBN: 9708086542195.

Vinkler, A. 2009. Přenos embryí. In: Hofírek, B., Dvořák, R., Němeček, L., Doležel, R., Pospíšil, Z. (eds.). *Nemoci skotu*. Noviko a.s. Brno. s. 1066. ISBN: 9708086542195.

Vinkler, A. 2009. Výběr a příprava dárců a příjemců. In: Hofírek, B., Dvořák, R., Němeček, L., Doležel, R., Pospíšil, Z. (eds.). *Nemoci skotu*. Noviko a.s. Brno. s. 1062-1063. ISBN: 9708086542195.

Vinkler, A. 2009. Výroba a konzervace inseminačních dávek. In: Hofírek, B., Dvořák, R., Němeček, L., Doležel, R., Pospíšil, Z. (eds.). *Nemoci skotu*. Noviko a.s. Brno. s. 1059-1060. ISBN: 9708086542195.

Vinkler, A., Lopatářová, M. 2009. Transfer embryí. In: Hofírek, B., Dvořák, R., Němeček, L., Doležel, R., Pospíšil, Z. (eds.). *Nemoci skotu*. Noviko a.s. Brno. s. 1062-1070. ISBN: 9708086542195.

Vinkler, A., Zajíc, J. 2009. Umělá inseminace. In: Hofírek, B., Dvořák, R., Němeček, L., Doležel, R., Pospíšil, Z. (eds.). Nemoci skotu. Noviko a.s. Brno. s. 1059-1032. ISBN: 9708086542195.

Vishwanath, R. 2003. Artificial insemination: the state of the art. *Theriogenology*. 59 (2). 571-584.

Zajíc, J. 2009. Prověření vhodné doby k inseminaci. In: Hofírek, B., Dvořák, R., Němeček, L., Doležel, R., Pospíšil, Z. (eds.). Nemoci skotu. Noviko a.s. Brno. s. 1060-1061. ISBN: 9708086542195.

Zajíc, J. 2009. Příprava inseminační dávky a technika inseminace. In: Hofírek, B., Dvořák, R., Němeček, L., Doležel, R., Pospíšil, Z. (eds.). Nemoci skotu. Noviko a.s. Brno. s. 1061-1062. ISBN: 9708086542195.