

**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI**

**Přírodovědecká fakulta**

**Katedra zoologie a ornitologická laboratoř**



# **Hodnocení ovariální aktivity u tura domácího v průběhu roku**

**Diplomová práce**

**Bc. Zuzana Vránová**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Zoologie

Forma studia: Prezenční

**Olomouc 2015**

**Vedoucí práce: Ing. Jiří Bezdíček, Ph.D.**

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně v průběhu magisterského studia pod vedením Ing. Jiřího Bezdíčka, Ph.D. na základě uvedených pramenů a literatury.

V Olomouci dne 15. 4. 2015

.....  
Bc. Zuzana Vránová

Poděkování patří především vedoucímu práce, panu Ing. Jiřímu Bezdíčkovi, Ph.D., za cenné rady, ochotu, čas a trpělivost, které mi při zpracování diplomové práce poskytl. Dále bych ráda poděkovala panu Ing. Alexanderu Makarevičovi, DrSc. a panu prof. Ing. Peteru Chrenekovi, DrSc. za možnost práce v laboratoři Výzkumného ústavu živočišné výroby v Nitře a také slečně Ing. Elišce Špalekové, Ph.D. za odbornou pomoc při práci. V neposlední řadě musím poděkovat svému partnerovi, rodičům a kamarádům za jejich podporu a podnětné připomínky.

### **Bibliografická identifikace:**

Jméno a příjmení autora: **Bc. Zuzana Vránová**

Název práce: **Hodnocení ovariální aktivity u tura domácího v průběhu roku**

Typ práce: **Magisterská**

Pracoviště: **Katedra zoologie a ornitologická laboratoř**

Vedoucí práce: **Ing. Jiří Bezdíček, Ph.D.**

Rok obhajoby: **2015**

### **Abstrakt**

*Ovaria* (vaječníky) patří mezi samičí pohlavní orgány. Jejich základní funkcí je sekrece hormonů, tvorba a dozrávání pohlavních buněk (oocytů). U všech druhů živočichů je správná ovariální aktivita nezbytná pro úspěšnou reprodukci. Ovariální aktivita je ovlivněna množstvím vnitřních a vnějších faktorů. Působení teplotního stresu či teplotních výkyvů během roku může mít zásadní vliv na fertilitu daného živočišného druhu. V předkládané práci byl vyhodnocen vliv různých období roku (jaro, podzim a zima) na reprodukci tura domácího (*Bos primigenius f. taurus*) z pohledu jeho ovariální aktivity. Ovariální aktivita byla vyhodnocena počtem primárních folikulů (celkem sledováno 805 ks.), počtem aspirovaných oocytů (395 ks.), počtem cyst (31 ks.) a úspěšností maturace oocytů. *Ovaria* použitá v této práci byla získána od 31 jedinců a to při porážce v teplotně rozdílném období roku, (tj. různá maximální teplota v měsíci porážky). Sledovanými měsíci byl březen (+14 °C); září (+22 °C) a únor (+6 °C). Výsledky ukázaly, že v ovariální aktivitě nebyl zjištěn mezi sledovanými obdobími roku (jaro, podzim, zima) statisticky průkazný rozdíl v průměrném počtu folikulů, počtu aspirovaných oocytů, počtu cyst a úspěšnosti maturace (dozrávání oocytů in vitro). Uvedená období roku jsou tak stejně vhodná pro získání dostatečného počtu oocytů, např. pro další biotechnické postupy (umělé oplodnění, kultivace oocytů, atd.) a výrazně neovlivňují parametry ovariální aktivity.

Klíčová slova: reprodukce, ovariální aktivita

### **Bibliographic identification**

Autor's first name and surname: **Bc. Zuzana Vránová**

Title of the thesis: **Evaluation of ovarian activity in cattle in different periods of the year**

Type of work: **Master thesis**

Department: **Department of Zoology and Ornithological Laboratory**

Supervisor: **Ing. Jiří Bezdíček, PhD.**

The year of presentation: **2015**

### **Abstract**

*Ovaria* (the ovaries) are female reproductive organs. Their basic functions are secretion of hormones and formation and maturation of oocytes. For successful reproduction, a proper ovarian activity is essential. Ovarian activity is affected by many external and internal factors. Effect of heat stress or temperature fluctuation during the year can have a significant effect on the fertility of animal species. In this study, the influence of different periods of the year (spring, autumn, and winter) on reproduction of cattle (*Bos primigenius f. taurus*) was evaluated in terms of its ovarian activity. The ovarian activity was assessed by a number of primary follicles (there were 805 follicles observed in total), by a number of aspirated oocytes (395 oocytes aspirated in total), by a number of cysts (31 cysts observed in all) and by a success rate of oocytes maturation. Ovaries used in this work were obtained from 31 specimens of cattle slaughtered in different periods of the year (i.e., at different maximum temperature in the month of butchery). The months observed here were March (+14 °C), September (+22 °C); and February (+6 °C). The results showed that there were no statistically significant differences in average number of follicles, in number of aspirated oocytes, in number of cysts and in maturation success rate between the observed periods of year (spring, autumn, and winter). The listed periods of year are, therefore, equally suitable for capture of sufficient number of oocytes, eventually, for other biotechnology procedures (in vitro fertilization, cultivation of oocytes etc.) and they are not an important factor which would affect the parameters of ovarian activity.

Key words: reproduction, ovarian activity

## **Obsah**

Seznam použitých zkratek.....	7
Úvod.....	8
1. Samičí pohlavní ústrojí skotu .....	9
1.1 Vaječníky (Ovaria) .....	9
2. Gametogeneze .....	9
2.1 Oogeneze .....	10
2.2 Rozdíl ve vývoji samčích a samičích gamet .....	11
3. Biotechnologické metody u savců .....	12
4. Vlivy působící na reprodukci .....	14
4.1 Vliv sezóny a tepelný stres .....	15
4.2 Vliv výživy a tělesné kondice .....	17
4.3 Vliv věku .....	17
5. Cíle práce.....	19
6. Materiál a metody.....	20
6.1 Sběr dat .....	20
6.2 Analýza dat.....	26
7. Výsledky .....	27
8. Diskuze .....	32
9. Závěr.....	34
10. Použitá literatura.....	35

## **Seznam použitých zkratk**

COCs	Cumulus oocyte complex (kumulus oocytární komplex)
ET	Embryotransfer
FA	Fatty acids (mastné kyseliny)
FBS	Fetal bovine serum (hovězí sérum)
FSH	Follicles stimulating hormone (folikuly stimulující hormon)
GnRH	Gonadotropin Releasing Hormone (hormon uvolňující gonadotropin)
LH	Luteinizing hormone (luteinizační hormon)

## Úvod

Základem pro přežití každého druhu je úspěšná reprodukce. Ta je výrazně ovlivněna genetickými predispozicemi jedinců a vnějším prostředím. Dříve bylo studium těchto vlivů zaměřeno na demografii (např. očekávaná plodnost, počet mláďat ve vrhu). V dnešní době se zkoumají především vlivy působící na úrovni gamet, kde reprodukce začíná. Předmětem zájmu jsou tedy faktory ovlivňující zrání, kvalitu, ovulaci oocytů, jejich získávání a následný přenos. Dnes se již v praxi uplatňuje mnoho biotechnologických opatření, které jsou kombinací molekulární a buněčné biologie, genových manipulací, fyziologie a anatomie. Mezi ty nejdůležitější patří *in vitro* fertilizace, inseminace, superovulace a synchronizace říje. Výzkumy se zaměřují hlavně na způsoby, jakými lze na základě obecných znalostí ovlivňovat pohlavní funkce (Říha a kol., 1999).

U všech živočichů mají faktory vnějšího prostředí výrazný vliv na fertilitu, především tedy na ovariální aktivitu (Robinson a kol., 1999; Crosignani a kol., 2002). Mezi hlavní činitele, které se podílí na reprodukci (tedy na kvalitě a kvantitě vyprodukovaných oocytů) se řadí akutní a chronické změny v přijímání potravy, teplota, tělesná kondice a věk samice (Kubovičová a kol., 2012; Robinson a kol., 1999; Crosignani a kol., 2002). V této práci je pozornost věnována zejména teplotě vnějšího prostředí působící na rozmnožování a kvalitu oocytů. Správné načasování asistovaného oplodnění během roku totiž může mít zásadní vliv na úspěšnost reprodukce.

Pro správné pochopení zákonitostí vývoje gamet je potřebná znalost struktur a funkcí, které jsou zodpovědné za jejich dozrávání. Detailní znalosti o morfologii a funkci pohlavních orgánů a gamet je tedy základní předpoklad pro úspěšné zvládnutí klinické a laboratorní praxe reprodukční medicíny (Pivko a kol., 2013).



## 1. Samičí pohlavní ústrojí skotu

Samičí pohlavní ústrojí zajišťuje základní rozmnožovací funkce – sekreci hormonů, tvorbu pohlavních buněk, proces oplození a vývoj zárodku až do porodu (Louda a kol., 2007). Pohlavní orgány jsou uloženy v pánevní dutině a skládají se z vaječníků, vejcovodů, dělohy, pochvy a vulvy (Kliment a kol., 1989; Louda a kol., 2007).

### 1.1 Vaječníky (Ovaria)

Funkce vaječníků spočívá v gametogenezi a tvorbě samičích pohlavních hormonů (Louda a kol., 2007). U všech domácích savců (kromě klisen) je stavba vaječniku stejná jako u člověka. Liší se však svým tvarem a velikostí. Vaječníky patří mezi vnitřní samičí pohlavní žlázy s endogenní i exogenní sekrecí. Nacházejí se u kyčelní kosti, kde jsou zavěšeny pomocí vazů. Vazem vaječnickovým jsou pak spojeny s děložními rohy. Mají oválný tvar (připomínající švestku, či mandli), přičemž celková velikost značně kolísá podle stáří samice. Šedorůžový povrch je tvořen jednovrstevným kubickým epitelem, který se chybně označuje jako epitel zárodečný, avšak na tvorbě nových pohlavních buněk se po narození nijak nepodílí. Těsně pod tímto epitelem se nachází vrstva vaziva - *tunica albuginea*. Následuje kůra a dřev. Dřev (*medula ovarii*) je protkána množstvím cév a nervů. Kůru vaječniku (*cortex ovarii*) tvoří buněčné vazivo a množství folikulů – vaječnickových váčků, které se skládají z oocyty a kumulárních buněk. Tyto váčky od puberty postupně dozrávají.

## 2. Gametogeneze

Při gametogenezi dochází k tvorbě pohlavních buněk – gamet. Rozlišujeme ji na spermatogenezi a oogenezi. Jelikož gamety mají haploidní sadu chromosomů, musí vznikat odlišným typem buněčného dělení. Toto dělení se nazývá meióza (dělení redukční). Gamety se tvoří z gonocytů (tj. prvopohlavní buňky). Koncem prvního měsíce začínají tyto buňky migrovat ze žloutkového váčku k základům gonád. Během toho dochází k řadě mitotických dělení. Koncem pátého týdne zárodečné buňky podstupují samotnou gametogenezi a cytodiferenciaci (zrání; Sadler, 2006; Alberts a kol., 1998).

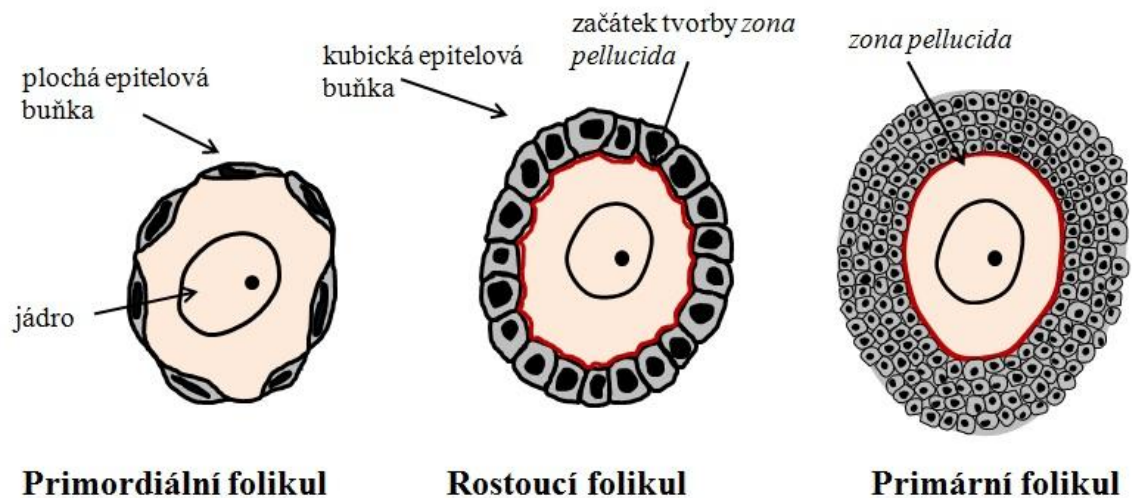
## 2.1 Oogeneze

Vývoj samičích pohlavních buněk začíná v okamžiku, kdy prvopohlavní buňky dorazí do základu vaječníku, kde se z nich ihned začnou tvořit nediferencované *oogonie*. *Oogonie* se koncem třetího měsíce shlukují do klastrů, které jsou obklopeny jednou vrstvou epitelových (=folikulárních; kumulárních) buněk. Tyto ploché folikulární buňky pocházejí z epitelu tvořícího povrch ovaria. Většina oogonií prochází dalším mitotickým dělením. Některé se však zastaví v profázi prvního meiotického dělení a dávají tak vzniknout tzv. primárnímu oocytu. Primární oocyt obklopený folikulárními buňkami se nazývá *primordiální folikul* (obr. 1). Těsně před ukončením prenatalního vývoje dosáhnou všechny primární oocyty do profáze prvního meiotického dělení. Nepokračují však dále do metafáze, ale vstupují do diplotenního stádia. Tuto blokaci zajišťuje inhibitor zrání oocytu (OMI – oocyte maturation inhibitor). V pubertě začne každý měsíc dozrávat 15–20 folikulů, které procházejí třemi stádii:

- primárním (preantrálním)
- sekundárním (antrálním)
- preovulačním

V průběhu růstu primárního oocytu mění folikulární buňky svůj tvar z plochého na kubický (obr. 1), množí se a vytváří tak vrstevnatý epitel kumulárních buněk. Celý tento útvar se nazývá primární folikul (obr. 1). Folikul roste, přičemž oocyt a kumulární buňky produkují glykoproteiny, čímž se tvoří tenká vrstva – *zona pellucida* (obr. 1). Postupným vývojem se mezi folikulárními buňkami vytvářejí dutinky – vzniká antrum a folikul se nazývá antrální (sekundární). Při každém ovulačním cyklu se vyvíjí více folikulů, avšak jen jeden – preovulační – dosáhne plné zralosti, ostatní zanikají. Jakmile sekundární (Graafův) folikul dozraje, vzestup hladiny luteinizačního hormonu (LH) navodí preovulační růstovou fázi. Meióza I je dokončena a jejím výsledkem je vznik dvou nestejných buněk. Jedna buňka – sekundární oocyt (*ootida*) – získá prakticky veškerou cytoplasmu, druhá – pólová buňka (první pólové tělísko) nezískává téměř žádnou, je výrazně menší a později zaniká. První pólové tělísko se nachází mezi membránou sekundárního oocytu a *zona pellucida*. Dále buňka (sekundární oocyt) pokračuje do druhého meiotického dělení, ale opět zůstává v metafázi blokována. Meióza II je dokončena jedině v případě, že je

oocyt oplozen. Pokud k oplození nedojde, buňka zaniká (např. Sadler, 2006; Šafářová, 2011).



Obr. 1: Vývoj folikulu (vlastní kresba)

Protože samičí gametogeneze má několik výrazných rozdílů, oproti spermatogenezi, je vhodné na nejvýznamnější rozdíly upozornit.

## 2.2 Rozdíl ve vývoji samčích a samičích gamet

Přestože se při oogenezi i spermatogenezi uplatňuje meióza, není tento vývoj zcela shodný. Liší se v několika významných bodech.

(1) V případě oogeneze je během meiotického dělení cytokineze nerovnoměrná. Jedna buňka – sekundární oocyt pohltí v podstatě veškerou cytoplasmu, ostatní buňky (tzv. polární tělíska) zanikají. Zatímco při spermatogenezi jsou výsledkem meiózy 4 plnohodnotné pohlavní buňky.

(2) Samičí pohlaví má již při narození vytvořené všechny primární oocyty, žádný nový nevzniká. Naproti tomu u samčího pohlaví se buňky, ze kterých se vyvinou spermie, tvoří kontinuálně v průběhu celého života.

(3) Spermatogeneze je proces nepřetržitý, kdežto pro oogenezi jsou typické „klidové“ periody (Cambell a Reece, 2008).

Uvedené rozdíly mezi spermatogenezi a oogenezi jsou pouze základními rozdíly procesu vzniku samčích a samičích gamet. Další rozdíly můžeme najít z genetického pohledu v rámci transkripce a rekombinace a také v rámci diferenciací gamet (Handel a Eppig, 1998).

### 3. Biotechnologické metody u savců

Významným mezníkem pro výzkum reprodukce zvířat bylo zavedení biotechnologických metod, které jsou v současné době nejvíce rozpracovány v chovu skotu. Významné postavení mají tyto postupy také v oblasti práce s genovými zdroji a to u celé řady různých druhů zvířat. Biotechnologické metody jako např. embryotransfer, oplodnění in vitro atd. přitom přinesly do výzkumu ovariální aktivity velké množství nových informací, a proto je důležité tyto metody krátce připomenout.

***In vitro fertilization (IVF)*** je metoda umělého oplodnění, mimo tělo zvířete. Její součástí je příprava spermií a oocytů. Pro umělé oplodnění skotu se většinou používají spermie již dříve odebrané a zamražené v tekutém dusíku (ale není to podmínkou).

Po odebrání samčího ejakulátu se provádí tzv. kapacitace. Kapacitace je v podstatě souhrn maturačních (zracích) změn spermie, které za normálních okolností probíhají v pohlavním ústrojí samice. Při přípravě spermií býků na in vitro se jako kapacitační médium používá obvykle Tyrodovo médium obsahující např.  $Ca^{2+}$ , sérový albumin, zdroje energie, heparin, NaCl, KCl, pyruvát, laktát aj. Současně se provádí také příprava oocytů. Oocyty se promíchají v promývacím roztoku, aby se zbavily maturačního média. Následně se udělá fertilizační kapka skládající se ze speciálního minerálního oleje a fert-talp-media (FTP), které obsahuje kromě heparinu také látky důležité pro závěrečnou kapacitaci spermií. Do takto připravené fertilizační kapky se přenesou spermie (asi 20  $\mu$ l) a vajíčka. Následuje inkubace (20 h při 39 °C). Po uplynulé době se provede vyhodnocení. Zygoty se očistí od zbytku kumulárních buněk a spermií a sumarizují se úspěšně oplodněné oocyty. Oplodněné jsou pouze ty oocyty, které byly v metafázi II. Nedožralá vajíčka, která zůstala zastavena v metafázi I, oplodněná být nemohou. Kromě tohoto typu in vitro, kdy se nechají pohlavní buňky splynout samovolně, lze provést také tzv. metodu ICSI – intra cytoplasmatická injekce (intra-cytoplasmatic-sperm-injection). V tomto případě se jedna spermie vpíchne pomocí mikromanipulátoru do oocytu a je tedy větší šance, že dojde k oplodnění. Vzniklé zygoty se dále kultivují v médiu ( IVC - in vitro culture) obsahující výživné buňky. Délka kultivace je asi 6 dní při teplotě 39 °C. Během této doby se každý den provádí kontrola. Hodnotí se správnost průběhu rýhování buněk, případně se zaznamenává výskyt fragmentů (Fellnerová a Bezdíček 2014). Správně vyvíjející se embrya jsou šestý den nachystána k transferu (ET - embryotransfer) do dělohy samice – tzv. příjemkyně.

Další metodou umělého oplodnění je *inseminace*. Při inseminace je průběh přípravy spermií v podstatě stejný, jako při IVF, avšak inseminační dávka je přímo aplikována do dělohy samice, kde také dojde k oplodnění.

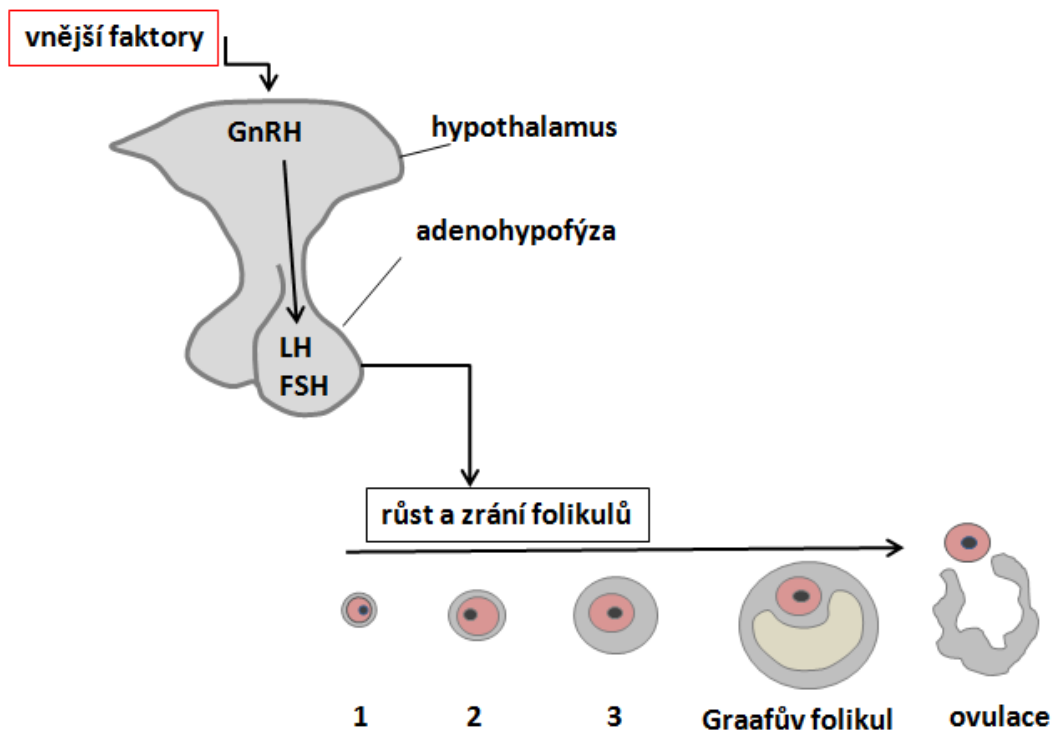
Oběma těmito metodám předchází tzv. *superovulace* – tedy hormonálně indukovaná ovulace, za účelem získání co největšího počtu oocytů. K stimulaci ovariálního systému se nejčastěji používá gonadotropin FSH. Umělým podáním FSH dojde k zvýšení jeho přirozené endogenní hladiny (Hegedúšová, 2011). Superovulaci lze vyvolat také jinými preparáty – např. PMSG (Pregnant mare serum gonadotropin) či HMG – Human menopauza gonadotropin (Říha a kol., 1999). Přesto, že se ovulace indukuje uměle, tak její výsledek je značně variabilní, neboť závisí na mnoha vnitřních a vnějších faktorech. Např. na fyziologickém stavu, plemenné příslušnosti, ročním období či stavu folikulů v době, kdy je stimulace započata (Hegedúšová, 2011).

#### 4. Vlivy působící na reprodukci

Reprodukce je kvantitativní proces, který značně ovlivňují nejen genetické predispozice, ale také environmentální faktory (Stádník a Louda, 1999). Nedílnou součástí celého reprodukčního procesu (ať už přirozeného či umělého) je náležitý průběh oogeneze (resp. folikulogeneze) v ovariích samice (Kubovičová a kol., 2012). Mezi vnější podmínky ovlivňující ovariální funkce patří zejména kvantita a kvalita výživy, roční období, klimatické podmínky a tělesná kondice (Crosignani a kol., 2002; Kubovičová a kol., 2012; Robinson a kol., 1999). Všechny vnější faktory obvykle spolupůsobí na daný druh a celková reakce jedince se pak odvíjí od jeho tělesné konstituce a kondice, genetickém založení a zdraví (Louda a kol., 2007). Mnoho zvířat je do jisté míry k tepelnému stresu adaptováno. Tato adaptace však je značně redukována, když ve snaze zvýšit užitkovost jsou původní adaptovaná plemena v tropických a subtropických oblastech nahrazována neadaptovanými plemeny s vysokou produkcí (Doležal, 2010).

Působení vlivů vnějšího prostředí se projevuje díky exteroceptorům, které jsou součástí smyslových orgánů. Skrze tyto receptory pak dochází k dráždění hypotalamo-hypofyzárního systému a kůry velkého mozku, jenž v konečném důsledku řídí průběh pohlavních funkcí (Louda a kol., 2007). Nejprve jsou stimuly vedeny do hypotalamu, kde se jako reakce na příchozí signály tvoří řídicí hormony – GnRH (Gonadotropin Releasing Hormon). GnRH řídí sekreční činnost předního laloku hypofýzy. Jedná se především o sekreci FSH (folikuly stimulující hormon) a LH – luteinizační hormon (Louda a kol., 2007). Jak FSH, tak LH ovlivňují správnou funkci vaječnicků a kvalitu folikulů – tedy jejich růst a zrání. Ve stresových podmínkách produkce těchto hormonů klesá (Lucy M., 2002). Zjistilo se, že folikuly hůře rostou a produkují méně estradiolu, jenž kontroluje embryonální vývoj a projevy říje (Wilson a kol., 1998). Na obrázku 2 je schematicky znázorněno hormonální řízení ovariální aktivity.

V případě hormonálně indukované ovulace je problémem široká variabilita superovulační odpovědi (Szabari a kol., 2008).



**Obrázek 2:** Schématický náčrt hormonální regulace růstu a zrání folikulů. (Vlastní kresba). Vnější faktory ovlivňují uvolňování GnRH (Gonadotropin Releasing hormon), ten následně stimuluje uvolnění FSH (Follicles stimulating hormone) a LH (Luteinizing hormone). 1, 2 a 3 stádia vývoje folikulu – primordiální (1); primární (2) a sekundární (3).

#### 4.1 Vliv sezóny a tepelný stres

Představy o tom, jaký přesně efekt má roční období na ovariální aktivitu a úspěšnost superovulace, se značně lišily. Je poměrně obtížné ostatní vlivy zcela eliminovat a dochází k mnoha interakcím a zpětným vazbám. Podle autorů Samunde a Chupin (1981) lze provádět superovulaci v průběhu celého roku. Avšak v poslední době snad všechny výzkumné studie, experimenty a závěry vypovídají o nepříznivém účinku vysokých teplot (Doležal, 2010). Vysoké letní teploty u skotu zvyšují rychlost dýchání a rektální teplotu, přičemž úspěšná produkce embryí in vitro je snížena (Ferreira a kol., 2011). Putney a kol. (1988) uvedli, že embrya a vajíčka by měla být odebírána během chladnějšího období. Tato zjištění korelují s tvrzením, že vysoké teploty a vlhkost mají negativní vliv na schopnost dozrávání oocytů (Rehman a kol., 1994) a že inseminace v horkých měsících roku je u skotu spojena se snížením fertility

(Putney a kol., 1989; Rensis a Scaramuzzi, 2003). Také Pradhan a kol. (2007) uvedl, že celkové počty vajíček a embryí jsou ovlivněny ročním obdobím – v zimě byly tyto počty vyšší. Ovlivněna je nejen kvantita, ale také kvalita vyprodukovaných oocytů. Výrazný pokles v jejich kvalitě v průběhu teplejší sezóny zaznamenal Rocha a kol. (1998) nebo Al-Katanani a kol. (2002). Chlazení krav po dobu 42 dní před plánovanou aspirací však nezabránilo letnímu snížení kvality oocytů. K poškození vajíček dochází pravděpodobně během periody předcházející antrálnímu stádiu folikulu (tzn. dříve, než začalo chlazení). Navíc teplotní stres zpomaluje růst dominantního folikulu, čímž může dojít k ovulaci méně kompetentních oocytů (Badinga a kol., 1993). Jedním z možných mechanismů, jakými může teplotní stres narušit zrání oocytů, je snížená produkce steroidních hormonů (Wolfenson a kol., 1997; Wilson a kol., 1998). Je však možné, že sezónní vlivy představují také jiný nežli tepelný stres (Al-Katanani a kol., 2002). Vliv teplotního stresu na reprodukci byl prokázán také v množství a kvalitě embryí, získaných v rámci superovulace krav. Nepříznivý vliv letního období vs. chladnější období roku se konkrétně projevil v podílu degenerovaných embryí (25,9 vs. 20,5%) a také v celkovém množství získaných (3,2 vs. 5,9 ks) a vhodných embryí (2,3 vs. 3,8 ks) pro embryotransfer (Bezdíček a kol., 2015).

Obecně lze říci, že jakékoli náhlé změny či dlouhodobé vystavení extrémně nízkým či vysokým teplotám v průběhu dne i noci nepříznivě ovlivňují reprodukci. Plemenice mají z důvodu tepelného stresu sníženou délku a intenzitu říje (Jordan, 2003). Nejvyšší procento zabřezávání plemenic lze tedy pozorovat v jarním a podzimním období, nejnižší pak v období letním (Louda a kol., 2007). Vysoké teploty totiž působí negativně na základní fyziologické pochody, čímž zatěžují organismus zvířat, která se pak snaží s tímto stresem vyrovnat (Doležal, 2010). Kromě toho změny v genetice a fyziologii zvířat způsobují, že jsou tato zvířata často méně schopna adaptovat se na podmínky prostředí s vysokými teplotami a tělesnou teplotu regulovat (Doležal, 2010). Nejvíce citlivé jsou k tepelnému stresu dojící krávy z důvodu značné produkce metabolického tepla při tvorbě mléka (Lucy, 2002). Problém však je, když se hledání způsobů k zmírnění tepelného stresu soustřeďuje pouze na období vrcholné laktace, neboť v ostatních fázích cyklu jsou krávy na vysoké teploty rovněž citlivé (Doležal, 2010).

Chovatelé si stále více uvědomují, že tepelný stres je velmi významný faktor, neboť neovlivňuje jen samotné rozmnožování, ale také celkový zdravotní stav a



pohodu zvířat a tím pádem užítkovost a ekonomické výnosy (Lucy, 2002; Doležal, 2010).

#### **4.2 Vliv výživy a tělesné kondice**

Výživa významným způsobem ovlivňuje nástup pohlavní zralosti i následné projevy pohlavních funkcí během života jedince (Louda a kol., 2007). Při nesouladu v příjmu živin a jejich skutečné potřebě dochází k poruše metabolismu steroidních hormonů a ke snížení fertility (Kubovičová a kol., 2012). Negativní účinky má nedostatek živin, stejně tak ale i jejich nadbytek (Říha a kol., 2004). Negativní energetická bilance v důsledku nesprávné výživy může vyvolat změnu tělesné kondice, což má následně vliv na průběh folikulogeneze a kvalitu oocytů (Kubovičová a kol., 2012). Mezi vážné projevy podvýživy patří: projevy tiché říje, zastavení (či nepravidelné) cyklování, poruchy ovulace, nesprávný vývoj folikulů a embryonální mortalita (Říha a kol., 2004). Překrmováním pak dochází k zvyšování hladiny glukózy a mastných kyselin (FA) v krvi, což v konečném důsledku má také neblahý vliv na životaschopnost embrya. Je zajímavé, že účinky nenasycených mastných kyselin jsou u in vitro oplození odlišné – se zvyšující se koncentrací FA ve folikulárních buňkách a oocytech se zlepšuje životaschopnost embrya a jeho odolnost při kryokonzervaci (Santos a kol., 2008).

#### **4.3 Vliv věku**

Věk jalovic se udává jako počet dní od narození jalovice do prvního oplození (Fröhderová a Havlíček, 2011). Chovatelé by měli věk mladých býčků a plemenic pečlivě sledovat již asi 2 měsíce před nástupem puberty. V pubertě (stejně jako u lidí) dochází vlivem sekrece pohlavních hormonů k pohlavní dospělosti, která u skotu nastává během 7. – 12. měsíce. Kolem 5. měsíce života se tedy musí od sebe obě pohlaví oddělit, aby nedošlo k předčasnému (nežádoucím) zabřeznutí. Takto brzké zabřeznutí ve většině případů vede ke komplikacím během březosti a porodu (Louda a kol., 2007). Kdy se jedinec stane pohlavně dospělým, závisí na třech faktorech – na plemenné příslušnosti, zdravotní kondici a na kvalitě výživy (Louda a kol., 2007; Fröhderová a Havlíček, 2011). Vyšší úroveň výživy lze částečně nástup puberty urychlit (Louda a kol., 2007).

První zapouštění závisí především na plemenné příslušnosti, např. u českého strakatého skotu je to mezi 16. a 19. měsícem (Fröhderová a Havlíček, 2011). Pozdější zapouštění jalovic má pozitivní vliv na jejich dlouho-výkonnost (Louda a kol., 2007).

Během prvního otelení je obvykle kvalita embryí nejnižší (Walters a kol., 2002). Celkové dospělosti (tedy jak pohlavní tak tělesné) dosahuje skot kolem pátého roku života (Louda a kol., 2007). Silva a kol. (2009) zkoumali výsledky superovulace u krav ve věku od 2 do 21 let. Od krav starších 14 let bylo v průměru získáno o  $5,0 \pm 0,2$  méně embryí celkem a o  $3,0 \pm 0,1$  méně přenosuschopných embryí než od mladých krav ( $p < 0,001$ ).

## 5. Cíle práce

Cílem předložené diplomové práce je vyhodnocení vlivu různých období roku na reprodukci zvířat z pohledu ovariální aktivity. Ve spolupráci se specializovaným pracovištěm byly na vaječnicích tura domácího (*Bos primigenius f. taurus*) posouzeny 4 parametry:

1. počet primárních folikulů
2. počet cyst
3. počet vyaspirovaných oocytů
4. procento dozrálých oocytů po kultivaci v médiu

## 6. Materiál a metody

### 6.1 Sběr dat

Výzkum probíhal během roku 2014 a 2015 na specializovaném pracovišti, kterým byl Výskumný ústav živočišnej výroby, Národné poľnohospodárske a potravinárske centrum (NPPC) Nitra, v oddělení pro genetiku a reprodukci hospodářských zvířat. Jedná se o pracoviště akreditované Ministerstvem zemědělství Slovenské republiky. Toto centrum jsem navštívila celkem třikrát – ve třech teplotně rozdílných obdobích roku. Maximální teploty jsem získala z oficiálně publikovaných údajů Slovenského hydrometeorologického ústavu a internetového serveru whetheronline (URL 1, URL 2). Uvedené teploty tak odpovídají teplotám vnějšího prostředí, ve kterém se jedinci tura domácího nacházeli.

Tato tři období je možné z meteorologického pohledu charakterizovat jako období jarní, které začíná 1. března (sledování v březnu 2014, 15 °C), podzimní začínající 1. září (sledování v září 2014, 22 °C) a zimní (sledování začátkem února 2015, 6 °C). V dalším textu jsou takto tato období označována.

Letní období nebylo do studie zahrnuto z důvodu uzavření pracoviště pro výzkum.

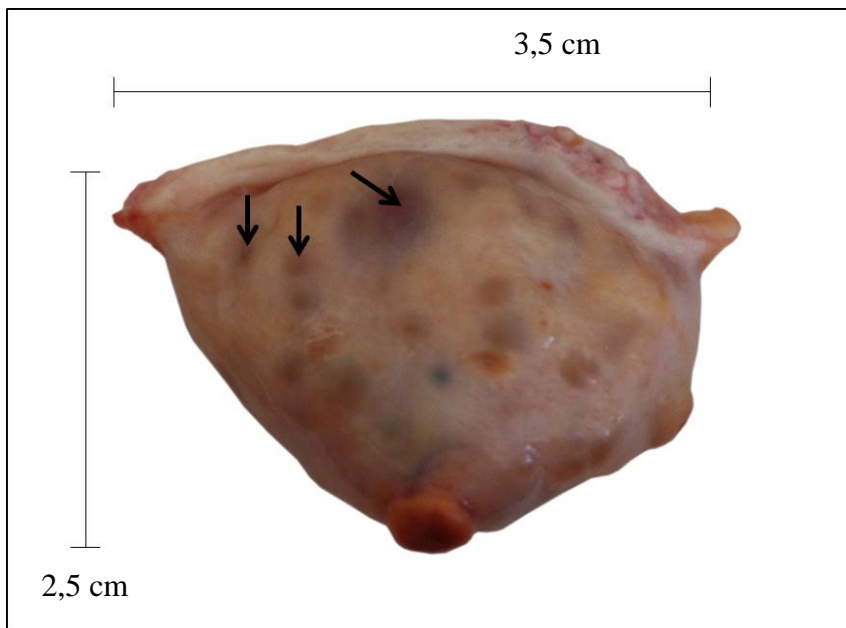
Ovaria tura domácího určená pro mou práci byla dopravena na výzkumný ústav v izotermických boxech při teplotě 25 – 30 °C ihned po usmrcení a jatečním opracování zvířete. Zpracovávání vaječnicků tedy začalo do 2 hodin od porážky. Pro vyhodnocení vlivu ročního období na ovariaální aktivitu byly použity 4 parametry:

1. počet primárních folikulů
2. počet cyst
3. počet vyaspirovaných oocytů
4. procento dozrálých oocytů po kultivaci v médiu

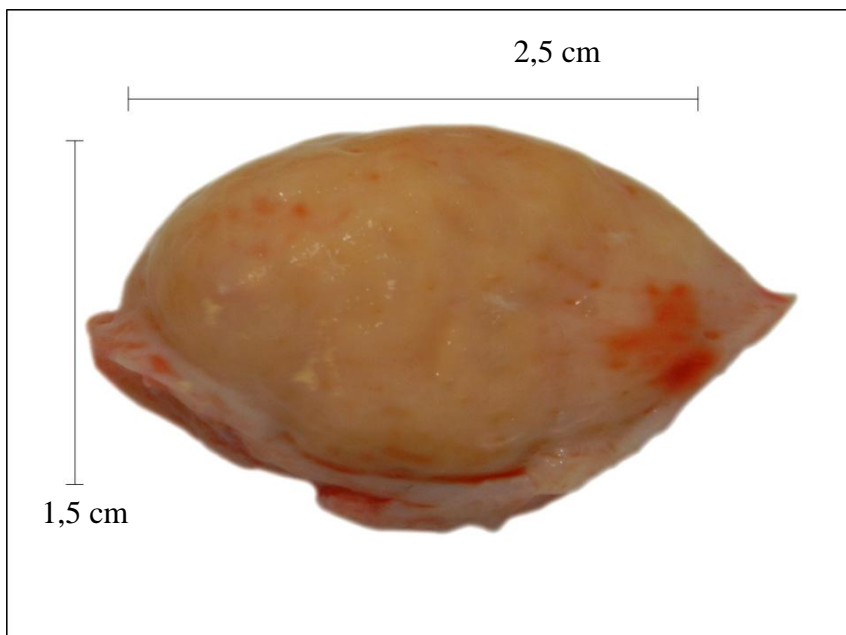
Vlastní práce byla tvořena několika kroky, kterým předcházelo očištění vaječnicků od zbytků oviduktů a vazů a jejich promytí ve fyziologickém roztoku a v 70 % alkoholu.

Prvním krokem bylo **vizuální zhodnocení ovarii**. Nejprve jsem pomocí pravítka změřila velikost (délku a šířku) a spočítala množství primárních folikulů, které jsou patrné jako různě velké černé skvrny na povrchu epithelia (obr. 3). Vaječnický, jejichž velikost byla menší než 3 cm, jsem vyloučila, neboť se jednalo o jalovice, které ještě nejsou zcela pohlavně dospělé (obr. 4). Zaznamenala jsem také počet přítomných cyst (obr. 5).

Obr. 3 – 5: Příklady posuzovaných vaječníků



Obr. 3: Vaječník o velikosti 3,5 x 2,5 cm s množstvím primárních folikulů (šipky).



Obr. 4: Vaječník mladého zvířete (jalovice). Velikost 2,5 x 1,5 cm, bez výrazných primárních folikulů.



Obr. 5. Degenerovaný vaječník s velkou cystou.

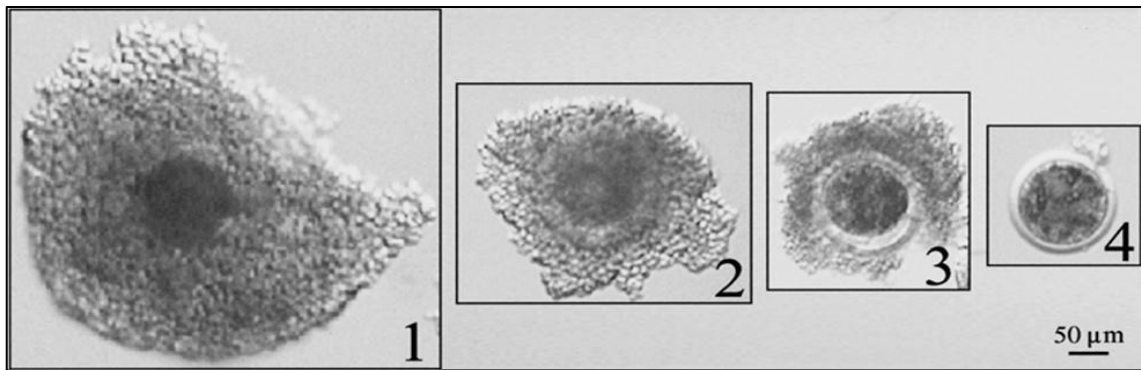
Druhým krokem byla **aspirace** (= zisk, nebo též punkce) kumulus-oocytárních komplexů (COCs). Aspirace byla provedena z folikulů o velikosti 2 až 8 mm pomocí injekční jehly a stříkačky. Tato práce vyžaduje velkou zkušenost, a proto tuto aspiraci provedl vyškolený pracovník výzkumného ústavu, což zajistilo průkaznost dosažených výsledků. Následně se z Petriho misky umístěné pod binokulární lupou MOTIC ze všech vyaspirovaných COCs vybraly pouze ty, které mají úplnou vrstvu kumulárních buněk (kumulární buňky musí být uspořádány minimálně ve třech vrstvách a měly by mít světle homogenní ooplazmu). Toto hodnocení vychází z klasifikace Gordona (1994), jenž na základě morfologických charakteristik dělí aspirované oocyty do 4 kategorií (Obr. 6).

Q1 – kompaktní vícevrstvý kumulus, homogenní cytoplasma

Q2 – kompaktní vícevrstvý kumulus, homogenní cytoplasma, ale s tmavšími oblastmi na okraji oocytu

Q3 – méně kompaktní kumulus s nepravidelnou cytoplasmou a místy s tmavšími skvrnami

Q4 – „nahé“ oocyty – kumulární buňky značně expandované a cytoplasma výrazně heterogenní



Obr. 6: Oocyty klasifikované na základě morfologických charakteristik (Gordon, 1994).

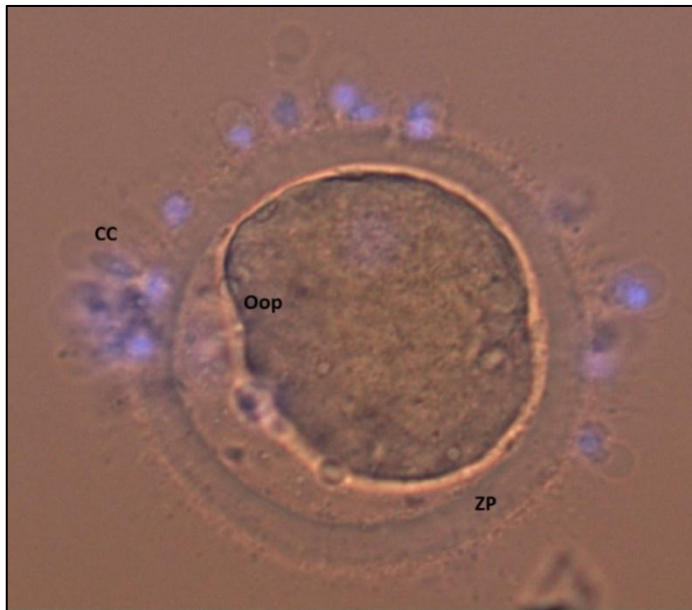
Kategorie Q4 je nevhodná pro další práci. Oocyty hodnocené jako Q1 – Q3 se následně třikrát promyly v promývacím médiu 199 HEPES Gibco, Auckland, Nový Zéland). Celkový počet vyaspirovaných oocytů je uveden v tabulce 7.

Po aspiraci oocytů následovala jejich **maturace** – zrání. Na maturaci bylo použité médium TCM-199 s GlutaMAXem (Gibco), s přidavkem pyruvátu sodného (0,2 mmol.l<sup>-1</sup>), gentamycinu (0,05 mg.ml<sup>-1</sup>), 10% fetálního, hovězího séra (FBS, BioWhittaker, Verviers, Belgie) a s přidavkem veterinárního přípravku Pluset obsahujícího hormonů FSH/LH (1/11.U., Calier Laboratories, Barcelona, Španělsko) Maturace probíhala 24 hodin, při 39 °C, ve zvlhčované atmosféře s 5% CO<sub>2</sub>.

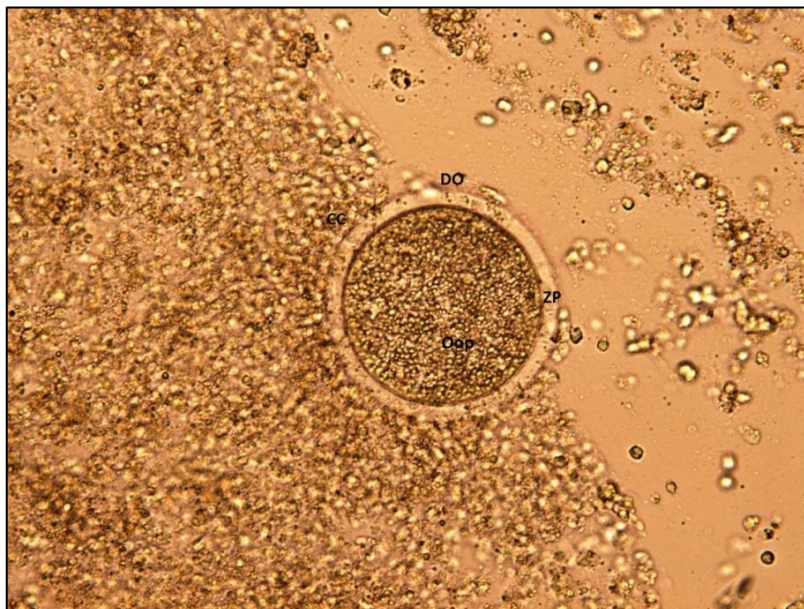
Po uplynutí 24hodin se oocyty zbavily kumulárních buněk – mechanicky (vortexováním) a chemicky – pomocí enzymu katalázy. Takto „očistěné“ se zamontovaly pomocí montovacího média na podložní sklíčka. Jako montovací médium se použil Vectashield s obsahem fluorescenčního jaderného barviva DAPI (Vector Laboratories, Burlingame, UK).

Posledním 4. krokem prováděným v laboratoři bylo **hodnocení oocytů**. Toto hodnocení jsem provedla s odbornou pomocí pod fluorescenčním mikroskopem Leica s příslušným filtrem. Úspěšnost dozrávání (maturace) se posoudila na základě přítomnosti kumulárních buněk, stavu ooplazmy a zony pellucidy (Obr. 7; 8; 9). Zhodnotila se také fáze meiotického dělení, ve které se oocyt nachází. Nezralé oocyty zůstávají ve fázi M I, zralé jsou již ve fázi M II (Obr 10). Sleduje se tedy výskyt pólového tělíska a metafázové destičky.

Obr. 7 – 10: Snímky pořízené světelným mikroskopem Leica



Obr. 7: Fluorescenční zobrazení: Oocyt s degenerovanou (smrštelou) ooplazmou (Oop), kolem svítí pozůstatky jader kumulárních buněk (CC), zona pelucida (ZP) neporušená. Z=320x, Barveno DAPI.

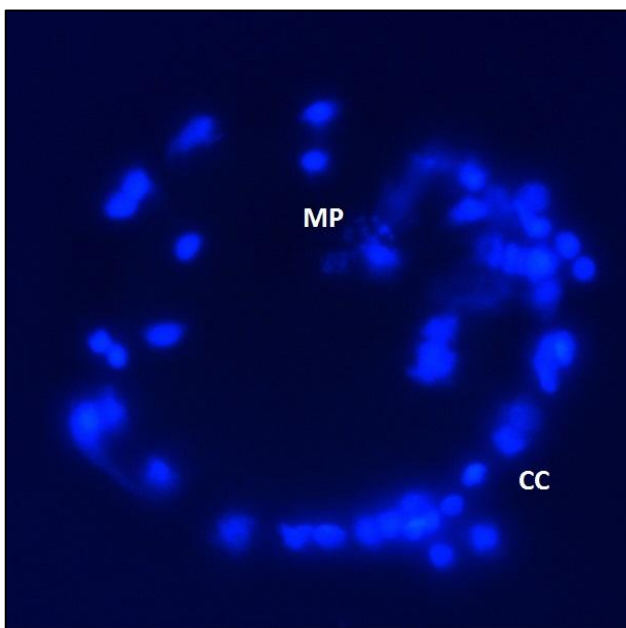


Obr. 8: Prematurovaný (= přezrálý) oocyt - denudovaná (oholená) část oocyty (DO), větší část má kumulární buňky (cumulus cells - CC) ve stádiu expanze. Zona pelucida (ZP) intaktní, nerovnoměrně granulovaná ooplazma (Oop).





Obr. 9: 2 maturované oocyty bez zřetelného pólového tělíska a metafázové destičky se zbytky kumulárních buněk (CC). *Zona pelucida* (ZP) u oocyty nalevo neporušená, u oocyty napravo prasklá. Z = 320x



Obr. 10: Fluorescenční zobrazení – MII oocyt (metafáze II) – zralý oocyt s metafázovou destičkou (metaphase plate – MP), pólové tělíska je nezřetelné. Kolem jasně září kumulární buňky (cumulus cells – CC) Barveno DAPI. Z = 320x

## 6.2 Analýza dat

Statistickou analýzu jsem provedla v programu STATISTICA 12.0 (Statsoft, 2013). V rámci sledovaných období roku (jaro, podzim, zima) byly pro početnosti primárních folikulů provedeny základní statistické výpočty (průměr, směrodatná odchylka, medián, modus, variační koeficient, minimální a maximální hodnota).

Vliv teplotních rozdílů během sledovaných období na reprodukci (početnost folikulů) byl proveden analýzou rozptylu (jednocestná ANOVA). Tato metoda umožňuje testovat rozdíl mezi třemi soubory dat (v daném případě období jaro – podzim – zima), které jsou na sobě nezávislé. Obecnou podmínkou pro použití metody ANOVA je homogenita rozptylů u testovaných skupin dat. Homogenita dat byla ověřena metodou Cochran, Hartley a Bartlett. Nakonec byl proveden post hoc test. Pomocí vícenásobného porovnání průměrů s Tukeyho kontrasty (Tukey HSD test) byla porovnáována jednotlivá období mezi sebou.

Statisticky významný vliv byl stanoven na  $\alpha = 0,05$ . Pro názornost byly výsledky zpracovány v programu STATISTICA 12.0 (StatSoft, 2013) ve formě tabulek a grafů. Pro grafickou vizualizaci distribuce dat byly použity histogramy a krabicové grafy.

## 7. Výsledky

K zjištění vlivu teplotně rozdílných období na reprodukci tura domácího byla sledována jejich ovariální aktivita. Ovariální aktivita byla hodnocena na základě 4 parametrů, kterými bylo množství primárních folikulů a cyst na vaječniku a počet aspirovaných oocytů a úspěšnost maturace. Toto hodnocení proběhlo za meteorologického jara, podzimu a zimy při teplotách 15 °C, 22 °C, a 6 °C.

Při analýze jsem porovnávala počet primárních folikulů v různém období roku. Po vyloučení nevhodných vaječníků (tj. < 3 cm) byl celkový počet vyšetřených vaječníků 55 (jaro – 22, podzim – 18, zima – 15). Primárních folikulů bylo při vizuálním hodnocení zjištěno 272 na jaře, 297 na podzim a 193 zimą (pro přehlednost zaznamenáno v tab. 1). Ve všech sledovaných obdobích byly počty folikulů srovnatelné – na jeden vaječník jich průměrně bylo na jaře 12,4 ks (SD = 7), na podzim 16,5 ks (SD = 8,5) a v zimě 12,9 ks (SD = 6,6, tab. 2; obr. 11). Nejvíce folikulů v jednom vaječniku bylo 34 a to v podzimním období. Nejmenší počet byl zaznamenán v období jarním (1 folikul ve vaječniku). V podzimním období byla také největší variabilita v počtu folikulů na jeden vaječník. Grafické znázornění rozdělení četností v počtu folikulů v různých obdobích zobrazují obr. 12., 13., a 14.

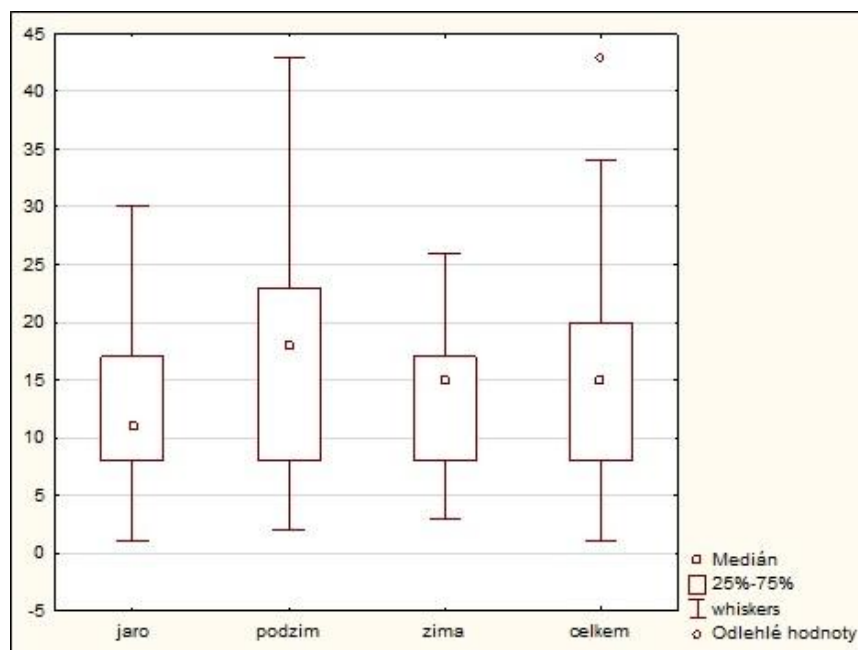
Po vyhodnocení homogenity rozptylů (tab. 3) sledovaných souborů dat byl použit post-hoc Tukeyho HSD test, ze kterého je patrné, že rozdíly v počtu folikulů mezi jednotlivými měsíci navzájem nebyly statisticky průkazné (tab. 4). Statisticky průkazné nebyly ani rozdíly v počtu cyst mezi sledovanými obdobími (tab. 5). Tomuto statistickému hodnocení také předcházela test homogenity (tab. 6).

Tab. 1: Počty vyšetřených vaječníků a primárních folikulů v jednotlivých obdobích roku.

	<b>počet vaječníků</b>	<b>počet primárních folikulů</b>
jaro	22	272
podzim	18	297
zima	15	193

Tab. 2: Základní statistické charakteristiky počtu primárních folikulů z jednoho vaječníku v jednotlivých obdobích roku.

	počet	průměr	medián	modus	frekvence modu	min.	max.	SD	R
jaro	22	12,4	11,0	20	4	1	30	7	57
podzim	18	16,5	16,5	15	3	2	34	8,5	51,5
zima	15	12,9	15,0	17	3	3	26	6,6	51



Obr. 11: Krabicové grafy (Box plots) počtu folikulů v různém období roku.

Tab. 3: Tabulka testu homogenity rozptylů počtu folikulů.

Hartley F-max	Cochran C	Bartlett $\chi^2$	df	p
1,673	0,437	1,144	2	0,564

Tab. 4: Průkaznost rozdílů v počtu folikulů v různém období - post-hoc Tukeyův HSD test. Čísla v tabulce jsou p hodnoty.

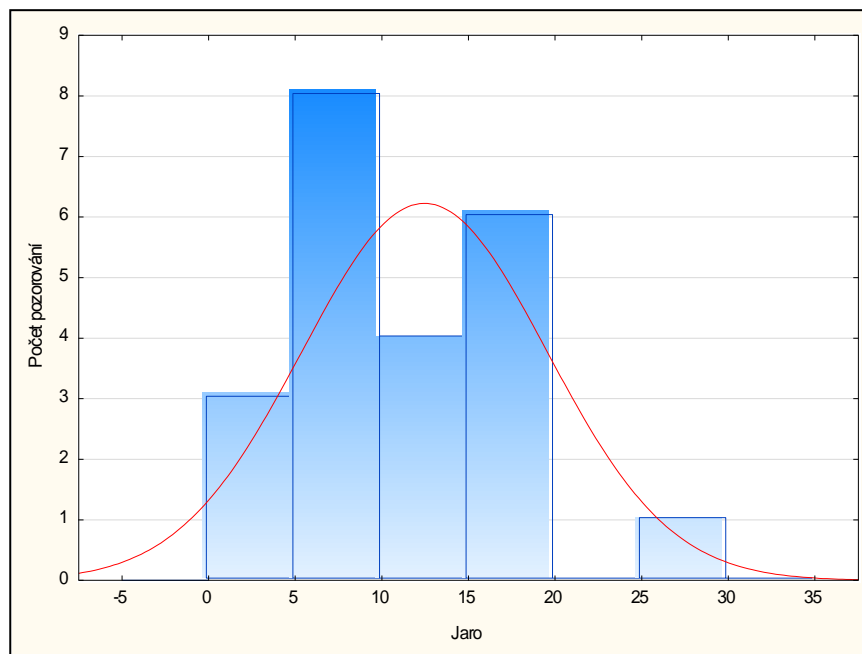
Období-průměr	jaro 12,364	podzim 16,500	zima 12,867
jaro		0,196	0,978
podzim	0,196		0,349
zima	0,978	0,349	

Tab. 5: Průkaznost rozdílů v počtu cyst v různém období – post-hoc Tukeyův HSD test. Čísla v tabulce jsou p hodnoty.

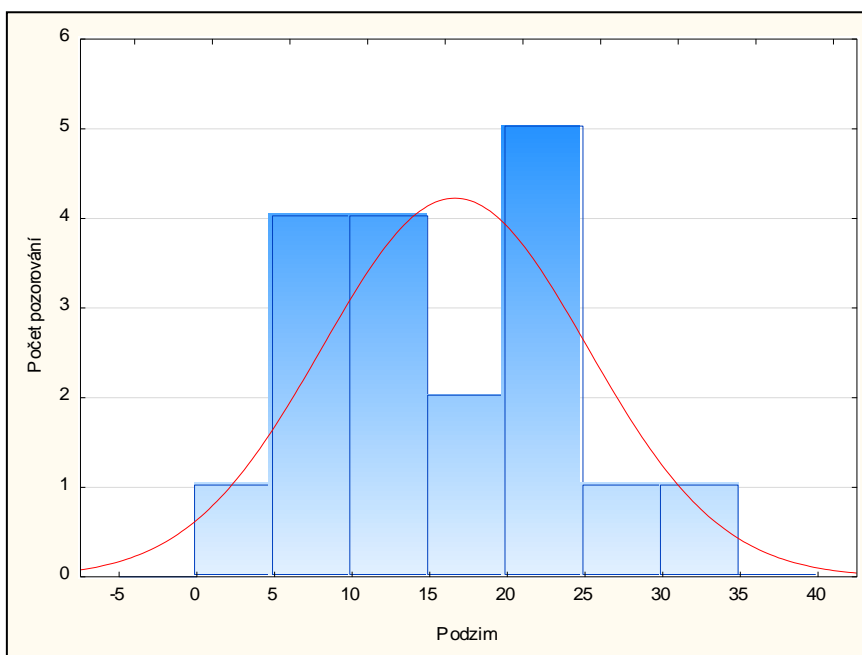
Období-průměr	<b>jaro 0,590</b>	<b>podzim 0,722</b>	<b>zima 0,333</b>
jaro		0,890	0,671
podzim	0,890		0,438
zima	0,671	0,438	

Tab. 6: Tabulka testu homogenity rozptylů počtu cyst.

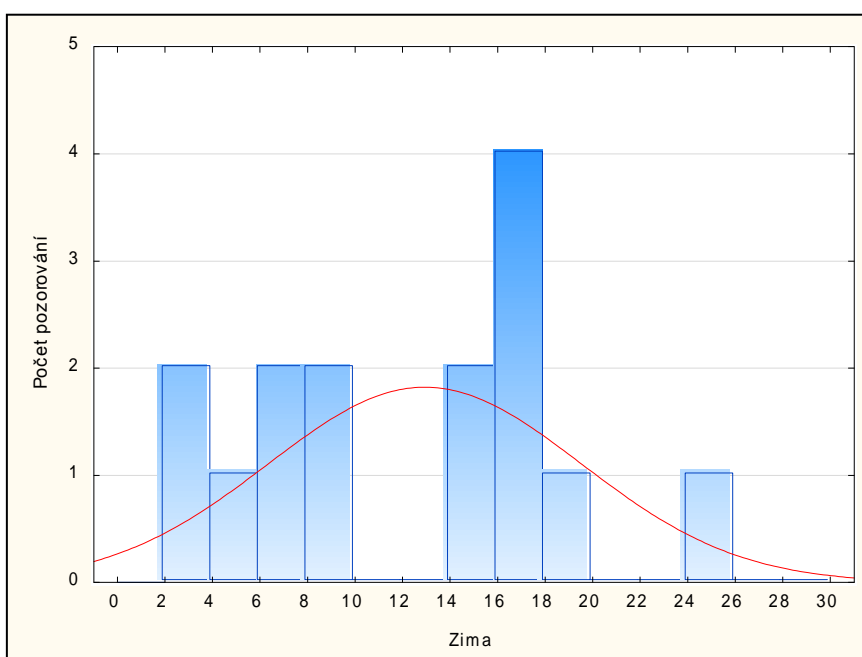
Hartely	F-max	Cochran C	Bartlett $\chi^2$	df	p
2,202		0,479	2,404	2	0,301



Obr. č. 12: Grafické znázornění rozdělení četností v počtu folikulů v období - jaro



Obr. č. 13: Grafické znázornění rozdělení četností v počtu folikulů v období - podzim



Obr. č. 14: Grafické znázornění rozdělení četností v počtu folikulů v období - zima

V jarním období bylo ze 119 vyaspirovaných oocytů (resp. COCs) 53,8 % vhodných a tedy použitých pro maturaci. V podzimním období ze 140 vyaspirovaných oocytů splňovalo podmínky pro použití k maturaci 45,7 % oocytů a v zimním 58,1 %. Následná úspěšnost dozrávání byla na jaře 71,8 %, na podzim 68,8 % a v zimě 70,9 %. V podzimním období bylo nejnižší procento oocytů použitých pro maturaci, avšak následná úspěšnost maturace nijak ovlivněna nebyla. Nejenže tedy byla kvantita primárních folikulů podobná, ale také kvalita aspirovaných oocytů se dá označit za shodnou (tab. 7).

Tab. 7: Počet vyaspirovaných oocytů a úspěšnost maturace

	<b>počet aspirovaných oocytů</b>	<b>počet oocytů použitých pro maturaci</b>	<b>% oocytů použitých pro maturaci</b>	<b>úspěšnost maturace (%)</b>
jaro	119	64	53,8	71,8
podzim	140	64	45,7	68,8
zima	136	79	58,1	70,9

## 8. Diskuze

V této práci byla prokázána vhodnost chladného období roku (jaro, podzim, zima) pro dosažení stabilních výsledků v počtu primárních folikulů, aspirovaných oocytů, cyst a také v úspěšnosti maturace. K podobným výsledkům došli také jiní autoři, a to nejen v rámci výzkumu v oblasti aspirace oocytů, ale také v rámci embryotransferu skotu. Al-Katanani a kol. (2002) prokázali snížení průměrného počtu získaných oocytů na krávu vlivem teplotního stresu (19,3 ks), zatímco u zvířat s možností ochlazení v letním období byl počet získaných oocytů (25,9 ks) shodný s chladnějším obdobím roku (25,1 ks). Negativní vliv teplotního stresu a naopak stabilní výsledky v chladnějším období roku prokázal v rámci embryotransferu také Bezdiček a kol. (2015). Autoři uvádějí při srovnání studeného (listopad až březen), mírného (duben, květen, říjen) a horkého (červen až září) období roku průkazné rozdíly v počtu vypláchnutých embryí (5,9; 5,8; 3,2 ks), vhodných embryí (3,8; 3,5; 2,3 ks) a podílu degenerovaných embryí (20,5; 20,9; 25,9 %) především ve vztahu k horkým měsícům. V chladnějším a teplotně středním období roku přitom bylo dosaženo velmi vyrovnaných a stabilních výsledků.

Pro chovatele může mít tento poznatek význam při snaze udržování homotermie zvířat za co nejmenších ekonomických ztrát. V těchto obdobích totiž nedochází k tepelnému stresu a není tedy ještě nutné žádné zvláštní opatření při ustájení za účelem dodržování podmínek welfare. Welfare, či pohoda zvířat, představuje, *sensu lato*, stav dokonalého psychického a fyzického zdraví, kdy zvíře žije v kooperaci se svým prostředím. Narušení welfare pak vede ke změně fyziologických pochodů v organizmu (Filipčík, 2014).

Skot obecně patří mezi zvířata s poměrně dobrými termoregulačními schopnostmi. Přesto přežvýkavci nejsou schopni zachovávat striktní homotermii (Doležal, 2010). Na fyziologické pochody působí vysoké teploty negativně (Rehman a kol., 1994; Doležal, 2010). Doležal (2010) dokonce uvedl, že z důvodu pokračujícího globálního oteplování, můžeme předpokládat, že vliv tepelného stresu u zvířat bude nabývat na rozsahu. Proto je nutné předem znát teplotní hranice, kdy již dochází k negativním vlivům vysokých teplot (narušení welfare) a zavčas upravit technologii chovu tak, aby se předešlo přímým reprodukčním a produkčním ztrátám. Změna technologie chovu spočívá např. v instalaci ventilátorů a sprchování vodou (Knížková a kol., 2003).



Pokud by byl experiment prováděn také během letních měsíců s výskytem tropických dní, kdy je teplota vyšší než 30 °C, negativní vliv teplotního stresu by se patrně projevil na počtu získaných (aspirovaných) oocytů, jak uvádí např. Al-Katanani a kol. (2002). Ovlivněn by byl patrně také počet cyst na vaječnicích (ve smyslu vyšší četnosti) a počet primárních folikulů (ve smyslu nižší četnosti). Rocha a kol. (1998) a Al-Katanani (2002) zaznamenali pokles v kvalitě oocytů během teplejší sezóny. Lze tedy také předpokládat, že množství oocytů použitých pro maturaci a samotná úspěšnost maturace by byla nižší.

Většina autorů hovoří o tepelném stresu ve smyslu vysokých letních teplot. Mohlo by být ovšem zajímavé vyhodnotit působení nejen letního období při stresu vysokými teplotami, ale také zimního období při teplotách nižších, než je bod mrazu. Muselo by se ale skutečně jednat o extrémně chladnou sezónu, neboť právě extrémní teploty nepříznivě ovlivňují reprodukci (Louda a kol., 2007). Navíc je známo, že vzhledem k arktickému fylogenetickému původu skotu je pro něj pobyt v prostředí s nízkými teplotami více vyhovující (Doležal, 2010).

## **9. Závěr**

Výsledky ukázaly, že v ovariální aktivitě nebyl zjištěn mezi sledovanými obdobími roku (jaro, podzim, zima) statisticky průkazný rozdíl v průměrném počtu folikulů, počtu aspirovaných oocytů, počtu cyst a úspěšnosti maturace. Uvedená období roku jsou tak vhodná pro získání dostatečného počtu oocytů, např. pro další biotechnické postupy (IVF, kultivace oocytů, atd.) a nejsou významným efektem, který by průkazně ovlivnil parametry ovariální aktivity.

## 10. Použitá literatura

AL-KATANANI, Y. M., PAULA-LOPEZ, F. F., HANSES, P. J (2002): Effect of season and exposure to heat stress on oocyte competence in Holsteincows. *J. DairySci.*, 85, 390–396.

ALBERTS, B., BRAY, D., JOHNSON, A., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., WALTER P. (1998): *Essential cell biology: an introduction to the molecular biology of the cell*. Garland publishing, London, 645 pp.

BADINGA, L., THATCHER, W. W., DIAZ, T., DROST, M., WOLFENSON, D. (1993): Effect of environmental heat stress on follicular development and steroidogenesis in lactating Holstein cows. *Theriogenology*, 39: 797–810.

BEZDÍČEK, J., MAKAREVICH, A., STÁDNÍK, L., KUBOVIČOVÁ, E., LOUDA, F., HEGEDŮŠOVÁ, Z., HOLÁSEK, R., DUCHÁČEK, J., STUPKA, R. (2015): Analysis of factors affecting the quantity and quality of embryo production in superovulated cows. *Züchtungskunde*, 87, in press.

CAMBELL, N. A. a REECE, J. B. (2008): *Biologie*, Computer Press, první vydání, ISBN 80-251-1178-4.

CROSIGNANI P, G., VEGETTI, W., COLOMBO, M., RIGNI, G. (2002): Resumption of fertility with diet in overweight women. *Reprod. Biomed.*, 5: 60–64. ISSN 1470–1626.

DOLEŽAL, O. a spolupracovníci (2010): *Metody eliminace tepelného stresu – významná chovatelská rezerva*. Soubor odborných statí pro chovatele, Praha, 41 pp.

FELLNEROVÁ, I. a BEZDÍČEK, J. (2014): *Praktická cvičení z fyziologie člověka a živočichů*. Univerzita Palackého v Olomouci, 166 pp, ISBN 978-80-244-3994-5.

FERREIRA, R. M., AYRES, H., CHIARATTI, M. R., FERRAZ, M. L., ARAÚJO, A. B., RODRIGUES, C. A., WATANABE, Y. F., VIREQUE, A. A., JOAQUIM, J. C., SMITH, L. C., MEIRELLES, F. V., BARUSELLI, P. S. (2011): The low fertility of repeat-breeder cows during summer heat stress is related to a low oocyte competence to develop into blastocysts. *J. DairySci.*, 94(5) 2383–2392.

FILIPČÍK R. (2014): Welfare zvířat [online]. [cit. 10. 4. 2015]. Dostupné z URL: <[http://web2.mendelu.cz/af\\_291\\_projekty2/vseo/stranka.php?kod=2078](http://web2.mendelu.cz/af_291_projekty2/vseo/stranka.php?kod=2078)>

FROHDERÖVÁ, M. a HAVLÍČEK, Z. (2011): Evaluation of reproductive performance in cattle. Department of Animal Nutrition and Forage Production, Faculty of Agronomy. Mendel University in Brno, 232–238.

GALLI, C., DUCHI, R., CROTTI, G., TURINI, P., PONDERATO, N., COLLEONI, S., LAGUTINA, I., LAZZARI, G. (2003): Bovine embryo technologies. *Theriogenology*, 59: 599–616.

GORDON, I. (1994): Laboratory production of cattle embryos. Wallingford, Oxon, UK, CAB International, 640 pp, ISBN 0851989284.

HANDEL, M. A. a EPPIG, J. J. (1998): Sexual Dimorphism in the Regulation of Mammalian Meiosis. *Curr Top Dev Biol*, 37: 333 – 358.

HEGEDŮŠOVÁ, Z. (2011): Vlivy působící na kvalitu vyprodukovaných embryí a zabřezávání plemenic v dojných stádech skotu. Disertační práce, Praha, 96 pp.

CHMELAROVÁ, V. (2013): Vyhodnocení vlivů působících na říjové projevy dojnic a úroveň reprodukce v chovu holštýnského skotu. Diplomová práce, Mendelova univerzita v Brně, 65 pp.

JORDAN, E. R. (2003) Effect of heat stress on reproduction. *J. DairySci.*, 86: 104–114

KLIMENT, J., HINTNAUS, J., ROB, O., NOVÁK, M., ŠŤASTNÝ, P. (1989): Reprodukcia hospodárskych zvierat. 2. vydání, Bratislava, Príroda ve spolupráci SZN Praha, 378 pp.

KNÍŽKOVÁ, I., KUNC, P., DOLEŽAL, O., DOLEJŠ, J., TOUFAR, O., KMÍŽEK, J. (2003): Tepelný stres u skotu. Metodické listy, Technika a technologie chovu skotu. Výzkumný ústav živočišné výroby – Úhřetěves, 9 pp.

KUBOVIČOVÁ, E., MAKAREVIČ, A., PIVKO, J., HEGEDŮŠOVÁ, Z., BEZDÍČEK, J., (2012): Vplyv telesnej kondície dojníc na ovariálny vývoj. *Náš chov*, 72 (8): 62–64 pp.

LOUDA, F., BJELKA, M., JETKOVÁ, A., POZDÍŠEK, J., STÁDNÍK, L., BEZDÍČEK, J. (2007): Zásady využívání plemenných býků v podmínkách přirozené plemenitby. Výzkumný ústav pro chov skotu, Rapotín, 43 pp.

LUCY, M. C. (2002): Reproductive loss in farm animals during heat stress. University of Missouri, Columbia, 5 pp.

PRADHAN, R., OSHIMA, K., OCHIAI, Y., KOJIMA, T., YAMAMOTO, N., GHANEM, M., NAKAGOSHI, N. (2008): Influence of season and parity on embryo recovery and subsequent reproductive performances in early post partum suckling Japanese Black cows. *Livestock Research for Rural Development*, 20(2).

PUTNEY, D. J., THATCHER, W. W., DROST, M., WRIGHT, J. M., DELORENZO, M. A. (1988): Influence of environmental temperature on reproductive performance of embryo donors and recipient in the south west region of United States. *Theriogenology*, 30: 905–922.

PUTNEY, D. J., MULLINS, S., THATCHER, W. W., DROST, M., GROSS, T. S. (1989): Embryonic development in superovulated dairy cattle exposed to elevated temperatures between the onset of estrus and insemination. *Anim. Reprod. Sci.*, 19: 37–51.

REHMAN, N., COLLINS, A. R., SUH, T. K., WRIGHT, R. W. (1994): Development of in vitro and fertilized bovine oocytes co-cultured with Buffalo Rat Liver cells. *Theriogenology*, 41: 1453–1462.

RENSIS, F. A SCARAMUZZI, R. J. (2003): Heat stresses and seasonal effect on reproduction in dairy cow – a review. *Theriogenology*, 60: 1193–1151.

ROBINSON, J. J., SINCLAIR, K. D., RANDEL, R. D., SYKES, A. R. (1999): Nutritional management of the female ruminant: Mechanistic approaches and predictive models. Fifth International Symposium on the Nutrition of Herbivores. Savoy, IL. American Society of Animal Science, 550–608.

ROCHA, A., RANDEL, R. D., BROUSSARD, J. R., LIM, J. M., BLAIR, R. M., ROUSSEL, J. D., GODKE, R. A., HANSEL, W. (1998): High environmental temperature and humidity decrease oocyte quality in *Bos taurus* but not in *Bos indicus* cows. *Theriogenology*, 49: 657–665.

ŘÍHA, J., MACHATKOVÁ, M., PETELÍKOVÁ, J., JAKUBEC, V., PYTLOUN, J., ŠEREDA, L., PAVLOK, A. (1999): *Biotechnologie v chovu a šlechtění hospodářských zvířat*. Českomoravská společnost chovatelů, VÚCHS Rapotín, 167 pp.

ŘÍHA, J., HANUŠ, O., JAKUBEC, V., JÍLEK, F. ILLEK, J., KVAPILÍK, J., ČERMÁK, V. (2004): *Reprodukce v procesu šlechtění skotu*. Asociace chovatelů masných plemen, Rapotín, 144 pp.

SADLER, W. T. (2006): *Langmanova lékařská embryologie*. GRADA Publishing a.s., 414 pp, ISBN: 978-80-247-2640-3.

SANTOS, J. E., CERRI, R. L., SARTORI, R. (2008): Nutritional management of the donor cow. *Theriogenology*, 69(1): 88–97.

SAUMANDE, J. a CHUPIN, D. (1981): Production of PMSG anti serum in cattle: Assay of inhibitory activity and use in super-ovulated heifers. *Theriogenology*, 15: 108pp.

SILVA, J. C. C., ALVAREZ, R. H., ZANENGA, C. A., PEREIRA, G. T. (2009): Anim. Reprod. Sci., 6(3): 440–445.

STÁDNÍK, L. a LOUDA, F. (1999): Vliv genetických parametrů býků zjišťovaných ve Francii na užitkovost a reprodukci dcer dovezených a otelených v České republice. Czech J Anim Sci., 44: 433–439.

StatSoft (2013): statistics and analytics software package STATISTICA

SZABARI, M., PINNYEY, S., BOROS, N., SEBESTYÉN, J., RETTER, Y. (2008): Some factors affect of embryo-flushing in dairy cattle. Acta Agraria Kaposváriensis, 12: 113–120.

ŠAFÁŘOVÁ, D. (2011): Kapitoly z obecné genetiky, Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta, Olomouc, 111 pp, ISBN: 978-80-244-2822-2.

WALTERS, A. H., BAILEY, T. L., PEASON, R. E., GWAZDUASKAS, F. C. (2002): Parity-related changes in bovine follicle and oocyte populations, oocyte quality, and hormones to 90 days post partup. J. DairySci., 85(4): 824–832.

WALSH, S. W., WILLIAMS, E. J., EVANS, A. C. (2011): A review of the causes of poor fertility in high milk producing dairy cows. Anim Reprod. Sci., 123: 127–138.

WILSON, S. J., MARION, R. S., SPAIN, J. N., SPIERS, D. E., KEISLER, D. H., LUCY, M. C. (1998): Effects of controlled heat stress on ovarian function of dairy cattle. 1. Lactating cows. J. DairySci., 81: 2124–2131.

WOLFENSON, D., LEW, B. J., THACHTER, W. W., GRABER, Y., MEIDAN, R. (1997): Seasonal and acute heat stress effects on steroid production by dominant follicles in cows. Anim. Reprod. Sci., 47: 9–19.

ZINK, V., LASSEN, J., ŠTÍPKOVÁ, M., (2012): Genetic parameters for female fertility and milk production traits in first-parity Czech Holstein cows. Czech J Anim Sci., 57: 108–114.

Internetové zdroje:

URL 1: Slovenský hydrometeorologický ústav [online]. [cit. 1.4.2015]. Dostupné z

URL <[http://www.shmu.sk/sk/?page=1&id=meteo\\_apocasio\\_sk&ii=11855](http://www.shmu.sk/sk/?page=1&id=meteo_apocasio_sk&ii=11855)>

URL 2: Wheather online [online]. [cit. 1.4.2015]. Dostupné z URL

<<http://www.weatheronline.cz/weather/maps/city?FMM=3&FYY=2014&LMM=3&LYY=2014&WMO=11855&CONT=euro&REGION=0001&LAND=SK&ART=TMX&R=0&NOREGION=0&LEVEL=162&LANG=cz&MOD=tab>>