

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra veterinárních disciplín**



**In vitro produkce embryí u koní**

**Bakalářská práce**

**Autor práce: Dominika Babická**

**Vedoucí práce: Ing. Jiří Šichtař, PhD.**

© 2016 ČZU v Praze

### **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci "In vitro produkce embryí u koní" 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 15. 4. 2016

---

## **Poděkování**

Ráda bych touto cestou poděkovala Ing. Jiřímu Šichtařovi, PhD. za pomoc při psaní bakalářské práce a mému manželovi za podporu.

# In vitro produkce embryí u koní

## Souhrn

Cílem této práce je napsat literární rešerši zahrnující nejnovější poznatky z oblasti *in vitro* produkce embryí u koní. Aby bylo možné provést *in vitro* produkci embryí, je potřeba nejprve znát anatomii klisny a řízení pohlavní aktivity. Pohlavní soustava klisny se skládá ze dvou vaječníků, dvou vejcovodů, dělohy, pochvy a vulvy. Na rozdíl od jiných hospodářských zvířat probíhá vývoj oocytů v dřeni vaječníků. Pohlavní aktivita je řízena neurohumorálně a produkci hormonů zajišťuje centrální nervová soustava a endokrinní žlázy.

Pro *in vitro* produkci embryí se musí nejprve získat oocyty. Ty se sbírají buď z živých, nebo mrtvých klisen. U živých klisen se využívá ovum pick up (OPU, transvaginální aspirace oocytů pomocí ultrazvuku), laparotomie přes slabinu, nebo transkutánní punkce přes slabinu. Neinvazivní metodou je OPU, kdy se každý folikul několikrát vyplachuje, a v získaném roztoku se hledají oocyty. Invazivní, za to však úspěšnější metodou při získání oocytů, je transkutánní punkce přes slabinu. Z vaječníků z jatek se oocyty sbírají rozřezáním vaječníků, kyretáží, nebo aspirací. Velmi dobré výsledky v množství získaných oocytů má rozřezání vaječníků. Po sesbírání se oocyty nejprve musí rozředit podle kvality kumulo-oocytárního komplexu na oocyty kompaktní, expandované, nebo degenerující. Kompaktní a expandované oocyty se rozlišují pod mikroskopem na základě morfologie okrajů těchto komplexů. Kompaktní oocyty mají čistou linii okraje, zatímco expandované oocyty mají okraje zdeformované a mají heterogenní cytoplazmu. Nejlepší výsledky pro produkci embryí vykazují expandované oocyty. Ty se nejprve musí nechat zrát v kultivačním médiu do stádia MII. Kultivační systém pro zrání oocytů se sestává z použití M199 s Earlovou solí, 10% fetálního bovinního séra a 5 mU/ml bovinního folikulostimulačního hormonu ve zvlhčené atmosféře 5% CO<sub>2</sub> ve vzduchu při 38,2°C. Bylo zjištěno, že nezáleží na délce kultivace, výsledky vývoje blastocyst po 24 nebo 48 hodinách byly stejné.

Standardní IVF se u koní nedá provést kvůli změnám na zoně pellucidě a problematické kapacitaci spermií. Proto se používá intracytoplazmatická injekce spermie (ICSI), kdy se přímo do oocytu injikuje jedna znehybněná spermie. Před ICSI musí proběhnout kapacitace spermie pomocí kalcium ionoforu. Oocyt se dále kultivuje *in vitro* do stádia blastocysty. Další možností je přenos oplozeného oocytu přímo do děložního rohu klisny, nebo se uchovává pomocí kryokonzervace pro další použití.

**Klíčová slova:** kůň, reprodukce, embryo, *in vitro*, ICSI

# **In vitro embryo production in horses**

## **Summary**

The aim of this work is to write a literature review covering the latest findings in the field of *in vitro* embryo production in horses. In order to perform *in vitro* embryo production, you first need to know the anatomy of a mare and management of sexual activity. Reproductive system of mares consists of two ovaries, two oviducts, uterus, vagina and vulva. Unlike other livestock, the development of oocytes is in the cortex of the ovary. Sexual activity is driven neurohumoral and production of hormone is ensured by the central nervous system and endocrine glands.

For *in vitro* embryo production must be obtained first oocytes. These are collected from either the living or the dead mares. For live mares are used ovum pick up (OPU, transvaginal ultrasound guided aspiration), standing flank laparotomy or transcutaneous flank puncture. OPU is a noninvasive method, where each follicle is flushed several times, and in the obtained solution is looked for oocytes. Invasive, but a very successful method for obtaining oocytes is transcutaneous flank puncture. There are three ways for collecting oocytes from abattoir ovaries - either by slicing ovaries or curettage or aspiration. Very good results in amounts of obtained oocytes was proved by slicing ovaries. First, after collecting oocytes must be sorted according to „cumulus-oocyte complex (COC)“ on compact, expanded or degenerating oocytes. Compact and expanded oocytes are distinguished under a microscope based on the morphology of the edges of this COC. Compact oocytes have a clear line margins, while margins of expanded oocytes are deformed and have heterogeneous cytoplasm. Best results for the production of embryos exhibit expanded oocytes. First, it has to be matured in the medium to the stage of MII. The culture system for oocyte maturation consists of the M199 with Earl's salts, 10% fetal bovine serum and 5 mU/ ml of bovine follicle stimulating hormone in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> in air at 38.2 ° C. It was found out that regardless of the duration of cultivation, results of development of blastocysts after 24 or 48 hours were the same.

Standard IVF in horses can not be performed due to the zona pellucida and sperm capacitation. Therefore it is used intracytoplasmic sperm injection (ICSI), when one immobilized sperm is injected directly into the oocyte. Before ICSI sperm capacitation must be done by using the calcium ionophore. Oocytes were further cultured *in vitro* to the

blastocyst stage. Another possibility is to transfer the fertilized oocyte directly to the uterine horn of the mare, or it is used cryopreservation for future.

**Keywords:** horse, reproduction, embryo, in vitro, ICSI

## Obsah

Úvod .....	9
<b>1 Anatomie klisny .....</b>	<b>10</b>
1.1 Vaječníky .....	10
1.2 Vejcovod.....	10
1.3 Děloha.....	10
1.4 Pochva a vulva .....	11
<b>2 Řízení pohlavní aktivity .....</b>	<b>11</b>
2.1 Kůra mozková a podkorová centra .....	12
2.2 Hypotalamus.....	12
2.3 Hypofýza .....	13
2.4 Epifýza.....	13
2.5 Vaječníky .....	14
2.6 Děloha.....	14
<b>3 Oogeneze .....</b>	<b>14</b>
<b>4 Folikulogeneze .....</b>	<b>15</b>
<b>5 Estrální cyklus .....</b>	<b>16</b>
5.1 Ovulace.....	17
<b>6 Embryogeneze .....</b>	<b>19</b>
<b>7 In vitro produkce embryí u klisen.....</b>	<b>21</b>
7.1 Získání oocytů.....	21
7.1.1 Z živých klisen.....	22
7.1.2 Z jatečného materiálu.....	25
7.2 Klasifikace COC a oocytů .....	26
7.3 Zrání oocytů <i>in vitro</i> .....	27
7.4 Oplození .....	28
7.4.1 Příprava spermie .....	28
7.4.2 In vitro fertilizace bez ICSI .....	28
7.4.3 In vitro fertilizace s ICSI .....	29
7.5 Kultivační systém vzniklých embryí.....	35
<b>Závěr .....</b>	<b>40</b>
<b>Literatura .....</b>	<b>41</b>

## Úvod

Při používání biotechnologií a nových poznatků v produkci embryí u koní se může naplnit potenciál v množství vyprodukovaných potomků na jednu klisnu. Zatímco klasickým připouštěním se získá ideálně jedno hříbě za rok, při použití biotechnologií to může být jedno hříbě za jeden estrální cyklus. Pokud vezmeme v úvahu, že připouštěcí sezona trvá půl roku, bylo by to šest hříbat ročně. Pokud by se však podařila vyřešit superovulace, jako je tomu u skotu, mohlo by být hříbat daleko více. Zatímco by klisny – příjemkyně byly březí, klisna dárkyně by mohla pokračovat ve sportu.

Embrya u koní se produkují primárně *in vivo*. To zahrnuje výplachy embryí zhruba 6,5. den, kdy je embryo dostatečně malé pro manipulaci. V této fázi se dá embryo použít pro kryokonzervaci, kdy je díky velikosti embrya, které je ve fázi časně blastocysty, menší pravděpodobnost poničení embrya v průběhu kryokonzervace. Vypláchnutá embrya se také dají použít pro okamžitý transfer do klisen – příjemkyň. Příjemkyně musí být zdravá a ve výborné kondici, musí mít pravidelný říjový cyklus a být schopná embryo přijmout, donosit, porodit a odchovat zdravé hříbě. Příjemkyně by měla být mladá klisna ve věku zhruba 3 až 12 let. Před třetím rokem ještě klisna není fyzicky zralá pro porod, po dvanáctém roce je zase větší pravděpodobnost méně kvalitních říjí, zhoršený stav hladké svaloviny, která je potřebná pro posouvání embrya do dělohy, může být problematická nidace embrya v děloze a kvůli zhoršenému stavu hladké svaloviny může být i ztížen porod.

Produkce embryí *in vivo* je však málo efektivní, jelikož lze od klisny získat pouze jedno embryo za cyklus. U některých velmi cenných klisen by však bylo potřeba embryí získat více a k tomu slouží techniky produkce embryí *in vitro*.



# 1 Anatomie klisny

Reprodukční soustava klisny umožňuje zachování druhu. Skládá se z vaječníků, vejcovodů, dělohy, pochvy a vulvy. K samičím reprodukčním orgánům patří také mléčná žláza (Reece, 2011).

K funkci samičí pohlavní soustavy nepatří jen tvorba pohlavních buněk, hormonů a páření jako je tomu u samců, ale také slouží k vývoji oocytů, zárodku či plodu (Sova, 1981).

## 1.1 Vaječníky

Vaječník je párová žláza, v níž se vyvíjí oocyty a produkují se pohlavní hormony. Vaječníky leží v kaudální části dutiny břišní za ledvinami a jsou zavěšeny na okruží. Díky volnějšímu zavěšení vaječnicků je umožněno snadnější vyšetření pohmatem. Klisny mají fazolovitý tvar vaječnicků (Sova, 1981). Vaječníky se nacházejí 8-10 cm od dorzální stěny břicha (König, 2002). Délka vaječnicku je 5 – 8 cm, šířka 2 – 3 cm a hmotnost 25 – 40 g (Marvan, 1992).

Stavba vaječnicku je na rozdíl od jiných hospodářských zvířat odlišná. Kůra vaječnicku je pokryta vazivovým obalem, uvnitř vaječnicku je dřev obsahující folikuly v různém stupni vývoje (Marvan, 1992).

## 1.2 Vejcovod

Vejcovod je párový orgán z hladké svaloviny vystlán sliznicí. Vejcovodem putuje oocyt od vaječnicku do děložního rohu, kde je oocyt oplozen spermií. Rozšířená část vejcovodu, která přiléhá k vaječnicku, se nazývá nálevka vejcovodu (Reece, 2011). Sliznice je pokryta cylindrickým řasinkovým epitelem (Komárek, 1964).

## 1.3 Děloha

Děloha slouží k vývoji plodu. Děloha se skládá z krčku, těla a dvou rohů. Rozlišujeme 3 typy děloh:

Dvojitá – kdy oba děložní rohy ústí do pochvy. Tento typ dělohy má samice králíka.

Jednoduchá dvourohá rozdělená děloha má tělo rozděleno přepážkou. Tento typ dělohy mají přežvýkavci, šelmy nebo prasnice.

Jednoduchá dvourohá nerozdělená děloha se nachází u klisny (Sova, 1981).

Klisna má relativně velké tělo dělohy. Děložní rohy u klisny jsou z hospodářských zvířat nejmenší, měří asi 25 cm a mírně se zvedají nahoru (Sova, 1981).

Krček u klisny je dlouhý 5 – 7,5 cm (Sova, 1981). Uvnitř dělohy je žláznatá sliznice – endometrium. Tloušťka a stupeň prokrvení endometria je různá podle hormonálních změn, a jestli je v děloze plod či nikoli. Endometriální žlázy zajišťují výživu embryu před placentací. Krček vstupuje do pochvy, je to silný svěrač z hladké svaloviny a kromě říje a porodu je pevně uzavřen. V krčku jsou přítomny pohárkovité buňky, které produkují sekret. Ten během březosti vytéká do pochvy a brání pronikání infekce do dělohy. Sekret je viditelný během říje. Střední vrstva děložní stěny se nazývá myometrium. Myometrium hypertrofuje v průběhu březosti a napomáhá vypuzení plodu při porodu. Povrch dělohy tvoří perimetrium, což je tenká vrstva pobřišnice přecházející v mesometrium – děložní okruží (Reece, 2011).

Rohy zasahují do dutiny břišní, krček a tělo u nebřezích samic je uložen v dutině pánevní. Cévní zásobení vaječníku, vejcovodu a dělohy je umožněno přední, střední a zadní děložní tepnou. Inervace probíhá za pomoci semenného nervu a bederní pleteně (Komárek, 1964).

## **1.4 Pochva a vulva**

Pochva je kopulační orgán samic (Sova, 1981). Je uložena v pánvi a spojuje vulvu s dělohou. Je bezžláznatá a pokryta vrstevnatým dlaždicovým epitelem. Pochva přechází v poševní předsíň a na jejím rozhraní mezi pochvou a předsíní vyúsťuje močová trubice (Reece, 2011).

Pochva rourovitý svalnatý orgán. Je uložena v dutině pánevní pod konečníkem, dorzálně od močového měchýře. Mezi pochvou a předsíní se nachází panenská blána, což je příčná slizniční řasa (Komárek, 1964).

Vulva je vnější pohlavní orgán klisny. Tvoří ji dva stydké pysky a poštváček, který samicím zůstal jako pozůstatek samčího pyje (Sova, 1981).

## **2 Řízení pohlavní aktivity**

Pohlavní aktivita je řízena neurohumorálně. Produkci hormonů zajišťuje centrální nervová soustava a endokrinní žlázy. Centrální nervovou soustavu tvoří mozek a páteřní mícha (König et Liebich, 2002). CNS slouží jako ústřední vyhodnocovací jednotka zajišťující ukládání, uchování a vybavení informací (Reece, 2011).

CNS se skládá z mozku a míchy. Mozek se dělí na přední, střední a zadní mozek.

Zadní mozek se dále dělí na vlastní zadní mozek a míšň mozek. Míšň mozek tvoří prodlouženou míchu, kde se nachází velké množství neuronů. Ty tvoří šedou hmotu, která se nazývá retikulární formace, kde jsou centra pro regulaci krevního oběhu, vdech, výdech, sání, žvýkání a centra aktivizující mozkovou kůru. Vlastní zadní mozek se dělí na most a mozeček. Středň mozek se rozděluje na mozková ramena, střechu středňho mozku a kanál středňho mozku (Marvan, 1992).

Předň mozek se skládá z mezimozku a koncového mozku. Mezimozek se dělí na dorzální a ventrální část. Do dorzální části patří talamus a epitalamus, ventrální část tvoří hypotalamus. V epitalamu se nachází epifýza, neboli šišinka (Marvan, 1992). V neurohumorálním řízení se využívá principů zpětné vazby. Negativní zpětná vazba tlumí vylučování ostatních hormonů z mozku a pozitivní zpětná vazba stimuluje uvolňování daného hormonu (Komárek, 1964).

## **2.1 Kůra mozková a podkorová centra**

Kůra mozková a podkorová centra tvoří limbický systém, který reguluje sexuální funkce. Pomocí smyslových orgánů, periferních a vegetativních nervů a míchy, přicházejí do mozku informace o stavu pohlavního ústrojí. Přenos vzruchů se děje pomocí neurotransmiterů. Neurotransmitery se dělí na cholinergní (acetylcholin), adrenergní (noradrenalin, dopamin), které pohlavní činnost stimuluji, a serotogenní (serotonin, melatonin), který pohlavní aktivitu inhibuje (Doležel, 1997).

## **2.2 Hypotalamus**

Hypotalamus je hlavní, centrální řídicí orgán reprodukčních funkcí. Hypotalamus tvoří předň (rostrální) a zadň (kaudální) sexuální centrum (Doležel, 1997).

V rostrálním centru tvoří neurosekreční buňky antidiuretický hormon (ADH) a oxytocin. Uvolnění oxytocinu spouští laktaci, zvyšuje kontrakce dělohy a kontrakce myometria za účelem pomoci transportu spermií, pomáhá také při vypuzení plodu při porodu (Reece, 2011).

Buňky kaudálního centra dostávají podněty z rostrálního centra a svými neurosekrety inhibují nebo stimuluji sekreci hypofýzy. Uvolňování a tvorbu hypofyzárních hormonů zajišťují tzv. uvolňovací hormony, neboli liberiny (releasing hormones – RH). Inhibici hypofyzárních hormonů zajišťují statiny (inhibiting hormones – IH). Nejvýznamnějším RH se

nazývá GnRH (gonadotrophin releasing hormon). Hypotalamus přechází do hypofýzy (Doležel, 1997).

### **2.3 Hypofýza**

Hypofýza neboli podvěsek mozkový se skládá z neurohypofýzy a adenohypofýzy. Hormony jsou transportovány z hypotalamu do adenohypofýzy portálním krevním oběhem. Do neurohypofýzy se dostávají neurosekrety pomocí neuritů (König et Liebich, 2002).

Z adenohypofýzy se uvolňují FSH, LH a prolaktin. FSH je zodpovědný za stimulaci růstu a zrání folikulů, a také ovlivňování tvorby estrogenů (Doležel, 1997). Je předán do oběhového systému klisny dvoufázovým uvolňováním. Zvýšením FSH může být ovlivněno až deset folikulů, ale pouze jeden nebo dva se mohou rozvinout do stádia, kdy dojde k ovulaci (Davies Morel, 2003).

Luteinizační hormon je stejně jako FSH vylučován předním lalokem hypofýzy. Koncentrace LH dosahuje vrcholu při říji (Davies Morel, 2003). LH stimuluje zrání folikulů, ovulaci a tvorbu žlutého tělíska a ovlivňuje syntézu progesteronu a estrogenů (Reece, 2011).

Prolaktin, další hlavní sezónně ovlivněný hormon, je zřejmě zodpovědný za změny v rychlosti metabolismu u koní, vzrůstající účinnost konverze živin během zimních měsíců, což je období, kdy je nouze o krmivo (Argo et Smith: 1983; Morley et al.: 1983; Evans et al.: 1991). Prolaktin také stimuluje funkci mléčné žlázy a žlutého tělíska (Doležel, 2003).

### **2.4 Epifýza**

Epifýza produkuje melatonin a serotonin. Délka dne je vnímána šišinkou (epifýzou), která pomocí hormonu melatoninu kontroluje aktivitu hypotalamo-hypofyzárního systému. Melatonin je produkován v noci epifýzou a pod vlivem krátké denní doby ovládá reprodukční systém (Fitzgerald et al.: 1987).

Melatonin je vylučovaný epifýzou ve dvou fázích: fotofázi (ve dne) a skotofázi (v noci). Výskyt nebo absence denního světla je vnímáno epifýzou skrz nervová sdělení ze sítnice oka. Při absenci světla je přeměna tryptofanu na melatonin poháněna (Grubaugh: 1982; Kilmer et al.: 1982; Cleaver et al.: 1991). Přesné způsoby, kterými melatonin ovládá hypotalamus, je nejasný, ale zdá se pravděpodobné, že zahrnuje dopamin a endogenní opiáty včetně  $\beta$ -endorfin (Kilmer et al.: 1982; Aurich et al.: 1994,1995; Guerin et Wang: 1994; Besognek et al. 1995).

## 2.5 Vaječníky

Folikuly obsažené ve vaječnicích produkují estrogény a progesteron. Hlavní funkcí estrogenů je stimulovat buněčnou proliferaci a růst tkání vztažených k reprodukci. Estrogény tedy zajišťují: stimulaci růstu žláz endometria, vývodných cest mléčné žlázy, zvýšení sekrece děložních žláz, sexuální chování, regulaci sekrece LH, regulaci uvolňování  $\text{PGF}_{2\alpha}$ , spojení epifýz s těly dlouhých kostí, tvorbu bílkovin, epiteliotropní aktivitu (Reece, 2011).

Progesteron má vliv na podporu růstu žláz endometria, stimuluje sekreci vejcovodu a endometriálních žláz pro poskytnutí výživy embrya pře jeho implantací, stimuluje růst alveolů mléčné žlázy, brání děložním stahům během gravidity, reguluje sekreci gonadotropinů (Reece, 2011).

## 2.6 Děloha

Děloha produkuje prostaglandin  $\text{F}_{2\alpha}$ .  $\text{PGF}_{2\alpha}$  je obtížné měřit v oběhovém systému kvůli jeho krátkému poločasu rozpadu a pulzačnímu způsobu uvolňování. Nicméně  $\text{PGF}_{2\alpha}$  má metabolický produkt rozpadu, metabolit prostaglandin F (PGFM), který má delší poločas, a tak se dá snadněji měřit a zároveň zůstává velmi podobný  $\text{PGF}_{2\alpha}$ . Díky využití hladiny PGFM jako vodítka se zjistilo, že hladina  $\text{PGF}_{2\alpha}$  stoupá mezi dny 14 až 17 po ovulaci těsně předtím, než začne klesat hladina progesteronu. U klisen, kde se objevuje perzistující CL (Reece, 2011), nebo u březích klisen, není zjištěn žádný takový vzestup.  $\text{PGF}_{2\alpha}$  je vylučován endometriem dělohy a způsobuje luteolýzu CL, což má za následek pokles hladiny progesteronu. U klisny se  $\text{PGF}_{2\alpha}$  dostane do vaječníku přes hlavní oběhovou soustavu, nikoli lokálním proudem opačného směru transportním systémem, který je u ovcí a krav. To lze prokázat hysterektomií, v případě klisny vyjmutím děložního rohu rohu (Ginther et First: 1971).

## 3 Oogeneze

Předtím, než proběhne oogeneze, se musí buňky nejprve rozdělit z mateřské na dvě dceřiné. Buněčný cyklus má několik fází. Čas mezi dvěma děleními se nazývá interfáze. Na začátku interfáze je fáze  $G_1$ , dále S fáze a  $G_2$  fáze. Dělení buňky – mitóza (meióza), se označuje jako M fáze. Při  $G_1$  fázi se intenzivně tvoří RNA a probíhá proteosyntéza. Buňka zvyšuje svoji hmotnost a počet organel. Tato fáze je nejdelší. S fáze se nazývá syntetická. Při ní proběhne replikace DNA, pokračuje tvorba RNA i proteosyntéza. V  $G_2$  fázi stále pokračuje proteosyntéza i syntéza RNA, syntetizují se i bílkoviny potřebné pro mitózu. Po té je zahájena

samotná M fáze, neboli mitóza, případně meióza u pohlavních buněk, nebo amitóza. Oocyty vznikají meiózou (Marvan, 1992).

Oogeneze probíhá ve třech fázích: rozmnožování, růst a zrání. Fáze rozmnožování a začátek růstu probíhá ještě v prenatálním období (Sova, 1981).

V období rozmnožování se oogonie na povrchu vaječníku několikrát za sebou mitoticky dělí. Oogonie jsou buňky zárodečného epitelu. Z několikrát rozdělené oogonie vzniká několik oogonií a ty pak vstupují do kůry vaječníku, kde se již jako oocyt I. řádu obalí vrstvou folikulárních buněk. Takoveto primární oocyty se tvoří pouze v prenatálním období, po narození již žádné nevznikají (Sova, 1981).

Období růstu je velmi dlouhé. Trvá od začátku pohlavní dospělosti do ukončení pohlavní činnosti. Do této fáze vstupuje při každém ovariálním cyklu několik primárních oocytů. Roste jádro, syntetizuje se RNA, proteiny, hromadí se žlutkové inkluze a vznikají kortikální zrna zajišťující monospermatické oplození (Marvan, 1992).

Posledním stádiem je stádium zrání, kdy dochází ke dvěma zracím dělením. K profázi prvního zracího dělení dochází ještě v Graafově folikulu. Toto dělení je dokončeno až po ovulaci ve vejcovodu. Tam se oocyt I. řádu rozdělí na oocyt II. řádu a na pólové tělísko. Druhé zrací dělení probíhá po oplození spermií. Oocyt II. řádu se dále rozdělí na ovum a pólové tělísko s tím, že první pólové tělísko se může taktéž rozdělit. Ve výsledku tedy vznikne jeden oocyt a až tři pólová tělíška (Komárek, 1964).

## **4 Folikulogeneze**

Vývojová stádia folikulů zahrnují primordiální, primární, sekundární, terciární a Graafovy folikuly. Primordiální zárodečné folikuly mají jednu vrstvu plochých folikulárních buněk. Přeměnou plochého epitelu vznikne primární folikul. Primární folikul roste a přeměňuje se v sekundární folikul (König et Liebich, 2002). Folikulární buňky se mitoticky dělí a vzniká několik vrstev. Nejspodnější vrstva buněk má cylindrický tvar a nazývá se corona radiata. Kolem buňky se tvoří zona pellucida, což je tenká blanka složená z glykoproteinů (Marvan, 1992). Sekundární folikul má šterbinové prostory vyplněné tekutinou, ty se spojí a vytvoří dutinu folikulu (antrum). Dále se zesiluje stěna, množí se tekutina a vzniká terciární folikul. Terciární folikul, který ovuluje, se nazývá Graafův folikul. U klisny je velký 3 – 6 cm (König et Liebich, 2002). Stěnu terciárního folikulu tvoří obal, jehož vnější část se nazývá theca folliculi externa vytvořená z vaziva a cév, a vnitřní část se nazývá theca folliculi interna tvořená buňkami (Marvan, 1992).

V průběhu reprodukčního života klisen zaniká mnoho primordiálních folikulů a na jeho samém závěru zůstává pouze několik primárních folikulů. Dozrávání do stadia Graafova folikulu začíná v pubertě a je řízeno hormonálně pomocí LH a FSH. Jen velmi málo folikulů ve stadiu Graafova folikulu ovuluje (Reece, 2011).

Ovulace probíhá u klisen (na rozdíl od většiny druhů hospodářských zvířat) v ovulační jamce, což je malá část vaječníku. Právě díky ovulační jamce mají vaječníky klisny fazolovitý tvar (Sova, 1981).

U většiny klisen bylo prokázáno, že mají během cyklu jednu až dvě folikulární vlny. Prvním typem vlny je majoritní folikulární vlna, která je charakterizována dominantním folikulem a vedlejšími folikuly. Druhým typem je minoritní vlna, u které největší folikul nedosáhne průměru dominantního folikulu (Ginther, 1979).

Folikuly ve fázi vývoje vylučují estrogény (Davies Morel, 2003). Folikuly produkují inhibin, který zřejmě způsobuje pokles FSH, když se blíží ovulace. Inhibin působí jako negativní zpětná vazba na produkci FSH. Aktivin byl izolován ve folikulární tekutině a má mít podobný, ale pozitivní efekt zpětné vazby na sekreci FSH (Piquette et al., 1990; Nett, 1993b).

## **5 Estrální cyklus**

Klisny jsou sezonně polyestrické, sexuálně aktivní pouze během jarních a letních měsíců. Toto období se označuje jako připouštěcí sezona a sezona, kdy se nepřipouští, je označena jako anestrická. V průměru trvá připouštěcí sezona od koonce února do srpna na severní polokouli a od září do února na jižní polokouli (8 až 12 cyklů). Plemenná příslušnost klisny má na říji velký vliv, ale samozřejmě existují individuální varianty. Poníci a velká těžká plemena, tzv. chladnokrevné typy, mají sklon mít připouštěcí období kratší, než více krevnaté typy, např. plnokrevníci a lehčí jezdečtí koně (Morel, 2003).

U některých velmi dobře krmených klisen chovaných ve stáji, může trvat estrální cyklus až do ledna, a potom zase přejdou do anestru (Morel, 2003).

Estrální cyklus je zahájen v pubertě (ve věku 10-24 měsíců). Každý cyklus trvá v průměru 21 dní (v rozsahu 20-22 dní). Každý cyklus je ukázkou fyziologických a behaviorálních jevů pod hormonální kontrolou a je dělen do dvou period: 1. estrus (folikulární fáze), kdy jsou klisny sexuálně vnímavé, ten trvá 4-5 dní a 2. diestrus (luteální fáze), kdy klisna odmítá sexuální pokusy hřebců o sblížení, ten trvá 16 dní (Davies Morel, 2003). Přesný čas těchto period se značně liší u individuálních klisen, s ročním obdobím a věkem, má tendenci být delší v přechodných obdobích během a mimo chovatelskou sezónu a u starších

klisen. Obecně jakákoli modifikace v délce cyklu je zapříčiněna spíše změnou v proestrální, estrální a metestrální fázi, než v diestru (Davies Morel, 2003).

Období diestru končí regresí žlutého tělíska, která nastává v důsledku působení  $\text{PGF}_{2\alpha}$  uvolněného z endometria u nebřezích klisen (Vernon et al., 1979). Během estru se zvyšuje koncentrace LH a koncentrace FSH se snižuje. Pochva se uvolňuje a krček se otevírá a tak je umožněno vstupu penisu při páření. Když vzroste sekrece děložních epiteliálních a poševních buněk, začne být krček vlhký, červený a rozšířený (Warszawsky et al., 1972).

V estrálním cyklu hraje významnou roli GnRH (Irvine et Alexander: 1993b). Existuje mnoho variant mezi jednotlivými klisnami v rozmezí a síle změn chování (Munro et al., 1979). Znamky říje jsou – povolnost, postoj jako při močení, nastavování a obracení vulvy, odhalení klitorisu (blýskání), zvednutý ocas, moč je jasně žlutá s charakteristickým pachem, akceptování pokusů hřebce o sblížení. Hladiny LH začínají stoupat několik dní před nástupem říje. Vrcholu by měly dosáhnout 24 hodin před ovulací (Whitmore et al.: 1973). Bylo zjištěno, že LH neřídí pouze konečný folikulární vývoj a neindikuje ovulaci, ale podílí se také na tvorbě CL, což možná vysvětluje, proč není dosaženo maximální koncentrace právě po ovulaci. LH klesá z maximální koncentrace na nízké hladiny při diestru během několika dnů po ovulaci (Pattison et al., 1972; Evans et al., 1979; Pantke et al., 1991; Alexander et Irvine, 1982, 1993; Irvine et Alexander, 1993a, 1994; Aurich et al., 1994).

V diestru roste produkce progesteronu. V časném diestru epitel v děloze proliferuje a tím se připravuje na implantaci embrya. Aktivují se epiteliální buňky a jsou během diestru viditelné jako vysoké a sloupcovité buňky. S nastupující říjí se stávají neaktivními a kvádrovitými (Ginther, 1992). Během diestru je děložní krček pevně uzavřen a tvoří pevné utěsnění proti proniknutí do dělohy. Jeho vzhled je bílý, pevný a suchý (Warszawsky et al., 1972).

Estrální cykly pokračují po celou dobu života klisny a ustanou pouze během anestrů. Klisna má estrální cyklus i během laktace, na rozdíl od jiných sezonně polyestrických zvířat, jako jsou např. ovce. Klisny jsou proto schopny být březí a zároveň kojit. Klisna ukazuje první estrus po porodu přibližně za 4-10 dní (Mathews et al., 1967; Allen, 1978; Ginther, 1992; Watson et al., 1994b).

## 5.1 Ovulace

Ovulace je komplexní proces zahrnující řadu dějů, které vedou k prasknutí dominantního folikulu (>30 mm) v ovulační jamce a vylití folikulární tekutiny, granulóznic buněk a kumulo oocytárního komplexu. Ke spontánní ovulaci dochází v důsledku reakce



dominantního folikulu na zvýšení koncentrace LH. Při splnění normálních fyziologických podmínek lze poruchu ovulace přičíst nedostatečné hladině LH nebo nedostatečnému počtu LH receptorů. Ovulace může být vyvolána uměle nebo urychleně během přechodného nebo připouštěcího období vnějšími preparáty podobné LH (např. hCG) nebo preparáty uvolňující LH (jako např. GnRH). (Ginther, 1992; McKinnon et Voss, 1993; Samper, 2000; Threlfall, 1997)

Ovulace je charakterizována jako prasknutí folikulární stěny vyplývající ze snížení velikosti antrum a shromáždění folikulární tekutiny v burse vaječníku a okolí. Vyprázdnění folikulární tekutiny z dominantního folikulu je zlomový proces trvající 5 až 90 sekund, přibližně 15 % tekutiny zůstane v antrum. Po prasknutí folikulu se antrum zaplní krví, formuje se corpus hemorrhagicum (Pycock et al., 2007).

Charakteristiky dominantního folikulu spojené s blížící se ovulací zjištěné pomocí ultrazvuku jsou stejné, ať je ovulace spontánní, nebo navozena uměle (Pycock et al., 2007).

Samotná velikost folikulu je nejčastějším kritériem pro nejjednodušší odhad doby ovulace. Obvyklý průměr ovulačního folikulu je 40 – 45 mm u klisen jezdeckého typu (Quarter horse, Arab, teplokrevník), ale rozsah může být mnohem větší (30 – 70mm). Největší průměr folikulu může být zapříčiněn ročním obdobím (o 5 – 8 mm větší je na jaře, oproti létu a podzimu). Ovulace se objevuje průměrně 4,2 dny, od doby, kdy dominantní folikul dosáhne velikosti 35 mm (Ginther, 1992).

Pokud se zvažuje přirozené připouštění nebo umělé oplození čerstvým spermatem, stačí vyšetření k odhadu ovulace každý druhý den. Inseminaci je doporučováno provést 12 hodin před nebo po ovulaci, pokud je použito chlazené sperma, pokud je použito mražené, potom by se měla inseminace provést 6 hodin v průběhu ovulace. V tomto případě je potřeba zkrátit časový interval mezi vyšetřeními a zjistit co nejpřesněji dobu ovulace dalšími metodami (McKinnon and Voss, 1993; Samper, 2000, Threlfall, 1997).

Změny ve tvaru folikulu, echogenicitě folikulární stěny, endometriální echostruktury a senzitivitě klisny k ovarialní palpaci jsou další diagnostické pomůcky, které pomohou určit dobu ovulace v řádu hodin. Změny v endometriální echostruktury od relativně homogenní v průběhu diestru po heterogenní během estru lze přisoudit zvětšujícímu se otoku endometria jako následek vysokého poměru estrogeneru a progesteronu během estru. (Ginther, 1995; Rantanen et McKinnon, 1998). Délka estru trvá v průměru 5 – 7 dní, většina ovulací probíhá (69 – 78 %) během poslední 2 dní estru a 10 – 14 % proběhne až po konci estru (Ginther, 1992; McKinnon et Voss, 1993).

Zvětšení tloušťky folikulární stěny (tj. thekální vrstva, basální lamina, granulová vrstva), které předchází ovulaci, je využíváno jako indikátor blížící se ovulace. (Pycock et al., 2007).

### **Vývoj žlutého tělíska**

Na rozdíl od žlutého tělíska u jiných domácích zvířat, je koňská luteální žláza obsažena v ovariální tkáni. Nově formující se tělísko může být vidět na jamce při zběžné kontrole, ačkoli nevyčnívá přímo z vaječníku. Digitální hodnocení žlutého tělíska je v tomto případě obtížné a velmi subjektivní. Objektívni hodnocení luteální žlázy lze však provést pomocí ultrasonografu. Paralelně s ovulací a po ní podstupují granulózní buňky biochemické a morfologické změny, kterým se říká luteinizace. Luteinizace zahrnuje pro zjednodušení morfologický vývoj od estrogen vylučujících granulózních buněk, až po progesteron vylučující luteální buňky ve spojení s novovaskularizací. Výsledkem ovulace dominantního folikulu je primární žluté tělísko při primární folikulární vlně blízko konci estru, kdy převládá estrogen, zatímco sekundární žluté tělísko se tvoří při ovulaci dominantního folikulu v sekundární vlně během diestru nebo březosti, kdy převládá progesteron. Primární a sekundární žluté tělísko, které se vyvíjejí v dutině s tekutinou, jsou označovány jako corpus hemorrhagicum. Další žlutá tělíska vycházejí z luteinizace neovulujících folikulů během časně březosti. Sekundární a další žlutá tělíska jsou označena jako doplňující žlutá tělíska. Regresní luteální žláza, bez ohledu na její původ, je označována jako corpus albicans. Prodloužená a zkrácená luteální funkce souvisí se stavem dělohy. (Ginther, 1992; McKinnon and Voss, 1993; Threlfall, 1997; Ginther, 1990).

## **6 Embryogeneze**

### **Oocyt a časná stádia rýhování embrya, den 0 (ovulace) až po šestý den**

V této fázi vývoje zůstává embryo ve vejcovodu, a proto je nemožné ho chirurgicky vyjmout (Betteridge et Mitchell, 1975). Tento poznatek je limitující pro studium rýhování *in vivo* a může mít podíl na tom, že normální *in vitro* oplození (IVF) zahrnující ICSI a transfer somatických buněčných jader (SCNT) zůstává u koní velmi neúspěšné (Galli et al., 2007).

V průběhu 24 hodin po oplození má zárodek 2 buňky, mezi 24 – 48 hodinami má 4 buňky a dochází k počáteční aktivaci embryonálního genomu (Betteridge, 2011).

Úspěšnost oplození přirozeným způsobem je vysoká, může dosáhnout 90%. Šest hodin po ovulaci jsou oocyty stále obklopeny kumulárními buňkami a nemůžou být prozkoumány znaky oplození (Ball et al., 1989).

U raných zygot a oocytů v MII fázi před a během ovulace je markantní nesymetrické rozdělení organel a inkluzí (Betteridge, 2007). Na počátku dělení zygoty vznikají „tmavé“ a „světlé“ blastomery. Segregace vnitřní buněčné hmoty u koní z trofoblastu v době formování blastocysty je mnohem pomalejší a rozdílný, než u přežvýkavců a prasat. Vnitřní buňky zůstávají u koní více rozptýlené, než u výše uvedených zvířat a zaplňují více prostoru v ohraničených buňkách trofoblastu. Díky tomu je u koní mnohem obtížnější rozlišit mezi morulou a ranými blastocystami, než u jiných hospodářských zvířat. Embryo přechází do dělohy zhruba šestý den (Betteridge, 2011).

K buněčnému dělení, diferenciaci a doprovodných změn funkcí je zapotřebí adenosintrifosfát (ATP) a prekurzory pro syntézu makromolekul. Celková jaderná DNA se zvyšuje stonásobně i více, jak se equinní zygota vyvíjí v blastocystu. Studie u jiných druhů živočichů naznačují, že životaschopnost a zdraví embrya, plodu, novorozence i dospělého koně a dokonce i potomstva dospělého koně byla ovlivněna metabolickými interakcemi v době, kdy je morula nebo raná blastocysta připravena k přechodu do dělohy (Betteridge, 2011).

V průběhu čtvrtého buněčného cyklu, kdy se embryo vyvíjí z osmi na šestnáct buněk (72 hodin po oplození), se aktivuje embryonální genom (Grøndahl et Hyttel, 1996).

### **Blastocysta před dokončením žloutkového váčku**

V době, kdy embryo přechází do dělohy klisny přes uterotubální spoj asi 6 dní po ovulaci (Battut et al., 2001), kdy zóna pellucida ještě neexpandovala, má průměr přibližně 180  $\mu\text{m}$  a je v přeměně mezi morulou a blastocystou. V této době se embryo stává přístupné pro výplach dělohy pro embryotransfer a výzkum. Dochází k morfologickým a fyziologickým změnám uvnitř i vně diferenciovaných buněk trofoblastu (Stout, 2006).

Uvnitř se dutina blastocysty začíná zvětšovat, vnitřní buněčná masa (embryoblast) je lépe ohraničená a je lemován endodermálními buňkami. Tvorba endodermální stěny probíhá u koní jinak, než u přežvýkavců nebo prasat. U koní nejprve buňky endodermu (168 – 192 hodin po oplození) formují oddělené kolonie, které jsou jen sporadicky distribuované přes vnitřek trofoblastu. Ty pak rostou a splývají v jednu souvislou plochu (Enders et al., 1993).

Z vnější strany je kapsule, což je nebuněčná glykoproteinová vrstva podobná mucinu (Betteridge, 2007), která leží mezi trofoblastem a vnitřním povrchem zony pellucidy. Zřejmě první den v děloze se zona pellucida odloučí od vnější strany kapsule. Kapsule je strukturálně silná, nezbytná pro pokračování březosti, a také pravděpodobně významná pokračující ochranná funkce zony pellucidy. Buňky trofoblastu produkují kapsulární hmotu, ale pokud se jedná o metodu oplození *in vitro*, není tato hmota přeměněna v jasnou nebuněčnou membránu

jako je vidět *in vivo*. Detekovat kapsuli lze poprvé zjistit rektální ultrasonografií až devátý den, ale spolehlivěji až jedenáctý den, kdy je dokončen žloutkový váček (Tremoleda et al., 2003).

Posuzování metabolické aktivity embryí ve fázích možných k přenosu, může mít přímou souvislost s přenosem embryí u koní, kdy měřený příjem kyslíku může mít vztah k životaschopnosti embrya (Lopes et al., 2007). Koňská embrya jsou pro výplach a transfer vhodná do osmého dne, převážně kvůli náchylnosti větších embryí k mechanickému poškození (Wilsher et al., 2010).

Některé vlastnosti embryonálního vývoje u koní jsou v popředí zájmů studia a mohou poskytnout informace k obtížné reprodukci *in vitro*. Mezi ně patří výrazná polarita oocytů a raného embrya, membrány, které jsou na vnější straně zony pellucidy, způsob, jakým se začne vnitřní buněčná hmota dělit a přechod embryí přes vejcovod, zatímco neoplozené oocyty jsou zde zadrženy (Betteridge, 2011).

## **7 *In vitro* produkce embryí u klisen**

Začátek asistované reprodukce je datován v 19. století, kdy byla provedena první umělá inseminace (Heape, 1989). Kromě umělé inseminace je u klisen hojně využíván i embryotransfer. Produkce embryí zahrnuje několik různých technik.

1. Transfer oocytů (OT)
2. Intracytoplazmická injekce spermií (ICSI)
3. Fertilizace *in vitro* (IVF)
4. Transfer jader somatických buněk nebo klonování (Gambini et al., 2012).

### **7.1 Získání oocytů**

Oocyty mohou být vyjmuty z vaječníků po smrti klisny, z nezralých folikulů, nebo ze stimulovaných předovulárních folikulů u živé klisny. Dozrávání nezralých oocytů *in vitro* poskytne přibližně 60% dozralých oocytů. Získané oocyty se musí nechat dozrát do stádia MII. Standardní *in vitro* oplození u koní stále není opakovatelné, oplození je prováděno vstříknutím spermií přímo do oocytu. (ICSI – intracytoplasmic sperm injection). Kultivace embrya vyžaduje médium s vysokým obsahem glukózy, přinejmenším během vývoje blastocysty. Množství vyvíjejících se blastocyst (25-35%) může být získáno podobně pro všechny dobytek. Množství zabřeznutí po transferu *in vitro* vyprodukovaných blastocyst je podobné jako pro embrya získaná *ex vivo* (Hinrichs, 2010a).

### 7.1.1 Z živých klisen

Pro aspiraci folikulů je používáno několik metod jako je laparotomie přes slabinu, transkutánní punkce přes slabinu, nebo TUGA (transvaginální aspirace pomocí ultrazvuku). TUGA má jednu výhodu a to, že je neinvazivní (Hinrichs, 2010a).

#### Laparotomie přes slabinu

Pro laparotomii skrz slabinu jsou klisny mírně sedovány a na straně, kde je paralumbální jamka je proveden řez a místo je připraveno pro sterilní operaci. Lokální anestezie (40-80 ml) je podána do kraniální oblasti předpokládaného řezu ve středu paralumbální jamky. Kůže a podkoží je vertikálně naříznuto, vnější a vnitřní šikmý břišní sval jsou od sebe odděleny podél jejich směru. Vaječníky jsou manipulovány *per rectum* a jsou pootočeny o 180° kraniomediálním směrem a skrz břišní stěnu je zaveden katetr (Köllmann et al., 2011; Haag et al., 2013).

#### TUGA

Aspirace oocytů (ovum pick up – OPU) je prováděno pomocí transvaginální sondy. Transvaginální aspirace oocytů pod ultrazvukem (TUGA) je neinvazivní metoda pro sběr oocytů. Nezralé oocyty odsáty pomocí TUGA se musí nechat dozrát *in vitro*. Očekávané procento uzrálých oocytů je přibližně 60% (Bøgh et al., 2002; Colleoni et al., 2007; Jacobson et al., 2010).

Získání oocytů z klisny bylo nejprve aplikováno na preovulační folikul za použití různých postupů včetně laparotomie v celkové anestezii, colpotomie a aspirace s použitím dlouhé jehly vsunuté přes slabinu do paralumbální jamky. Tyto přístupy byly invazivní a jejich efektivita byla omezená. Nejpraktičtější, méně invazivní, efektivní, a opakovatelná technika, která je dnes používána, je ultrazvukové transvaginální odsávání folikulů pomocí dvojité 12-ga jehly (Carnevale et al., 2005). Oocyty mohou být sbírány z předovulačního folikulu, který měří nejméně 35 mm v průměru po 24 hodinách po injekčním podání hCG společně s tím, pokud dárkyně vykazují příznaky děložního edému. Ovulace po podání hCG obvykle trvá 36 až 40 hodin. Proto u oocytů sbíraných po 24 hodin nebo později pokračuje meióza, mají expandovaný cumulus, který usnadňuje jejich získání, na druhou stranu vyžadují 16 hodin dodatečného kultivace, než jsou inseminovány. Po získání z dárkyň a několika hodin kultivace, aby došlo k dokončení zrání, mohou být oocyty chirurgicky přeneseny k inseminaci příjemkyň (Carnevale et al., 2004a), nebo mohou být podrobeny intracytoplazmatické injekci spermií (ICSI) a znovu chirurgicky přeneseny do vejcovodu příjemkyně, nebo kultivovány *in vitro* až do stádia blastocysty a nakonec přeneseny nechirurgicky. Úspěšnost zabřeznutí

chirurgickým transferem oocytů do vejcovodu k oplodnění *in vivo*, nebo krátce po ICSI, je okolo 40% (Carnevale et al., 2004). Existuje limit pro počet *in vivo* uzrálých vajíček, i přes jejich vysoké kvality, které mohou být získány z dárkyně v průběhu roku, jelikož při každém cyklu a pouze v období rozmnožování, je přítomen pouze jeden předovulační folikul. Během OPU jsou odsávány všechny folikuly, které mají alespoň 1 cm, rovněž v období, kdy se nepřipouští, čímž se zvyšuje počet oocytů, které mohou být získány od dárkyně. Vzhledem k velkým rozměrům folikulů a silnému upevnění kumulárního komplexu oocytů k folikulární stěně, je nutné použít dvojité jehly, které umožňují opakované vyplachování, a to 8 až 10 krát pro každý folikul (Galli et al., 2014).

Klisny – dárkyně jsou zklidněny kombinací butorphanolu (0, 01 mg/kg) a mlazinu (0, 33 mg/kg). Také může být podán 0, 04 mg/kg propanthelin bromidu pro lepší uvolnění recta. Během TUGA je sonda chráněna plastovým obalem s jehlou k propíchnutí folikulární stěny. Po aspiraci je odebrána tekutina a dána do Petriho misky, kde se hledá COC, cumulo-oocytární komplex (Alvarenga et da Cruz Landim Alvarenga, 2000).

Míra úspěšnosti používající tyto procedury u krav je vysoká (přibližně 60 %) a folikuly mohou být odsávány každé 3-4 dny bez redukce počtu folikulů. Bohužel míra úspěšnosti odsávání nezralých folikulů klisen je nízká - pod 30 % (Brück et al., 1992; Cook et al., 1993; Duchamp et al., 1995; Kanitz et al., 1995; Mari et al., 2005). Nízké procento úspěšnosti je přičítáno těsnějšímu a pevnějšímu spojení equinních oocytů ke stěně folikulu, ve srovnání s bovinním oocytem (Hawley et al., 1995). Míra úspěšnosti je vyšší u malých nezralých folikulů, než u větších, rozdíl je přisuzován menší ploše u menších folikulů, a tak vzrůstá šance, že se vypudí oocyt během odsávání (Kanitz et al., 1995; Bøgh et al., 2002).

Relativně vysoká úspěšnost aspirace z nezralých folikulů (od 43 % do 58 %) byla zaznamenána v některých laboratořích provádějících odsávání technikou, která zahrnuje flushing (vypláchnutí) každého folikulu osmkrát (Meintjes et al., 1995; Bøgh et al., 2002; Colleoni et al., 2007; Jacobson et al., 2010) pomocí odsávací jehly s dvojitou stěnou a s oddělenými vtékajícími a odtékajícími kanálky. Ve studii Colleoni et al. (2007) uvádí, že číslo odsátých folikulů bylo vysoké (průměrně 17 z klisny) a z toho vyplývá v průměru 10 nezralých oocytů odejmutých každé klisně každé odsávací období.

Problémem však zůstává interval mezi odsáváním folikulů u klisen. Odsávání folikulů na týdenní bázi zapříčiňuje pokles v počtu folikulů. Průměrný počet folikulů z vaječníku klesá z 8,7 na 4,7 folikulů na klisnu, pokud jsou klisny vystaveny odsávání folikulu jedenkrát každý týden v periodě 11 týdnů (Duchamp et al., 1995). Je možné, že folikuly jsou v této době mladé, ačkoli počet odebraných kompaktních kumulo-oocytárních komplexů byl vysoká.

Existuje možnost opakovaného odsávání folikulů u individuálních klisen i přes dlouhou periodu. Bøgh a jeho spolupracovníci (2003) provedli za více než 8 let opakovaně na čtyřech klisnách OPU. Průměrně bylo uděláno 19 aspirací za připouštěcí sezonu, což znamená, že bylo aspirováno 122 folikulů u každé klisny, počet získaných oocytů nebyl uveden. U klisen pokračoval normální estrální cyklus. Pouze u jedné klisny se při hodnocení odebraných vaječníků ukázalo, že měla abscesy na vaječniku. V další studii (Jacobson et al., 2010) byly zaznamenány výsledky OPU každých 14 dní během připouštěcí sezony. Klisny podstoupily 8 cyklů aspirace, každá měla v průměru 72 aspirovaných folikulů. Počet odsátých folikulů se za cyklus nezměnil (Jacobson et al., 2010), ani se nezměnil počet získaných oocytů (Hinrichs, 2010a).

V průběhu několika let byla provedena velká studie o posouzení vývojové kompetence nezralých oocytů získaných metodou OPU z obou experimentálních a komerčních dárců v rámci klinického programu OPU (Colleoni et al., 2007). Aby bylo zajištěno co největší množství získaných oocytů, sledovali se dárkyně pomocí ultrazvuku, pro zvolení nejvhodnější času pro OPU na základě přítomnosti dostatečného počtu folikulů (normálně  $\geq 8$ - 10 folikulů  $> 1$  cm) a nejlépe bez přítomnosti dominantního folikulu. Tato situace je zvláště výhodná v přechodném období (není dominantní folikul). Z těchto důvodů je průměrný počet odsátých folikulů a sesbíraných oocytů vyšší, než u většiny zveřejněných studií, i když množství získaných oocytů se stále zvyšuje se zkušenostmi a praxí (Galli et al., 2014).

Vývoj do stádia blastocysty probíhá plně *in vitro*. Výsledek je velmi variabilní vzhledem k extrémním rozdílům mezi samičími i samčími dárci a různým příčinám neplodnosti. Klisny mohou být podrobeny opakovanému sběru bez jakýchkoliv vedlejších účinků, pod sedací detomidinu, epidurální anestézií, aby se zabránilo kontrakci konečníku, a s katetrizací močového měchýře (Mari et al., 2005). Na konci procedury se klisně podávají antibiotika po dobu 3 dnů jako preventivní opatření. U jiných studií u pokusných mladých zvířat byly pevné, čtrnáctidenní plány (Jacobson et al., 2010). Nicméně u starých nebo neplodných dárců, kteří jsou zapsaní do klinického OPU programu, je obtížné stanovit pevný řád a dává se přednost přizpůsobení potřebám jednotlivých dárců (Galli et al., 2014).

### **Transkutánní punkce přes slabinu**

Získání dozrávajících oocytů z živých klisen z preovulačního folikulu se děje po stimulaci hCG nebo GnRH. Odsávání gonadotropinem stimulovaného dominantního preovulačního folikulu je obvykle používáno k získání oocytů pro transfer. Úspěšnost získání oocytů z těchto folikulů je vysoká, 65 až 80v% (Hinrichs et al. 1990; Carnevale et Ginther, 1995; Hinrichs et al., 1998; Carnevale et al., 2005). V těchto folikulech narůstá a

z folikulární stěny se uvolňuje kumulo-oocytární komplex v přípravě na ovulaci. Odsávání z předovulačního folikulu je výhodné z důvodu jeho velké velikosti (průměr >35 mm), může být jednoduše získán za použití jehly přes slabinu (Vogelsang et al., 1988; Hinrichs et al., 1998). Jako první použil techniku získání oocytů z živých klisen Palmer et al. (1987). Zatímco technik drží vaječník *per rectum*, je skrz slabinu zavedena jehla k preovulačnímu folikulu. Úspěšnost takto získaných oocytů je 63%. McKinnon et al. (1987) zaznamenali úspěšnost 71,4% při použití trokaru a větší jehly (9,8 mm). Podobnou studii udělali i Hinrichs et al. (1993) s úspěšností 73%. Protože léčba superovulace je u koní stále problematická, při každém cyklu je použitelný pouze jeden, nebo dva preovulační folikuly. Dokonce, i když je použita superstimulační léčba, velká část vaječníku (kvůli přítomnosti několikanásobných preovulačních oocytů) může způsobit ztížení odsátí folikulů, pokud jsou přítomné více, než jeden či dva folikuly (MacLellan et al., 2002).

### **7.1.2 Z jatečného materiálu**

Pro *in vitro* produkci embryí u koní mohou být oocyty získávány z vaječnicků z jatek. Oocyty mohou být efektivně získány otevřením folikulů skalpelem a seškrábnutí vrstvy buněčné tkáně folikulu pomocí kyrety, nebo rozřezáním (Hinrichs et DiGiorgio, 1991).

#### **Rozřezání vaječnicků**

Vaječnický získány chirurgicky jsou transportovány do laboratoře v 0,9% NaCl při pokojové teplotě. Vaječnický jsou vloženy do 5 % roztoku bovinního fetálního séra ve fyziologickém roztoku pufovaném fosfátem (PBS) a nakrájeny k získání COC (Hinrichs, 2010b).

Rozřezání vaječnicků poskytuje velké množství oocytů oproti odsávání. Pro účely této metody bylo získáno 61 vaječnicků a z každého vaječnicku se získalo průměrně 9, 5 oocytů (u aspirace bylo z 51 vaječnicků průměrně získáno 6, 8 oocytů). Rozřezání vaječnicků se provádí sterilním skalpelem (Wani et al., 1999).

#### **Kyretáž**

Vaječnický jsou transportovány do laboratoře při pokojové teplotě (26 – 34°C). Připojené orgány jsou odřezány a vaječnický jsou očištěny sterilní gázou. Všechny viditelné folikuly jsou otevřeny skalpelem a granulózní vrstva každého folikulu je vyškrábnuta 0,5 cm kyretou. Obsah kyrety jy vymyt do samostatných Petriho misek do média a pod mikroskopem je zkoumán COC (Choi et al., 2004a).

#### **Aspirace folikulů (odsávání)**



Metoda seškrabávání folikulů je časově náročná, tudíž může být aspirace v některých případech preferováno zvláště, pokud je přítomno málo vědeckých pracovníků na větší množství materiálu, ačkoliv množství získaných folikulů může být pouze poloviční než metodou seškrabávání. (Alm et al., 1997; Dell'Aquila et al., 2001). Aspirace může být provedena jehlou a injekční stříkačkou nebo jehlou připojenou k vakuové pumpě (Hinrichs, 2010a).

Vaječníky by měly být z klisny získány hned jak je po smrti možné a udržovat je v pokojové teplotě při přepravě do laboratoře. Schopnost produkovat embrya se snižuje přibližně do 6 hodin po smrti (Carnevale et al., 2004; Ribeiro et al., 2008).

Vaječníky se transportují do laboratoře v solném roztoku při 33 – 35°C do 4 hodin po porážce. Folikuly, které měly v průměru 5-30 mm byly získány seškrábnutím během aspirace pomocí 17- ga jehly a odsáním. Aspirace byla dokončena a pokračuje kultivace, která byla zahájena do 6 h po porážení klisny (Carnevale et al., 2004).

## 7.2 Klasifikace COC a oocytů

Při sesbírání folikulů může být morfologie cumulu popsána jako kompaktní (Cp), nebo expandovaný (Ex).

Koňské Cp oocyty pocházejí z živých folikulů, ale jsou do značné míry z folikulů nezralých, takže oocyty nejsou schopné uzrát *in vitro*. Jako Cp oocyty mohou být klasifikovány pouze oocyty mající obě pevné tkáně a kompaktní cumulus. Charakter tkáně je nejlépe vyhodnocován pohledem na okraj záhybu tkáně. Pevná tkáň ukazuje těsné, čisté linie na okraji (Hinrichs, 2010a).

Ex oocyty pocházejí z atretických folikulů, které však mají vysokou meiotickou schopnost (Hinrichs et Williams, 1997). Jakékoli nepatrné otoky na cumulu nebo tkáni se klasifikují jako Ex. Oocyty samotné se mohou jevit jako zdeformované při zkoumání malého množství; nicméně zkoumání vyššího množství je potřeba při určení, jestli je okraj opravdu zdeformovaný výsledkem degenerace, nebo zdali zjevná nesprávnost je kvůli oddělení světlých a tmavých částí cytoplasmy. Taková heterogenní cytoplasma je běžně viděna u Ex oocytů a je přiřazována k vysoké meiotické schopnosti (Hinrichs et Williams, 1997). Používání těchto metod k rozřídění setřených folikulů z jatečných tkání, je přibližně 60% získaných oocytů klasifikováno jako Ex, 30% jako Cp a 10% jako degenerujících. Stupeň úspěšnosti dozrávání *in vitro* je omezen barvením oocytů po dozrání nebo vypuzením prvního polárního tělíška. U Ex oocytů je to skoro 65% a u Cp oocytů 20% (Alm et Hinrichs, 1996; Hinrichs et Williams, 1997; Choi et al., 2004a; Hinrichs et al., 2005).

### 7.3 Zrání oocytů *in vitro*

Prvního úspěchu při zrání oocytů *in vitro* u koní dosáhli Fulka a Okolski (1981). *In vitro* zrání oocytů může být jednoduše uskutečněno kultivací nezralých oocytů. Nicméně rychlost jaderného zrání a získání cytoplasmatického zrání je ovlivňován mnoha parametry, jak je ukázáno u schopnosti formovat blastocystu *in vitro* po oplození. Ex oocyty mají významně vyšší schopnost zrání do metafáze II (MII), než Cp oocyty. Pro oocyty odebrané z jatečných vaječníků je důležitá doba, kterou oocyty stráví ve vaječniku předtím, než jsou získány, což ovlivní délku kultivace nezbytnou pro jaderná i cytoplasmatické zrání nebo schopnost rozvoje (Hinrichs et al. 2005). Oocyty odebrné z vaječníků ihned po porážce, vyžadují delší dobu kultivace a mají nižší vývojové schopnosti, než oocyty získané po odložení 5 až 9 hodin (Hinrichs et al. 2005). Pokud se zdrželo odebrání vaječníků před získáním oocytů, prokázal se vzrůst utváření blastocyst po IVF/IVM (*in vitro* fertilizace a maturace) taky u skotu (Blondin et al., 1997). Optimální doba zrání byla Ex oocytů 20 až 30 hodin a u Cp oocytů mezi 30 až 36 hodinami. Pokud oocyt jednou dozraje, neexistuje rozdíl ve schopnosti formovat blastocysty mezi Cp a Ex oocyty (Hinrichs et al., 2005). Jako dobrá pomůcka k rozvržení počátku zrání, je možné dát equinní oocyty na noc do jednoduchého média (Earles-Hanksovo médium), které je v pokojové teplotě a následně vložit do kultivačního média. Tento postup nemá žádný vliv na zrání nebo rozvoj blastocysty po ICSI (Choi et al., 2006). EH (Earles- Hanksovo) médium je mix 40% M 199 s Hankovou solí a 25 mM Hapes, 40% M199 s Earlovou solí a 20% teplotně deaktivovaného FBS - fetální bovinní sérum (Hinrichs et al., 2005).

Kultivační systém pro zrání oocytů se sestává z použití M199 s Earlovou solí, 10% fetálního bovinního séra a 5 mU/ml bovinního folikulostimulačního hormonu ve zvlhčené atmosféře 5% CO<sub>2</sub> ve vzduchu při 38,2°C. Ačkoli jiná média mohou při zrání oocytů také fungovat, nejvyšší zaznamenaná úroveň produkce blastocysty *in vitro* byla dosažena pomocí zrání oocytů v tomto médiu (Hinrichs et al., 2005; Choi et al., 2007; Ribeiro et al., 2008).

Zhodnocení oocytů po zrání *in vitro* vyžaduje odstranění cumulu, to je mnohem těžší u koní, než u ostatních druhů. K tomu se využívá opakované pipetování s menšími pipetami s menším průměrem. Hyaluronidáza pomáhá při zrání oocytů. Odstranění cumulu z nezralých oocytů napomůže pipetování v roztoku trypsinu/EDTA (EDTA je kyselina ethylendiaminotetraoctová) v bezkalciovém a bezmagneziovém mediu (Hinrichs, 2010a).

## 7.4 Oplození

S rozvojem ultrazvuku a jeho využití pro aspiraci folikulů, která umožňuje sbírání oocytů dozrálých *in vivo*, začal být zájem o standardizaci IVF. Bohužel tato metoda není v produkci hříbat příliš úspěšná. Jedním z problémů je problematické získání vaječnicků z jatek, obtížnost zrání oocytů *in vitro* a obtížná kapacitace spermií *in vitro*. Proto je u koní IVF velmi drahé a neefektivní (Hinrichs, 2005).

### 7.4.1 Příprava spermie

Čerstvé semeno se odebírá hřebci za použití uzavřené umělé vagíny (model Missouri) nebo oteřené umělé vagíny (Hannoverský typ). Ejakulát se musí posoudit, zjistit koncentrace a aktivita spermií. Následně se ejakulát ředí na  $80 \times 10^6$  spermií na  $\text{ml}^{-1}$  pomocí odstředěného mléka obohaceného glukózou. Semeno hřebce se pro účely *in vitro* produkce embryí zmrazí za použití odstředěného mléka s vaječným žloutkem. Před oplozením se pejetý se semenem rozmrazí při  $50^\circ\text{C}$  po dobu 42 sekund (Blanchard et al., 1998).

### 7.4.2 In vitro fertilizace bez ICSI

Během normálního oplození se jádro spermie dostane do oocytu skrz membránu a dvě gamety splynou. Proces splynutí gamet je zahrnutý i u *in vitro* oplození (IVF), při kterém se spojí dozrálý oocyt a kapacitovaná spermie. Ačkoli jsou techniky IVF u skotu a lidí úspěšné (Trounson, A. O. et al.:1994), úspěšnost IVF u koní je malá (Zhang et al., 1990; Palmer et al., 1990; Del Campo et al., 1990; Li et al., 1995; Grøndahl et al., 1995a; Dell'Aquila et al., 1996; Marcos et al., 1996). Hlavní překážkou u equinní IVF je nedostatek metod při kapacitaci spermií a penetrace do oocytu (Varner et al., 1987; Blue et al., 1989).

Standardní IVF nebylo u koní opakovaně úspěšné. Úspěšnějšího oplození může být dosaženo po úpravě spermií (McPartlin et al., 2009). U této metody však zatím nebyl prokázán úspěšný rozvoj embrya. Další práce v této oblasti může vyprodukovat efektivní metodu pro equinní IVF (Hinrichs, 2010a).

Úspěšnost tvorby dvou prvojader nebo rýhování byla podle Choi et al. (2002) 8, 7%, tj. 9/103 u normálně oplozených oocytů, kterým byla částečně odstraněna zona pellucida, současně však narostl počet polyspermií. Vyšších fertilizačních schopností bylo dosaženo s použitím Ex oocytů 17, 1%, tj. 6/35, zatímco při použití oocytů s Cp kumulem byla fertilizace nízká – 4, 4%, tj. 3/68. Embyonální růst však po kultivaci po IVF nenastal, což indikuje absence rýhování v každém z 93 inseminovaných oocytů (Dell'Aquila et al., 1997a).

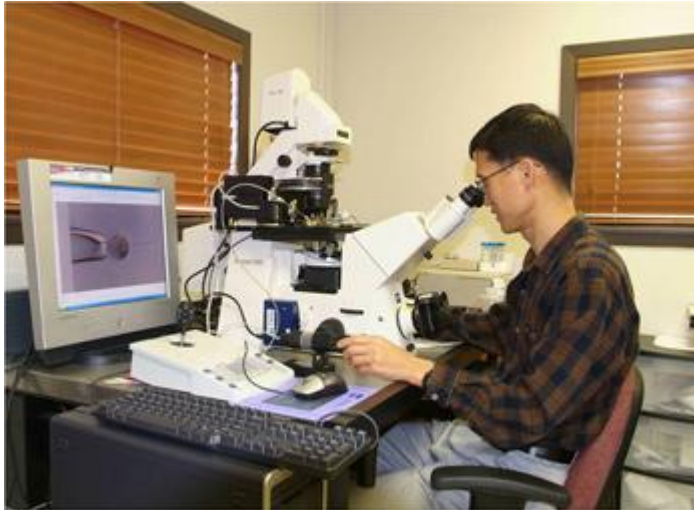
Použití ICSI u koní bylo stěžejní pro rozvoj technik asistované reprodukce vzhledem k obtížím provedení IVF jednoduchou společnou inkubací samičí a samičí gamety. Pouze dvě hříbata byla zaznamenána z IVF *in vivo* zralých oocytů (Bezard, 1992; Palmer et al., 1991).

### 7.4.3 In vitro fertilizace s ICSI

Klinické použití ICSI bylo vyvinuto před mnoha lety jako řešení v souvislosti s mužskou neplodností v lidské asistované reprodukci (Palermo et al., 1992). Technika nyní funguje tak účinně, že v mnoha klinikách je preferovaným způsobem oplodnění *in vitro* u člověka. Existují domněnky, že spermie mohou přenášet abnormality na potomstvo, protože se selekce spermií ve fyziologickém stavu nevyskytuje. Nicméně pokud je analýza dat nastaven na věk, výskyt dvojčat, neplodnost a další faktory související s pacientem, nepředstavují potomci po ICSI větší výskyt abnormalit, než normální potomstvo (Palermo et al., 2012; Palermo et al., 2008).

Technika intracytoplasmatické injekce spermie (ICSI) byla představena Hiramotem (1962), který ji prováděl na oocytech mořských ježků, která ale nikdy nedosáhla vzniku prvojádra. Graham (1966) a Brun (1974) popsali vývoj prvojádra u žab (*Xenopus laevis*). Uehara a Yanagimachi (1976; 1977) studovali interakci gamet v oocytech křečků a zaznamenali, že spermatické buňky mnoha druhů mohou formovat prvojádro po mikrochirurgickém zavedení do zralé křeččí ooplazmy.

Metoda ICSI je prováděna pod inverzním mikroskopem, který obsahuje mikromanipulátor, který se ovládá joystickem. ICSI se provádí pomocí přidržující a injekční pipety, které jsou vyrobené z 30 $\mu$ l borosilikátové skleněné kapiláry. Přidržující pipeta má vnější průměr 80  $\mu$ m (120 – 140  $\mu$ m) a vnitřní průměr 20 - 30  $\mu$ m. Pipeta s injekcí má vnitřní průměr 5 – 7  $\mu$ m a vnější 7 – 10  $\mu$ m. Obě pipety jsou ohnuty do úhlu 40 až 45°, aby se usnadnila manipulace v Petriho misce. Spermie je znehybněna a nasáta bičíkem napřed do injekční pipety. Oocytu je znemožněn pohyb pomocí přidržující pipety. Nejprve je oocyt natočen tak, že jeho pólové tělíčko je v pozici 6 hodin a doprostřed oocytu je vpravena spermie v pozici 3 hodiny (Dell'Aquila, 1997).



Zdroj: <http://vetmed.tamu.edu/equine-embryo-laboratory/clinical-services/icsi>

Z důvodu přímého vpravení spermie do oocyty je potřeba uměle provést kapacitaci spermie, která jinak normálně proběhne při standardním oplození. Pro kapacitaci spermií se u různých druhů zvířat využívá heparin, který má však u koní nízké, nebo žádné účinky (Hinrichs, 2010a). Del Campo et al. (1990) ve své práci zaznamenal podobné výsledky při použití Percollova gradientu a kofeinu. Nejlepší výsledky pro kapacitaci spermií má použití calcium ionoforu (Del Campo et al., 1990).

Po kapacitaci spermií je potřeba spermii znehybnit pro nasátí do injekční jehly. K znehybnění se používá několik pulzů jehly do bičíku, nebo se spermie znehybní vložením do polyvinylpyrrolidonu. Polyvinylpyrrolidon (PVP) byl úspěšně použit při intracytoplasmatické injekci spermie (ICSI) pro zvýšení viskozity roztoku spermií, což usnadňuje manipulaci a imobilizaci spermií. Před ICSI jsou spermie nejprve dány do média obsahující PVP, kde je jedna spermie vybrána a injikována do oocyty společně s malým množstvím média (Hlinka et al, 1998).

V poslední době bylo zjištěno, že vystavení spermií PVP způsobuje mikroskopické změny ve struktuře spermií. Jádro spermie může být poškozeno a to jak z hlediska tvaru, tak i ve struktuře chromatinu. Poničení jádra vyvolaného PVP může být kvůli rozpadu spermatických membrán (Strehler et al., 1998). Kromě toho Dorzortsev et al. (1995) podotkl, že PVP oddálilo nástup kmitů vápníku a dekonenzaci spermie v oocyty. V důsledku toho může vystavení spermie PVP zastavit vývoj embrya. Protože je PVP velký polymer, nemůže difundovat ven z oocyty, ani nemůže stráven lysozomálními enzymy (Jean et al., 2001). Buňky, které jsou v kontaktu s PVP, zvyšují sekreci mukózy (Kepes et al., 1993). Kromě toho se předpokládá, že chromozomální abnormality u embryí po ICSI může být zapříčiněno PVP během ICSI (Feichtinger et al., 1995).

Na druhou stranu bylo zjištěno, že PVP ovlivňuje akrozomální reakci spermie a zlepšuje fertilizační schopnost po ICSI. Podle experimentů lze říci, že velmi záleží i na výrobci PVP a potenciálním zdroji kontaminace, zda bude mít PVP pozitivní nebo negativní efekt na vývoj embrya (Kato et al., 2009).

Palermo et al. (1992) zaznamenal úspěšné oplození metodou ICSI u *in vivo* uzrálých oocytů. Od té doby se ICSI v humánní medicíně úspěšně používá pro překonání různých typů mužské neplodnosti (Van Steirteghem et al., 1993a; Van Steirteghem et al., 1993b; Nagy et al., 1994; Tesarik et Sousa, 1995a; Tesarik et Sousa, 1995b). Nicméně pro domestikovaná zvířata má dosud ICSI omezený úspěch (Dell'Aquila et al., 1997a).

Zatímco oplodnění a časný embryonální vývoj byl uskutečněn za použití standardních mikromanipulačních technik pro ICSI, úspěšnost vývoje blastocysty *in vitro* je zřejmě spojená s použitím Piezo jehly k provedení injekce spermie (Hinrichs et al., 2005; Galli et al., 2007). Jehla může fungovat při zajištění toho, že membrána oocytu je před injekcí narušena. Po injekci spermií není potřebné žádné ošetření zvenčí (Choi et al., 2006a).

Dvě stě  $\mu\text{l}$  semene bylo dáno do 5 ml zkumavky obsahující 1 ml Tyrodova albuminu modifikovaného laktátem a pyruvátém (TALP), (Parrish et al., 1988) a inkubováno v atmosféře 5 %  $\text{CO}_2$ . Po dvaceti minutách bylo odebráno 0,6 ml média a centrifugováno při 327 g po 3 minuty v 1,7 ml polypropylenové zkumavce. Spermie byly znovu rozptýlené a jednou vymyty ve stejném médiu a supernatant na povrchu byl odebrán a spermie použity pro ICSI. Před injekcí spermie se vložil 1  $\mu\text{l}$  suspenze se spermií do 3  $\mu\text{l}$  sp-TALP obsahující 10 % polyvinylpyrrolidonu v oleji. (Choi et al., 2002).

Injekce spermie je realizována v oddělené 50  $\mu\text{l}$  kapce Hepes pufru TCM-199 obsahujícím 10% FBS (fetální bovinní sérum). TCM-199 je tkáňové kultivační médium a používá se jako základní kultivační médium (Li et al., 2002). Všechny manipulace jsou prováděny v pokojové teplotě (Choi et al., 2002).

Injekce spermie byla provedená Grøndhalem et al. (1997) pod inverzním mikroskopem. Dva mikrolitry spermatické suspenze byly přidány do 10  $\mu\text{l}$  kapky Sperm-prep (přípravné médium) doplněné polyvinylpyrrolidonem, která byla umístěna centrálně v Petriho misce o průměru 5 cm. Potom byly 2 nebo 3 obnažené oocyty vloženy do každé z devíti 5  $\mu\text{l}$  kapek EBSS (Earlův solný roztok) a 1% HSA (lidský sérový albumin) pod minerálním olejem, které byly dány na kraj Petriho misky. Byla izolována samotná buňka spermie schopná pohybu, bičík byl traumatizován mezi kultivační miskou a jehlou a spermie byla nasána spolu s bičíkem do injekční pipety. Potom byla jehla vsunuta do ooplasmu do pozice „tři hodiny“ s polárním tělískem v pozici „12 hodin“, bylo navozeno vakuum za účelem

prasknutí oolemy a odsátá část ooplazmy do injekční pipety. Následně byly aspirovaná ooplasma a spermatozoon umístěné do ooplazmy s minimálním objemem média. Deset oocytů bylo fíngovaně injektováno vsunutím prázdné pipety a byla porušena oolema. Všechny injektované oocyty byly pozorovány 5 minut za účelem odhadnutí, jestli jsou oocyty schopné ustát stres z injekce a obnovit jejich kulovitý nebo vejčitý tvar (Grøndhal et al., 1997).

První hříbě, narozené z *in vitro* uzrálého oocytu oplodněného ICSI, uvedl Squires, et al. (1996). Tento úspěch byl následován obdobím proměnlivých výsledků až do vývoje ICSI pomocí piezo vrtáku, které odstranilo většinu nekonzistentnost technik v důsledku heterogenní a tlusté zony pellucidy, kterou je obtížné proniknout s konvenčními ICSI pipetami, zejména *in vitro* zralých oocytů. Kromě toho další výhodou ICSI je ta, že ve srovnání s IVF je možnost rozšířit výběr hřebců, kteří mají být použiti, včetně těch, kteří mají špatnou pohyblivost spermií a nižší reprodukční schopnosti *in vivo*, což je hlavním důvodem, proč byla ICSI vyvinuta. V původní studii srovnával Lazzari, et al. (2002) vývojový potenciál *in vitro* zralých oocytů oplodněných ICSI zmrazeným semenem různé motility. Nebyly nalezeny žádné rozdíly v rýhování nebo ve vývoji blastocysty mezi oocyty injektovanými spermii hřebců s dobrou, špatnou, nebo žádnou plodností, pokud byly spermie selektované pro ICSI schopné pohybu. Naproti tomu, pokud v době ICSI nebylo možné vybrat před injekcí živé spermie, neexistoval žádný vývoj do stádia blastocysty. V jiné studii (Choi et al., 2006) oocyty injektované nepohyblivou spermii izolovanou ze spermatu vystaveného dvěma cykly zmrazení a rozmrazení, vedly k vývoji blastocysty. V další studii použili ti samí autoři (Choi et al., 2011) lyofilizovanou spermii a aktivovali oocyt extraktem spermií pro získání potomstva.

K dnešnímu dni roste počet laboratoří, které hlásí narození hříbat po ICSI, a to jak z *in vivo*, tak *in vitro* zralých oocytů. V současné době se u koní začíná používat několik praktik pro klinickou léčbu neplodnosti. Některé skupiny zaznamenaly příležitostné narození hříbat po ICSI *in vitro* zralých oocytů buď po chirurgickém přenosu raných embryí do vejcovodu (Cochran et al., 1998), nebo *in vitro* kultivací embryí do stádia blastocysty a přenos děložním krčkem do dělohy (Li et al., 2001). Vývoj *in vitro* zrání a technologie ICSI zvyšuje úsilí rozvíjet vhodné kultivační systémy pro časný rýhování embryí (Galli et al., 2014).

Ve studii ICSI v laboratoři (Jacobson et al., 2010) bylo obnoveno 72 oocytů po 19 TUGA odsátých obdobích (3,8 oocytů/klisna/období). U těchto oocytů, 37 (51 %) došlo *in vitro* a 33% těchto folikulů se zformovalo v blastocystu po ICSI. To má za následek produkci 63% blastocyst za odsáté období. Naproti tomu, když bylo provedeno odsátí stimulovaných

předovulárních oocytů, maximum výše znovuoobnovení oocytů byla 0,8 % oocytů u klisny za období a vývoj blastocyst po ICSI bylo 41 %, podle odhadu 33 % vývoje blastocyst u klisny za odsátí (Jacobson et al., 2010). Je pozoruhodné, že vývoj blastocysty z předovulárního, *in vivo* uzralých oocytů nebylo významně vyšší, než u oocytů uzralých *in vitro*. Colleoni et al. (2007) odebrali z klisny z nezralých folikulů 10 oocytů pomocí TUGA, z nichž 66 % došlo *in vitro*. Po ICSI, 40/313 (13 %) injikovaných oocytů se zformovalo do blastocysty, to je 85 % úspěšnost formování blastocyst za odsáté období (Hinrichs, 2010a).

U práce Grøndhala et al. (1997) byly oocyty aspirovány z jatečných vaječníků a zrály *in vitro* po dobu 36 hodin při teplotě 38°C. ICSI byla provedena pomocí zmrazeného a znovu rozmrazeného spermatu hřebce poté, co byly kultivovány v médiu obsahujícím lidský sérový albumin. Oocyty po injekci spermie byly 1) kultivovány *in vitro* po dobu 10, 20, nebo 72 hodin; 2) převedeny do vejcovodu pseudopregnantních myší; nebo 3), přeneseny do synchronizované klisny po prvotní kultivaci *in vitro*. Transferované oocyty byly vyjmuty po 72 hodin a všechna tato vajíčka byla zafixována, obarvena a zpracována pro elektronový mikroskop. Tvorba prvojádra byla pozorována u 2 ze 12 předpokládaných zygot 10 h po injekci, kdy byly pozorovány kortikální granule v oblasti plazmatické membrány. Dvacet hodin po injekci, byla pozorována 2 prvojádra u 6 z 12 injektovaných oocytů (50% úspěšnost oplození). Míra rýhování *in vitro* byla 16 % po 72 hodinách kultivace a nejvyvinutější embryo mělo 6 až 8 buněk. Míra rýhování *in vivo* byla velmi nízká, jelikož pouze jedno z deseti embryí se rýhovalo do fáze 2 buněk. Metoda ICSI equinních oocytů měla za následek oplození, tvorbu prvojádra a uvolňování kortikálních granulí. Nicméně mezi úspěšností oplození a aktivací oocytů nebyla paralela s rýhováním zygoty (Grøndhal et al., 1997).

Oocyty podrobeny ICSI podle Dell'Aquila et al. (1996) byly kompletně obnaženy pomocí 80 IU/ml hyaluronidázy. Procento rýhovaných oocytů a vývoje dvou prvojader bylo 29,8 %, tj. 17/57, vyšších fertilizačních schopností bylo dosaženo použitím Ex oocytů 52,2%, tj. 12/23, zatímco při použití oocytů s Cp cumulem byla fertilizace nízká – 14,7 %, tj. 5/34. Po ICSI se 7 z 55 oocytů rýhovalo, z nichž 5 bylo expandovaných, a z těchto pěti byly dva ve stádiu 16 buněk a další byly v osmi-, tří- a dvou-buněčném stádiu. Zbylé dva injikované oocyty pocházející z Cp oocytů dosáhly 4- a 8- buněčného stádia (Dell'Aquila et al., 1997a).

U studie od Choi et al. (2004b) byly použity pouze Ex oocyty, které byly získány z jatečné tkáně. Z vaječníků bylo získáno 1014 Ex oocytů, které byly 24 hodin kultivovány v maturačním médiu. Z nich bylo během obnažení 25 porušeno. U 619 oocytů (63 %) byla zjištěna přítomnost polárního tělíska. Tyto oocyty byly podrobeny ICSI a 611 (99 %) byla úspěšně provedena injekce spermie. Z nich bylo ke studii použito 550 oocytů. Do klisen bylo



přeneseno 132 oocytů. Z klisen bylo následně vyjmuto 69 (52%) embryí. Z nich bylo 25 (36%) ve stádiu blastocysty. Třináct (19%) vyjmutých embryí bylo ve stádiu moruly. U oocytů kultivovaných *in vitro* v DMEM/F-12 (Dulbecco'vo modifikované Eagle médium: živný mix F-12) + 10% FBS (telecí plodové sérum) bylo po ICSI 5 (11%) ve stádiu moruly a 7 (15%) ve stádiu blastocysty a u oocytů kultivovaných v tom samém médiu s equinními epiteliálními explantáty bylo 7 (66%) ve stádiu moruly a 10 (16%) ve stádiu blastocysty.

Ve studii Grøndahla et al. (1997) bylo přeneseno 104 injikovaných oocytů (z toho 94 po injekci spermie a 10 fingovaně injektovaných oocytů) do kapek 750  $\mu$ l Menezo B2 média sestávajícího z 5 % FES. Oocyty byly kultivovány jako u normálních zrajících oocytů. Všechny oocyty byly kultivovány *in vitro* minimálně 10 hodin a následně byly podrobeny různým ošetřením. Deset oocytů bylo kultivováno po dobu 14-15 hodin *in vitro* po ICSI a následně bylo chirurgicky přeneseno do vaječníku klisny, u které byla navozena ovulace, jak bylo popsáno u Grøndahla et al. (1995a), tzn., že u klisen, které byly vybrány pomocí ultrazvuku na základě výskytu folikulu většího než 35 mm, byla navozena ovulace 24 hodin před přenosem pomocí injekce hCG. Celková anestezie byla navozena pomocí thiopenthemem a alcuronchloridem, a udržována byla halothanem obsaženým v kyslíku v polouzavřeném okruhu. Skrz řez slabinou byly oocyty přeneseny pomocí sterilního lidského embryonálního katetru do ampule vejcovodu. Sedmdesát dva hodin po transferu byla klisna usmrcena, její vejcovod byl vyjmut a několikrát vypláchnut 0,1 M Dulbeccovým fosfátovým pufrům obsahujícím 10 % FES (fetální equinní sérum) a oocyty byly odděleny pod stereo mikroskopem. Pravděpodobné zygoty byly kultivovány podle popisu výše a každých 24 hodin se jim vyměnilo médium za čerstvé. Byly pozorovány dvakrát denně pomocí inverzního mikroskopu za účelem zaznamenání času embryonálního dělení (Grøndhal et al., 1997).

Z celkového počtu 298 COC, které byly vybrány na normálním cumulu a ooplazmě a podrobily se zrání *in vitro* v šesti po sobě jdoucích experimentech, přežilo obnažení 256 oocytů. U celkem 132 (52 %) obnažených oocytů se objevilo polární tělíčko a neporušená oolema, to znamená, že se po zrání oocytů *in vitro* předpokládá jejich vývoj ve stádiu metafáze II (Grøndhal et al., 1997).

Další ICSI byla provedena na 108 oocytech v šesti po sobě jdoucích experimentech. Po injekci zůstalo 94 (87 %) životaschopných oocytů. U 14 (13 %) oocytů, které nepřežily, praskla nebo zkolabovala oolema při injekci, nebo se krátce po ní oocyt rozpadl. Deset fingovaně injektovaných oocytů (bez zanesení spermie) manipulaci přežilo (Grøndhal et al., 1997).

V experimentu, který provedl Galli et al. (2013) bylo použito 117, 78, 91 a 46 oocytů v metafázi II a podrobena injekci. Z první skupiny se rýhovalo 88 (75, 2%) oocytů, u druhé 49 (62, 8%) oocytů, u třetí 72 (79, 1%) oocytů a u poslední to byly 4 (8, 7%) oocyty. Z těchto skupin se u první do stádia moruly nebo blastocysty dostalo 42 (35, 9%) oocytů, u druhé 21 (26, 9%) oocytů, u třetí 33 (36, 3%) oocytů a u čtvrté 0 oocytů.

## 7.5 Kultivační systém vzniklých embryí

Po oplození metodou ICSI bylo pozorováno formování samčího a samičího prvojádra, které se objevuje 10 až 20 hodin po injekci. Toto načasování formování prvojádra je v souladu s pozorováním *in vivo* a *in vitro* (Grøndahl et al., 1995a; Hinrichs et al., 1995; Enders et al., 1987), ačkoli pozorovaný čas zahájení rýhování byl poněkud opožděný oproti tomu, co bylo pozorováno *in vivo* (Bezard et al., 1989; Betteridge et al., 1982; Grøndahl et al., 1993).

Proces aktivace oocytů zahrnuje několik probíhajících dějů po splynutí: znovuzahájení meiózy, vylití kortikálních granulí a transformace z jader spermie a oocytu k samčímu a samičímu prvojádru, což vede k rýhování (Yanagimachi, 1994). Mechanismus aktivace oocytů *in vivo* ani *in vitro* zatím ještě není plně známý. Nicméně se ví, že vzrůst koncentrace intracelulárního volného vápníku ( $\text{Ca}^{2+}$ ) je nezbytný pro aktivaci oocytu. V humánních oocytech injekce spermie spouští aktivaci oocytů a vede k rýhování (Van Steirteghem et al., 1993a; Van Steirteghem et al., 1993b; Nagy et al., 1994; Tesarik, 1996). Mechanismus, kterým jsou oocyty po ICSI aktivovány, není úplně známý. Jsou navrhovány dvě alternativní možnosti: buď je spuštěna aktivace oocytů mechanicky pomocí jehly a oolema je porušena partenogenetickým mechanismem (Edwards et Van Steirteghem, 1993), nebo je iniciována faktory v buňce spermie (Swann, 1993; Tesarik et al., 1994). Překvapivě bylo zjištěno, že oba stupně oplození a rýhování mohou být vylepšeny dodatečnou aktivací buď s použitím vápníku regulujících preparátů (Tesarik et Sousa, 1995a), nebo zvýšením  $\text{Ca}^{2+}$  pomocí intenzivní injekční techniky. Nutnost další aktivace oocytů po injekci spermie je vysoce druhově specifická (Tesarik et Sousa, 1995b). Aktivace koňských oocytů byla zaznamenána Hinrichs and Schmidt (1995) za použití vápníkového ionoforu a dalších vápníkových přítok regulujících preparátů (calcium influx-regulating chemicals).

U equinní embryí je vidět vývoj blastocysty od 7. dnu kultivace. Tento vývoj zahrnuje mírné zvětšení a utváření organizované vnější vrstvy buněk, trofoblastu (Hinrichs et al., 2007). U koňských embryí *in vitro* nedochází k rozvoji blastocoelu s tenkou trofoblastovou vrstvou a utváření vnitřní buněčné hmoty, jak je tomu u embryí skotu. Do klisny příjemkyne

mohou být embrya přenesena, jakmile je vidět nějaký náznak vývoje blastocysty. Embrya se mohou začít vyvíjet do stádia blastocysty v jakémkoliv čase mezi 7. a 10. dnem kultivace. Nebyl zaznamenán žádný rozdíl v uskutečněné březosti nebo úspěšnosti narození živých hříbat v souvislosti se stářím embrya v době vývoje blastocysty (Hinrichs, 2010b).

Úspěšnost březosti po přenosu vyprodukovaných blastocyst *in vitro* je 70 až 80 %. Zatímco nedávné studie ukázaly sklon ve vývoji embryí pouze do stádia trofoblastu (Hinrichs et al. 2007), následující studie získala 13 březostí po přenosu 17 embryí (76 %) s 12 nebo 13 březostmi vyvíjejícími se normálně (plodu bilo srdce). Jedním z důvodů zdokonalení životaschopnosti embryí může být souvislost se zajištěním konsistentních kultivačních podmínek (Hinrichs, 2010b).

Interval mezi ovulací a transferem oocytů musí být mezi 36 a 44 hodinami. Většina oocytů odebraná 24 hodin po injekci hCG je v metafázi I a vyžaduje další čas pro kompletní dozrání (Carnevale et al., 2005).

Po sběru a roztřídění jsou oocyty přeneseny do kultivačního média TCM-199, což je fetální telecí sérum a 0,2 mM pyruvátu, a pak jsou inkubovány při 38,5 až 39 °C v atmosféře s 5-6% CO<sub>2</sub> po 12 – 18 hodin před transferem. Většina oocytů by měla být po 36 hodinách po aplikaci hCG v metafázi II a mohou být přeneseny do vaječniku příjemkyně. (Carnevale et al., 2002).

O účinku specifických faktorů média na rozvoj equinních embryí *in vitro* nebylo evedeno mnoho prací. Dobrý rozvoj do 4 dnů (8-16 buněčných stádií) může být získán v rozmanitých médiích. Kultivační médium používána u jiných druhů, jako je G1/G2, nenapomáhá utvářet equinní blastocysty. G1 a G2 média jsou kultivační média používaná v humánní medicíně, jejichž základem je NaCl, KCl, laktát, pyruvát, HSA (lidský sérový albumin) a NaHCO<sub>3</sub> (Choi et al. 2003a,b; 2004a,b). Dobré úspěšnosti při tvorbě blastocyst (25 až 35% injikovaných oocytů) bylo dosaženo použitím kultivace embryí v DMEM/F-12 médiu (Dulbeccovo modifikované Eagle medium: živný mix F-12) s 10% fetálním bovinním sérem, ve výši 1 µl média pro embryo, v namixované plyné atmosféře z 5% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> a 90% N<sub>2</sub> při 38,2°C (Hinrichs et al., 2005). Třebaže specifické faktory v DMEM/F-12, které podporují vývoj equinní blastocysty nebyly prozkoumány, toto médium obsahuje 17mM glukózu. Lepší vývoj equinních embryí do stádia moruly a blastocysty byl dosažen v modifikované SOF (syntetická oviductální tekutina) doplněné 19 mM glukózy, než v tom samém médiu se 1,5 mM glukózy (Herrera et al., 2008). Produkce equinní blastocysty může být získána zahájením kultivace v modifikovaném SOF a dále přenosem do DMEM/F-12 přibližně pátý den (Hinrichs, 2010a).

Kumulární-oocytární komplexy a granulující ooplazma zrály *in vitro* podle metody, kterou popsal Grøndahl et al. (1995b), která sestává z TCM 199 obsahující 2,92 mM calcium-laktát, 2 mM sodium-pyruvát, 25 mM bikarbonát sodný, 2,5 µg/ml fungizone a 50 µg/ml gentamycinu; 1,0 µg/ml estradiol-17β; 5,0 µg/ml koňského hypofyzárního LH, 1,0 µg/ml prasečího hypofyzárního FSH; a 10% fetální equinní sérum. Bylo kultivováno 5 - 8 oocytů ve skupině v 750 µl kapkách média ve čtyřmiskové destičce po 36 hodin při 38,0°C ve zvlhčené atmosféře s 5% CO<sub>2</sub> ve stacionárním Henning Knudsen CO<sub>2</sub> inkubátoru. Na konci kultivační doby bylo vyjmuto okolí expandovaného cumulu, který je ponořen po 30 sekund do 2% hyaluronidázy v HEPES-buffered Sperm-prep médiu doplněném 1% lidským albuminovým sérem (HSA). Pomocí dvou skleněných pipet s rozdílným průměrem se oddělí zona od kumulárních buněk. Obnažený oocyt byl posouzen na přítomnost polárního tělíska v inverzním mikroskopu (Grøndahl et al., 1997).

Bylo zaznamenáno mnoho různých kultivačních podmínek pro preimplantační vývoj oplozených oocytů u koní pomocí ICSI, včetně stanovených médií jako jsou G1/2 (Choi et al., 2002), Dulbeccovo modifikované Eagle médium/živná směs F-12 a CZB, což je modifikované médium obsahující laktát nebo pyruvát, 0,1mM kyselinu ethylendiaminotetraoctovou, ale bez glukózy (Choi et al., 2004b) a synteticky upravená tekutina vejcovodu (Ritchie, 2006). Společná kultivace somatických buněk v dřívější práci byla vyhodnocena za použití Vero buněk (Dell'Aquila et al., 1997), ovidukálních epitelálních buněk (Battut et al., 1991), kumulárních buněk (Li et al., 2001), granulóznych buněk (Rosati et al., 2002), nebo kultivace v upraveném médiu (Choi et al., 2001). Nicméně ve většině z těchto systémů zůstávají množství získaných blastocyst nízké, v rozmezí od 4% do 16%, což je množství, které je srovnatelné s partenogenetickou aktivací (Lazzari, 2002). Srovnání mezi zveřejněnými zprávami o *in vivo* kultivaci ICSI raných embryí ve vejcovodu klisen (Choi et al., 2004b) nebo dočasných recipientních ovcí (Lazzari, 2002; Galli, 2002) a *in vitro* kultivací v různých kultivačních médiích jasně prokázal, že kultivace *in vivo* podporuje větší rozvoj blastocysty. V jiné studii *in vitro* poskytuje kultivační systém, založený na Dulbeccově modifikovaném Eagle médiu/živná směs F-12 v atmosféře se směsí plynů, vývoj blastocysty podobný jako je vidět *in vivo* (27% -38%) (Jacobson et al., 2010; Alm et al., 2008). Nicméně když odpovídá počet buněk sedmi denní blastocysty, *in vitro* produkovaná embrya, kultivovaná v modifikované syntetické tekutině vejcovodu, měla významně méně buněk a byla mnohem více podobná pěti denním *in vivo* embryím. Tento rozdíl je třeba brát v úvahu, když jsou *in vitro* produkovaná embryí přenesena za použití příjemkyň 5. den po ovulaci (Tremoleda et al., 2003).

Existuje nicméně výhoda mít embrya v raném vývojovém stádiu, protože dochází ke zlepšení jejich přežití při kryokonzervaci. Je známo, že *in vivo* získaná koňská embrya vypláchnutá z dělohy se nedají úspěšně zmrazit, vzhledem k jejich velikosti. Kryokonzervace *in vitro* produkovaných embryí ve fázi rané blastocysty nebo blastocysty, vede k velmi vysoké míře přežití po rozmrazení a množství zabřeznutí může přesáhnout 60% (Galli et al., 2007). Tato schopnost *in vitro* produkce embryí není popsána u jiných druhů hospodářských zvířat (Galli et al., 2014).

U studie Grøndahla et al. (1997) bylo kultivováno dvanáct oocytů podrobených ICSI po 10 hodin a následně zafixovány a dvanáct oocytů po ICSI bylo kultivováno po 20 hodin a následně zafixováno. Následně byla provedena analýza pomocí elektronového mikroskopu po 10 a 20 hodinách kultivace na 24 oocytech. Ze 12 zafixovaných oocytů se po 10 hodinách kultivace u 6 (50 %) oocytů objevila ekvatoriální rovina a 1 pólové tělísko, u 2 (17 %) 2 polární tělíska a 1 prvojádru a u 4 (33 %) byla nalezena degenerace. Z 12 oocytů zafixovaných po 20 hodinové kultivaci, se u 6 (50 %) objevila 2 prvojádru, u 2 (17 %) bylo pouze jedno prvojádru a u 4 (33 %) zdegenerovalo. Za zdegenerované oocyty byly považovány ty, které měly viditelně poškozenou oolemu nebo když byla ooplazma poškozena vakuoly.

Deset fiktivně injektovaných oocytů bylo zafixováno a zpracováno po 20 hodinách. Analýzou pomocí světelné mikroskopie bylo odhaleno, že 4 oocyty (40 %) zůstalo v metafázi II a 6 (60 %) zdegenerovalo. Žádné známky aktivace oocytů jako např. tvorba prvojádru, druhé polární tělísko, dělení nebo rýhování, nebylo u fiktivně injektované skupiny oocytů vidět (Grøndhal et al., 1997).

Ve skupině, která byla kultivována 10 hodin, u 6 oocytů (50 %) byla vidět ekvatoriální rovina a dělicí vřeténko. V cytoplazmě byly lokalizovány tukové kapénky, které dají ooplazmě polarizovaný vzhled. Početné kortikální granule byly pozorovány v těsné blízkosti oolemy. Injekce buňky spermie není identifikovatelná kvůli zředění. U dvou oocytů (17 %) se objevily 1 prvojádru a dvě pólová tělíska, ale nebyla nalezena žádná buňka spermie. U čtyř oocytů (33 %) se zjistila degenerace, zobrazily se početné vakuoly, porušené orgány a plazmatická membrána. Dvacet hodin po ICSI byla u šesti oocytů (50 %) objevena dvě prvojádru a dva oocyty (17 %) měly po jednom prvojádru. Čtyři oocyty (33 %) zdegenerovaly (Grøndhal et al., 1997).

U dalšího experimentu bylo první dělení pozorováno 36 hodin po ICSI. Jen u velmi málo oocytů (16 %) se objevilo rýhování a nejvyvinutějším stádiem po 72 hodinové kultivaci byla 6 až 8 buněčná embrya (Grøndhal et al., 1997).

Pět z deseti injektovaných oocytů (50 %), které byly chirurgicky přeneseny do vejcovodů klisny příjemkyně, bylo vyjmuto a z nich jeden (20 %) se jednou rýhoval. Zbylé čtyři oocyty měly kulovitý tvar ve stadiu jedné buňky s neporušenou oolemou (Grøndhal et al., 1997).

Výsledkem výzkumu je, že equinní oocyty uzralé *in vitro* mohou být oplozeny injekcí zamražené/rozmražené spermie a objeví se formování prvojádra. Pouze 13 % oocytů nepřežilo injekci spermie, což znamená, že koňské oocyty tolerují stres z mechanického vniknutí injekce se spermií do ooplazmy (Grøndhal et al., 1997).

Pozorovaný stupeň oplození (stupeň formování prvojádra 20 hodin po injekci) byl v této studii relativně velký (50 %) a to znamená, že equinní oocyty po zrání *in vitro* jsou schopny do určité míry projevit aktivaci po injekci spermie. Kortikální granule byly uvolněny, hlavička spermie a jádro oocytu byly pozorovány až po tvorbu prvojádra. Povrch jádra byl kulatý a v nukleoplazmě byly nalezeny husté vláknité NPB (nukleoplazmatické mosty). Takovéhle NPB tvary byly dříve spojovány s nepohyblivou rRNA syntézou u equinních oocytů (Grøndahl et al., 1995; Grøndahl et Hyttel, 1996). Pozorovaný stupeň rýhování (pohybuje se mezi 0 – 20 %) neodráží míru oplození (Grøngal et al, 1997).

Dell'Aquila et al. (1997a) zaznamenal míru oplození okolo 30 % po ICSI u *in vitro* uzralých oocytů. Ačkoli také zaznamenali nižší stupeň rýhování a to okolo 13 %. Tyto výsledky naznačují, že pouze injekce spermie zčásti iniciují fyziologickou kaskádu aktivace oocytů. Mechanické narušení oolemy u fingoaně injektovaných oocytů má zřejmě malý nebo žádný efekt na aktivaci oocytu (Grøndhal et al., 1997).

Na závěr injekce zmraženého spermatu do *in vitro* uzralých equinních oocytů vyústilo ve formování prvojádra a uvolněním kortikálních granulí. Aktivace oocytu nebyla zřejmě kompletní, ale po injekci spermie zřídka vyústila v rýhování (Grøndhal et al., 1997).

## Závěr

*In vitro* produkce embryí u koní se ve světě provádí pouze na několika specializovaných pracovištích. Vyžaduje velkou časovou náročnost, množství laboratorního materiálu pro sběr, kultivaci a přenos oocytů, vyškolené pracovníky a proto je zatím velmi drahá.

Oocyty se mohou získat z živých klisen, nebo vaječníků získaných z jatek. Procento získaných oocytů pomocí ovum pick up z živých klisen je 43 - 58 %. Lepší úspěšnost získání oocytů, 65 - 80 %, je pomocí transkutánní punkce přes slabinu.

Po získání oocytů se zkoumá, zdali jsou oocyty kompaktní nebo expandované. Expandované oocyty se nechávají dozrát do fáze MII. Úspěšnost dozrání je lepší u expandovaných oocytů (65 %), než u kompaktních oocytů (20 %). Expandované oocyty také vyžadují kratší dobu kultivace. Doba zrání nemá žádný vliv na rýhování oocytu. Dozrálé oocyty se následně oplodní. Klasická *in vitro* fertilizace u koní nefunguje z důvodu problematické kapacity spermií a tloušťce zony pellucidy. Pro produkci embryí se tedy využívá ICSI, kdy se jedna znehybněná spermie injikuje přímo do oocytu. Spermie musí být nejprve znehybněna a k tomu se používají pulzy injekcí do bičíku, nebo polyvinylpyrrolidon. Úspěšnost rýhování oocytů je po ICSI až 79, 1 %, úspěšnost tvorby blastocyst 36, 3 %. Úspěšnost zabřeznutí po přenosu blastocyst vyprodukovaných *in vitro* je 70 – 80 %. Embrya vyprodukovaná *in vitro* se snadněji zamrazují a po jejich rozmrazení je úspěšnost zabřeznutí 60 %.

## Literatura

- Alexander, S. L., Irvine, C. H. G. 1982. Radioimmunoassay and *in vitro* bioassay of serum LH throughout the equine oestrus cycle. *Journal of Reproduction and Fertility*. Supplement. 32. 253–260.
- Alexander, S. L., Irvine, C. H. G. 1993. FSH and LH. In: McKinnon, A. O., Voss, J. L. (eds). *Equine Reproduction*. Lea and Febiger. Philadelphia, p. 45-56.
- Allen, W. R. 1978. Control of ovulation and oestrus in the mare. In: Crichton, D. P., Haynes, H. B., Foxcroft, G. R., Lamming, G. E. (eds). *Control of Ovulation*. Butterworths, London. 453–470.
- Alm, H., Hinrichs, K. 1996. Effect of cycloheximide on nuclear maturation of horse oocytes and its relation to initial cumulus morphology. *Journal of Reproduction and Fertility*. 107 (2). 215–220.
- Alm, H., Torner, H., Becker, F., Kanitz, W., Hinrichs, K., 1997. Comparison of different methods for recovery of horse oocytes. *Equine Veterinary Journal*. Supplement. 29 (25). 47–50.
- Alm, H., Choi, Y. H., Love, L., Heleil, B., Torner, H., Hinrichs, K. 2008. Holding bovine oocytes in the absence of maturation inhibitors: kinetics of *in vitro* maturation and effect on blastocyst development after *in vitro* fertilization. *Theriogenology*. 70 (7). 1024–9.
- Alvarenga, M. A., Da Cruz Landim-Alvarenga, F. 2000. New assisted reproductive techniques applied for the horse industry. In: Samper, J. C. (ed.). *Equine breeding management and artificial insemination*. Saunders; 2nd edition. Philadelphia. p. 209-220. ISBN: 9781416052340.
- Argo, C. M., Smith, J. S. 1983. The relationship of energy requirements and seasonal changes of food intake in Soay rams. *Journal of Physiology*. 343. 23-24 (abstract).
- Arthur, G. H., Allen, W. E. 1972. Clinical observations on reproduction on a pony stud. *Equine Veterinary Journal*. 4 (3). 73-75.
- Aurich, L., Schlote, S., Hoppen, H.-O., Klug, E., Hope, H., Aurich, J. E. 1994. Effects of opioid antagonist naloxane on release of LH in mares during the anovulatory season. *Journal of Endocrinology*. 142 (1). 139-144.
- Aurich, L., Hope, H. and Aurich, J. E. 1995. Role of endogenous opioids for regulation of the oestrous cycle in the horse. *Reproduction in Domestic Animals*. 30 (4). 188-192.



- Ball, B. A., Little, T. V., Weber, J. A., Woods, G. L. 1989. Survival of Day-4 embryos from young, normal mares and aged, subfertile mares after transfer to normal recipient mares. *Journal of Reproduction and Fertility*. 85 (1). 187-194.
- Battut, I., Bezard, J., Palmer, E. 1991. Establishment of equine oviduct cell monolayers for co-culture with early equine embryos. *Journal of Reproduction and Fertility*. Supplement. 44:393–403.
- Battut, I., Grandchamp des Raux, A., Nicaise, J. L., Fieni, F., Tainturier, D., Bruyas, J. F. 2001. When do equine embryos enter the uterine cavity? An attempt to answer. In Katila, T., Wade, J. F. (eds.). *Proceedings of the 5th International Symposium on Equine Embryo Transfer*. Havemeyer Foundation Monograph Series No. 3. Newmarket: R&W Publications. p. 66-68.
- Besognek, B., Hansen, B. S., Daels, P.F. 1995. Prolactin secretion during the transitional phase and relationships to onset of reproductive season in mares. *Biology of Reproduction*. 459–467.
- Betteridge, K. J., Mitchell, D. 1975. A surgical technique applied to the study of tubal eggs in the mare. *Journal of Reproduction and Fertility*. Supplement. 23. 519-524.
- Betteridge, K. J., Eaglesome, M. D., Mitchell, D., Flood, P. E., Beriault, R. 1982. Development of horse embryos up to twenty two days after ovulation: observations on fresh specimens. *Journal of Anatomy*. 135 (1). 191-209.
- Betteridge, K. J. 2007. Equine embryology: an inventory of unanswered questions. *Theriogenology*. Supplement. 68 (1). S9-21.
- Betteridge, K. J. 2011. Embryo Morphology, Growth and Development. In McKinnon, A. O. et al. (ed.). *Equine Reproduction*, 2nd Edition. Wiley-Blackwell. p. 3288. ISBN: 9780813819716.
- Bezard, J., Magistrini, M., Duchamp, G., Palmer, E. 1989. Chronology of equine fertilization and embryonic development *in vivo* and *in vitro*. *Equine Veterinary Journal*. Supplement 8. 105-110.
- Bezard, J. 1992. *In vitro* fertilization in the mare. *Proceedings of the International Scientific Conference on Biotechnics in Horse Reproduction*. Cracow, Poland: Agricultural University of Cracow. p. 12 (abstract).
- Blanchard, T. L., Varner, D. D., Schumacher, J. 1998. Manual of equine reproduction. In *Semen Preservation*. Mosby-Year-Book Inc, St Louis, MO. p 143–154. ISBN: 0815143788.

- Blondin, P., Coenen, K., Guilbault, L. A., Sirard, M. A. 1997. *In vitro* production of bovine embryos: developmental competence is acquired before maturation. *Theriogenology*. 47 (5). 1061–1075.
- Blue, B. J., McKinnon, A. O., Squires, E. L., Seidel, G. E. Jr, Muscari, K. T. 1989. Capacitation of stallion spermatozoa and fertilization of equine oocytes *in vitro*. *Equine Veterinary Journal*. 21 (8):111-116.
- Bøgh, I. B., Be'zard, J., Duchamp, G., Baltsen, M., Ge'zard, N., Daels, P., Greve, T. 2002. Pure preovulatory follicular fluid promotes *in vitro* maturation of *in vivo* aspirated equine oocytes. *Theriogenology*. 57 (7). 1765–1779.
- Bøgh, I. B., Brink, N. S., Jensen, H. E., Lehn-Jensen, H., Greve, T. 2003. Ovarian function and morphology in the mare after multiple follicular punctures. *Equine Veterinary Journal*. 35 (6). 575–579.
- Brück, I., Raun, K., Synnestvedt, B., Greve, T. 1992. Follicle aspiration in the mare using a transvaginal ultrasound-guided technique (short communication). *Equine Veterinary Journal*. 24 (1). 58–59.
- Brun, R. B. 1974. Studies on fertilization in *Xenopus laevis*. *Biology of Reproduction*. 11 (5). 513-518.
- Carnevale, E. M., Ginther, O. J. 1995. Defective oocytes as a cause of subfertility in old mares. *Biology of Reproduction*. Monograph 1. 209–214.
- Carnevale, E. M., Coutinho da Silva, M. A., Maclellan, L. J. 2002. Effects of culture media and time of insemination on oocyte transfer. *Theriogenology*. 58 (2). 759-762.
- Carnevale, E. M. 2004a. Oocyte transfer and gamete intrafallopian transfer in the mare. *Animal Reproduction Science*. 82–83. 617-24.
- Carnevale, E. M., Coutinho da Silva, M. A., Preis, K. A., Stokes, J. E., Squires, E. L. 2004. Establishment of pregnancies from oocytes collected from the ovaries of euthanized mares. *Proceedings of the 50th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners*. 531–533.
- Carnevale, E. M., Coutinho da Silva, M. A., Panzani, D., Stokes, J. E., Squires, E. L. 2005. Factors affecting the success of oocyte transfer in a clinical program for subfertile mares. *Theriogenology*. 64 (3). 519–527.
- Choi, Y. H., Chung, Y. G., Seidel Jr, G. E., Squires, E. L. 2001. Developmental capacity of equine oocytes matured and cultured in equine trophoblast-conditioned media. *Theriogenology*. 56 (2). 329-39.

- Choi, Y. H., Love, C. C., Love, L. B., Varner, D. D., Brinsko, S., Hinrichs, K. 2002. Developmental competence *in vivo* and *in vitro* of *in vitro* matured equine oocytes fertilized by intracytoplasmic sperm injection with fresh or frozen-thawed spermatozoa. *Reproduction*. 123 (3). 455-65.
- Choi, Y. H., Chung, Y. G., Walker, S. C., Westhusin, M. E., Hinrichs, K. 2003a. *In vitro* development of equine nuclear transfer embryos: effects of oocyte maturation media and amino acid composition during embryo culture. *Zygote*. 11 (1). 77–86.
- Choi, Y. H., Love, C. C., Varner, D. D., Love, L. B., Hinrichs, K. 2003b. Effects of gas conditions, time of medium change, and ratio of medium to embryo on *in vitro* development of horse oocytes fertilized by intracytoplasmic sperm injection. *Theriogenology*. 59 (5-6). 1219–1229.
- Choi, Y. H., Love, L. B., Varner, D. D., Hinrichs, K. 2004a. Factors affecting developmental competence of equine oocytes after intracytoplasmic sperm injection. *Reproduction*. 127 (2). 187-194.
- Choi, Y. H., Roasa, L. M., Love, C. C., Varner, D. D., Brinsko, S. P., Hinrichs, K. 2004b. Blastocyst formation rates *in vivo* and *in vitro* of *in vitro* matured equine oocytes fertilized by intracytoplasmic sperm injection. *Biology of Reproduction*. 70 (5). 1231– 1238.
- Choi, Y. H., Love, C. C., Varner, D. D., Hinrichs, K. 2006. Equine blastocyst development after intracytoplasmic injection of sperm subjected to two freeze-thaw cycles. *Theriogenology*. 65 (4). 808-819.
- Choi, Y. H., Love, L. B., Varner, D. D., Hinrichs, K. 2006a. Holding immature equine oocytes in the absence of meiotic inhibitors: Effect on germinal vesicle chromatin and blastocyst development after intracytoplasmic sperm injection. *Theriogenology*. 66 (4). 955-963.
- Choi, Y. H., Love, L. B., Varner, D. D., Hinrichs, K. 2007. Effect of holding technique and culture drop size in individual or group culture on blastocyst development after ICSI of equine oocytes with low meiotic competence. *Animal Reproduction Science*. 102 (1-2). 38–47.
- Choi, Y. H., Varner, D. D., Love, C. C., Hartman, D. L., Hinrichs, K. 2011. Production of live foals via intracytoplasmic injection of lyophilized sperm and sperm extract in the horse. *Reproduction*. 142 (4). 529-538.
- Cleaver, B. D., Grubaugh, W. R., Davis, S. D., Sheerin, P. C., Franklin, K. J., Sharp, D. C. 1991. Effect of constant light exposure on circulating gonadotrophin levels and hypothalamic

- gonadotrophinreleasing hormone (GnRH) content in the ovariectomized pony mare. *Journal of Reproduction and Fertility. Supplement.* 44. 259-266.
- Cochran, R., Meintjes, M., Reggio, B., Hylan, D., Carter, J., Pinto, C. 1998. Live foals produced from sperm-injected oocytes derived from pregnant mares. *Journal of Equine Veterinary Science.* 18 (7). 36-40.
- Colleoni, S., Barbacini, S., Necchi, D., Duchi, R., Lazzari, G., Galli, C. 2007. Application of ovum pick-up, intracytoplasmic sperm injection and embryo culture in equine practice. *Proceedings of the 53rd Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners.* 554–559.
- Cook, N. L., Squires, E. L., Ray, B. S., Jasko, D. J. 1993. Transvaginal ultrasound-guided follicular aspiration of equine oocytes. *Equine Veterinary Journal. Supplement.* 25 (S15). 71-74.
- Davies Morel, M. C. G. 2003. *Equine Reproductive Physiology, Breeding, and Stud Management.* CABI Publishing Series. p. 374. ISBN: 0851996434.
- Del Campo, M. R., Donoso, X., Parrish, J. J., Ginther, O. J. 1990. *In vitro* fertilization of *in vitro* matured equine oocytes. *Journal of Equine Veterinary Science.* 10 (1). 18-22.
- Dell'Aquila, M. E., Fusco, S., Lacalandra, G. M., Maritato, E. 1996. *In vitro* maturation and fertilization of equine oocytes recovered during the breeding- season. *Theriogenology.* 45 (3). 547-560.
- Dell'Aquila, M. E., Cho, Y. S., Minoia, P., Traina, V., Lacalandra, G. M., Maritato, F. 1997a. Effects of follicular fluid supplementation of *in vitro* maturation medium on the fertilization and development of equine oocytes after *in vitro* fertilization or intracytoplasmic sperm injection. *Human Reproduction.* 12 (12). 2766–2772.
- Dell'Aquila, M. E., Cho, Y. S., Minoia, P., Traina, V., Fusco, S., Lacalandra, G. M., Maritato, E. 1997. Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) versus conventional IVF on abattoir-derived and *in vitro*-matured equine oocytes. *Theriogenology.* 47 (6). 1139-1156.
- Dell'Aquila, M. E., Masterson, M., Maritato, F., Hinrichs, K. 2001. Influence of oocyte collection technique on initial chromatin configuration, meiotic competence, and male pronucleus formation after intracytoplasmic sperm injection (ICSI) of equine oocytes. *Molecular Reproduction and Development.* 60 (1). 79-88.
- Doležel, R. a kolektiv. 1997. *Veterinární gynekologie.* Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita. 144 s. ISBN 80-85114-04-6.

- Dorzortsev, D. P., Ryubouchkin, A., De Sutter, P., Dhont, M. 1995. Sperm plasma membrane damage prior to intracytoplasmic sperm injection: a necessary condition for sperm nucleus decondensation. *Human Reproduction*. 10 (11). 2960-4.
- Duchamp, G., Be'zard, J., Palmer, E. 1995. Oocyte yield and the consequences of puncture of all follicles larger than 8 millimetres in mares. In: *Equine Reproduction VI. Biology of Reproduction*. 1. 233–241.
- Edwards, R. G., Van Steirteghem, A. C. 1993. Intracytoplasmic sperm injections (ICSI) and human fertilization-does calcium hold the key to success. *Human Reproduction*. 8 (7). 988-989.
- Enders, A. C., Liu, I. K. M., Bowers, J., Lantz, K. C., Schlafke, S., Suarez, S. 1987. The ovulated ovum of the horse: cytology of nonfertilized ova to pronuclear stage ova. *Biology of Reproduction*. 37 (2). 453-466.
- Enders, A. C., Schlafke, S., Lantz, K. C., Liu, K. M. 1993. Endoderm cells of the equine yolk sac from Day 7 until formation of the definitive yolk sac placenta. *Equine Veterinary Journal*. 25 (S15). 3-9.
- Evans, M. J., Irvine, C. H. G. 1979. Induction of follicular development and ovulation in seasonally acyclic mares using gonadotrophin releasing hormones and progesterone. *Journal of Reproduction and Fertility*. Supplement. 27. 113–121.
- Evans, M. J., Alexander, S. L., Irvine, C. H. G., Livesey, J. H., Donald, R. A. S. 1991. *In vitro* and *in vivo* studies of equine prolactin secretion throughout the year. *Journal of Reproduction and Fertility*. Supplement. 44. 27-35.
- Feichtinger, W., Obruca, A., Brunner, M. 1995. Sex chromosomal abnormalities and intracytoplasmic sperm injection. *Lancet*. 346 (8989). 1566.
- Fitzgerald, B. P., Affleck, K. J., Barrows, S. P., Murdock, W. L., Barker, K. B., Loy, R. G. 1987. Changes in LH pulse frequency and amplitude in intact mares during the transition into the breeding season. *Journal of Reproduction and Fertility*. 79 (2). 485-493.
- Fulka Jr., J., Okolski, A. 1981. Culture of horse oocytes in vitro. *Journal of Reproduction and Fertility*. 61 (1). 213-215.
- Galli, C., Crotti, G., Turini, P., Duchi, R., Mari, G., Zavaglia, G. 2002. Frozenthawed embryos produced by Ovum Pick Up of immature oocytes and ICSI are capable to establish pregnancies in the horse. *Theriogenology*. 58:705–8.
- Galli, C., Colleoni, S., Duchi, R., Lagutina, I., Lazzari, G. 2007. Developmental competence of equine oocytes and embryos obtained by *in vitro* procedures ranging from *in vitro*

maturation and ICSI to embryo culture, cryopreservation and somatic cell nuclear transfer. *Animal Reproduction Science*. 98 (1-2). 39-55.

Galli, C., Colleoni, S., Duchi, R., Lagutina, I., Lazzari, G. 2013. Equine assisted reproduction and embryo technologies. *Animal Reproduction*. 10 (3). 334-343.

Galli, C., Duchi, R., Colleoni, S., Lagutina, I., Lazzari, G. 2014. Ovum pick up, intracytoplasmic sperm injection and somatic cell nuclear transfer in cattle, buffalo and horses: from the research laboratory to clinical practice. *Theriogenology* 81 (1). 138-151.

Gambini, A., Jarazo, J., Olivera, R., Salamone, D. F. 2012. Equine Cloning: *In Vitro* and *In Vivo* Development of Aggregated Embryos. *Biology of Reproduction*. 87(1). 1–9.

Ginther, O. J., First, N. L. 1971. Maintenance of the *corpus luteum* in hysterectomised mares. *American Journal of Veterinary Research*. 32 (11). 1687-1691.

Ginther, O. J. 1979. Reproductive biology of the mare - basic and applied aspects. Cross Plaines, Wis. p. 413.

Ginther, O. J. 1990. Prolonged luteal activity in mares: a semantic quagmire. *Equine Veterinary Journal*. 22 (3). 152-156.

Ginther, O. J. 1992. *Reproductive Biology of the Mare: Basic and Applied Aspects*, 2nd ed. Equiservices Publishing. p. 642. ISBN: 0964007215.

Ginther O. J. 1995. *Ultrasonic Imaging and Animal Reproduction: Fundamentals*, Book 1. Equiservices Publishing. p. 225. ISBN: 0964007231.

Graham, C. E. 1966. The regulation of DNA synthesis and mitose in multinucleate frog eggs. *Journal of Cell Science*. 1 (3). 363-374.

Grøndahl, C., Nielsen, C. G., Eriksen, T., Greve, T., Hyttel, P. 1993. *In vivo* fertilisation and initial embryogenesis in the mare. *Equine Veterinary Journal*. 25 (S15). 79-83.

Grøndahl, C., Hst, T., Brck, I., Viuff, D., Bezard, J., Fair, T., Greve, T., Hyttel, P. 1995a. *In vitro* production of equine embryos. In: Sharp, D. C., Bazer, F. W. (eds.). *Equine Reproduction VI*. Madison. Society for the Study of Reproduction. 1. 299-307.

Grøndahl, C., Hyttel, P., Grøndahl, M. L., Eriksen, T., Gotfredsen, P., Greve, T. 1995b. Structural and endocrine aspects of equine oocyte maturation *in vivo*. *Molecular Reproduction and Development*. 42 (1). 94-105.

Grøndahl, C., Hyttel, P. 1996. Nucleogenesis and ribonucleic acid synthesis in preimplantation equine embryos. *Biology of Reproduction*. 55 (4). 769-774.

Grøndahl, C., Hansen, T. H., Hossaini, A., Heinze, I., Greve, T., Hyttel, P. 1997. Intracytoplasmic Sperm Injection of *In Vitro* Matured Equine Oocytes. *Biology of Reproduction*. 57 (6). 1495-1501.

- Grubaugh, W. R. 1982. The effects of pinealectomy in pony mares. *Journal of Reproduction and Fertility. Supplement.* 32. 293–295.
- Guerin, M. U., Wang, X. J. 1994. Environmental temperature has an influence on timing of the first ovulation of seasonal estrus in the mare. *Theriogenology.* 42 (6). 1053–1060.
- Haag, K. T., Magalhaes-Padilha, D. M., Fonseca, G. R., Wischral, A., Gastal, M. O., King, S. S., Jones, K. L., Figueiredo, J. R., Gastal, E. L. 2013. *In vitro* culture of equine preantral follicles obtained via the Biopsy Pick-Up method. *Theriogenology.* 79(6). 911-917.
- Hawley, L. R., Enders, A. C., Hinrichs, K. 1995. Comparison of equine and bovine oocyte-cumulus morphology within the ovarian follicle. *Biology of Reproduction.* 243–252.
- Heape, W. 1989. On the artificial insemination of mares. *Veterinarian.* 71. 202-212.
- Herrera, C., Revora, M., Vivani, L., Miragaya, M. H., Lossino, L., Quintans, C., Pasqualini, R. S. 2008. Effect of high glucose concentrations during *in vitro* culture of equine embryos. *Proceedings, 7th International Symposium on Equine Embryo Transfer. R&W Communications. Suffolk.* 52–53.
- Hinrichs, K., Kenney, D. F., Kenney, R. M. 1990. Aspiration of oocytes from mature and immature preovulatory follicles in the mare. *Theriogenology.* 34 (1). 107–112.
- Hinrichs, K., DiGiorgio, L. M. 1991. Embryonic development after intrafollicular transfer of equine oocytes. *Journal of Reproduction and Fertility. Supplement.* 44. 369-374.
- Hinrichs, K., Schmidt, A. L., Friedman, P. P., Selgrath, J. P., Martin, M. G. 1993. *In vitro* maturation of horse oocytes: characterization of chromatin configuration using fluorescence microscopy. *Biology of Reproduction.* 48 (2). 363-370.
- Hinrichs, K., Schmidt, A. L., Selgrath, J. P. 1995. Activation of horse oocytes. *Biology of Reproduction.* 1. 319-324.
- Hinrichs, K., Williams, K. A. 1997. Relationships among oocyte-cumulus morphology, follicular atresia, initial chromatin configuration, and oocyte meiotic competence in the horse. *Biology of Reproduction.* 57 (2). 377-384.
- Hinrichs, K., Matthews, G. L., Freeman, D. A., Torello, E. M. 1998. Oocyte transfer in mares. *Journal of the American Veterinary Medical Association.* 212 (7). 982-986.
- Hinrichs, K., Choi, Y. H., Love, L. B., Varner, D. D., Love, C. C., Walckenaer, B. E. 2005. Chromatin configuration within the germinal vesicle of horse oocytes: changes post mortem and relationship to meiotic and developmental competence. *Reproduction.* 72 (5). 1142-1150.
- Hinrichs, K., Choi, Y. H., Walckenaer, B. E., Varner, D. D., Hartman, D. L. 2007. *In vitro*-produced equine embryos: production of foals after transfer, assessment by differential

- staining, and effect of medium calcium concentrations during culture. *Theriogenology*. 68 (4). 521-529.
- Hinrichs, K. 2010a. In Vitro Production of Equine Embryos: State of the Art. *Reproduction of Domestic Animals*. 45 (2). 3–8.
- Hinrichs, K. 2010b. Application of assisted reproductive technologies (ART) to clinical practice. *Proceeding of the Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners*. 56.
- Hiramoto, Y. 1962. Microinjection of the live spermatozoa into sea urchin eggs. *Experimental Cell Research*. 27. 416-426.
- Hlinka, D., Herman, M., Vesela, J., Hredzak, R., Horvath, S., Pacin, J. 1998. A modified method of intracytoplasmic sperm injection without the use of polyvinylpyrrolidone. *Human Reproduction*. 13 (7). 1922-7.
- Irvine, C. H. G., Alexander, S. C. 1993a. Secretory patterns and rates of GnRH, FSH and LH revealed by intensive sampling of pituitary venous blood in the luteal phase mare. *Endocrinology*. 132. 212-218.
- Irvine, C. H. G., Alexander, S. C. 1993b. GnRH. In: McKinnon, A. O., Voss, J. L. (eds). *Equine Reproduction*. Lea and Febiger. Philadelphia. p. 37–45.
- Irvine, C. H. G., Alexander, S. C. 1994. The dynamics of gonadotrophin releasing hormone, LH and FSH secretion during spontaneous ovulatory surge of the mare as revealed by intensive sampling of pituitary venous blood. *Journal of Endocrinology*. 140 (2). 283–295.
- Jacobson, C. C., Choi, Y. H., Hayden, S. S., Hinrichs, K. 2010. Recovery of mare oocytes on a fixed biweekly schedule, and resulting blastocyst formation after intracytoplasmic sperm injection. *Theriogenology*. 73 (8). 1116–1126.
- Jean, M., Mirallié, S., Boudineau, M., Tatin, C., Barriè`re, P. 2001. Intracytoplasmic sperm injection with polyvinylpyrrolidone: a potential risk. *Fertility and Sterility*. 76 (2). 419-420.
- Kanitz, W., Becker, F., Alm, H., Torner, H. 1995. Ultrasoundguided follicular aspiration in mares. *Biology of Reproduction*. 225–231.
- Kato, Y., Nagao, Y. 2009. Effect of PVP on sperm capacitation status and embryonic development in cattle. *Theriogenology*. 72 (5). 624–635.
- Kepes, J. J., Chen, W. Y., Jim, Y. F. 1993. “Muroid dissolution” of bones and multiple pathologic fractures in a patient with past history of intravenous administration of polyvinylpyrrolidone (PVP) A case report. *Bone and Mineral*. 22 (1). 33-41.



- Kilmer, D. N., Sharp, D. C., Berhund, L. A., Grubaugh, W., McDowell, K. J., Peck, L. S. 1982. Melatonin rhythms in pony mares and foals. *Journal of Reproduction and Fertility*. Supplement. 32. 303–307.
- Komárek, V. a kol. 1964. *Anatomie a fyziologie hospodářských zvířat*. Státní zemědělské nakladatelství v Praze. 387s. ISBN: 07012640450.
- Köllmann, M., Rötting, A., Heberling, A., Sieme, H. 2011. Laparoscopic techniques for investigating the equine oviduct. *Equine Veterinary Journal*. 43 (1). 106-111.
- König, H. E., Liebich, H.-G. 2002. *Anatomie domácích savců: Splanchnologie, cévní a nervová soustava*. 2. díl. Hajko & Hajková. 416s. ISBN 8088700574.
- Lazzari, G., Crotti, G., Turini, P., Duchi, R., Mari, G., Zavaglia, G. 2002. Equine embryos at the compacted morula and blastocyst stage can be obtained by intracytoplasmic sperm injection (ICSI) of *in vitro* matured oocytes with frozen-thawed spermatozoa from semen of different fertilities. *Theriogenology*. 58 (2-4). 709-12.
- Li, L. Y., Meintjes, M., Graff, K. J., Paul J. B., Denniston, R. S., Godke, R. A. 1995. *In vitro* fertilization and development of *in vitro* matured oocytes aspirated from pregnant mares. In: Sharp, D. C., Bazer, F. W. (eds.). *Equine Reproduction VI*. Madison. Society for the Study of Reproduction. 1:309-317.
- Li, X., Morris, L. H., Allen, W. R. 2001. Influence of co-culture during maturation on the developmental potential of equine oocytes fertilized by intracytoplasmic sperm injection (ICSI). *Reproduction*. 121 (6). 925-932.
- Li, X., Morris, Lee H.-A., Allen, W. R. 2002. *In Vitro* Development of Horse Oocytes Reconstructed with the Nuclei of Fetal and Adult Cells. *Biology of Reproduction*. 66(5). 1288–1292.
- Lopes, A. S., Madsen, S. E., Ramsing, N. B., Løvendahl, P. Greve, T., Callesen, H. 2006. Investigation of respiration of individual bovine embryos produced *in vivo* and *in vitro* and correlation with viability following transfer. *Human Reproduction*. 22(2). 558-556.
- Maclellan, L. J., Carnevale, E. M., Coutinho da Silva, M. A., Scoggin, C. F., Bruemmer, J. E., Squires, E. L. 2002. Pregnancies from vitrified equine oocytes collected from super-stimulated and non-stimulated mares. *Theriogenology*. 58 (5). 911-919.
- Marcos, M. V., Spell, A. R., Butine, M. D., Arns, M. J. 1996. Influence of cumulus cells on *in vitro* maturation and fertilization of equine oocytes. *Theriogenology*. 45 (1). 263.
- Mari, G., Merlo, B., Iacono, E., Belluzzi, S. 2005. Fertility in the mare after repeated transvaginal ultrasound-guided aspirations. *Animal Reproduction Science*. 88 (3-4). 299-308.

- Marvan, F. a kol. 1992. Morfologie hospodářských zvířat. 1. vyd. Praha. Brázda. 303 s. ISBN 80-209-0226-0.
- Mathews, R. G., Rophia, R. T. and Butterfield, R. M. 1967. The phenomenon of foal heat in mares. Australian Veterinary Journal. 43 (12). 579–585.
- McKinnon, A. O., Wheeler, M. B., Carnevale, E. M., Squires, E. L. 1987. Oocyte transfer in the mare: preliminary observations. Equine Veterinary Science. 6 (6). 306-309.
- McKinnon, A. O., Voss, J. L. Equine Reproduction. Philadelphia: Lea &Febiger, 1993.
- McPartlin, L. A., Suarez, S. S., Czaya, C. A., Hinrichs, K., Bedford- Guaus, S. J. 2009. Hyperactivation of stallion sperm is required for successful *in vitro* fertilization of equine oocytes. Biology of Reproduction. 81 (1). 199-206.
- Meintjes, M., Bellow, M. S., Paul, J. B., Broussard, J. R., Li, L. Y., Paccamonti, D., Eilts, B. E., Godke, R. A. 1995. Transvaginal ultrasound-guided oocyte retrieval from cyclic and pregnant horse and pony mares for *in vitro* fertilization. Biology of Reproduction. 45 (1). 281-292.
- Morley, J. E., Levine, A. S., Yim, G. K., Lowy, M. J. 1983. Opioid modulation of appetite. Neuroscience and Behaviour Reviews. 7 (2). 281–305.
- Nagy, Z. P., Liu, J., Joris, H., Devroey, P., Van Steirteghem, A. 1994. Time-course of oocyte activation, pronucleus formation and cleavage in human oocytes fertilized by intracytoplasmic sperm injection. Human Reproduction. 9 (9). 1743-1748.
- Nett, T. M. 1993. Reproductive peptide and protein hormones. In: McKinnon, A. O., Voss, J. L. (eds). Equine Reproduction. Lea and Febiger. Philadelphia. p. 109–114.
- Palermo, G., Joris, H., Devroey, P., Van Steirteghem, A. C. 1992. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. Lancet. 340 (8810). 17-18.
- Palermo, G. D., Neri, Q. V., Takeuchi, T., Squires, J., Moy, F., Rosenwaks, Z. 2008. Genetic and epigenetic characteristics of ICSI children. Reproductive Biomedicine Online. 17 (6). 820-833.
- Palermo, G. D., Neri, Q. V., Monahan, D., Kocent, J., Rosenwaks, Z. 2012. Development and current applications of assisted fertilization. Fertility and Sterility. 97 (2). 248-259.
- Palmer, E., Duchalp, G., Bezárd, J. 1987. Non-surgical recovery of follicular fluid and oocytes of mares. Journal of Reproduction and Fertility. Supplement 35. 689-690.
- Palmer, E., Magistrini, M., Bezard, J., Duchamp, G. 1990. Gestation apres fecondation *in vitro* dans l'espece equine. Comptes Rendus de l'Académie des Sciences Paris. 310. 71-74.
- Palmer, E., Bezard, J., Magistrini, M., Duchamp, G. 1991. *In vitro* fertilization in the horse. A retrospective study. Journal of Reproduction and Fertility. Supplement 44. 375-384.

- Pantke, P., Hyland, J., Galloway, D. B., Maclean, A. A., Hoppen, H. O. 1991. Changes in luteinising hormone bioactivity associated with gonadotrophin pulses in the cycling mare. *Journal of Reproduction and Fertility. Supplement.* 44. 13-20.
- Pattison, M. L., Chen, C. L., King, S. L. 1972. Determination of LH and estradiol-17 $\beta$  surge with reference to the time of ovulation in mares. *Biology of Reproduction.* 7. 136–140.
- Piquette, G. N., Kenney, R. M., Sertich, P. L., Yamoto, M., Hsueh, A. J. W. 1990. Equine granulosa theca cell tumours express inhibin $\alpha$  and  $\beta$ A subunit messenger ribonucleic acids and proteins. *Biology of Reproduction.* 43 (6). 1050–1057.
- Pycock, J., Samper, J. C., McKinnon, A. O. 2007. *Current Therapy in Equine Reproduction.* Elsevier Health Sciences. 512 p. ISBN: 9780721602523.
- Rantanen, N. W., McKinnon, A. O. *Equine Diagnostic Ultrasonography.* Baltimore: Williams & Wilkins, 1998.
- Reece, W. O. 2011. *Fyziologie a funkční anatomie domácích zvířat.* Grada Publishing a. s. 480 s. ISBN: 9788024732824.
- Ribeiro, B. I., Love, L. B., Choi, Y. H., Hinrichs, K. 2008. Transport of equine ovaries for assisted reproduction. *Animal Reproduction Science.* 108 (1-2). 171–179.
- Ritchie, W. A. 2006. Nuclear transfer in sheep. *Methods in Molecular Biology.* 325: 11–23.
- Rosati, I., Berlinguer, F., Bogliolo, L., Leoni, G., Ledda, S., Naitana, S. 2002. The effect of co-culture on the development of *in vitro* matured equine oocytes after intracytoplasmic sperm injection. *Equine Veterinary Journal.* 34 (7). 673-678.
- Samper, J. C. 2000. *Equine Breeding Management and Artificial Insemination.* Philadelphia: WB Saunders. p. 310. ISBN: 0721670121.
- Sova, Z. 1981. *Fyziologie hospodářských zvířat.* Státní zemědělské nakladatelství v Praze. 512 s. ISBN: 07089810450.
- Squires, E., Wilson, J., Kato, H., Blaszczyk, A. 1996. A pregnancy after intracytoplasmic sperm injection into equine oocytes matured *in vitro*. *Theriogenology.* 45 (1). 306.
- Stout, T. A. E. 2006. Equine embryo transfer: review of developing potential. *Equine Veterinary Journal.* 38 (5). 467-478.
- Strehler, E., Baccetti, B., Sterzik, K., Capitani, S., Collodel, G., Santo, D. M. 1998. Detrimental effects of polyvinylpyrrolidone on the ultrastructure of spermatozoa (*Notulae seminologicae* 13). *Human Reproduction.* 13 (1). 120–123.
- Swann, K. 1993. The soluble sperm osmoligen hypothesis. *Zygote.* 1 (4). 273-276.
- Tesarik, J., Sousa, M., Testart, J. 1994. Human oocyte activation after intracytoplasmic sperm injection. *Human Reproduction.* 9 (3). 511-518.

- Tesarik, J., Sousa, M. 1995a. More than 90% fertilization rates after intracytoplasmic sperm injection and artificial induction of oocyte activation with calcium ionophore. *Fertility and Sterility*. 63 (2). 343-349.
- Tesarik, J., Sousa, M. 1995b. Key elements of a highly efficient intracytoplasmic sperm injection technique: Ca<sup>2+</sup> fluxes and oocyte cytoplasmic dislocation. *Fertility and Sterility*. 64 (4). 770-776.
- Tesarik, J. 1996. Fertilization of oocytes by injecting spermatozoa, spermatids and spermatocytes. *Reviews of Reproduction*. 1 (3). 149-152.
- Threlfall, W. R. 1997. Equine Theriogenology. In: Youngquist, R. S. (ed.). *Current Therapy in Large Animal Theriogenology*. Philadelphia: WB Saunders. p. 1088. ISBN: 9780721693231.
- Tremoleda, J. L., Stout, T. A., Lagutina, I., Lazzari, G., Bevers, M. M., Colenbrander, B. 2003. Effects of *in vitro* production on horse embryo morphology, cytoskeletal characteristics, and blastocyst capsule formation. *Biology of Reproduction*. 69 (6). 1895–1906.
- Trounson, A. O., Pushett, D., Maclellan, L. J., Lewis, I., Gardner, D. K. 1994. Current status of IVM/IVF and embryo culture in humans and farm animals. *Theriogenology*. 41 (1). 57-66.
- Uehara, T., Yanagimachi, R. 1976. Microsurgical injection of spermatozoa into hamster eggs with subsequent transformation of sperm nuclei into male pronuclei. *Biology of Reproduction*. 15 (4). 467-470.
- Uehara, T., Yanagimachi, R. 1977. Behaviour of nuclei of testicular, caput and cauda epididymal spermatozoa injected into hamster eggs. *Biology of Reproduction*. 16 (3). 315-321.
- Van Steirteghem, A. C., Liu, J., Joris, H., Nagy, Z., Janssenswillen, C., Tournaye, H., Derde, M. P., Van Assche, E., Devroey, P. 1993a. Higher success rate by intracytoplasmic sperm injection than by subzonal insemination. Report of a second series of 300 consecutive cycles. *Human Reproduction*. 8 (7). 1055-1060.
- Van Steirteghem, A. C., Nagy, Z., Joris, H., Liu, J., Staessen, C., Smits, J., Wisanto, A., Devroey, P. 1993b. High fertilization and implantation after intracytoplasmic injection. *Human Reproduction*. 8 (7). 1061-1066.
- Varner, D. D., Ward, C. R., Storey, B. T., Kenney, R. M. 1987. Induction and characterization of acrosome reaction in equine spermatozoa. *American Journal of Veterinary Reserach*. 48 (9). 1383-1389.

- Vernon, M. W., Strauss, S., Simonelli, M., Zavy, M. T., Sharp, D. C. 1979. Specific PGF-2 alpha binding by the corpus luteum of the pregnant and non-pregnant mare. *Journal of Reproduction and Fertility. Supplement 27.* 421-429.
- Vogelsang, M. M., Kreider, J. L., Bowen, M. J., Potter, G. D., Forrest, D. W., Kraemer, D. C. 1988. Methods for collecting follicular oocytes from mares. *Theriogenology.* 29 (5). 1007-1018.
- Wani, N. A., Wani, G. M., Khan, M. Z., Sidiqi, M. A. 1999. Effect of different factors on the recovery rate of oocytes for *in vitro* maturation and *in vitro* fertilisation procedures in sheep. *Small Ruminant Research.* 34 (1). 71-76.
- Warszawsky, L. F., Parker, W. G., First, N. L., Ginther, O. J. 1972. Gross changes of internal genitalia during the estrous cycle in the mare. *American Journal of Veterinary Research.* 33 (1). 19-26.
- Watson, E. D., McDonnell, A. M. Cuddeford, D. 1994. Characteristics of cyclicity in maiden thoroughbred mares in the United Kingdom. *Veterinary Record.* 135 (5). 104-106.
- Whitmore, H. L., Wentworth, B. C., Ginther, O. J. 1973. Circulating concentrations of luteinising hormone during estrous cycles of mares as determined by radioimmunoassay. *American Journal of Veterinary Research.* 34. 631-636.
- Wilsher, S., Clutton-Brock, A., Allen, W. R. 2010. Successful transfer of day 10 horse embryos: influence of donor-recipient asynchrony on embryo development. *Reproduction.* 193 (3). 575-585.
- Yanagimachi, R. 1994. Mammalian fertilization. In: Knobil, E., Neill, J. D. (eds.). *The Physiology of Reproduction.* New York. Raven Press. p. 189-317. ISBN: 9780123971753.
- Zhang, J. J., Muzs, L. Z., Boyle, M. S. 1990. *In vitro* fertilization of horse follicular oocytes matured *in vitro*. *Molecular Reproduction and Development.* 26 (4). 361-365.