

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra veterinárních disciplín



***In vitro* produkce embryí u krav**

Bakalářská práce

Autor práce: Lucie Bedrníková

Obor studia: Živočišná produkce

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

© 2018 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci "*In vitro* produkce embryí u krav" jsem 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 neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 11.4. 2018 _____

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala Ing. Jiřímu Šichtařovi, Ph. D., za vedení mé bakalářské práce, za pomoc a cenné rady při psaní.

In vitro produkce embryí u krav

Souhrn

Bakalářská práce je sepsána formou literární rešerše a zabývá se tématem *in vitro* produkce embryí u krav. Základním krokem k provedení *in vitro* produkce embryí je odběr oocytů. Odběr oocytů u skotu je možný provádět dvěma způsoby, jedním z nich je odběr oocytů *in vivo* (z živého zvířete) a druhý je odběr oocytů *in vitro* (z mrtvého zvířete). Odběr oocytů *in vivo* je výhodnější díky opakovatelnému odběru a získání velkého množství oocytů. Pro odběr oocytů *in vivo* se využívá nejčastější transvaginální ultrazvuková punkce, touto metodou se dají oocyty odebírat až 2x týdně. Transvaginální ultrazvuková punkce je prokázána jako velmi úspěšná technika, ve které je dosahováno 60% úspěšnosti. Dále mohou být oocyty odebírány pomocí laparotomie a laparoskopie. Při odběru *in vitro*, se oocyty z odebraných vaječníků získají krájením, disekcí, rozřezáváním kůry vaječniku, aspirací a seškrabáváním folikulární stěny. Po získání oocytů se musí odebrané oocyty nejprve ohodnotit.

Dalšími kroky *in vitro* produkce embryí je IVM (*in vitro* maturace), IVF (*in vitro* fertilizace) a IVC (*in vitro* kultivace). Po odběru jsou oocyty vždy v jádře i cytoplazmě nezralé, proto je nejdříve musíme nechat dozrát ve zracím médiu v přítomnosti hormonů. Nejčastěji se jako zrací médium používá TCM-199 (tkáňové kultivační médium). Zránění oocytů se uskutečňuje buď v mikrokapkách na Petriho miskách, a nebo čtyřjamkových kultivačních miskách krytých olejem v inkubátoru při 39°C s 5% CO₂ při 90 % vlhkosti ve vzduchu po dobu 22 až 24 hodin.

Pro oplození oocytů *in vitro* je nejčastěji využíváno klasické oplození, ovšem dají se využít i některé mikromanipulační techniky, jako je subzonální fertilizace a intracytoplazmatická injekce spermií. Při klasickém *in vitro* oplození se oocyty spolu se spermiemi přenesou do oplozovacího média. Pro oplození se musí nejprve připravit spermií, tzn. vyvolá se kapacitace. Oplození trvá 24 hodin a probíhá při teplotě 39°C v 5% atmosféře CO₂, někteří autoři ale provádí oplození v atmosféře, která je složena z 90% N₂, 5% O₂, a 5% CO₂ po dobu 22 hodin.

Po oplození se dále předpokládáné zygoty kultivují *in vitro* do stádia blastocysty. Embrya ve stádiu blastocysty se ohodnotí a poté se přenesou do příjemkyň nebo se provede kryokonzervace.

Klíčová slova: kráva, reprodukce, oocyt, *in vitro* oplození, embryo

***In vitro* embryo production in cows**

Summary

This bachelor thesis is written in a form of literary research and the thesis is focused on *in vitro* embryos production of cows. The first step in performing *in vitro* embryos production is collecting oocytes. There are two ways to collect cattle oocytes, one is oocytes collection *in vivo* (the animal is alive) and the second way is oocytes collection *in vitro* (the animal is dead). *In vivo* oocytes collection is more efficient thanks to repetitive collection and the possibility of getting a big amount of oocytes. The most popular method used for collecting *in vivo* oocytes is transvaginal ultrasound puncture, this method allows to get the oocytes collected up to 2 times per week. Transvaginal ultrasound puncture is a very successful technique which reaches up to 60% success rate. The other methods are either a laparotomy or a laparoscopy. Using the *in vitro* way, the oocytes are collected from the ovaries by slicing, dissection, cutting through the bark of one of the ovaries, aspiration and by scraping of the follicular wall. The collected oocytes must be evaluated.

The next steps of *in vitro* embryos production are IVM (*in vitro* maturation), IVF (*in vitro* fertilization) and IVC (*in vitro* cultivation). The collected oocytes are always unripe in the core and in the cytoplasm, that's why they need to be put into a hormone medium to ripe. The often used medium is TCM-199 (TissueCulture Medium 199). The maturation of the oocytes usually takes place in microdrops, Petri dish or in an oil covered four-hole container in an incubator with the temperature set to 39°C with 5% CO₂ flow and 90% air humidity during 22 to 24 hours.

For fertilizing the oocytes using the *in vitro* method the most often used technique is a classic fertilization, but it is possible to use other micromanipulation techniques such as sub-zone fertilization and intracytoplasmic sperm injection (ICSI). While using the classic *in vitro* method the oocytes along with the sperm are transferred into the fertilizing medium. The sperm has to be prepared to fertilize that is, the capacity is raised. The average fertilization time is 24 hours with the temperature set to 39C with 5% CO₂ flow, although some authors are performing the fertilization in an atmosphere that is composed of 90% N₂ flow, 5% O₂ flow and 5% CO₂ flow with a total time of 22 hours.

After the fertilization are the presumed zygotes cultivated *in vitro* into the stage of blastocysts. The embryos in the stage of blastocyst are evaluated and then transferred in the receivers or the cryopreservation is performed.

Keywords: cow, reproduction, oocyte, *in vitro* fertilization, embryo

Obsah

1	Úvod	1
2	Cíl práce	2
3	Literární rešerše	3
3.1	Reprodukční orgány krávy	3
3.1.1	Vnější pohlavní orgány- vulva, klitoris, poševní předsíň	3
3.1.2	Vnitřní pohlavní orgány- pochva, děloha, vejcovody, vaječníky	3
3.2	Fyziologie samičího pohlavního ústrojí	4
3.2.1	Řízení pohlavních funkcí samic.....	4
3.2.2	Oogeneze	6
3.2.3	Folikulogeneze.....	8
3.2.3.1	Růst a zrání folikulů	8
3.2.3.2	Biochemie folikulární tekutiny.....	9
3.2.3.3	Ovulace	10
3.2.4	Estrální cyklus.....	10
3.2.4.1	Fyziologie estrálního cyklu	10
3.2.5	Oplození a raný embryonální vývoj.....	11
3.3	<i>In vitro</i> produkce embryí u krav	12
3.3.1	Odběr oocytů.....	13
3.3.1.1	Odběr oocytů <i>in vivo</i>	13
3.3.1.2	Odběr oocytů <i>in vitro</i>	15
3.3.2	Hodnocení oocytů	17
3.3.3	Zrání oocytů	19
3.3.4	Oplození oocytů	21
3.3.4.1	Sperma používané pro oplození <i>in vitro</i>	22
3.3.4.2	Příprava oocytů pro <i>in vitro</i> oplození.....	22
3.3.5	Kultivace	24
3.3.6	Hodnocení embryí.....	24
4	Závěr	28
5	Seznam použité literatury	29

1 Úvod

Nejdůležitější vlastností plemenic je reprodukce. Zajišťuje udržení chovu, produkci telat, a je nezbytná k produkci masa a mléka. Řada chovatelů se potýká s problémy v oblasti reprodukce stále častěji, tyto problémy představují pro chovatele veliké finanční a jiné ztráty. Každá plemenice může porodit pouze jedno tele ročně, ačkoliv jalovičky mohou vyprodukovat až stovky tisíc oocytů za život. Rozvoj biotechnologických metod v chovu skotu přispívá k odstranění problémů s reprodukcí a umožňuje získávat velké množství telat od jedné krávy. Využívá geneticky cenných jedinců, kteří se například nemůžou přirozeným způsobem rozmnožovat. Tyto metody se stále zdokonalují, a zvyšují tak úspěšnost reprodukce v chovech skotu. Jednou z metod je *in vitro* produkce embryí u krav. V roce 1981 se narodilo první tele pomocí této biotechnologické metody.

2 Cíl práce

Cílem práce je vytvořit literární rešerši, shrnující nejnovější poznatky z oblasti *in vitro* produkce embryí u krav.

3 Literární rešerše

3.1 Reprodukční orgány krávy

Funkce samičích pohlavních orgánů neslouží jen, jako u samců, k tvorbě pohlavních buněk, produkci hormonů a páření, ale slouží ještě jako prostředí pro vývoj oplozeného vajíčka, zárodku a plodu (Komárek a kol., 1964).

Samičí pohlavní orgány se rozdělují na vnitřní, kam patří vaječníky, vejcovody, děloha a pochva, a zevní, k nimž patří poševní předsíň, vulva, klitoris (Marvan a kol., 2011).

3.1.1 Vnější pohlavní orgány- vulva, klitoris, poševní předsíň

Vulva, neboli ochod, je vstup do pohlavních cest samice. Skládá se ze dvou stydkých pysků, které ze stran ohraničují svisle postavenou stydkou štěrbinu (Marvan a kol., 2011). Stydké pysky jsou pokryty nepigmentovanou kůží (Jelínek a kol., 2003).

Klitoris se nachází ve ventrální spojce stydkých pysků, a je to vývojový zbytek po základu samčího pyje (Komárek a kol., 1964).

Poševní předsíň představuje pokračování pochvy (Komárek a kol., 1964). Slouží i jako vývodná močová cesta. Z ventrální strany do ní vyúsťuje močová trubice, a to v její kraniální části. U krávy je poševní předsíň dlouhá 8 – 10 cm (Marvan a kol., 2011).

3.1.2 Vnitřní pohlavní orgány- pochva, děloha, vejcovody, vaječníky

Pochva je vlastní kopulační orgán uložený v pánvi (Sova a kol., 1981). Je to dutý svalnatý rourovitý orgán, vystlaný sliznicí. Pochva je vystlána sliznicí krytou vrstevnatým dlaždicovým epitelem bez žláz (Reece, 2011). U samic, které dosud nekopulovaly, je zachována hranice mezi pochvou a předsíní. Tato hranice se nazývá panenská blána (Komárek a kol., 1964).

Děloha je dutý silnostěnný orgán (Marvan a kol., 2011), zavěšení celé dělohy zajišťují široké vazy děložní (Komárek a kol., 1964). Děloha je složena z děložního krčku, který dopředu přechází v děložní tělo, na něž kraniálně navazují dva děložní rohy (Marvan a kol., 2011). Děložní stěna je složena ze tří vrstev. Tvoří ji sliznice (endometrium), svalová vrstva (myometrium) a seróza (perimetrium) (Sova a kol., 1981). U krávy je vyvinut dvourohý typ dělohy (Marvan a kol., 2011). Délka děložních rohů u krávy v dospělosti je 35 - 45 cm. Na děložní rohy kaudálně navazuje děložní tělo. U krávy je dlouhé jen 3 cm (Marvan a kol., 2011).

Děložní krček je u krávy dlouhý 8 – 12 cm (Marvan a kol., 2011). Děložním krčkem prochází kanálek děložního krčku, který je uzavřen a otevírá se jen během říje a porodu (Jelínek a kol., 2003). U krávy sliznice děložního krčku není hladká, ale vytváří čtyři vysoké kruhové záhyby s podélnými řasami, na nichž se nacházejí nižší sekundární řasy (Marvan a kol., 2011).

Vejcovody jsou párové trubice z hladké svaloviny (Reece, 2011). Ve vejcovodech dochází k oplození vajíček spermii. Rozšířená část vejcovodu, která přiléhá k ovariu, vytváří nálevku vejcovodu (Reece, 2011). U krávy je vejcovod dlouhý 20 - 30 cm. Stěna vejcovodu je složena ze sliznice, svaloviny a pobřišnice. Sliznice vejcovodu je kryta jednovrstevným až víceřadým cylindrickým epitelem (Marvan a kol., 2011).

Vaječník je párová samičí pohlavní žláza (Marvan a kol., 2011), produkující samičí pohlavní buňky, hormony (Jelínek a kol., 2003). Jsou zavěšeny na vaječnickovém okruží a uloženy v dutině pánevní, popřípadě v zadní části dutiny břišní (Komárek a kol., 1964).

Vaječník u krávy je oválný (Jelínek a kol., 2003). Je relativně malý, velikostí i tvarem připomíná plod švestky. Délka je 3 – 4,5 cm, šířka 2 - 3 cm a jeho hmotnost je 15 – 20 g (Marvan a kol., 2011).

Barva vaječníku je šedorůžová a má tuhoelastickou konzistenci (Marvan a kol., 2011). Na povrchu vaječníku je epitelová vrstva, pod ní je bělavý obal. Pod bělavým obalem je vrstva korová (Reece, 2011), pak je centrálně uložena dřev. V dřevu je obsažené kolagenní vazivo, krevní a lymfatické cévy a nervy (Sova a kol., 1981). Krevní zásobení vaječnicků zajišťuje vaječnicková tepna. V korové vrstvě jsou obsaženy folikuly v různém stádiu vývoje (Reece, 2011). V hlubších vrstvách jsou uloženy dospívající folikuly, malé a primární jsou blíže povrchu (Sova a kol., 1981).

3.2 Fyziologie samičího pohlavního ústrojí

3.2.1 Řízení pohlavních funkcí samic

Řízení reprodukčního procesu a činnosti pohlavního ústrojí je založeno na působení hormonů a nervové soustavy. Centrální nervová soustava (CNS) má rozhodující úlohu, aby uvedla celý endokrinní mechanismus do chodu (Sova a kol., 1981). CNS zajišťuje uložení, uchování a vybavování informací (Reece, 2011).

V míšním mozku v prodloužené míše se nachází retikulární formace (síťový útvar), který tvoří šedou hmotu. Je to seskupení velkého množství neuronů, roztroušenými mezi

nervovými vlákny. V retikulární formaci jsou centra pro vdech, výdech, regulaci krevního oběhu, sání, vylučování slin, potu a centra, která aktivují nebo inhibují mozkovou kůru.

V koncovém mozku na mozkových hemisférách se nachází limbický systém, který se uplatňuje při kontrole bdění, spánku, při řízení endokrinních funkcí, při emočních, sexuálních pochodech a při rozmnožování (Komárek a kol., 1964).

Tenká vrstva šedé hmoty, tvořící povrch pláště koncového mozku, se nazývá mozková kůra. Jsou do ní přiváděny informace z receptorů celého těla. Vzruchy klasifikuje, rozlišuje, seskupuje a uspořádává. Pokud je tělo nemocné tlumí reprodukční funkce.

V mezimozku se nachází hypotalamus a epifýza (Marvan a kol., 2011).

Hlavní řídicí centra pohlavní aktivity tvoří hypotalamo-hypofýzo-ovariální osa, je to uzavřený funkční okruh (Kudláč a kol., 1987). U neurohumorálního řízení jsou použity principy zpětné vazby. Vylučování ostatních hormonů z mozku tlumí negativní zpětná vazba a uvolňování určitého hormonu stimuluje pozitivní zpětná vazba (Komárek a kol., 1964).

Hypotalamus

Kůra koncového mozku pomocí smyslových orgánů zaznamenává vlivy a faktory, které po zpracování jsou vedeny do hypotalamu. Hypotalamus se skládá z předního sexuálního centra, kde jsou vzruchy a informace o stavu celého organismu zpracovány a pomocí impulzů jsou výsledky předány do zadního sexuálního centra. V něm je navozena pulzativní sekrece neurosekretů (hypotalamických hormonů) (Jelínek a kol., 2003).

V předním sexuálním centru se tvoří hormon oxytocin, který způsobuje kontrakce hladké svaloviny především v děloze a mléčné žláze (Kudláč a kol., 1987).

Hypofýza

Hypofýza se skládá z adenohypofýzy (žlázová část, přední lalok) a neurohypofýzy (nervová část, zadní lalok) (Sova a kol., 1981). Transport hormonů z hypotalamu do adenohypofýzy se uskutečňuje portálním krevním oběhem (Konig et Liebich, 2002). Adenohypofýza řídí růst, vnitřností svalů, kostí, štítné žlázy, nadledvin, gonád a mléčné žlázy. V adenohypofýze se produkují hormony spojené s reprodukcí folikulostimulační hormon (FSH), luteinizační hormon (LH), luteotropní hormon (prolaktin-LTH) (Sova a kol., 1981).

Folikulostimulační hormon (FSH) je glykoprotein. U samic podporuje zrání folikulů. Vaječník připravuje pro účinek LH. Luteinizační hormon (LH) je také glykoprotein. Společné působení FSH a LH urychlí zrání folikulů a dojde k sekreci estrogenů. K ovulaci dojde, když jsou oba gonadotropiny přítomny společně. Luteotropní hormon- prolaktin (LTH) - je čistý protein, má vliv na tvorbu mléka a udržuje žluté tělísko (Sova a kol., 1981).

Oxytocin hormon neurohypofýzy způsobuje děložní kontrakce, vyprazdňování mléka z alveol a mlékovodů. K uvolňování dojde po masáži vemene nebo při sání mláděte. Oxytocin působí po dobu 5 - 10 minut (Sova a kol., 1981).

Vaječníky

Hormony vaječníků jsou estrogeny a progesteron. Estrogeny se tvoří v Graafových folikulech, v placentě, a v malé míře v kůře nadledvin (Sova a kol., 1981). Zajišťují tvorbu bílkovin, epitelotropní aktivitu, stimulaci růstu vývodných cest mléčné žlázy, žláz endometria, navozují sexuální chování, regulují sekreci LH, regulují uvolňování prostaglandinu $F_{2\text{alfa}}$ - $PGF_{2\text{alfa}}$ (Reece, 2011).

Progesteron je produkovaný žlutým tělískem vaječníků, placentou a kůrou nadledvin. Progesteron zajišťuje podporu růstu žláz endometria, stimuluje sekreční aktivity vejcovodu a endometriálních žláz dělohy, stimuluje růst alveolů mléčné žlázy, brání děložním stahům během gravidity, reguluje sekreci gonadotropinů (Reece, 2011).

Hormon relaxin je vylučovaný žlutým tělískem a placentou. Ke konci gravidity jeho množství v krvi stoupá. Relaxin vyvolává uvolnění pánevních vazů před porodem, částečně působí na odvápnění pánevní spony (Sova a kol., 1981).

Děloha

V děloze se tvoří hormon prostaglandin $F_{2\text{alfa}}$ - $PGF_{2\text{alfa}}$, je to derivát kyseliny arachidonové. $PGF_{2\text{alfa}}$ se dále vytváří v nervové tkáni a folikulech. $PGF_{2\text{alfa}}$ ovlivňuje činnost vaječníků, uplatňuje se při ovulaci, způsobuje zánik žlutého tělíska (pokud nedojde k zabřeznutí), ovlivňuje porod, vyvolává kontrakce, napomáhá vylučování GnRH v hypotalamu a produkci steroidů v pohlavních žlázách (Kudláč a kol., 1987).

3.2.2 Oogeneze

Oogeneze je tvorba oocytů, neboli vývoj samičích pohlavních buněk (Frandsen et al., 2009).

Před začátkem oogeneze se buňky nejdříve rozdělí z jedné mateřské na dvě dceřiné. Buněčný cyklus je cyklus, kterým prochází buňka mezi svými děleními. Interfáze je čas mezi dvěma děleními buňky. Buněčný cyklus na začátku interfáze začíná G1 fází, poté následuje S fáze, G2 fáze a vlastní dělení buňky mitóza a meióza se označují jako M fáze. V G1 fázi probíhá intenzivní tvorba RNA a proteosyntéza, tato fáze je z buněčného cyklu nejdelší. V S fázi probíhá replikace DNA, dále zde pokračuje proteosyntéza a tvorba RNA. V G2 fázi opět pokračuje syntéza RNA a proteosyntéza, tato fáze je zakončena zahájením M fáze

(mitóza, meióza, amitóza). Mitózou vznikají somatické buňky, meiózou vznikají pohlavní buňky (Marvan a kol., 2011).

Amitóza je přímé dělení buňky, nedochází k rovnoměrnému rozdělení genetické informace. U amitózy dojde k zaškrcení a rozdělení buňky. Mitóza je jaderné dělení. Při mitóze vznikají z jedné mateřské dvě zcela stejné dceřiné buňky. Mitóza má 4 fáze: Profáze, Metafáze, Anafáze, Telofáze. Meióza je redukční dělení buňky a zahrnuje dvě po sobě jdoucí dělení. Meióza I. je redukční (heterotypické) dělení, dojde zde k redukci počtu chromozomů na polovinu, z rodičovské diploidní vzniknou dvě dceřiné haploidní buňky (Frandsen et al., 2009). Fáze dělení jsou Profáze I, ta má pět stádií (Leptoténe, Zygoténe, Pachyténe, Diploténe, Diakinéze), Metafáze I, Anafáze I, Telofáze I. Meióza II. je ekvační (homeotypické) dělení, zde se sesterské chromatidy rozdělí do dvou dceřiných buněk. Fáze jsou Profáze II, Metafáze II, Anafáze II, Telofáze II (Marvan a kol., 2011)

Oogeneze probíhá ve třech fázích: rozmnožování, růst, zrání (Sova a kol., 1981). Fáze rozmnožování začíná už v prenatálním období na povrchu vaječníku, kdy se oogonie, buňky zárodečného epitelu, několikrát za sebou mitoticky dělí. Vznikne velké množství oogonií, které se přesunou z povrchu vaječníku do kůry pod vazivový obal. Tam se každá z buněk, jako již primární oocyt, obalí jednou vrstvou folikulárních buněk (Sova a kol., 1981). Přeměna oogonií v primární oocyty probíhá na vaječnicích do konce prenatálního období, potom již žádné primární oocyty nevznikají (Verlhac a Villeneuve, 2010).

Fáze růstu je velmi dlouhé období a trvá až do ukončení pohlavní činnosti. Při každém ovariaálním cyklu do této fáze vstupuje několik primárních oocytů. V této fázi roste jádro, hromadí se žlutkové inkluze, vznikají a hromadí se kortikální zrna pod jadernou membránou. V této fázi dojde k množení cytoplazmy oocytů a buněk obklopujících oocyt, a dále se vytvoří membrána oocytu (Marvan a kol., 2011).

Fáze zrání je posledním stádiem vývoje vajíčka. Je velmi krátká, u krávy trvá 22 - 24 hodin. Fáze je charakteristická dvěma zracími děleními. Její počátek proběhl již v prenatálním období, kdy byl přerušen v diplotentním stádiu prvního zracího dělení. Tato fáze se dokončuje před ovulací (Verlhac a Villeneuve, 2010). V jádře oocytu se tvoří dělicí vřetenko a mizí jaderná membrána, dochází ke konjugaci chromozomů v jádře oocytu a k výměně genového materiálu. Následuje metafáze prvního zracího dělení, kdy se jedna sada chromozomů spolu s malým množstvím cytoplazmy oddělí od oocytu. Vzniklý útvar se označuje jako pólové tělíčko. Primární oocyt se tedy rozdělí na oocyt II. řádu a na pólové tělíčko (Sova a kol., 1981).

Oocyt vstoupí do druhého zracího dělení, které se přeruší v metafázi. Zralý oocyt je při ovulaci v metafázi druhého zracího dělení a obsahuje haploidní počet chromozomů. Druhé zrací dělení je dokončeno jen v případě, že dojde k oplození. Při oogenezi vznikne tedy jedno oplození schopné vajíčko a tři pólová tělíska (Frandsen et al., 2009). Pokud nedojde k oplození, druhé zrací dělení se nedokončí a buňka zanikne (Jelínek a kol., 2003).

3.2.3 Folikulogeneze

Folikuly rozdělujeme na primordiální, primární, sekundární a terciální folikuly. Folikuly jsou prostory ve vaječnicích, které umožňují vajíčku plnit gametogenezi (Van den Hurk et al., 1997). Folikulogeneze je charakterizována dvěma fázemi. První z nich je preantrální fáze, která zahrnuje tvorbu primordiálních, primárních a sekundárních folikulů. Tato fáze nepodléhá kontrole gonadotropiny, které produkuje adenohipofýza. Gonadotropiny jsou hormony, které podporují vývoj gonád. Druhá fáze je antrální fáze, která je již řízena gonadotropinou. Působí zde luteinizační hormon a folikulo-stimulační hormon (Fair, 2003).

3.2.3.1 Růst a zrání folikulů

Primordiální folikuly se skládají z neúplné vrstvy plochých epitelových buněk, pocházejících ze zárodečného epitelu (Adams et al., 2008). Primordiálních folikulů, které obklopují oogonii, obsahují vaječníky po narození až stovky tisíc. Průměr primordiálního folikulu se pohybuje mezi 30 – 50 μm . Postupně folikul získává vrstvu granulóznic buněk, a stává se z něj primární folikul (Van den Hurk et al., 1997).

Primární folikuly jsou uloženy ve vaječnickové kůře přímo pod bělavým obalem. Jsou to kulovité útvary (Marvan a kol., 2011), které mají u skotu průměr 40 - 60 μm (Van den Hurk et al., 1997). Primární folikuly se skládají z oocytu, obklopené jednou celistvou vrstvou folikulárních buněk (Frandsen et al., 2009). Tyto folikuly se s nástupem puberty začínají měnit a zvětšovat na sekundární (rostoucí) folikuly. Růst primárního folikulu je podmíněn zvětšováním oocytu (Marvan a kol., 2011).

Folikulární buňky se zvětšují, mitoticky dělí a u sekundárních folikulů je pohlavní buňka obalena již mnoha vrstvami folikulárních buněk (Komárek a kol., 1964). Vnější obal kolem vaječné buňky je zona pellucida. Je to průsvitná blanka složena z glykoproteinů (Frandsen et al., 2009). Vnitřní vrstva buněk rostoucího folikulu má cylindrický tvar a nazývá se corona radiata (Marvan a kol., 2011). U sekundárních folikulů se ke konci stádia folikulární buňky diferencují v buňky granulózní (Doležel, 2009). U krav se tvoří 6 - 10 vrstev granulóznic buněk (Van den Hurk et al., 1997). Pod vlivem LH se produkuje androstendion

a testosteron a množí se thekální buňky, které pronikají do granulózy. Gonadotropin podněcuje granulózní buňky k tvorbě folikulární tekutiny a k mitóze (Frandsen et al., 2009). Štěrbiny vyplněné mokem se slijí a vytvoří se jednotná dutina obsahující folikulární tekutinu, tím se sekundární folikul změní v terciální folikul (Marvan a kol., 2011).

Terciální folikul vzniká, když se primární oocyt zvětší, zmnoží se folikulární buňky a část folikulu se vyklene nad povrch vaječníku (Marvan a kol., 2011). Poslední fází terciálního folikulu je Graafův folikul, který má více než 6 vrstev granulózních buněk (Adams et al., 2008). Tento folikul vyčnívá z ovariálního povrchu a dá se nahmatat. U krávy je jeho průměr 1 - 2 cm (Frandsen et al., 2009). Stěny Graafova folikulu tvoří na jeho povrchu obal Theca folliculi, který má vnější (Theca folliculi externa) a vnitřní (Theca folliculi interna) vrstvu (Marvan a kol., 2011). U krávy se více vyvíjí jeden folikul rychleji než ostatní a při ovulaci se uvolní pouze jedno vajíčko. Zbytek folikulů tvoří atretické folikuly, které podléhají atrezi (Frandsen et al., 2009).

Inhibin a estrogeny mají negativní zpětnovazebný účinek na vylučování FSH z adenohipofýzy, pomalu se vyvíjející folikuly zanikají kvůli poklesu FSH. Granulózní buňky produkují estrogeny, které naopak podporují vývoj folikulu. Tato vazba určuje, který z rozvíjejících se folikulů bude ovulovat (Frandsen et al., 2009).

3.2.3.2 Biochemie folikulární tekutiny

Folikulární tekutina je nažloutlá viskózní tekutina, která se pohybuje v prostorech ovariálních folikulů (Frandsen et al., 2009), má významnou roli ve fyziologických, biochemických a metabolických procesech jaderného a cytoplazmatického zrání oocytů. Funkce folikulární tekutiny: zahájení růstu folikulů, zrání oocytů, ovulace a transport vajíček do vaječníku. Stimulační a inhibiční látky v tekutině ovlivňují cyklus folikulů (Hafez, and Hafez, 2000).

Obsahuje aminokyseliny, proteiny, enzymy (proteasy, peptidasy), cukry, gonadotropiny, glykoproteiny, imunoglobuliny, mukopolysacharidy, soli. Enzymy napomáhají prasknutí stěny folikulu a dále ovulaci. Aminokyseliny jsou základní stavební složkou proteinů (bílkovin). Bílkoviny mají stavební, transportní a ochranné funkce. Cukry jsou zdroj energie, stavebních a zásobních látek. Gonadotropiny stimulují vývoj pohlavních orgánů. Imunoglobuliny jsou látky, které tvoří obranou funkci proti parazitům, bakteriím (Frandsen et al., 2009).

3.2.3.3 Ovulace

Ovulací nazýváme prasknutí Graafova folikulu a uvolnění pohlavní buňky. V místě prasklého Graafova folikulu se po ovulaci začne vyvíjet žluté tělísko, které vytváří hormon progesteron. Je-li vajíčko oplozeno, žluté tělísko se zvětšuje a zůstává po celou dobu gravidity, mizí až po porodu (Komárek a kol., 1964). Ovulace probíhá 8 - 12 hodin po říji, u krav je ovulace spontánní (samovolná) (Doležel, 2009).

Oocyt ovuluje v metafázi II., zároveň v této fázi může být oplozen (Hafez, and Hafez 2000).

3.2.4 Estrální cyklus

Estrální (říjový) cyklus je fyziologický děj, při kterém se periodicky na pohlavních orgánech samice vytvářejí příznivé podmínky pro oplození vajíčka a vývoj plodu. Estrální cyklus se objevuje v pohlavní dospělosti, u krávy to je v 8 - 12 měsících (Marvan a kol., 2011). Krávy jsou polyestrická zvířata a doba trvání jednoho říjového cyklu se pohybuje v rozmezí 17 až 25 dnů. U jalovic to je v průměru 20 dnů, u krav 21 dnů. Estrální cyklus se dělí na 4 fáze proestrus, estrus, metestrus, diestrus (Doležel, 2009).

3.2.4.1 Fyziologie estrálního cyklu

Proestrus je fáze předříjová. U krav je to 19. až 21. den cyklu. Na vaječnicích vlivem FSH dozrává a roste Graafův folikul, v němž se tvoří zvýšené množství estrogenu (Frandsen et al., 2009). Pod vlivem hormonu $PGF_{2\alpha}$ dojde k zániku žlutého tělíska, které bylo součástí předchozího cyklu. V této fázi se objevují první příznaky říje, začíná tvorba cervikálního hlenu a dochází k zarudnutí a otoku vnějších genitálií (Jelínek a kol., 2003).

Estrus (říje) je nejdůležitější částí estrálního cyklu. U krav 1. až 2. den cyklu. Tato fáze je nejvhodnější pro inseminaci nebo přirozenou plemenitbu, délka této fáze u krávy je 12 až 24 hodin (Doležel, 2009). V počátcích říje působí hormon FSH, v průběhu se začne více uvolňovat LH. V určité fázi se zvýší hladina estrogenu a začnou blokovat uvolňování FSH (Sova a kol., 1981). Na vaječnicích v období říje dozrává dominantní preovulační folikul, který dosahuje velikosti 16 - 23 mm (Doležel, 2009). Děložní krček se otevírá a z vulvy vytéká hlenovitý, hustý sekret. Dochází k překrvení celého pohlavního ústrojí, zduření stydkých pysků (Marvan a kol., 2011).

Metestrus je poříjová fáze (Frandsen et al., 2009), která trvá od 2. do 5. dne cyklu. U krávy když odezní zevní příznaky říje, dochází vlivem LH za 8 - 12 hodin k ovulaci. Po prasknutí folikulu začne na jeho místě vznikat žluté tělísko (Sova a kol., 1981). V této fázi se

sníží hladina estrogenu, a zvýší se hladina progesteronu. Také dochází k metestrickému krvácení, po skončení říje z vulvy začne vytékat krvavý výtok (Frandsen et al., 2009).

Diestrus je meziříjové období. U krav je to 6.–18. den cyklu. V této fázi roste žluté tělísko. Pokud nedojde k oplození, odezní účinky progesteronu a žluté tělísko zanikne, poté nastoupí znovu proestrus. Zánik žlutého tělíska způsobuje produkce prostaglandinu, který se uvolňuje z endometria. Pokud dojde k oplození, žluté tělísko na vaječniku zůstává (Sova a kol., 1981). Progesteron připravuje dělohu na příjem embrya.

Proestrus a estrus se souhrnně označují jako proliferační (estrogenní), a to proto, že v nich převažuje hladina 17β -estradiolu a dochází k proliferativním změnám na pohlavním ústrojí. Metestrus a diestrus se označují jako sekreční (progesteronová) fáze, v jejímž průběhu převažuje v těle zvířat hormon progesteron a na pohlavním ústrojí probíhají sekreční změny (Jelínek a kol., 2003).

3.2.5 Oplození a raný embryonální vývoj

Embryonální vývoj začíná oplozením vajíčka. Je to proces splynutí samčích a samičích pohlavních haploidních buněk (Kudláč a kol., 1987). Oplození trvá 20 - 24 hodin, a dochází k němu v druhé třetině vejcovodu. Po oplození vznikne zygota s diploidním počtem chromozomů (Verlhac a Villeneuve, 2010).

Oplození má několik fází. První fáze je sbližování gamet, kdy se spermie transportují k místu oplození do vejcovodu. Spermie při průchodu pohlavním ústrojím samice procházejí procesem kapacity spermií, kdy spermie dozrávají a získávají oplozovací schopnost. Druhá fáze je penetrace. Penetrace je složitý proces, kdy oocyt je v metafázi druhého zracího dělení a spermie v této fázi pronikají do oocyty. Při pronikání spermie do oocyty vzniká kortikální reakce, která vyloučí obsah kortikálních zrn oocyty. Kortikální zrna obsahují hydrolytické enzymy, které změni vlastnosti buněčné membrány oocyty a zona pellucida (Marvan a kol., 2011). Pomocí této reakce je zabráněno průniku dalších spermií do cytoplazmy oocyty. V poslední fázi se po proniknutí spermie do oocyty dokončí druhé zrací dělení (Peters and Ball, 1995).

Po proniknutí se tvoří prvojádra (jádra vajíčka, spermií) s následnou syngamií jader. Prvojádra se zvětšují, dojde k výměně genetické informace a poté nastoupí mitotické dělení (rýhování) (Peters and Ball, 1995).

Zygota se několikrát mitoticky dělí na 2, 4, 8, 16 buněk a poté se z ní stává morula, blastocysta, gastrula (Frandsen et al., 2009).

Dělení buněk se nazývá rýhování a u krávy trvá 6 - 7 dní. U krávy se za 40 - 56 hodin po ovulaci zygota rozdělí na dvě buňky, tyto buňky se nazývají blastomery. Poté pokračuje dále rýhování, kdy se embryo dvoubuněčné rozdělí postupně na 4, 8 a 16 blastomer. Embryo u krávy sestupuje z vejcovodu do dělohy ve stádiu 8-16 blastomer. Sestup trvá 3 - 4 dny (Marvan a kol., 2011).

U krávy dojde k poslednímu dělení na 32 blastomer až v děloze. Tento mnohobuněčný útvar se nazývá časná morula a vzniká 5. den po oplození. Poté se z ní stává 6. den po oplození morula. Sedmý až osmý den se z moruly stává blastocysta, ve které je shluk buněk (embryoblast) a dutina naplněná tekutinou zvaná blastocel. Růst embrya je závislý na odstranění zona pellucida (hatching), u skotu k tomu dochází 8. až 9. den po ovulaci. Dutina blastocysty se zvětšuje, dochází k dalšímu dělení buněk, zona pellucida praská a dochází k vyklubání (Peters and Ball, 1995).

Embryoblast dává základ tělu mláděte. Později se z vnějšího obalu (trofoblastu) vytvoří placenta, která vyživuje plod až do porodu (Peters and Ball, 1995). Dále se tvoří tři zárodečné listy ektoderm, mezoderm a entoderm (gastrulace) a ve třetím týdnu dochází k tvorbě plodových obalů (amnion, chorion a allantois) (Kudláč a kol., 1987). Nervový systém, kůže, kopyta a mléčná žláza vznikají z ektodermu. Svaly, kosti, část reprodukčního systému vzniká z mezodermu, a dýchací systém reprodukční systém a trávicí soustava z entodermu. Po vytvoření orgánových soustav se stane embryo plodem, u skotu tomu dojde na konci druhého měsíce gravidity (Verlhac a Villeneuve, 2010).

3.3 *In vitro* produkce embryí u krav

In vitro oplození a produkce embryí patří mezi reprodukční biotechnologické metody, které jsou považovány za důležité, protože vedou k rychlému zvýšení genetického pokroku u zvířat. Jedním z hlavních důvodů produkce embryí *in vitro* je v rychlosti vyprodukování velkého množství embryí, pro zlepšení genetiky ve stádě (Vieira et al., 2014). V roce 1959 byl králík prvním savčím druhem, u kterého byli produkováni živí potomci pomocí IVF. Z latinského původu znamená *in vitro* fertilizace „oplození ve zkumavce“ (Schatten and Constantinescu, 2007). V dnešní době se používá především u skotu k získání geneticky cenných embryí od vysokoužitkových krav (Lopatářová a kol., 2009). Existuje řada odborníků a společností, kteří se tímto zabývají a službu nabízejí. Účinnost *in vitro* technologií ovlivňují faktory, jako je zdravotní stav dárce, kvalita oocytů nebo technika použitá pro kultivaci embrya (Galli et al., 1996). První živé tele pomocí IVF se narodilo v roce 1981 jako výsledek přenosu 4-buněčného embrya do vejcovodu krávy, ale už v roce

1987 se přenášela vyvinutá a *in vitro* vyprodukovaná embrya ve stádiu blastocysty, ze kterých se rodila telata (Schatten and Constantinescu, 2007).

In vitro produkce embryí je sofistikovaná biotechnologická metoda, kterou lze rozdělit do několika částí, a to na odběr oocytů a dokončení tří fází: zrání IVM (maturace), oplození IVF (fertilizace), kultivace IVC (culture) (Wrenzycki et Stinshoff, 2015).

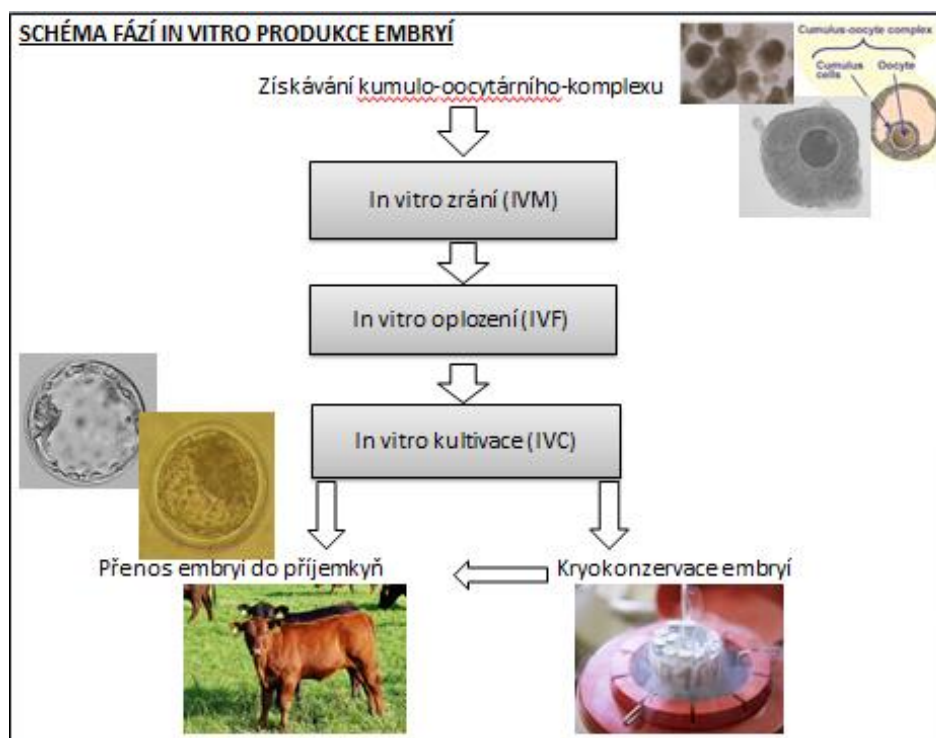


Schéma fází *in vitro* produkce embryí (Wrenzycki et Stinshoff, 2015)

3.3.1 Odběr oocytů

Oocyty se dají u krav získávat jak za podmínek *in vivo* (z živé krávy), tak za podmínek *in vitro* (po smrti krávy, v laboratoři), (Čech, 2009).

3.3.1.1 Odběr oocytů *in vivo*

Odběr oocytů *in vivo* je metoda, při které získáváme oocyty od živých dárcovských zvířat (Galli et al., 2001). Odběr oocytů *in vivo* se provádí jednou až dvakrát za týden a může být prováděn dál po mnoho týdnů (Galli et al., 1996). Tato technika odběru od živých dárců je velmi univerzální. Protože u této metody není vyžadována žádná hormonální stimulace, proto může být prováděna u všech věkových kategorií, od dvouměsíčních telátek až po staré krávy. Používá se jak u suchostojných, laktujících, tak i březích dárců do 4 měsíce (Galli et al., 2001). Pro odběr oocytů *in vivo* můžeme použít například transvaginální ultrazvukovou punkci, laparotomii, a laparoskopii (Bols et al., 1995).

Transvaginální ultrazvuková punkce – OPU (ovum pick-up)

Tato metoda je nejběžněji používaná. Byla prokázána jako velmi úspěšná technika pro odběr oocytů, která je velmi často opakovatelná. Oocyty se touto metodou mohou odebírat 2 krát týdně a můžeme ji provádět více týdnů po sobě. I když se oocyty mohou odebírat 2 krát týdně, neovlivňuje to negativně zdravotní stav zvířete nebo jeho reprodukční schopnosti a navíc stres zvířat je minimální (Hashimoto et al., 1999).

Zařízení pro odběr transvaginální ultrazvukovou punkcí je jehlový naváděcí systém s jednorázovými jehlami z nerezové oceli a ultrazvukovou sondou. Jehly se připojují na silikonovou hadičku, kterou prochází trubička z nerezavějící oceli o délce 60 cm a průměru 6 mm, k níž se přichytí jehla. Jehlový naváděcí systém je umístěn do držáku z nerezové oceli, který má průměr 45 mm a je vhodný jak pro jalovice, tak i pro krávy. Rukojeť má takové uzpůsobení, aby umožnilo zavést zařízení pro OPU do pochvy tak, že rukojeť je opřena o pravou stranu zvířete a levá ruka je volná pro manipulaci s jehlou. Zařízení je připojeno na sací čerpadlo, které vytváří podtlak. Dále je zde připojeno sběrací zařízení s filtrem, do kterého se odsává odebraná folikulární tekutina (Bols et al., 1995).

Před provedením transvaginální ultrazvukové punkce je třeba zvíře zafixovat ve speciální fixační kleci. Po vydezinfikování vnějších pohlavních orgánů se již může přistoupit k samotnému odběru. Jehlový naváděcí systém s ultrazvukovou sondou vložíme do pochvy a druhou rukou přes rektum vaječník přitáhneme a přitiskneme k ultrazvukové sondě, aby mezi nimi byla jen poševní stěna. Poté dojde k propíchnutí poševní stěny a dále folikulu, který je na vaječníku. Folikulární obsah je odsáván do nahřáté tekutiny (Elder et al., 2003).

Machatková a kol. (2009) uvádí, že u transvaginálního odběru oocytů pomocí sonografie je dosahováno 60% úspěšnosti, v průměru se získá 6 - 8 oocytů na donorku a aspiraci. Ale zároveň Galli et al., (2001) uvádí, že z jednoho odběru získáme průměrně 8 až 10 oocytů, vhodné jsou však většinou dva.

Možností pro zvýšení počtu oocytů je nasuperstimulování zvířete. Superovulace je metoda, která uměle vyvolá růst, zrání a ovulaci velkého množství folikulů, než by tomu bylo při přirozené říji (Mapletoft et al., 2002). Aby se mohla zahájit hormonální stimulace, musí být přítomno na vaječnicích velké množství malých folikulů. Proto je superovulace zahajována v době, kdy nastane růstová fáze folikulární vlny. K aplikaci FSH dojde v den vzniku folikulární vlny nebo den po jejím vzniku. Při hormonální stimulaci nesmí být přítomen na vaječnicích dominantní folikul, protože zhoršuje výsledky superovulace (Hesser et al., 2011). K vyvolání superovulace se používají hormonální preparáty, jako jsou gonadotropiny (Mapletoft et al., 2013). Tyto preparáty se nejčastěji aplikují v polovině

estrálního cyklu. Cílem superovulace je získat velké množství oocytů od vysokoužitkových krav a geneticky cenných plemenic (Hesser et al., 2011).

U krav se k vyvolání superovulace nejčastěji používají různé typy gonadotropinů. Gonadotropiny se buď získávají z extraktu hypofýz prasat (pFSH) a ovcí (oFSH), nebo dále se používá preparát equinní choriový gonadotropin (eCG) (Hesser et al., 2011).

Nejčastěji se používá v praxi hypofyzární FSH. V tomto preparátu kromě FSH je i LH. U preparátů se posuzuje poločas jejich rozpadu, kdy u FSH je to pět hodin a méně. Je proto nutné aplikaci tohoto preparátu opakovat. K aplikaci FSH se nejčastěji používá metoda sestupných dávek, kterou aplikujeme dvakrát denně po dobu čtyř dnů ve dvanáctihodinových intervalech (Bó et Mapletoft, 2014).

eCG je glykoprotein, který má jak účinek FSH, tak i LH. Má prodlouženou biologickou aktivitu. Tento preparát se v praxi moc nevyužívá, jelikož má dlouhodobý účinek, s negativním dopadem na výskyt neovulovaných folikulů a pokračující stimulaci vaječnicků (Mapletoft et al., 2013). U krav je poločas rozpadu eCG až 40 hodin a v krvi se vyskytuje až 8- 10 dní. Tento přípravek se aplikuje v množství kolem 3000IU. Aplikuje se 16. den estrálního cyklu mezi luteální a folikulární fází (Mapletoft et al., 2002).

Laparotomie

Při laparotomii se zavede trokar přes poševní klenbu. Jeho součástí je set, který tvoří světlo, endoskop, punkční jehla s hadičkou. Rektálně se nadzvednou vaječnický k blízkosti endoskopu a folikuly se odsají. Druhým způsobem laparotomické metody je zavedení jehly pomocí dvou trokarů v místě pravé hladové jámy (Čech, 2009).

Laparoskopie

Tato metoda se provádí 8. až 12. den estrálního cyklu. Laparoskopické získávání oocytů se provádí přes pravý bok krávy, v místě hladové jámy. Oocyty se odsávají G-spinální jehlou ve vakuu 100 mm Hg (Schellander et al., 1989).

3.3.1.2 Odběr oocytů *in vitro*

Odběr oocytů *in vitro* se provádí po smrti krávy, kdy se vaječnický odeberou až po porážce zvířete (Čech, 2009). Machatková a kol. (2009) uvádí, že počet oocytů získaných *post mortem* je v rozmezí 5 až 50 oocytů, průměrně však je možné izolovat 15 oocytů.

Vaječnický odebrané na jatkách deset minut po porážce se umístí do zahřátého fyziologického roztoku, ve kterém vydrží při teplotě 37°C až 3 hodiny (Sanbuisshoet al., 1989).

Dalším možným způsobem jak transportovat vaječníky z jatek do laboratoře je transport vaječnicků při 37°C v Dulbecco médiu. V tomto médiu je asi dvakrát větší koncentrace aminokyselin a čtyřikrát větší koncentrace vitamínů. Oproti podobným médiím je obohacené o antibiotika. Dále se v tomto médiu vyskytuje pyruvát sodný, dusičnan železitý a některé doplňkové aminokyseliny, které nejsou vždy neesenciální. Originální složení tohoto média obsahuje 1,000 mg/L glukózy. U běžněji používaných variant se toto množství zvýšilo na 4,500 mg/L (Čech, 2009).

Další možnou metodou jak transportovat vaječníky z jatek je umístění odebraných vaječnicků do plastového sáčku bez kapaliny a přepravit jev izolované bedně, při teplotě 28°C (Hasler et al., 1997).

Yang et al. (1990) uvádějí, že vaječníky, které jsou odebrané na jatkách, mohou být uchovávány po dobu až 8 hodin při teplotě 25°C bez snížení úspěšnosti oplození *in vitro*, a schopnosti vyvíjet se do kvalitních blastocyst. Nicméně dále uvádějí, že skladování po dobu 4 hodin při 37°C nebo při 4°C vedlo ke snížení životaschopnosti oocytů.

Po převozu z jatek se vaječníky opláchnou vodou o teplotě 28°C, vloží se na 5 minut do vody s přídavkem 1% roztoku Nolvasanu a čistícího roztoku, znovu se odebrané vaječníky propláchnou vodou a jsou uskladněny při teplotě 23 - 27°C (Hasler et al., 1997).

Poté se získávají oocyty z folikulů, když vaječník vezmeme do ruky, jsou na něm viditelné folikuly o různých velikostech. Velké (10 - 15 mm), střední (6 - 9 mm), nebo malé (2 - 5 mm) folikuly, ze kterých jsou pak odebírány oocyty (Machatková a kol., 2009). Většinou se uvádí, že vhodné folikuly jsou o velikosti 2 až 5 mm (Bols et al., 1995). Nicméně Staigmiller (1988) říká, že by se pro *in vitro* měly používat oocyty ze středně velkých folikulů. Sanbuissho et al. (1989), uvádějí, že vhodné folikuly jsou o velikosti 3 až 10 mm.

Používané metody pro sběr oocytů z vaječnicku jsou krájení, disekce, rozřezávání kůry vaječnicku, aspirace a seškrabávání folikulární stěny. Například metoda disekce vaječnicků je výhodná v tom, že umožňuje izolaci jednotlivých folikulů a dá se stanovit jejich velikost před sběrem oocytů (Galli et al., 1996). Ovšem nejpoužívanější technika získání oocytů z vaječnicku v laboratorních podmínkách je aspirace oocytů z folikulů. Pomocí tenké jehly a injekční stříkačky, nebo použitím podtlakové pumpy, se odsaje folikulární tekutina, která obsahuje kumulo-oocytární-komplex (COC), což jsou oocyty obklopené kumulárními buňkami (Hasler et al., 1995).

Další zajímavá metoda, kterou lze využít pro sběr oocytů z vaječnicku, je metoda TAO (transplantační a aspirační vaječník). Tato metoda umožňuje přímou vizualizaci folikulů pro aspiraci oocytů transilluminací ovariální meduly a kůry. Umožňuje pomocí centrálního

osvětlení přes plexisklovou tyč vidět a identifikovat mnohem více viditelných folikulů (Gordon, 2003).

Nevýhodou odběru oocytů *in vitro* je dlouhý čas mezi sběrem oocytů a umístěním do kultivačního média. U této techniky získáme pouze limitovaný počet oocytů (Bols et al., 1995).

Jakmile se oocyty získají, existuje několik způsobů, co s nimi udělat, ovšem všechny systémy vedou k tomu, že oocyty se dají do prostředí, ve kterém se pak mohou hodnotit (Gordon, 2003). Gibbons et al.(1995) uvádí, že oocyty, které jsou odebrány a shromážděny ve sběrné nádobě, se nejdříve propláchnou roztokem PBS obohaceným o 10% v/v NCS (New born Calf Serum - novorozenecké telecí sérum), 1% v/v penicilin streptomycin a 25 U/ml heparinu. Schellander et al.(1989) uvádí jiný způsob, a to takový, že po aspiraci folikulů byla zředěná folikulární tekutina zahřata na teplotu 38 °C. Oocyty jsou poté třikrát promyty v roztoku TALP (Schellander et al., 1989). Roztok TALP je thyroïdní preparát, který obsahuje 25 mM hydrogenuhličitanu sodného a 0,6 % BSA (bovinní sérový albumin), který tam je jako zdroj proteinů, dále obsahuje laktát sodný a pyruvát sodný jako zdroj energie (Gordon, 2003). Dále jsou oocyty uloženy do Petriho misek o objemu 35 ml, do jedné kapky roztoku TALP pod 4 ml silikonového oleje. Poté nastává hodnocení odebraných oocytů (Schellander et al., 1989).

Arlotto et al. (1996) hodnotili, jak působí zdroje folikulů a velikosti oocytů na *in vitro* zrání a produkci embryí skotu. V první fázi bylo zjištěno, že oocyty pokračují v růstu u všech studovaných folikulárních velikostí 1 až 15 mm. Oocyty byly odebrány ze stejných vaječnicků, z viditelných (periferních) a kortikálních folikulů. Množství odebraných oocytů bylo dvojnásobně vyšší, než by tomu bylo z jednoho ovariálního místa. Oocyty, které byly odebrány z kortikálních folikulů, byly menší a měly nižší potenciál jak pro meiotické zrání, tak i pro vývoj embryí, než oocyty z povrchu. Jenom v průměru největší kortikální oocyty prodělaly *in vitro* zrání, a poté se vyvinuly na blastocysty stejnou rychlostí, jako oocyty z periferních folikulů.

3.3.2 Hodnocení oocytů

Ne všechny oocyty, které se získají z vaječnicků krav, mají schopnost vyvinout se do životaschopných embryí. Po odběru se musí vybrat nejlepší kumulo-oocytární komplexy pro *in vitro* zrání, a proto je zapotřebí nejdříve oocyty ohodnotit. Při hodnocení oocytů se používají různé systémy. Většina systémů je závislá na vizuálním a subjektivním posouzení v laboratoři. Výběr oocytů pro *in vitro* zrání se posuzuje z hlediska množství a uspořádání

kumulárních buněk, dále podle stavu cytoplazmy a velikosti oocytů (Gordon, 2003). Kumulární buňky jsou populací granulárních buněk, které oocytům poskytují významné funkce, jako je například poskytování důležitých nutričních látek, které podporují jejich vývoj a růst, účastní se formování zona pellucida a corona radiata, účastní se formování proteinů a kyseliny hyaluronové, která je velice důležitá pro transport a zachycení spermií ve vejcovodech. Hodnocení oocytů se provádí pod stereomikroskopem (Galli et al., 1996).

Dle Hawk and Wall (1994) lze rozdělit oocyty do tří skupin. První skupina zahrnuje oocyty dobré kvality, tyto oocyty jsou obklopeny kompaktními vrstvami kumulárních buněk. Cytoplazma je zřetelná, vyrovnaná, hustá a jemně granulovaná. Celkově je COC světlá a průhledná. Druhá skupina zahrnuje oocyty střední kvality, tyto oocyty jsou obklopeny kompaktní vrstvou kumulárních buněk, které pokrývají celou zona pellucida anebo alespoň její část. Cytoplazma není zřetelně vidět, má jemné až středně velké granulování. Celkově je COC mírně tmavší a méně průhledná. Třetí skupina zahrnuje oocyty špatné kvality, které nejsou obklopeny kumulárními buňkami. Cytoplazma je světle hnědá až černá, má velmi tmavé oblasti a hrubé granulování. Oocyty jsou deformované. Celkově je COC tmavá a nepravidelná. Navíc Hazeleger, et al., (1995) dodává, že oocyty používané pro *in vitro* produkci embryí by měli mít v průměru více než 120 μm .

Další systém hodnocení publikovali Galli et al. (1996) and Hasler et al. (1995). A ty hodnotí oocyty pouze podle množství kumulárních buněk, kterými je oocyt obklopen. Rozdělují je do čtyř skupin, nejlepší oocyty jsou takové, které mají 4 a více vrstev kumulárních buněk. Do druhé skupiny řadíme oocyty se třemi a jednou vrstvou kumulárních buněk. Poté další skupina zahrnuje oocyty, které nemají vrstvu kumulárních buněk, nebo vrstvu mají jen částečně. A nejhorší skupina zahrnuje oocyty degenerované, oocyty u kterých jsou kumulární buňky rozšířené.

Pro *in vitro* produkci embryí jsou dále vybírány oocyty, které mají alespoň jednu vrstvu kumulárních buněk, nejlépe však je, když jsou oocyty obklopeny čtyřmi a více vrstvami kumulárních buněk (Hasler et al., 1995), avšak minimální předpoklad vyvinout se do stádia blastocysty mají oocyty s minimem kumulárních buněk (Gordon, 2003). Oocyty, které jsou obklopeny těsnou, úplnou, vícevrstevnou kumulární vrstvou, jsou nejvíce schopné podstupovat *in vitro* zrání a oplodnění (Greve and Madison, 1991).

Grimes and Ireland, (1986) uvádí, že pro výběr oocytů pro *in vitro* se dá použít i makroskopický vzhled folikulu, protože oocyty, které pocházejí z průsvitných folikulů, mají snížený vývojový potenciál kvůli pokročilé artrézi.

Praktický dopad vybírání vhodných oocytů pro *in vitro* produkci embryí publikovali Jeřeta a kol. (2013), kteří sledovali vývoj oocytů podle morfologických znaků získaných od jedné dárkyně plemene Belgické modrobílé. Z obou vaječníků plemenice se podařilo odebrat 20 oocytů. Oocyty byly rozděleny do dvou skupin podle jednotlivých morfologických znaků, jako byl stav cytoplazmy oocytu a morfologie kumulární vrstvy obklopující oocyt. Vynikající oocyty jsou obklopeny úplnou, vícevrstevnou kumulární vrstvou, celkový COC byl světlý a průhledný, u oocytů s dobrou morfologickou kvalitou jsou oocyty vícevrstevnou kumulární vrstvou, celkový COC byl tmavší. Po kultivaci všech oocytů bylo získáno deset blastocyst vhodných pro kryokonzervaci. Větší úspěšnost embryonálního vývoje byla u oocytů s dobrou morfologickou kvalitou oocytu než u oocytů klasifikovaných jako vynikající.

3.3.3 Zrání oocytů

V některých případech mohou oocyty dozrát *in vivo*, a poté se sesbírají pomocí aspirace z Graafových folikulů těsně před ovulací, což však vyžaduje velmi přesné načasování sběru, ale ve většině případů se nezralé oocyty shromažďují a pak dozrávají *in vitro* (Schatten and Constantinescu, 2007). Proto jsou oocyty kultivovány *in vitro*, což znamená, že se vytváří prostředí, která se vyskytují u *in vivo* zrání. Například King et al. (1986) uvádí, že je rozdíl v tom, že procesy *in vitro* probíhají rychleji než procesy *in vivo*. I když kultivační podmínky jsou prakticky v dnešní době dokonalé, tak u *in vivo* dozralých oocytů je potenciál pro úspěšnou produkci embryí daleko vyšší než u *in vitro* dozralých oocytů. V podmínkách *in vitro* hraje důležitou roli více faktorů, pro úspěšnou produkci embryí. Musí být vytvořeny takové podmínky, aby oocyt dokončil meiotické a cytoplazmatické zrání a po oplození se rozvinul do životaschopné blastocysty (Greve and Madison, 1991).

Po zhodnocení a vybrání kvalitních oocytů se tyto oocyty umísťují do kultivačního média. Kultivační roztoky používané u skotu jsou obvykle média, která obsahují základní fyziologický roztok s přísadkami pyruvátu, glukózy a laktátu. Rozdíly v médiích spočívají v koncentraci iontů a zdrojů energie. Roztoky dále obsahují séra s antibiotiky, aminokyseliny, vitamíny, puriny (Gordon, 2003). Nejčastěji se jako zrací médium používá TCM-199 (Tissue Culture Medium 199, tkáňové kultivační médium). Do zracího média TCM 199 se v některých případech ještě přidává 10% fetálního bovinního séra, dále pak folikulostimulační a luteinizační hormon, a hydrogenuhličitan sodný (Gordon, 2003).

Existuje spousta studií, které hodnotí přídavek různých aditiv do zracích médií a hodnotí procenta oocytů, které dozrají do metafáze II. Například v experimentu Quero et al. (1995), zkoumali účinnost bovinní plodové vody (BAF), na *in vitro* zrání oocytů. Jedna

skupina oocytů dozrávala v zracím médiu s přidavkem 10 % BAF, druhá skupina dozrávala ve zracím médiu s přidavkem 20 % BAF, a třetí skupina byla doplněna o 50 % BAF. Výsledkem experimentu bylo, že oocyty dozrály do metafáze II, v přítomnosti 20% BAF bylo procento dozrálých oocytů 77%, v přítomnosti 10% BAF byla 68%, a u skupiny, která obsahovala 50 % BAF, dozrálo 44% oocytů do metafáze II.

Dále Opiela et al. (2014) zkoumali vliv hyaluronanu na zrání. Hyaluronan je látka, která se běžně vyskytuje v COC při zrání, jejich hypotézou tedy bylo, že větší přidavek hyaluronanu zlepší zrání *in vitro*. Jedna skupina oocytů dozrávala ve zracím médiu s 0,035% hyaluronanu, druhá skupina dozrávala ve zracím médiu s 0,07 % hyaluronanu, a třetí skupina dozrávala jen v médiu bez přítomnosti hyaluronanu. Nejvyšší meiotické zrání (70,2%), bylo pozorováno v médiu bez přítomnosti hyaluronanu. Nejnižší (63,1%) naopak bylo v médiu doplněném o 0,07% hyaluronanu. V médiu doplněném o 0,035% hyaluronanu byla meiotická zralost téměř 67,7%. Získaná meiotická zralost se mezi analyzovanými skupinami významně nelišila, experiment ukázal, že hyaluronan nemá škodlivý vliv na oocyty.

V dalším experimentu Chowdhury et al. (2017) zkoumali, jak přidavek lykopenu zlepšuje *in vitro* zrání. Lykopen je jasně červený karotenoidový pigment a silný *in vitro* antioxidant, který se nachází v rajčatech, a jiných červených plodech a zelenině. Jejich hypotézou bylo, že přidavek lykopenu zlepší *in vitro* zrání a sníží oxidační stres. Procento oocytů, které postupovalo při zrání do fáze MII, bylo významně vyšší u skupiny, do které byl během zrání přidán lykopen, než u skupiny ve které nebyl.

Yinghua et al. (2017) publikovali experiment, ve kterém zkoumali jak kostní morfologický protein-4 (BMP-4) ovlivňuje *in vitro* zrání v prodloužené kultivaci. Ze závěru vyplývá, že přidání BMP-4 podporuje růst oocytů v prodloužené kultivaci, ale narušuje vývojovou kompetenci oocytů.

Marques et al. (2018) hodnotili, jak přidavek melatoninu do zracího média ovlivňuje rychlost embryonálního štěpení, tvorbu blastocyst a jejich kvalitu. Pro *in vitro* zrání bylo vybráno 30 až 35 COC s homogenní cytoplazmou a několika buněčnými vrstvami. Tyto oocyty byly vloženy do zracího média TCM-199, ve kterém byly Earleovy soli, l-glutamin, 10% fetální hovězí sérum, 0,2 mM pyruvátu, 5 mg / ml luteinizačního hormonu, 1 mg / ml FSH, 75 ug / ml amikacinu a 1mM cystaminu. Některé oocyty byly doplněny různými koncentracemi melatoninu do zracího média. V prvním médiu je koncentrace IVM + 10⁻⁷, v druhém IVM + 10⁻⁹, a v posledním IVM + 10⁻¹¹. U skupiny do které melatonin nebyl přidán, dozrálo do metafáze II 73,9% oocytů, což byl nejnižší výsledek. U skupiny s koncentrací melatoninu IVM + 10⁻⁹ dozrálo do MII 90,9% oocytů, u skupiny IVM + 10⁻¹¹

11dozrálo 86,6% oocytů do MII a u skupiny IVM + 10-7 dozrálo do MII 82,7% oocytů. Přidání melatoninu do zracího média v koncentracích 10-9 a 10-11 zvýšilo rychlost embryonálního štěpení, ale nezlepšilo tvorbu blastocyst. Tento experiment ukazuje, že přídavek melatoninu v IVM není nutný.

Laskowski et al. (2017) sledovali v experimentu, jaký má vliv inzulin během *in vitro* zrání oocytů na tvorbu blastocyst. Inzulin je metabolický hormon, který reguluje energetickou homeostázu a reprodukční funkce. Oocyty byly náhodně rozděleny do tří skupin, bovinní inzulin byl přidán do média během IVM, buď v koncentraci 0,1 uq ml⁻¹ nebo 10 uq ml⁻¹ a do třetí skupiny se inzulin nepřidal. Ukázalo se, že u skupin ke kterým byl přidán inzulin, vykazovaly nižší výtěžnost blastocyst (na základě nezralých oocytů), než u skupiny ke které inzulin přidán nebyl. Inzulin tedy během dozrávání snížil rychlost vývoje blastocyst, ale významně neovlivnil štěpení, embryonální stádium nebo stupeň vývoje.

Hussain et al. (2015), sledoval účinnost tří zracích médií na zrání oocytů *in vitro*. Skupiny oocytů rozdělil do tří zracích médií: TCM-199, Ham's F-12 a Ham's F-10. TCM-199 obsahuje oproti ostatním adenin, adenosin, hypoxanthin, thymidin, vitamíny a neobsahuje žádné proteiny, lipidy ani růstové faktory. Média Ham's F-12 a Ham's F-10 obsahují zinek, hypoxanthin, thymidin a neobsahují žádné bílkoviny nebo růstové faktory, obvykle se doplňují fetálním hovězím sérem a používají systém pufru na bázi hydrogenuhličitanu sodného, což vyžaduje prostředí o koncentraci 5 – 10 % CO₂. V tomto experimentu každé médium obsahovalo stejné přísady: pyruvát sodný, gentamicin, L-glutamin, prasečí FSH a folikulární tekutinu. Výskyt metafáze I a metafáze II byl nejvyšší u oocytů, které byly kultivovány v TCM-199 s přísadami při teplotě 38,5°C po dobu 24 hodin. Ve srovnání s Ham's F-12 a Ham's F-10, poskytlo médium TCM-199 spolu s přísadami lepší rychlost *in vitro* zrání oocytů. (Hussain et al., 2015).

Zrání oocytů se uskutečňuje buď v mikrokapkách krytých olejem, na Petriho miskách, a nebo čtyřjamkových nádobách krytých olejem v inkubátoru při 39°C s 5% CO₂ při 90 % vlhkosti ve vzduchu po dobu 22 až 24 hodin (Looney et al., 1994).

3.3.4 Oplození oocytů

Fertilizace, neboli oplození, je stav, kdy dojde ke splynutí samčích a samičích rodičovských pohlavních buněk, které nesou pouze jednu sadu chromozomů. To znamená, že jsou haploidní. Po splynutí vznikne nový jedinec, který již má dvě sady chromozomů, tedy je diploidní. U *in vitro* fertilizace u skotu dojde po dokončení zrání, které trvá 20 - 24 hodin,

k přenosu oocytů ze zračního média TCM-199, do speciálního oplozovacího média (Gordon, 2003).

3.3.4.1 Sperma používané pro oplození *in vitro*

Ne každý býk, produkuje spermie vhodné pro *in vitro* fertilizaci. U oplození *in vitro* se nejčastěji používá zmražené sperma. Konzervované sperma je nejčastěji uchováváno v pejetách (Blondin et al., 1997).

Při přípravě spermatu, se pejety rozmrazí při teplotě 38 – 39°C, po dobu 10 sekund, a z pejet se odebere 100 µl spermatu. Spermie poté musíme oddělit od ředidla, které prodlužovalo životaschopnost spermií po dobu zmrazení. Existuje několik způsobů pro oddělení spermií z ředidla. Nejčastěji používaná metoda je centrifugace (Kreysing et al., 1997). Tuto metodu provádíme v centrifugační zkumavce, která má objem 15ml. Sperma je navrstveno na nespojitý Percollův gradient, ten se skládá z 2 ml 90% Percollu překrytého 2 ml 45% Percollu. Centrifugace se provádí 20 - 30 minut při míře odstředění 3214 x g (Gordon, 2003).

Jedním z dalších způsobů pro oddělení spermií je metoda vyplavení (Swim up) (Machatková a kol., 2009). Tato metoda spočívá v oddělení nepohyblivých a pohyblivých spermií aktivní migrací do média. Spermie se nejprve rozmrazí při teplotě 38 – 39°C po dobu 10 sekund, a z pejet se odebere 100 µl spermatu. Spermie se umístí do zkumavek, ve kterých je umístěno 1 ml kapacitačního média, a jsou inkubovány po dobu 45 minut při teplotě 38,5°C v inkubátoru v 5 % CO₂. Poté jsou vyplavené spermie odebrány a shromážděny v centrifugační zkumavce (Laskowski et al., 2017). Metoda vyplavení se nedoporučuje pro příliš viskózní ředidla (Galli et al., 1996).

U obou metod se po oddělení pohyblivých spermií stanoví jejich koncentrace, a poté se spermie přidají do oplozovacího média k oocytům (Galli et al., 1996).

3.3.4.2 Příprava oocytů pro *in vitro* oplození

Při klasickém *in vitro* oplození se oocyty před vložením do média nejprve musí dvakrát až čtyřikrát propláchnout v PBS (Phosphate Buffered Saline – fosfátový pufr) či v jiném médiu, a poté propláchnout i v samotném oplozovacím médiu (Blondin et al., 1997). Propláchnuté oocyty se vloží ve skupinách po 30 až 50 kusech do misek, ve kterých je nalito 250 µl oplozovacího média. Do média se nejdříve přidají oocyty minimálně 35 - 40 minut, před přidáním spermií (Galli et al., 1996).

Oplozovací médium je nejčastěji tvořeno z modifikovaného fert- TALP (TALP je thyroïdní preparát, ve kterém je obsaženo 25 mM hydrogenuhličitanu sodného a 0,6% BSA, který slouží jako zdroj proteinů). Ve fert- TALP je často přídavek BSA bez mastných kyselin, heparinu a kyseliny pyrohroznové. Dalším využívaným médiem je SOF (syntetická oviduktální tekutina) médium doplněné o esenciální, neesenciální aminokyseliny, glutamin a glycin (Kreysing et al., 1997). V oplozovacích médiích jsou vlastně obsaženy látky, které podporují motilitu a kapacitaci spermií, heparin slouží pro zlepšení kapacity spermií. (Galli et al., 1996).

Při klasickém *in vitro* oplození se oocyty spolu se spermii přenesou do oplozovacího média. Spermie jsou inkubovány s oocyty po dobu 6-26 hodin, spermie adhezuje na zona pellucida, pomocí enzymů ji naruší a za intenzivního pohybu bičíku proniká přes cytoplazmatickou membránu do cytoplazmy oocytu. K zajištění optimálního průběhu oplození je nezbytná přítomnost 10 000 spermií na jeden oocyt (Machtková a kol., 2009). Ovšem Pereira et al. (2005) uvádí, že pro optimální oplození je vhodná přítomnost 1×10^6 spermií/ml. Oplození probíhá při teplotě 39°C v 5% atmosféře CO₂ (Kreysing et al., 1997), někteří autoři ale provádí oplození v atmosféře, která je složena z 90% N₂, 5% O₂, a 5% CO₂ po dobu 22 hodin (Laskowski et al., 2017). King et al., (1986) porovnával dvě různé teploty. Míra penetrace u oocytů byla 36% při teplotě 37°C a 58% při teplotě 39°C. Ve většině případů se provádí *in vitro* zrání a *in vitro* oplození při teplotě 39°C.

Jak je uvedeno výše, pro *in vitro* oplození oocytů je ve většině případů smícháno sperma s oocyty. Ovšem lze využít i různé mikromanipulační techniky. Jednou z nich je subzonální fertilizace a Intracytoplazmatická injekce spermie (ICSI- Intracytoplasmic sperm injection) (Machtková a kol., 2009).

Mikromanipulační techniky

Subzonální fertilizace je metoda, při níž se do pervitelinního prostoru oocytu přenesou několik spermií pomocí mikromanipulace (Obruca et al., 1995). Metoda Intracytoplazmatická injekce spermie je prováděna pod inverzním mikroskopem, který obsahuje mikromanipulátor. ICSI je prováděno za pomoci injekční a přidržující pipety. Tyto pipety jsou vyrobené z 30 µl borosilikátové skleněné kapiláry. Injekční pipeta je menší, má průměr 8 µl a přidržující pipeta má průměr 80 µl. Pipety jsou ohnuté do úhlu 45°. Oocyty se umístí do Petriho misky do tlumeného média EBSS (Earlův solný roztok), pohyblivá spermie se znehybní pomocí několika pulzů jehly do bičíku, a je bičíkem napřed aspirován do pipety. Takto nasátá spermie je opatrně vstříkována do ooplazmy oocytů. Oplození trvá 18 hodin. U této metody se musí uměle provést kapacitace spermie, která jinak normálně probíhá při oplození. Pro

kapacitaci se využívá heparin (Obruca et al., 1995). Machatková a kol. (2009) uvádí, že tato technika oplození snižuje počet spermií na 100 až 1 spermii na jeden oocyt.

Oplozené oocyty se oddělí a propláchnou v TALP médiu, odstraní se kumulární buňky a oplozené oocyty (předpokládané zygoty) se přenesou do kultivačního média (Kreysing et al., 1997, Machatková a kol., 2004).

3.3.5 Kultivace

Kultivace zahrnuje raný vývoj embrya od stádia předpokládané zygoty až po stádium blastocysty. Kultivační média musí vytvořit kultivační podmínky pro embrya, které se co nejvíce budou podobat prostředí, které je ve vejcovodech a děloze. Tato média obsahují roztok minerálních solí, které upravují pH, dále stopové prvky, aminokyseliny, pyruvát, glukóza. Dále se tato média obohacují o fetální telecí séra nebo sérové albuminy (Hasler et al., 1995).

Nejpoužívanější metodou je kultivace v syntetických médiích doplněné bovinním, fetálním nebo estrálním sérem v atmosféře vzduchu s 5% CO₂ (Machatková a kol., 2009). Machatková a kol. (2009) uvedla, že raná embrya byla kultivována v syntetických médiích doplněných bovinním sérovým albuminem v atmosféře 90% N₂, 5% O₂, a 5% CO₂, ale tato kultivace zatím nepřinesla očekávané výsledky. Další možností je kokultivace spolu se somatickými buňkami (epitelové buňky vejcovodu, jaterní buňky potkanů) v médiu TCM 199 nebo v médiu B2 Menezo s 10% séra nebo 1% albuminového bovinního séra při teplotě 38,8°C v 5% CO₂ (Knitlová et al., 2017).

Stejně jako u zrání oocytů mohou být vyvíjející se embrya kultivována jak v mikrokapkách pod minerálním olejem, tak i v jamkách mikroploten používaných pro buněčné kultury (Machatková a kol., 2009). Dále se u těchto oocytů provádí za 24 - 48 hodin kontrola rýhování. Do stádia blastocysty v *in vitro* kultivačních systémech se předpokládané zygoty dostanou 7. - 9. den po oplození (Galli et al., 1996).

3.3.6 Hodnocení embryí

Hodnocení embryí je nejčastěji prováděno z důvodů rozlišení embryí od neoplozených oocytů. Posuzuje se, zda je fáze vývoje embryí v souladu s předpokládanou vývojovou fází a zda jsou embrya schopna podrobit se přenosu nebo kryokonzervaci (Bó et Mapletoft, 2013).

Hodnocení embryí u skotu se běžně provádí pod stereomikroskopem při zvětšení 50 až 100 x. Embryo je položeno do malé mělké misky a musí se ohodnotit i se zona pellucida z různých hledisek a stran. Celkový průměr embryí u skotu se pohybuje v rozmezí 150 až 190

µm, průměr se stanovuje i s tloušťkou zona pellucida, která má v průměru 12 až 15 µm. Od stádia jednobuněčného embrya až po stupeň blastocysty, se celkový průměr prakticky nemění. Životaschopnost embrya se nejlépe určuje podle jeho vývojové fáze. Ideální embryo je takové, které má kulovitý a kompaktní tvar (Jahnke et al., 2015). Blastomery embrya by měly mít podobný tvar, velikost, barvu a strukturu. Embryo by nemělo mít zrnitou strukturu. Pervitelinní prostor pod zona pellucida, by měl být čistý bez známek nečistot. Zona pellucida embrya by měla být jednotná, bez popraskání (Bó et Mapletoft, 2013).

Klasifikační systém embryí vychází z kódovacího systému IETS (mezinárodní společnost pro přenos embryí, www.iets.org), podle kterého se hodnotí embrya podle vývojových stádií a podle jejich kvality. Pro hodnocení vývojových stádií embryí se využívá číselný kód, jenž se pohybuje v rozmezí čísel 1-9 (Wright, 2016).

- Číslo 1 označuje neoplozený oocyt nebo embryo, které se skládá pouze z jedné buňky.
- Číslo 2 označuje embryo, které se skládá 2 až 12 buněk. Vývoj embrya je značně zpožděn, toto stádium by nemělo být použito pro přenos nebo kryokonzervaci (Wright, 2016).
- Číslo 3 je časná morula. Embrya, která 4. – 5. den sestupují do dělohy v *in vivo* podmínkách, se nacházejí ve fázi časné moruly, nebo moruly. Časná morula se skládá nejméně z 16-ti buněk. Jednotlivé blastomery jsou od sebe těžko rozpoznatelné (Lindner, et al., 1983). Většinu pervitelinního prostoru zabírá buněčná hmota embrya. Toto stádium je nevhodné pro kryokonzervaci (Jahnke et al., 2015).
- Číslo 4 je morula. Vytvořila se kompaktní hmota z jednotlivých blastomer, které se spojili. Hmotnost embrya zabírá 60 až 70% pervitelinního prostoru (Bó et Mapletoft, 2013).
- Číslo 5 je časná blastocysta. V embryu se vytvořila dutina naplněná tekutinou označovaná jako blastocel (Jahnke et al., 2015). Embryo v této fázi zabírá 70 až 80% pervitelinního prostoru. V této fázi je většinou těžké rozpoznat vnitřní buněčnou hmotu a buňky trofoblastu (Lindner, et al., 1983).
- Číslo 6 je blastocysta. V této fázi je zřetelná odlišnost vnějšího trofoblastu a vnitřní buněčné hmoty, buněčná hmota je kompaktnější. Embryo již zabírá většinu pervitelinního prostoru (Bó et Mapletoft, 2013).

- Číslo 7 je rozšířená blastocysta. Celkový průměr embrya se v této fázi rychle zvětšuje, ale současně dochází ke ztenčování zóna pellucida přibližně na třetinu její původní tloušťky (Jahnke et al., 2015).
- Číslo 8 je klubající se blastocysta. V tomto stádiu se embryo už zcela zbavilo zóna pellucida, nebo se z ní teprve klube. (Bó et Mapletoft, 2013).
- Číslo 9 je rozšířená klubající se blastocysta. Od čísla 8 se liší hlavně větším průměrem. Tato fáze embryonálního vývoje není vhodná pro mezinárodní obchod (Jahnke et al., 2015).

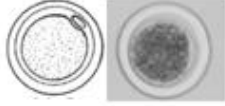
Podle systému IETS jsou embrya dále hodnocena podle kvality. Kvalita se hodnotí podle morfologických charakteristik jednotlivých embryí. Řadíme sem tvar, barvu, velikost pervitelinního prostoru a množství degenerovaných buněk (Wright, 2016). Pro hodnocení kvality embryí se používají kódy kvality v rozmezí čísel 1 - 4 (Jahnke et al., 2015).

- Kód 1 je vynikající nebo dobrá kvalita embryí. Tato embrya velice dobře přežívají při procesech mražení nebo rozmražení, a bývají doporučena pro mezinárodní obchod (Bó et Mapletoft, 2013). Embrya jsou symetrická s kulovitým tvarem, blastomery jsou jednotné ve velikosti, hustotě a barvě. Minimálně 85% hmoty embrya by mělo být životaschopné a neporušené. Zóna pellucida by měla být hladká (Jahnke et al., 2015).
- Kód 2 je uspokojivá kvalita embryí. Tyto embrya mají lehkou nepravidelnost v celkovém průměru embrya nebo ve velikosti a barvě jednotlivých buněk. Minimálně 50% hmoty embrya může být porušena. Je u nich nižší přežitelnost při mražení/ rozmražení (Bó et Mapletoft, 2013).
- Kód 3 je špatná kvalita embryí. Značná nepravidelnost je ve tvaru, velikosti hmoty embrya, v barvě a hustotě jednotlivých buněk. Dvacet pět procent hmoty embrya by mělo být neporušeno (Jahnke et al., 2015). Proces mražení/ rozmražení tato embrya nepřežijí (Bó et Mapletoft, 2013).
- Kód 4 zahrnuje mrtvá, degenerovaná embrya, nebo embrya tvořená jednou buňkou. Tato embrya se vyřazují, nejsou schopná života (Jahnke et al., 2015).

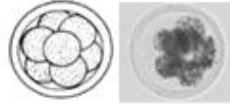
Každému embryu, které nedosáhlo ve stádiu embryonálního vývoje alespoň stádia časné moruly, měl by mu být přiřazen kód kvality 4. Neživotaschopná embrya by neměla být přenášena do příjemkyň, ani by neměla být konzervována (Wright, 2016).

STÁDIA VÝVOJE EMBRYÍ

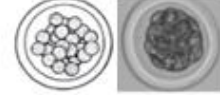
Číslo 1- jednobuněčné
embryo (den 1)



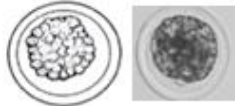
Číslo 2- osmibuněčné
embryo (den 4)



Číslo 3- časná morula
(den 5-6)



Číslo 4- morula (den 6)



Číslo 5- časná blastocysta
(den 7)



Číslo 6- blastocysta
(den 7-8)



Číslo 7- rozšířená
blastocysta (den 8-9)



Číslo 8- klubající se
blastocysta (den 9)



Číslo 9- rozšířená klubající
se blastocysta (den 9-10)

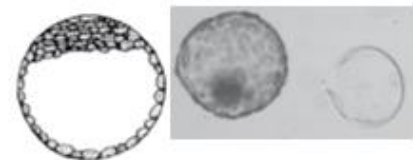


Schéma stádií vývoje embryí (Jahnke et al., 2015).

4 Závěr

In vitro produkce embryí je metoda používána u hospodářských zvířat v dnešní době především u skotu. Jedním z hlavních důvodů *in vitro* produkce embryí je v rychlosti vyprodukování velkého množství geneticky cenných embryí od vysokoužitkových krav. Základním krokem je odběr oocytů. Nejvýhodnější je odběr oocytů *in vivo* (od živých zvířat), jelikož zvířata k odběru mohou být využívána opakovaně a není zde vyžadována žádná hormonální stimulace. Nejpoužívanější metodou pro odběr oocytů *in vivo* je transvaginální ultrazvuková punkce, která je prokázána jako velmi úspěšná technika, ve které je dosahováno 60% úspěšnosti. Ačkoliv se touto metodou mohou oocyty odebírat až 2 krát týdně, neovlivňuje negativně zdraví zvířat, a stres zvířat je minimální. Po odběru je nutné oocyty ohodnotit a vybrat kvalitní oocyty pro další fáze. Oocyty se dále umístí do zracího média v přítomnosti hormonů, protože jsou nezralé. Ve většině případů probíhá *in vitro* zrání při 39 °C, a trvá průměrně 24 hodin. Další fází je oplození, které trvá průměrně 24 hodin. Pro oplození se musí nejprve připravit spermie, protože ne každý býk produkuje spermie vhodné pro *in vitro* oplození. Nejčastěji se využívá klasické oplození, kdy se spermie a oocyty přesunou do oplozovacího média. Oplození probíhá při teplotě 39°C v 5% atmosféře CO₂, někteří autoři ale provádí oplození v atmosféře, která je složena z 90% N₂, 5% O₂, a 5% CO₂ po dobu 22 hodin. A poté se předpokládané zygoty kultivují. Nejpoužívanější metodou je kultivace v syntetických médiích, která bývají doplněna bovinním, fetálním nebo estrálním sérem v atmosféře vzduchu s 5% CO₂, nebo se používá metoda kokultivace spolu se somatickými buňkami (epitelové buňky vejcovodu, jaterní buňky potkanů). U *in vitro* kultivačních systémů se embrya dostanou do stádia blastocysty 7. den po oplození, a v této fázi se embrya přenášejí do příjemkyň nebo se zmrazí.

5 Seznam použité literatury

Adams, G.P., Jaiswal, R., Singh, J., Malhi, P. 2008. Progress in understanding ovarian follicular dynamics in cattle. *Theriogenology*. 69 (1). 72-80.

Arlotto, T., Schwartz, J. L., First, N. L., Leibfried-Rutledge, M. L. 1996. Aspects of follicle and oocyte stage that affect *in vitro* maturation and development of bovine oocytes. *Theriogenology*. 45 (5). 943-956.

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.

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.

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

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.

Doležel, R. 2009. Pohlavní aktivita. In: Hofírek, B., Dvořák, R., Němeček, L., Doležel, R., Pospíšil, Z. (eds.). *Nemoci skotu*. Noviko a.s. Brno. s. 469-474. ISBN: 9708086542195.

Elder, K., Dale, B. 2003. *In vitro fertilization*. Cambridge university press. P. 295. ISBN: 0511006020

Fair, T. 2003. Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence. *Animal Reproduction science*. 78. (3-4). 203-216.

- Frandsen, R.D., Wilke, W.L., Fails, A.D. 2009. Anatomy and physiology of farm animals. Blackwell publishing Iowa. P. 512. ISBN: 9780813813943.
- Galli, C., Lazzari, G. 1996. Practical aspects of IVM/IVF in cattle. *Animal Reproduction Science*. 42 (1-4). 371-379.
- 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.
- 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. CABI Publishing. P. 393. ISBN: 0851996663
- Greve, T., Madison, V. 1991. In vitro fertilization in cattle: a review. *Reproduction Nutrition Development*. 31 (2). 147-157.
- Grimes, R. W., Ireland, J. J. 1986. Relationship of macroscopic appearance of the surface of bovine ovarian follicles, concentrations of steroids in follicular fluid, and maturation of oocytes in vitro. *Biology of Reproduction*. 35 (3). 725-732.
- Hafez, E. S. E., Hafez. B. 2000a. Folliculogenesis, Egg Maturation, and Ovulation. In: Hafez, B., Hafez, E. S. E. (eds.). *Reproduction in Farm animals*. 7th edition. Lippincott Williams Wilkins. Meryland. p. 68-81. ISBN: 0683305778.
- Hashimoto, S., Takakura, R., Minami, N., Yamada, M. 1999. Ultrasound-guided follicle aspiration: Effect of the frequency of a linear transvaginal probe on the collection of bovine oocytes. *Theriogenology*. 52 (1). 131-138.
- Hasler, J.F., Henderson, W.B., Hurtgen, P.J., Jin, Z.Q., McCauley, A.D., Mower, 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 ethyleneglycol. *Theriogenology*. 48 (4). 563-579.
- Hawk, H.W., Wall, R.J. 1994a. Improved yields of bovine blastocysts from *in vitro*-produced oocytes. I. Selection of oocytes and zygotes. *Theriogenology* 41. 1571–1583.
- Hazeleger, N.L., Hill, D.J., Stubbings, R.B., Walton, J.S. 1995. Relationship of morphology and follicular fluid environment of bovine oocytes to their developmental potential *in vitro*. *Theriogenology* 43, 509–522.
- 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.
- Hussain, M., Chakravarty, P., Soren, S., Deori, S., Begum, S. S. 2015. Effect of recovery technique and culture media on *in vitro maturation* of indigenous cattle oocytes of Assam. *Indian Journal of Animal Research*. 49 (1).
- Chowdhury, M. MR., Choi, B. H., Khan, I., Lee, K. L., Mesalam, A., Song, S. H., Xu, L., Joo, M. D., Afrin, F. 2017. Supplementation of lycopene in maturation media improves bovine embryo quality *in vitro*. *Theriogenology*. 103. 173-184.
- Jahnke, M. M., West, J. K., Youngs, C. R. 2015. Evaluation of In Vivo-Derived Bovine Embryos. In: Hopper, R. M. (ed.). *Bovine Reproduction*. Wiley Blackwell. USA. p. 733-748. ISBN: 13: 978-1-1184-7083-1/2015.
- Jelínek, P., Koudela, K. a kol. 2003. *Fyziologie hospodářských zvířat*. Mendelova zemědělská a lesnická univerzita. Brno. 414 s. ISBN: 80-7157-644-1
- Jeřeta, M., Rozsévač, O., Malát, K., Čtvrtlíková-Knitlová, D., Hanzalová, K., Machatková, M. 2013. Využití metody fertilizace oocytů *in vitro* u plemene belgické modrobílé. *Veterinářství*. 12 (63). 913-916.

King, W.A., Bousquet, D., Greve, T., Golf, A. K. 1986. Meiosis in bovine oocytes matured in vitro and in vivo. *Acta Vet Scand.* 27 (2). 267-279.

Knitlová, D., Hulínská, P., Jeřeta, M., Hanzalová, K., Kempisty, B., Machatková, M. 2017. Supplementation of l-carnitine during *in vitro* maturation improves embryo development from less competent bovine oocytes. *Theriogenology.* 102. 16-22.

Komárek, V. a kol. 1964. Anatomie a fyziologie hospodářských zvířat. Státní zemědělské nakladatelství. Praha. 387 s. ISBN: 07-012-64-04-50

Konig, H. E., Liebich, H. G. 2002. Anatomie domácích savců: Splanchnologie, cévní a nervová soustava. 2. díl. Hajko&Hajková. 416s. ISBN 8088700574.

Kreysing, U., Nagai, T., Niemann, H. 1997. Maledependent variability of *fertilization* and embryo development in two bovine in vitro fertilization systems and the effect of casein phosphopeptides. *Reproduction, fertility and development.* 9. 465-474.

Kudláč, E., Elečko, J. a kol. 1987. Veterinární porodnictví a gynekologie. Státní zemědělské nakladatelství. Praha. 576 s. ISBN: 07-053-87-04-50

Laskowski, D., Bage, R., Humblot, P., Andersson, G., Sirard, M. A., Sjunnesson, Y. 2017. Insulin during *in vitro* oocyte maturation has an impact on development, mitochondria, and cytoskeleton in bovine day 8 blastocysts. *Theriogenology.* 101 (1). 15-25.

Lindner, G. M., Raymond, W., Wright, J. 1983. Bovine embryo morphology and evaluation. *Theriogenology.* 20 (4). P 407-416.

Looney, C.R., Lindsey, B.R., Gonseth, C.L., Johnson, D.L. 1994. Commercial aspects of oocyte retrieval and *in vitro fertilization* for embryo production in problem cows. *Theriogenology.* 41. 67-72.

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.

Machatková, M., Jeřeta, M., Hulínská, P. 2009. Faktory ovlivňující efektivnost produkce embryí skotu *in vitro*. *Náš chov*. 11. 24-26.

Machatková, M., Krausová, K., Jokesová, E., Tománek, M. 2004. Developmental competence of bovine oocytes effects of follicle size and the phase of follicular wave on *in vitro* embryo production. *Theriogenology*. 61 (2-3). 329-335.

Machatková, M., Hanzalová, K., Horaková, J., Recková, Z., Hulínská, P. 2006. Collection of oocytes from donors in the growth phase of follicular development can enhance the production of bovine embryos for cryopreservation. *Veterinární medicína*. 51 (5). 232-238.

Marvan, F. a kol. 2011. *Morfologie hospodářských zvířat*. 5. vyd. Brázda. Praha. 304 s. ISBN: 978-80-213-2188-5

Marques, T. C., da Silva Santos, E. C., Diesel, T. O., et al. 2018. Melatonin reduces apoptotic cells, SOD2 and HSPB1 and improves the *in vitro* production and quality of bovine blastocysts. *Reproduction in domestic animals*. 53 (1). 226-236.

Mapletoft, R., Steward, K., Adams, G. 2002. Recent advances in the superovulation in cattle. *Reproduction Nutrition Development*. 42 (6). 601-611.

Mapletoft, R. J., Bó, G. A. 2013. Innovative strategies for superovulation in cattle. *Animal Reproduction*. 10 (3). 174-179.

Obruca, A., Mock, K., Feichtinger, W., Lunglmayr, G. 1995. Fertilization and pregnancies following intracytoplasmic injection of testicular spermatozoa. *Assisted reproduction and genetics*. 12 (9). 627-631.

Opiela, J., Romanek, J., Lipinski, D., Smorag, Z. 2014. Effect of Hyaluronan on developmental Competence and quality of oocytes and obtained blastocysts from *in vitro* maturation of bovine oocytes. *BioMed Research International*. 519189. 1-8.

Pereira, D. C., Dode, M. A. N., Rumpf, R. 2005. Evaluation of different culture systems on the *in vitro* production of bovine embryos. *Theriogenology*. 63 (4). 1131-1141.

Peters. A. R., Ball. P. J. H. 1995. Reproduction in cattle. Blackwell Science. Cambridge. p. 234. ISBN: 0632038276.

Quero, J. M. O., Millán, M. M., Cordoba, M. V., Merlin, M. P., Franganillo, A. R. 1995. The effect of bovine amniotic fluid on *in vitro maturation* of bovine oocytes. British Veterinary Journal. 151 (5). 547-554.

Reece, W. O. 2011. Fyziologie a funkční anatomie domácích zvířat. GradaPublishing a. s. Praha. 480 s. ISBN: 9788024732824

Sanbuissho, A., Threlfall, W.R. 1989. The effects of estrous cow serum on the *in vitro maturation* and fertilization of the bovine follicular oocyte. Theriogenology. 31 (3). 693-699

Schatten, H., Constantinescu, G. M. 2007. Comparative Reproductive Biology. Blackwell Publishing. P. 402. ISBN: 978-0-8138-1554-1/2007

Schellander, K., Fayrer-Hosken, R.A., Keefer, C.L., Brown, L.M., Malter, H. 1989. *In vitro fertilization* of bovine follicular oocytes recovered by laparoscopy. Theriogenology. 31 (4). 927-932.

Sova, Z. a kol. 1981. Fyziologie hospodářských zvířat. Státní zemědělské nakladatelství. Praha. 512 s. ISBN: 07-089-81-04-50

Staigmiller, R. B. 1988. *In vitro* methods for production of viable oocytes. Journal of Animal Science. 66 (2). P 54-64.

Van den Hurk, R., Bevers, M.M., Beckers, J.F. 1997. *In-vivo and in-vitro* development of preantral follicles. Theriogenology. 47 (1). 73-82.

Verlhac, M. H., Villeneuve, A. 2010. Oogenesis. Wiley-Blackwell. Offord. P 501. ISBN: 978-0-470-69682-8.

Vieira, L. M., Rodrigues, C. A., Castro Netto, A., Guerreiro, B. M., Silveira, C. R. A., Moreira, R. J. C., SáFilho, M. F., Bó, G. A., Mapletoft, R. J., Baruselli, P.S. 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.

Wrenzycki, C., Stinshoff, H. 2015. Importance of reproductive biotechnology in cattle in Europe. *Tierärztliche Praxis Großtiere*. 43 (2). 115-122

Wright, J., M. 2016. Appendix D. Photographic illustrations of embryo developmental stage and quality codes. IETS Manual, 4th Edition. Dostupné z <www.iets.org>.

Yang, N. S., Lu, K. H., Gordon, I. 1990. *In vitro* fertilization (IVF) and culture (IVC) of bovine oocytes from stored ovaries. *Theriogenology*. 33 (1). P 352.

Yinghua, Y., Chihiro, K., Kenichiro, S., Yanagawa, Y., Katagiri, S., Nagano, M. 2017. Extension of the culture period for the *in vitro* Growth of bovine oocytes in the presence of bone morphogenetic protein-4 increases oocyte diameter, but impairs subsequent developmental competence. *Animal science journal*. 88 (11). 1686-1691.