

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra chovu hospodářských zvířat



**Fakulta agrobiologie,
potravinových a přírodních zdrojů**

**ICSI – metodika využití v asistované reprodukci
hospodářských zvířat**

Diplomová práce

Bc. Hana Holá

Biotechnologie a šlechtění zvířat

Ing. Martina Janošíková, PhD.

© 2023 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "ICSI-metodika využití v asistované reprodukci hospodářských zvířat" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové 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 diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 30. 3. 2023

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala Ing. Martině Janošíkové, PhD. za užitečné rady a vedení této diplomové práce. Dále Ing. Janě Rychtářové, PhD. za trpělivé a ochotné jednání, milou spolupráci a získání množství informací. Závěrem bych chtěla velmi poděkovat Ing. Josefu Fulkovi, DrSc. za velmi cenné praktické ukázky, ochotu a zajímavou spolupráci.

Metodika použití ICSI při asistované reprodukci hospodářských zvířat.

Souhrn

Intracytoplazmatická injekce spermie - ICSI, je mikromanipulační technika, která umožňuje injekci jedné spermie do oocyty. Umožňuje tedy řešení mnoha reprodukčních problémů, jako je například nedostatečná motilita spermií. Využití této metody se rozšířilo také na domestikované i divoce žijící druhy, za účelem řešení reprodukčních problémů a produkce geneticky nebo fenotypově elitních jedinců.

Efektivita této metody u hospodářských zvířat se však druh od druhu liší, a to v souvislosti s anatomickými a fyziologickými vlastnostmi gamet jednotlivých druhů a také samotného procesu splnutí těchto buněk - oplození.

Cílem této práce bylo poukázat na aktuální poznatky ohledně využití ICSI v asistované reprodukci hospodářských zvířat - teoretické i praktické seznámení s metodou ICSI a shrnutí aktuálních poznatků týkajících se možného využití této metody v chovech koní, přežvýkavců a prasat.

Praktická část představuje využití ICSI pro produkci mezidruhových zygot. Jelikož je pomocí této metody možné obejít mezidruhové faktory, je umožněn vznik interspecifických zygot a toho se dá využít například pro hodnocení pohlavních buněk. Konkrétně v tomto případě se jednalo o využití myších oocytů pro ICSI pomocí kozlích spermií. Cílem této části bylo praktické využití mikromanipulační techniky, dokumentace vzniklých zygot a statistické vyhodnocení úspěšnosti ICSI.

Experiment probíhal ve Výzkumném ústavu živočišné výroby v Uhřetěvsi pod vedením Ing. Jany Rychtářové, PhD. Oocyty byly získávány z myší hybridního kmene BDF1, po jejich hormonální stimulaci a následném usmrcení.

ICSI byla prováděna na mikromanipulátoru Eppendorf PiezoXpert. Vyhodnocení fluorescenčního barvení bylo prováděno na fluorescenčním mikroskopu Olympus BX51.

Experiment byl velmi ovlivěn tím, že první zkušenosti s praktickým prováděním ICSI byly získávány právě během tohoto experimentu. To mělo za následek horší přežitelnost oocytů. S čistým svědomím tedy nelze prokázat, že byly rozdíly mezi skupinami způsobeny stavem DNA spermií.

Oplozené i neoplozené oocyty v různých fázích vývoje byly zaznamenány a byly využity pro ukázkou praktického provedení mikromanipulace. Vytvoření praktické části této práce, včetně samotné práce v laboratoři bylo velmi přínosné přesto, že bylo z hlediska dat a vyhodnocení hypotézy neúspěšné.

Klíčová slova: mikromanipulace, ICSI, reprodukce

Methodology for the use of ICSI in assisted reproduction of farm animals.

Summary

Intracytoplasmic sperm injection - ICSI, is a micromanipulation technique that allows the injection of a single sperm into an oocyte. It therefore enables the solution of many reproductive problems, such as insufficient sperm motility. The use of this method has also been extended to domesticated and wild species, to solve reproductive problems and produce genetically or phenotypically elite individuals.

However, the effectiveness of this method in farm animals varies from species to species, in connection with the anatomical and physiological characteristics of the gametes of individual species, as well as the process of fusion of these cells - fertilization.

The aim of this work was to point out the current knowledge regarding the use of ICSI in the assisted reproduction of farm animals - a theoretical and practical introduction to the ICSI method and a summary of the current knowledge regarding the possible use of this method in breeding horses, ruminants, and pigs.

The practical part presents the use of ICSI to produce interspecies zygotes. As interspecies factors can be bypassed using this method, the formation of interspecific zygotes is enabled and this can be used, for example, for the evaluation of gametes. Specifically, in this case it was the use of mouse oocytes for ICSI using goat sperm. The aim of this part was the practical use of the micromanipulation technique, the documentation of the resulting zygotes and the statistical evaluation of ICSI.

The experiment took place at the Animal Production Research Institute in Uhřetěves under the guidance of Ing. Jana Rychtářová, PhD. Oocytes were obtained from mice of the BDF1 hybrid strain, after their hormonal stimulation and subsequent sacrifice.

ICSI was performed on an Eppendorf PiezoXpert micromanipulator. Evaluation of fluorescence staining was performed on an Olympus BX51 fluorescence microscope.

The experiment was greatly influenced by the fact that the first experience with the practical implementation of ICSI was gained during this experiment. This resulted in poorer oocyte survival. Therefore, it cannot be proven in good conscience that the differences between the groups were due to the DNA status of the sperm.

Fertilized and unfertilized oocytes in different stages of development were recorded and used to demonstrate the practical implementation of micromanipulation. The creation of the practical part of this work, including the work in the laboratory itself, was very beneficial, despite the fact that it was unsuccessful in terms of data and hypothesis evaluation.

Keywords: micromanipulation, ICSI, reproduction

Obsah

1 Úvod	8
2 Vědecká hypotéza a cíle práce	9
3 Literární rešerše	10
3.1 ICSI v chovu a asistované reprodukci hospodářských zvířat	10
3.1.1 ICSI v chovu a reprodukci koní	10
3.1.2 ICSI v chovu a reprodukci přežvýkavců	12
3.1.3 ICSI v chovu a reprodukci prasat	13
3.2 Interspecifická ICSI	13
3.3 Princip kompetence oocytů	14
3.3.1 Schopnost oocytu obnovit meiózu.....	15
3.3.2 Schopnost dělení oocytů po oplození	15
3.3.3 Schopnost vývinu do stadia blastocysty	15
3.4 Kultivace oocytů in vitro	16
3.4.1 Optimální podmínky a manipulace s oocyty	16
3.4.2 Aktivace oocytů	16
3.4.3 Strategie pro zlepšení schopnosti tvorby prvojader.....	16
3.4.4 Vliv fragmentace DNA na oplození	17
4 Metodika	18
4.1 Metodika ICSI	18
4.2 Využití ICSI pro hodnocení integrity DNA spermií	19
4.2.1 Přehled biologického a laboratorního materiálu	19
4.2.1.1 Modelové organismy	19
4.2.1.2 Chemikálie, roztoky a média	20
4.2.1.3 Přístroje.....	22
4.2.1.4 Ostatní laboratorní materiály	22
4.2.2 Výroba mikromanipulačních pipet	23
4.2.3 Hormonální stimulace samic a izolace oocytů	26
4.2.4 Příprava spermií pro ICSI.....	28
4.2.5 Příprava na mikromanipulaci.....	28
4.2.6 ICSI.....	29
4.2.7 Fixace oocytů a imunofluorescenční barvení	33

5	Výsledky	35
5.1.1	Hormonální stimulace samic - ovulace oocytů.....	35
5.2	Úspěšnost ICSI	36
5.2.1	Statistické vyhodnocení výchozích dat.....	37
6	Diskuze	39
7	Závěr	44
8	Literatura	45
9	Seznam použitých zkratk a symbolů	52

1 Úvod

Jedním z cílů vývoje biotechnologických metod je ochrana genetických zdrojů a zachování genetické rozmanitosti na úrovni in vivo (v živých organismech) a in vitro (uchovávání geneticky cenného materiálu jako je sperma, oocyty, tkáně aj.).

Nejrozšířenější biotechnologickou metodou v oblasti reprodukce HZ je inseminace. V chovech dojeného skotu je většina plemenic inseminována, na rozdíl od chovů koz a ovcí či koní, kde je úspěšnost inseminace zejména mraženým semenem výrazně nižší. U těchto druhů zvířat stále existují rezervy v oblasti krátkodobého i dlouhodobého uchovávání biologického materiálu. Proto je pozornost věnována studiu mechanismů zrání gamet a procesu oplození na buněčné úrovni.

Velký potenciál by tedy u těchto druhů mohla mít metoda intra cytoplasmatické injekce spermií (ICSI), která se například v chovu koní stává velmi populární a efektivní metodou. Mezi výhody této metody se dá řadit možnost využití spermií, které by za přirozených okolností nebyly schopné oplození - jedná se například o spermií se špatnou motilitou, poškozeným bičíkem, atp. To umožňuje reprodukci geneticky významných, ale různými způsoby znevýhodněných plemenů. Je nutné brát v potaz také vyšší pravděpodobnost výskytu patologických jevů během vývoje, způsobených poškozením DNA. S využitím například i interspecifické - mezidruhové ICSI je možné vyhodnocovat tato poškození na principu vytvoření mezidruhových zygot. Metoda mezidruhového oplození in vitro byla poprvé použita v osmdesátých letech v rámci vývoje metod souvisejících s posuzováním některých parametrů spermií, které přímo souvisely s oplozovací schopností. V tomto pokusu je blíže popsáno využití metody ICSI jako vyhodnocovacího prostředku poškození DNA spermií. Byly využívány myší oocyty (kmen BDF1), které byly injikovány spermiemi z mražených ID kozlů. Zmíněný biologický materiál byl zvolen pro jeho dobrou dostupnost.

Naopak nevýhodou metody ICSI je však náročnost na manuální zručnost technika a kvalitní laboratorní vybavení. V neposlední řadě je nutné ve výzkumu dále věnovat pozornost mechanismům a fyziologickým aspektům pohlavních buněk hospodářských zvířat. Jejich specifická a rozdílná náročnost neumožňují plošné a komerční využití ICSI u všech druhů. Aktuálně se tedy vědecké skupiny po celém světě snaží tyto negativní faktory odbourat, nebo nalézt alternativní řešení.

Využití těchto metod v oborech živočišné výroby a ochrany genových zdrojů je zcela relevantní a to nejen pro hodnocení stavu biologického materiálu určeného pro reprodukční účely, ale hlavně pro reprodukci geneticky kvalitních jedinců, jejichž gamety jsou během tohoto procesu hodnoceny a vybrány na základě jejich vlastností a kvality. To umožňuje snížení zdravotních rizik a eliminaci patologických jevů. Důležitým aspektem je také fakt, že například v chovu koní hraje velkou roli peněžní hodnota jedinců a jejich prestiž a exkluzivita. Lidé v tomto odvětví mají zájem o investice do kvalitních chovů a elitních jedinců, proto je v ICSI v chovu koní spatřována budoucnost reprodukce.

2 Vědecká hypotéza a cíle práce

Cílem této diplomové práce bylo shrnutí aktuálních poznatků ohledně metodiky ICSI u hospodářských zvířat a ověření hypotézy: metoda konzervace spermií má vliv na přežitelnost injikovaných oocytů. Dále pak specifikace fyziologických mezidruhových rozdílů a možné řešení problémů s oplozením. Teoretická část představuje shrnutí aktuálních využití metody ICSI v asistované reprodukci hospodářských zvířat, konkrétně koní, skotu a prasat. Mikromanipulační techniky mají poměrně široké spektrum využití a uplatní se nejen v IVF, ale například i při prenatální diagnostice, nukleotransferech a embryonálních biopsiích.

Účelem praktické části bylo představení ICSI jako metody pro hodnocení kvality biologického materiálu. Izolované myší oocyty byly injikovány kozlími spermii, docházelo tedy k vytváření mezidruhových zygot. Metodika zahrnuje také přehled všech potřebných materiálů (chemických, biologických i laboratorních). Důležitým aspektem bylo zvládnutí metod izolace oocytů, jež zahrnují hormonální stimulaci myší, jejich usmrcení a vyjmutí vaječnicků pro samotnou izolaci oocytů. Byl tedy kladen důraz na časovou organizaci pro hormonální stimulaci a vhodnou dobu izolace biologického materiálu.

Získávání a kultivace oocytů byly prováděny dle široce využívaných laboratorních protokolů, dle kterých byla připravována kultivační média, enzymy umožňující odstranění kumulárních buněk oocytu a časová schémata pro uchování izolovaných a následně injikovaných oocytů.

Stěžejním procesem této práce byla mikromanipulace, konkrétně interspecifická intracytoplasmatická injekce spermie, která byla konzervována pomocí jedné z metod pro uchování spermií.

Při pokusu byli pro iICSI použity kozlí spermie, rozdělené do skupin. První – kontrolní skupina A představovala spermie z čerstvého ejakulátu odebraného pomocí umělé vagíny (ředidlo AndroMed). Druhá a třetí skupina zahrnovala kryoprezervované spermie odebrané pomocí umělé vagíny (skupina B) a pomocí elektroejakulace (skupina C).

Různé způsoby konzervace s sebou nesou různou míru poškození samčích pohlavních buněk. Jedná se o snížení motility, snížení koncentrace oplození schopných spermií, narušení integrity jejich DNA nebo morfologické poškození.

Cílem tohoto pokusu bylo tedy reálné provedení mikromanipulační techniky ICSI a její využití pro hodnocení procesu oplození. Mikromanipulační techniky jsou obecně poměrně náročné nejen na dovedosti technika, ale i na laboratorní vybavení. Proto je potřeba brát v potaz mnoho faktorů, včetně faktoru lidského. Velmi významnou roli pak hraje nejen kondice oocytu ale také fyziologické vlastnosti spermií a jejich schopnost oplození. Po splynutí buněk hraje pak významnou roli stav DNA. Ten je možný vyhodnotit pomocí fluorescenčního barvení a následného zobrazení pomocí fluorescenčního mikroskopu. Fluorescenčně značené protilátky se vážou na poškozené části DNA, které jsou přístupné pouze při rozvinutí - dekonenzaci chromozomů. Během této fáze vývoje zygoty (PN5) jsou tedy případná poškození DNA dobře monitorovatelná.

Výstupem tohoto pokusu je základní statistické vyhodnocení úspěšnosti ICSI, popsání rozdílů úspěšnosti u vybraných skupin spermií a dokumentace možných výsledků fluorescenčního barvení, hodnocených na základě detekce histonu γ H2AX, jež detekuje poškození DNA.

3 Literární rešerše

Intracytoplazmatická injekce spermie (ICSI) se stala užitečnou technikou pro klinické uplatnění v chovu koní. Produkce ICSI blastocyst a potomků je však u většiny farmářských a volně žijících druhů nadále omezená. Existuje mnoho technických rozdílů v provedení ICSI u různých druhů a její proměnlivá účinnost bývá způsobena různými biologickými a metodologickými aspekty. Jedním z hlavních využití ICSI v živočišné výrobě je reprodukce vysoce hodnotných jedinců. Bohužel některé domácí druhy, jako je skot, vykazují nízkou schopnost tvorby prvojader po injekci spermie, což vedlo k vývoji různých protokolů umělé aktivace a předběžného ošetření spermií.

ICSI se také využívá k produkci geneticky modifikovaných zvířat; přes četné pokusy u několika domácích druhů se však trvale produkovala pouze transgenní prasata. ICSI je mikromanipulační technika, která zahrnuje injekci jedné spermie do cytoplazmy zralého oocyty. První zpráva o tvorbě pronukleů po ICSI u savců byla dosažena u gamet křečka (Uehara & Yanagimachi 1976). V roce 1992 se narodilo první dítě vytvořené injekcí spermie (Palermo et al. 1992) a ICSI se následně stala celosvětově významnou technikou pro lidskou asistovanou reprodukci. Využití této techniky se následně rozšířilo na další druhy, včetně skotu (Goto et al. 1990), králíka (Hosoi & Iritani 1993), myši (Kimura & Yanagimachi 1995), ovce (Catt et al. 1996), koně (Cochran et al. 1998), kočku domácí a divoké kočkovité šelmy (Pope et al. 1998), prase (Kolbe & Holtz 2000) a kozu (Wang et al. 2003).

Navzdory úsilí několika pracovních skupin po celém světě je však úspěch této techniky u hospodářských zvířat omezený. Nejextrémnějším případem je kráva, jejíž míra oplodnění po ICSI je kriticky nízká (Arias et al. 2016). U ovcí, je úspěšnost vývoje do blastocysty také nízká, i přes vývoj umělé aktivační léčby (Shirazi et al. 2011).

3.1 ICSI v chovu a asistované reprodukci hospodářských zvířat

3.1.1 ICSI v chovu a reprodukci koní

Vývoj technologií asistované reprodukce u koní byl relativně pomalý ve srovnání s jinými domácími zvířaty, jako jsou přežvýkavci nebo prasata. V posledních několika letech však došlo k nárůstu zájmu o hříbata, která přišla na svět pomocí asistované reprodukce. Vývoj efektivních metod pro získávání oocytů z živých klisen poté umožnil klinické využití in vitro oplození. Konvenční metody IVF, které zahrnují zrání oocytů, kultivaci oocytů s kapacitovanými spermii a následnou kultivaci zygot, se u koní na rozdíl například od skotu ukázaly jako neúčinné. Tento fakt vedl k výzkumu využití efektivnější metody produkce embryí – intracytoplazmatické injekce spermie (ICSI). Tato embrya jsou kultivována a následně transcervikálně přenesena klisně příjemkyni.

První hříbě produkované pomocí ICSI se narodilo v USA (Squires et al. 1996). Efektivita buněčného dělení a vývoje embrya byla ale tehdy nízká a bylo obtížné dosáhnout vývojového stadia blastocysty. Až využití piezo mikromanipulátoru zvýšilo míru aktivace i štěpení oocytů (Galli et al. 2007).

Kultivace embryí byla zpočátku prováděna in vivo, ve vejcovodu klisny. Těmito metodami bylo možné získat 18 až 36 % štěpených embryí (Galli et al. 2002). Choi a kol. (2002)

získal asi 80% míru štěpení s embryi > 8 buněk do 96 hodin od kultivace in vitro. Nové metody bylo také nutné vyvinout ke kultivaci raného zárodku.

Klíčovou motivací k implementaci ICSI v komerčních šlechtitelských programech byl posun od získávání nízkého počtu preovulačních oocytů z velkých folikulů k získávání většího množství nezralých oocytů z malých folikulů transvaginální ultrazvukovou aspirací. Preovulační folikuly mají 75–85% efektivitu tvorby zralých oocytů s vyšším vývojovým potenciálem, než mají oocyty z menších folikulů. Vysoký počet oocytů, získaných z nezralých folikulů je vhodný pro zrání in vitro a následnou ICSI (Morris 2018).

Metoda ovum pick up (OPU) pro získávání oocytů pro IVF byla vyvinuta v lidské asistované reprodukci v 80. letech 20. století. Využití této metody se rychle rozšířilo i v chovu skotu. Provádí se relativně snadná a efektivní transvaginální ultrazvuková metoda OPU, která umožňuje sériovou punkci folikulů (Morris 2018).

Globálně bylo vyvinuto několik různých technik OPU. Například použití jehly s dvojitým lumenem zvýšilo úspěšnost získávání oocytů na více než 50 % na folikul. K samotnému propláchnutí se typicky využívá buď komerční proplachovací médium nebo HEPES-pufrované médium M199 s Hanksovými solemi a fetálním bovinním sérem (Jacobson 2010). Tekutina se udržuje teplá (37°C) v průběhu celé procedury, která zahrnuje proplachování folikulu a seškrabování jeho stěny pro maximalizaci regenerace. Tato kombinace proplachování a seškrabování je u klisen zásadní, jelikož na rozdíl od skotu je komplex cumulus-oocyt pevně připojen k folikulární stěně (Hawley 1995).

Zkušení technici jsou nyní schopni získávat průměrně 5-12 oocytů na jednu OPU proceduru, v závislosti na počtu přítomných folikulů a dalších faktorech. Tato zvýšená efektivita je mírně kompenzována redukcí úspěšnosti zrání tak, že metafáze II dosáhne během kultivace přibližně 50 %. Oproti tomu většina oocytů získaných z preovulačních folikulů účinně zraje in vivo (Hinrichs et al. 2014).

Úspěšné oplodnění závisí na přítomnosti zralého oocytu s chromatinem v metafázi II a vhodně zralou cytoplazmou. Úskalí kompetence koňských oocytů byly a jsou nadále systematicky a komplexně přezkoumávány. Mnoho vlastností koňských oocytů se zcela liší od charakteristik jiných druhů.

Historicky byla úspěšnost IVF u klisen nízká, takže technika ICSI představovala významnou příležitost (Squires 1996). Pro ICSI byly popsány dva základní kroky, které vedou k aktivaci oocytu a následnému embryu. Prvním je účinná imobilizace spermie odlomením bičíku a druhým je proces průniku plazmatickou membránou oocytu (Vanderzwalmen 1996). Bylo také zjištěno, že samotná ICSI spolehlivě neindukuje zvýšení intracelulárních oscilací Ca²⁺ potřebných pro úspěšné oplodnění koňského oocytu. Od zavedení piezo-manipulátoru se však aktivace oocytů dosahuje již konzistentně. Injekce pomocí Piezo systému dochází k lepší permeabilizaci membrány a průnik oolemmou je efektivnější (Li et al. 2000).

Pro minimalizaci poškození oocytu se doporučuje ICSI pipeta s vnitřním průměrem 5-8 μm. Aby se membrána oocytu po ICSI zacelila, uchovávají se injikovány oocyty v manipulačním médiu po dobu 1-2 hodin a poté jsou přemístěny do média kultivačního. Během prvních dvou hodin po ICSI je důležité zabránit zvýšení pH, které negativně ovlivňuje vznik blastocyst. Je tedy nutné použít vhodně pufrované médium a lyzované oocyty před kultivací z kultivační misky odstranit (Rader 2016).

Úspěšnost zabřeznutí po přenosu in vitro produkovaných blastocyst se díky zdokonalení kultivačních systémů a morfologické klasifikaci embryí v průběhu let zlepšila. Časné studie dosáhly na 33-67% úspěšnost zabřeznutí (Li et al. 2001). Aktuálně se uvádí úspěšnost v rozmezí 60 až 80 % (Galli et al. 2016). Průběh březosti byl hlášen jako normální a hříbata životaschopná. Studie 30 hříbat produkovaných embryotransferem, ICSI a přirozeným způsobem neodhalila žádné významné rozdíly v růstu hříbat, placentrálních parametrech nebo expresi 17 genů souvisejících s růstem placenty (Valenzuela 2018).

U koní se ICSI využívá k reprodukci elitních jedinců a umožňuje překonávat fyziologické bariéry. Selhávání superovulace a konvenční in vitro fertilizace byly hlavním důvodem pro využití ICSI v asistované reprodukci koní.

3.1.2 ICSI v chovu a reprodukci přežvýkavců

Úspěšnost vývoje kravských embryí po ICSI jsou ve srovnání s embryi produkovanými IVF mnohem nižší. Více než 90 % oocytů není po injekci schopno oscilace Ca^{2+} . Většina kravských embryí tedy vykazuje chyby v dekondezaci spermií a tvorbě prvojader, díky čemuž zůstává úspěšná ICSI komplexní výzvou (Arias et al. 2015). Diskutuje se, zda jsou tyto nekonzistence způsobeny neschopností býčích spermií vyvolat úplnou aktivaci oocytů nebo špatnou reakcí kravské ooplazmy na injekční stimul, což vyvolává nesprávnou dekondezaci hlavičky spermií (Aguila et al. 2017).

U druhů, jako jsou myši, lidé a koně, k aktivaci oocytu postačuje samotná ICSI. Aktivace oocytu je potřebná pro dekondezaci hlavičky spermie, tvorbu samčího prvojádra a zahájení následného embryonálního vývoje. U myši se do stadia blastocysty vyvine přibližně 70 % injikovaných oocytů, zatímco u skotu není úspěšnost vývoje vyšší než 12-20 % (Galli et al. 2003).

Důvodů nízké vývojové kapacity bovinních embryí po ICSI existuje několik. Jedním z nich může být právě neúplná aktivace oocytu. Pro zlepšení aktivace je ICSI kombinována s fyzikální (elektrická stimulace) nebo chemickou aktivací (etanol, ionomicin). Aktivace oocytů je přirozeně indukována faktorem popsaným jako specifická izoforma fosfolipázy C (PLC ζ). Uvolňování PLC ζ může být procesem ICSI narušeno. Další výzvou je indukce intracelulárních vápníkových vln, ke kterým v oocytu nedochází spontánně. To přispívá k rychlému rozpadu membrán, díky kterému je PLC ζ volně vystavena cytoplazmě oocytu a následně dochází k narušení její správné funkce (Roldan 2006).

Obsah akrozomu injikované spermie má také potenciálně škodlivý účinek na oocyt, který přímo koreluje s velikostí hlavičky spermie (Morozumi & Yanagimachi 2005). Poškození způsobené akrozomálními enzymy zahrnuje například deorganizaci cytoskeletu injikovaných oocytů. Jsou vytvářeny různé strategie pro narušení akrozomu a plazmatické membrány, jenž usnadňuje dekondezaci spermií a tvorbu prvojader. Patří mezi ně sonikace, zmrazení-rozmrazení, lyofilizace a ošetření chemickými látkami (dithiothreitol, Triton X-100). Některé z těchto postupů však způsobují poškození DNA spermií, což může ovlivnit další embryonální vývoj (Watanabe et al. 2010).

3.1.3 ICSI v chovu a reprodukci prasat

Navzdory nedávným pokrokům v oblasti embryologie je produkce prasečích embryí in vitro omezena, hlavně vysokou mírou polyspermie po konvenčním oplodnění in vitro (Lee 2006).

V tomto smyslu by technika intracytoplazmatické injekce spermií (ICSI) mohla být alternativou k in vitro produkci monospermických zygot. U prasečí ICSI je jedním z hlavních problémů selhání dekondezace jádra spermie a následné tvorby funkčního samčího pronuklea po injekci spermie do oocyty (Kren et al. 2003).

Pokud jde o prasata, ICSI se stala alternativní technikou oplodnění pro výzkumné účely (Coy & Romar 2002). V posledních letech se transgenní prasata stala nepostradatelnými pro biomedicínský výzkum a jsou využívána v oblasti xenotransplantací a jako modely pro lidská onemocnění. Nicméně konvenční pronukleární mikroinjekce, tj. Injekce DNA konstruktů do prvojader oplozených oocytů, není pro produkci transgenních prasat účinná (Nottle et al. 1997). Perry et al. (1999) uvedli alternativní metodu pro produkci transgenních myších, tzv. ICSI-mediated gen transfer method. Spermie jsou zde koinkubovány s DNA a následně pomocí mikroinjekce vzpraveny do ooplazmy, což umožňuje vložení nepůvodních genů do genomu zárodku pomocí zavedení molekul DNA navázaných na hlavičky spermií.

Pokud by tato metoda byla aplikovatelná na prasata, poskytla by vysoce účinnou a jednoduchou metodu produkce transgenních prasat. Tato metoda navíc také vyžaduje použití spermií s poškozenými plazmatickými membránami (fyzikální procesy, povrchově aktivní látky). Narušení plazmatické membrány spermií umožňuje DNA asociovat se submembránovými strukturami oocyty, což hraje důležitou roli při přenosu DNA. Postupy pro toto narušení však mohou poškodit jádro spermie a tím znemožnit embryogenezi.

3.2 Interspecifická ICSI

Techniky asistované reprodukce (ART) jsou široce využívány s různými cíli u mnoha druhů savců. Jednou z těchto technik je právě ICSI, která zvyšuje míru oplození v případě, že je kvalita spermatu špatná (Penfold et al. 2003). Kvalita spermií se odvíjí od integrity DNA, pro jejíž hodnocení se dá využít několik postupů, např. test akridinovou oranží, barvení chromocycinem A3, anilinem a toluidovou modří, TUNEL analýza, jednobuněčná gelové elektroforéza nebo kometový test (Shamsi et al. 2011). Tyto metody typicky vyžadují relativně vysoký počet spermií a vykazují relativně nízkou citlivost. Navíc hodnocení poškození DNA u intaktních spermií není příliš přesné, jelikož jejich chromatin je silně kondenzovaný protaminy. Hlavička spermie v cytoplazmě oocyty dekondezuje a tvoří pronuklea, ve kterých jsou protaminy nahrazeny histony (Yoshida a Perry 2007). Obecně je tak možné během dvou dnů vyhodnotit, zda je vybraný vzorek spermatu vhodný pro další použití či nikoliv, případně zda je daný působil uchování spermatu vhodný (Rychtářová et al. 2021).

Nízká kvalita spermatu bývá pozorována například u divokých kočkovitých šelem a omezuje použití umělé inseminace nebo IVF (Wildt et al. 1992). Tento problém se vyskytuje například u geparda (*Acinonyx jubatus*) a levharta (*Panthera pardus*). U obou těchto druhů byl pozorován vysoký výskyt strukturního pleomorfismu a abnormalit spermií, způsobených genomickou homozygotností mezi jedinci. Ukázalo se, že gepardí a leopardí ejakuláty

obsahovaly 71 a 80 % morfologicky abnormálních spermií, ve srovnání s 29,1 % u kočky domácí (*Felis catus*). Jelikož ICSI umožňuje selekci morfologicky normálních spermií, mohla by být důležitá pro podporu reprodukce a zachování genetické biodiverzity u volně žijících kočkovitých šelem.

Vzhledem k podobnostem mezi volně žijícími druhy koček a kočkou domácí, je možné zlepšit produkci embryí pomocí ICSI nebo generováním mezidruhových embryí pomocí oocytů kočky domácí přispět k ochraně divokých druhů koček, z nichž většina je považována za ohrožené (Moro et al. 2014).

3.3 Princip kompetence oocytů

Kompetence oocytu je schopnost oocytu dozrát, podstoupit úspěšné oplodnění, dosáhnout stádia blastocysty a dát životaschopné a zdravé potomstvo. Vyhodnocování této kompetence je komplexní proces, který zahrnuje mnoho po sobě jdoucích, souběžných a vzájemně nezávislých kroků, včetně zrání oocytů, jejich oplodnění a následný vývoj embrya. Tuto vývojovou schopnost získává oocyt biosyntézou a/nebo skladováním mnoha klíčových molekul (Sirard et al. 2006). V některých případech definice zahrnuje i potenciál k udržení správného vývoje plodu až do porodu. Z hlediska vývojové biologie tato schopnost zahrnuje některé z nejkritičtějších a nejsložitějších biologických procesů, například remodelace gamety za účelem přijetí a integrace samčího genomu, jaderné přeprogramování k totipotenci v zygotě a aktivace embryonálního genomu. Výzkum modelových organismů, jako jsou červi a mouchy ukazuje, že některé prvky gastrulace jsou naprogramovány již v gametě (Munne et al. 2009)

Vzhledem ke složitosti zahrnutých biologických procesů bylo obtížné definovat klíčové události nezbytné pro to, aby oocyt získal tento potenciál. Nicméně panuje obecná shoda v tom, že tvorba zdravé samčí gamety závisí na koordinovaném vývoji somatických a zárodečných buněk v ovariálním folikulu. Tato koordinace vyžaduje nepřetržitou výměnu informací mezi dvěma buněčnými kompartmenty. Je známo mnoho molekulárních jednotek zprostředkovávajících tento dialog a hormonální a parakrinní kontrolu. Stále ale některé biologické aspekty těchto funkcí zůstávají neobjasněné. Metabolické spojení zárodečných buněk okolních granulózniích či kumulárních buněk je důležitým faktorem této interakce, která v konečném důsledku podporuje vývojovou kompetenci. Důležitými determinanty kvality oocytů jsou i jaderná a cytoplazmatická zráná, ke kterým dochází během posledních fází zrání oocytů. Zahrnuté molekulární složky jsou sice známé, ale musí být také uspořádány v koherentním plánu mechanismu potřebného pro vývojovou kompetenci (Conti & Franciosi 2018).

Výběr oocytů s nejlepším vývojovým potenciálem byl předmětem intenzivního výzkumu v posledních několika desetiletích a bylo navrženo nespočet strategií k dosažení tohoto cíle. Morfologická kritéria jsou nejpoužívanějšími paradigmaty, ale fakt, že i nejnornálněji vypadající oocyt nebo embryo může skrývat aneuploidii, tento přístup limituje (Munne et al. 2009) a podnítil tak hledání dynamičtějších morfologických kritérií. K lepšímu pochopení kvality oocytů byly také použity nejnovější metody v hodnocení genové exprese prostřednictvím transkriptomiky nebo genomiky. Některá omezení včetně invazivní povahy tohoto přístupu v současné době brání jeho širokému využití (Freour & Vassena 2017).

Následuje obsáhlý výčet a krátký popis úrovní kompetence oocytů.

Představují klíčové kroky, které charakterizují vývoj kompetence:

1. Schopnost obnovit meiózu
2. Schopnost dělení po oplození
3. Schopnost vývinu do stadia blastocysty
4. Schopnost nidace a vývoje plodu do fáze porodu
5. Schopnost vývoje a porodu jedince v dobrém zdravotním stavu
6. Schopnost obnovení meiózy

3.3.1 Schopnost oocyту obnovit meiózu

Schopnost oocyту obnovit meiózu je pravděpodobně nejsnáze měřitelná a je základem časoprostorové synchronie molekul buněčného cyklu. Jakmile oocyty opustí folikuly, mají schopnost spontánně obnovit meiózu (Edwards 1965). Nejsou zapotřebí žádné stimulační látky. Obnovení meiózy je indikováno tvorbou prvního pólového tělíska nebo pomocí specifického barvení metafáze. Toto obnovení meiózy je považováno za důsledek nepřítomnosti folikulárního inhibitoru (Hampl & Eppig 1995).

3.3.2 Schopnost dělení oocytů po oplození

Schopnost dělit se po oplození je téměř automatická a je vnitřním potenciálem plně vyvinutých savčích oocytů, jelikož k dělení buňky může dojít i bez oplodnění, například pomocí aktivačních podnětů, jako je elektrický proud nebo etanol (Ware et al. 1989). Pokud k dělení nedochází, může to být důsledkem dysfunkční spermie, která nedokázala aktivovat oocyt nebo oocyt sám neměl schopnost podstoupit první buněčné dělení (First et al. 1988).

3.3.3 Schopnost vývinu do stadia blastocysty

Nejkritičtější a zároveň klíčový marker kompetence oocytů běžně používaný ve většině laboratoří. Je známo, že oplozený oocyt dosáhne fáze blastocysty ve vhodných kultivačních podmínkách během 6-9 dnů. Schopnost zachovat embrya vitální během prvního týdne vývoje je ovlivněna stavem folikulu, ze kterého je oocyt získán. Protože většina raných embryí, která nedosáhnou stadia blastocysty, je blokována už během stadia přeměny gamety na zygotu, ke kterému dochází ve stadiu osmi buněk. Dalo by se říct, že nekompetentní oocyty nedokážou vhodně aktivovat embryonální genom (Barnes & First 1991).

Během raného vývoje je v oocytu akumulováno množství proteinů a RNA, což je pravděpodobně zodpovědné za správnou aktivaci embryonálního genomu. Vzhledem k tomu, že blastocysty lze klasifikovat na základě jejich morfologie, je zřejmé, že jejich kvalita se liší v závislosti na kritériích, jako je počet buněk, hmotnostní poměr buňky, expanze blastocoelu, celkový vzhled atd. Jejich schopnost vývoje až do porodu nebo přežití kryokonzervace je také ovlivněna morfologií i původem - in vitro nebo in vivo (Dinnyes et al. 2000).

3.4 Kultivace oocytů in vitro

3.4.1 Optimální podmínky a manipulace s oocyty

Podmínky, za kterých je prováděn odběr a manipulace s gametami a embryi mají významný vliv na následný vývojový potenciál embrya. Při manipulaci s gametami/embryi je proto nezbytné, aby faktory, jako je teplota, pH, složení média atd., byly vždy optimalizovány. Tato optimalizace je důležitá pro minimalizaci stresu během odběru a manipulace. Například oocyty a embrya savců by nikdy neměly být vystaveny médiu bez aminokyselin. Tato prevence stresu je nezbytná, ať už je doba manipulace krátká (méně než pět minut) nebo dlouhá (několik hodin), jelikož může ovlivnit vývojovou kompetenci embryí (Gardner et al. 2004).

3.4.2 Aktivace oocytů

Po splynutí spermie s oocytem, spouští spermie aktivaci oocyty, což je základem pro časný embryonální vývoj. Úplná aktivace oocyty zahrnuje obnovení meiozy, vytvoření druhého pólového tělíska (PB), uvolnění kortikálních částic a tvorbu samčího a samičího prvojádra (Swann & Lai 2016). K aktivaci oocyty dochází díky oscilaci Ca^{2+} v ooplasmě. Faktorem zodpovědným za spouštění těchto oscilací u savců je specifická izoforma fosfolipázy C ve spermii (Yoon & Fissore 2007).

V případě druhů jako je člověk, myš, kůň a kočka domácí, stačí k aktivaci oocyty, udržení vývoje do fáze blastocysty a dokonce porodu živého jedince, samotná injekce spermie.

Úspěšnost vývoje kravských ICSI embryí je mnohem nižší ve srovnání s IVF embryi. Více než 90 % oocytů není po injekci spermie schopno oscilace Ca^{2+} (Malcuit et al. 2006). Většina ICSI embryí proto vykazuje neodpovídající dekonduzaci spermií a nízkou schopnost tvorby prvojader, díky čemuž zůstává ICSI komplikovanou výzvou (Aguila et al. 2017).

U ovcí je po ICSI vývoj do stádia blastocysty také nízký, ve srovnání s IVF. Narozdíl od bovinní ICSI není způsobena selháním tvorby prvojádra, ale zastavením vývoje většiny ICSI embryí ve stádiu 8 až 16 buněk (Gomez et al. 1998). Později bylo dosaženo lepších výsledků pomocí chemické aktivace, které ale nesetřvaly do pozdějších stádií (Pereyra Bonnet et al. 2008).

3.4.3 Strategie pro zlepšení schopnosti tvorby prvojader

Jak již bylo zmíněno, kravské oocyty nejsou po ICSI schopny aktivace. Velký ekonomický zájem o tento druh však vedl k vývoji in vitro reprodukčních systémů, které jsou uzpůsobeny pro požadavky kravských embryí. Tvorba samčích prvojader po ICSI však zůstává velmi nízká (Sekhavati et al. 2012).

Dá se říci, že byly vytvořeny dva typy strategií: jedna působící na oocyt pomocí exogenních aktivačních ošetření, druhá působí na membrány spermií pomocí předběžných ošetření.

A konečně, zvláštní pozornost vyžaduje mechanické poškození spermie, prováděné pomocí injekční pipety a piezo systému. Během ICSI procedury je před injekcí spermii záměrně poškozen bičík. Tento úkon je zásadní pro konečný úspěch procedury (Salamone et al. 2017). Je známo, že pouhý stimul injekce spermie do cytoplazmy zralého oocyty je u koní dostatečný

k aktivaci vývoje embrya. Opakovanou úspěšnost ICSI u koní lze vysvětlit obsahem a účinností koňské fosfolipázy C (PLC ζ), která indukuje píky Ca $^{2+}$ a k jejímuž uvolňování v oocyту dochází díky použití piezo systému (Choi et al. 2003).

3.4.4 Vliv fragmentace DNA na oplození

Význam poškození DNA spermií byl prokázán studii, ve kterých míra poškození DNA korelovala s různými ukazateli plodnosti, jako je oplození schopnost, schopnost štěpení embryí, míra implantace, březost a narození živého potomka. Pokud DNA spermií není schopna po vstupu do ooplazmy kondenzovat, nemusí dojít k oplození. S vyšší mírou poškození DNA spermie se zvyšuje pravděpodobnost potratu (Spano et al. 2000).

Role standardních parametrů pro hodnocení spermií se stává v oblasti asistované reprodukce diskutabilní. ART obchází mechanismy přirozeného výběru a tím se zvyšuje šance spermie s abnormálním genomovým materiálem na oplození oocyту (Aitken 1999).

O vlivu poškození DNA spermií na výsledky po ART existují rozsáhlé studie. Většina z nich prokázala významné negativní korelace s výslednými parametry plodnosti. Některé studie korelaci mezi mírou poškození DNA a mírou oplození neprokázaly, ale poukázaly spíše na asociace mezi poškozením DNA a postfertilizačním vývoji embrya.

Mnoho studií s využitím metody ICSI prokázalo nízkou korelaci mezi mírou oplození a mírou poškození DNA. To poukazuje na fakt, že metoda ICSI obchází mnoho aspektů přirozeného výběru a umožňuje tak spermii s poškozenou DNA oplodnit ocyt. Většina těchto studií nicméně zjistila souvislost s mírou gravidity, z čehož vyplývá, že embryo využívá určité mechanismy, které zabraňují přenosu defektního genomového materiálu na potomstvo.

Rozdíl v pozorováních lze také vysvětlit heterogenitou technik použitých k měření poškození DNA a studované populace (Agarwal & Allamaneni 2004).

4 Metodika

4.1 Metodika ICSI

Metoda ICSI zahrnuje použití složitého vybavení, včetně inverzního mikroskopu spojeného s mikromanipulačním systémem. Mikromanipulátor v podstatě převádí makroskopické pohyby na mikroskopické, což umožňuje manipulaci s gametami. Je vybaven dvěma rameny, jedno připojené k manipulační pipetě (holding pipetě) a druhé k injekční pipetě, která je v některých případech připojena k systému s piezoelektrickým pohonem.

Manipulační pipeta zachytí oocyt tak, aby jeho pólové tělísko (PB) bylo v poloze 6 nebo 12 ve směru hodinových ručiček. Injekční pipeta, používaná pro imobilizaci a držení jedné spermie, projde membránou oocyta metafáze II a uloží spermii do cytoplazmy. Genetický materiál oocyta se očekává v blízkosti PB, proto je polohování oocyta důležité, aby se minimalizovalo poškození chromozomů nebo vřeténka (Salamone et al. 2017).

Metodologii ICSI podrobně popsalo několik autorů (Yoshida & Perry 2007, Stein & Schultz 2012, Simopoulou et al. 2016).

Pokud jde o přípravu vzorku spermatu, v závislosti na kvalitě a použitém druhu mohou být do ICSI protokolů zahrnuty metody pro selekci pohyblivých spermií, jako je swim-up metoda nebo separace pomocí hustotního gradientu. Vzhledem k tomu, že je potřeba pouze jedna spermie na 1 injikovaný oocyt, každou pejetu s mraženým spermatem lze odstříhnout na několik ICSI dávek (Rader et al. 2016).

Po rozmrazení a selekci spermií je kritickým krokem jejich imobilizace. Za tímto účelem se využívá polyvinylpyrrolidon (PVP) - roztok s vysokou viskozitou, který snižuje pohyblivost spermií (Hyakutake et al. 2015). Pomalý pohyb spermie v PVP umožňuje přiložení injekční pipety přes bičík spermie a odlomit jej o dno manipulační misky. Výsledné narušení bičíku spermie nejen usnadňuje manipulaci se spermií, ale také se předpokládá, že usnadňuje dekonenzaci hlavičky a aktivaci oocyta, což jsou základní kroky během časného vývoje embrya (Morozumi et al. 2006). Odolnost bičíku vůči jeho narušení se u jednotlivých druhů zvířat liší, například u býka je poměrně vysoká.

Pro ICSI jsou využívány komerční nebo ručně vyráběné pipety. Protože se velikost spermií u jednotlivých druhů liší, je třeba použít injekční pipety s různými vnitřními průměry. Tvar pipety dále závisí na použitém systému. Zatímco pro konvenční metodu nebo laserem podporovaný systém se využívají zkosené ostré pipety s hrotem. Při využití piezoelektrického systému se používají pipety tupé. Piezoelektrický aktuátor je připojen k mikromanipulačnímu systému (Smits et al. 2012).

Dalším kritickým krokem je penetrace oolemy. Pokud je použit piezoelektrický aktuátor, je postup značně jednodušší. V případě, že piezoelektrický systém není k dispozici, bude se obtížnost postupu lišit v závislosti na elasticitě membrány oocytů, která se mezi druhy liší.

Piezo-ICSI je modifikovaná forma mikroinjekce, která je úspěšně využívána v myším IVF-ICSI již déle než tři desetiletí. Využívá piezoelektrický aktuátor (vibrační krystalová základna) pro umožnění mikroinjekce pomocí pipety s tupým koncem. Piezo pulz slouží k proražení cytoplazmatické membrány a umožňuje uložení spermie přímo do cytoplazmy, a to bez nutnosti aspirovat cytoplazmu. Bylo publikováno několik studií dokazujících, že piezo-

ICSI zvyšuje míru oplození a snižuje rychlost degenerace oocytů ve srovnání se standardním ICSI (Fujii et al. 2020). Zároveň ale může být použití piezo-injektoru technicky náročnější a vyžaduje použití provozní kapaliny se setrvačnou hmotou uvnitř mikroinjekční pipety pro aktivaci piezo pulsu. Tato kapalina, která je potřebná pro přesné ovládní pulzu, bývá rtuť nebo fluorinert. Ani u jedné z těchto kapalin není prokázána klinická bezpečnost (Zander-Fox et al. 2021).

4.2 Využití ICSI pro hodnocení integrity DNA spermií

4.2.1 Přehled biologického a laboratorního materiálu

Tato práce byla vypracována na základě experimentů a s nimi spojených činností, které byly prováděny ve Výzkumném ústavu živočišné výroby v Uhřetěvsi, v laboratořích Oddělení biologie reprodukce. Veškerý materiál, biologický, laboratorní a přístroje byly ze zdrojů výzkumného ústavu.

4.2.1.1 Modelové organismy

Myší oocyty

Pro účely diplomové práce byly použity laboratorní myši kmene BDF1 a CD1 (Velaz s.r.o.). Konkrétně samice ve věku od 6 do 12 týdnů. Myší oocyty byly vybrány na základě morfologických, fyziologických a ekonomických kritérií. Absence lipidových granul umožňuje lepší viditelnost buněčných struktur. Například prvojádra, která se tvoří po splynutí gamet, jsou díky tomu pozorovatelná světelnou binolupou. Dále pak myší oocyty obsahují množství varianty histonu H2AX, což umožňuje jeho detekci fluorescencí.

Yoshida a Perry (2007) doporučují inbrední kmen B6D2F1, jelikož se tyto myši dobře rozmnožují a efektivně ovulují. Jejich oocyty jsou v porovnání s jinými kmeny odolnější pro mikromanipulace a jejich embrya se úspěšně vyvíjí v in vitro i in vivo podmínkách.

Veškeré manipulace a činnosti spojené s experimentem byly prováděny v souladu se směrnicí 2010/63/EU o ochraně zvířat používaných pro vědecké účely.

Spermie

Spermie využití v tomto pokusu, byly odebírány od samců plemene koza bílá krátkosrstá, které patří mezi genetické zdroje České Republiky. Inseminační dávky byly pro tento pokus rozděleny do tří skupin na základě použitého ředidla, způsobu odběru spermií a místa, kde byly tyto odběry provedeny (viz tab.)

Tabulka 1: Rozdělení skupin spermií

Označení skupiny	ředidlo	způsob odběru	místo odběru
1	AndroMed	umělá vagína	1.ZAS Chorušice
2	AndroMed	elektroejakulace	ČZU, Praha
3	BullXCell	elektroejakulace	ČZU, Praha

Tabulka 2: Porovnání složení ředidel

AndroMed	BullXCell
redestilovaná voda	redestilovaná voda
glycerol	glycerol
kyselina citrónová	kyselina citrónová
cukry	cukry (fruktóza)
pufry	pufry
ATB	ATB
Tris pufr	Fosfolipidy
	Vaječný žloutek (1:4)

4.2.1.2 Chemikálie, roztoky a média

Název / označení	Výrobce / dodavatel
Ethanol	P-LAB, Praha, CZ
Minerální olej	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Rtuť	P-LAB, Praha, CZ
M2 medium	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
EmbryoMax KSOM	Millipore, Praha, CZ
hCG	Intervet, Boxmeer, The Netherlands
Sergon (PMSG)	Bioveta, Ivanovice na Hané, CZ
Hyaluronidáza	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Albumin z bovinního séra (BSA)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
PBS	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Phospho-Histone H2A.X Rabbit mAb	Cellsignal, USA
Alexa Fluor Donkey anti rabbit	Jackson ImmunoResearch, Ely, UK
Montovací medium ProLong Gold (Antifade Reagent with DAPI)	Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Triton X-100	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

Složení manipulačního média M2 je důležitým komponentem a může ovlivnit následný vývoj embrya. Využití média M2 se doporučuje pro manipulaci s myšimi embryi a gametami při laboratorní teplotě. M2 médium je modifikovanou alternativou média M16, kdy jsou směsi bikarbonátu nahrazeny HEPES bufferem ((4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid), který umožňuje relativně dlouhou manipulaci mimo CO₂ inkubátor, jelikož udržuje stabilní pH. Je doplněno také antibiotickými složkami a jako zdroj energie slouží obsažené pyruváty a laktáty, jelikož například glukóza není pro vývoj embryí vhodným zdrojem energie – nedokáže ji ve fázi vývoje efektivně využívat. Manipulační média vyžadují pufrovací systém, který udržuje pH během manipulace. Jsou doporučována média na bázi HEPES nebo MOPS. Bez ohledu na fázi vývoje nebo druh gamet a embryí jsou aminokyseliny (alanin, asparagin, asparát, glutamát, glycin, prolin, serin) nezbytnou součástí manipulačních médií. Tyto aminokyseliny mají zásadní roli při udržování vitality gamet a embryí tím, že působí jako osmolyty, pH pufrů, energetické substráty a chelátory. I krátkodobá expozice (pět minut) embryí manipulačnímu médiu postrádajícího těchto sedm aminokyselin má škodlivý účinek na následný vývoj. Manipulační média by měla být používána při pH 7,2-7,3, protože toto je fyziologické intracelulární pH pro savčí embrya. To je důležité hlavně pro manipulaci s oocyty, protože se zdá, že nemají žádný aktivní transportní systém pH. Manipulační média jsou obvykle doplněna sérovým albuminem (BSA, HSA) nebo syntetickou makromolekulou jako je PVA (poly-vinyl alcohol). (Gardner et al. 2004)

Příprava roztoků:

- PBS:
 - o 200 ml redestilované vody a jedna tableta PBS. Roztok je následně ve sterilních nádobách umístěn do lednice.
- PVP (ředěné v M2)
 - o 1,2 g PVP v 10 ml M2 média. Po rozpuštění PVP vzniká viskózní tekutina, která byla rozdělena do alikvot a umístěna do lednice.
- Manipulační medium M2
 - o Výsledný roztok M2 obsahuje 0,1 % BSA (1 mg BSA + 1 ml média M2)
- PBS/BSA
 - o BSA je rozpuštěno v čistém PBS roztoku. Výsledný roztok s 1% a 3% koncentrací BSA.
- PBS/Triton
 - o Roztok připraven naředěním tritonu X-100 v čistém roztoku PBS (20 µl Tritonu v 10 ml PBS)
- PBS/Paraformaldehyd
 - o 200 mg paraformaldehydu bylo rozpouštěno v 5 ml čistého roztoku PBS při 60-70 °C na magnetické míchače
- Hyaluronidáza
 - o Roztok hyaluronidázy v PBS v koncentraci 0,1 %.

4.2.1.3 Přístroje

Invertovaný mikroskop Olympus IX71	Olympus, Praha, CZ
Mikroinjektor Eppendorf CellTram	Eppendorf, Říčany, CZ
Mikromanipulátor Eppendorf PiezoXpert	Eppendorf, Říčany, CZ
Lupa Nikon SMZ645	Nikon, Praha, CZ
CO2 inkubátor SANYO MCO-17AIC	Schoeller, Praha, CZ
Laminární box ThermoScientific MSC	Thermo Fisher Scientific, DNK
Fluorescenční mikroskop Olympus BX51	Olympus, Praha, CZ
Otavovač kapilár MicroForge MF-900	Narishige, Tokyo, JAP
Vytahovač kapilár Puller Sutter P97	Sutter Instrument, Novato, USA
Sterilizátor EcoCell	Labor-Komplet, Praha, CZ
Laboratorní centrifuga Eppendorf MiniSpin	Eppendorf, Říčany, CZ

4.2.1.4 Ostatní laboratorní materiály

Skleněné kapiláry - holding (1.0x0,58x100mm)	Harvard Apparatus, UK
Skleněné kapiláry - mikroinjekční (1.0x0.78x150mm)	Harvard Apparatus, UK
Zkumavky Nunc 15 ml	Thermo Fisher Scientific, DNK
Parafilm Bemis	P-LAB, Praha, CZ
Petriho misky Nunclon Delta Surface	Thermo Fisher Scientific, DNK
4well miska Nunc IVF Multidish	Thermo Fisher Scientific, DNK
Podložní skla KnittelGlass 76x26 mm	Waldemar Knittel, DE
Krycí skla Glaswarenfabrik 12mm	Glaswarenfabrik Karl Hecht, DE

4.2.2 Výroba mikromanipulačních pipet

Výroba mikromanipulačních pipet vyžaduje specializované vybavení. Postupů na jejich výrobu existuje velké množství, v závislosti na účelu. Oesterle (2008) publikoval příručku pro výrobu manipulačních pipet, ve které uvádí mnoho nastavení programu pro vytahovač.

Mikromanipulační a holdingové pipety byly nejdříve pomocí vytahovače kapilár Puller Sutter (viz obr. č. 1) vyrobeny ze skleněných kapilár značky Harvard Apparatus. Programy pro vytažení holdingových a mikromanipulačních pipet se liší. Z jedné skleněné kapiláry tedy byly získány dvě pipety, které jsou poté opět v závislosti na účelu a typu (mikroinjekční nebo holdingová) upraveny, vhodně tvarovány a taveny pomocí otavovačky kapilár Microforge MF-900 (viz obr. č. 2).



Obrázek 1: Puller Sutter

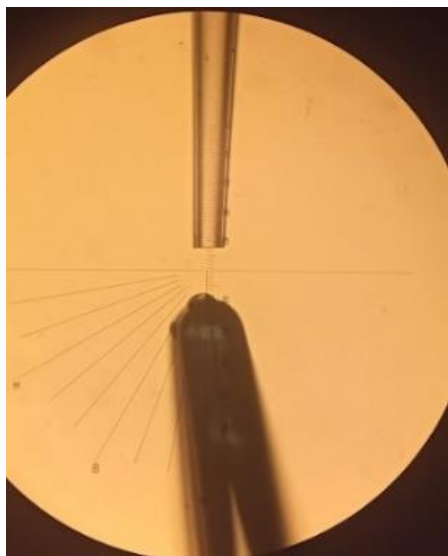


Obrázek 2: Microforge

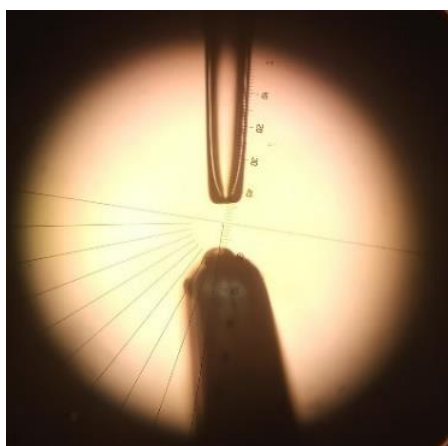


Obrázek 3: Detail vytahování pipety

Holdिंगová pipeta Harvard Apparatus (1.0 OD x 0.58 ID x 100 L mm)
Úprava v otavovačce:



Obrázek 4: holdिंगová pipeta před otavením (foto autor)

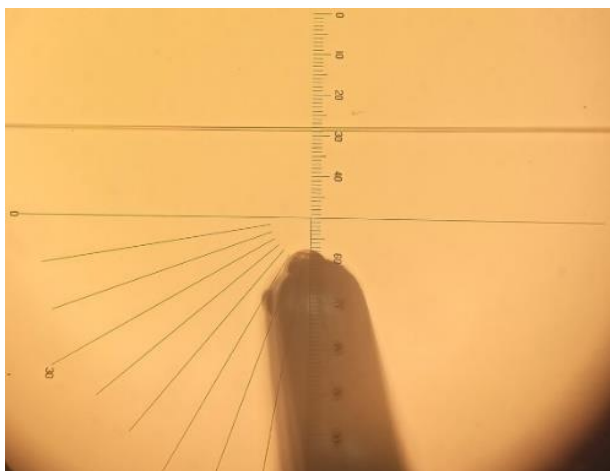


Obrázek 5: otavená holdिंगová pipeta (foto autor)

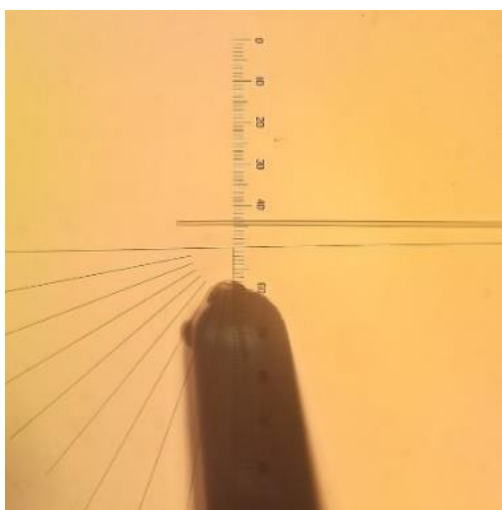


Obrázek 6: ohybání holdिंगové pipety (foto autor)

Mikroinjekční pipeta Harvard Apparatus (1.0 OD x 0.78 ID x 150 L mm)



Obrázek 7: neupravená injekční pipeta (foto autor)



Obrázek 8: upravená injekční pipeta (foto autor)

4.2.3 Hormonální stimulace samic a izolace oocytů

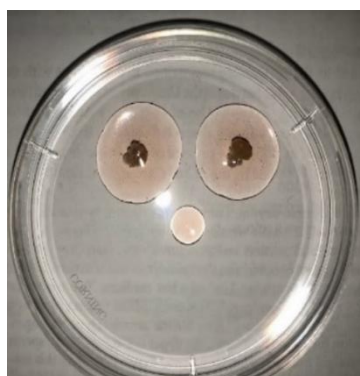
Superovulace byla u myších samic vyvolávána v zásadě podle Rychtářové et.al.2021), s drobnými modifikacemi. 5-7 IU hormonu PMSG (pregnant mare serum gonadotropin). Hormon PMSG je dobře známý hormon využívaný spolu s gestagenem k vyvolání a zefektivnění ovulace například před umělou inseminací. Jedná se o placentární glykoprotein získávaný ze séra březích klisen a je vylučován z endometriálních kalíšků v děloze březích klisen. Tento hormon byl aplikován intraperitoneálně, s následnou aplikací hormonu hCG po 46-47 hodinách.

Samice byly 16-17 hodin po aplikaci hCG v souladu se Směrnicí Evropského parlamentu a Rady vlády z 22. září 2010 (2010/63/EU) o ochraně zvířat používaných pro vědecké účely usmrcovány (dislokace míchy v oblasti krční páteře) a z jejich břišní dutiny byly izolovány vaječníky (viz obr. č. 9). Vaječníky byly vždy bezprostředně po vyjmutí umístěny do Petriho misky s manipulačním médiem M2, které bylo minimálně půl hodiny předem temperováno na 36,4 °C (viz obr. č. 10).

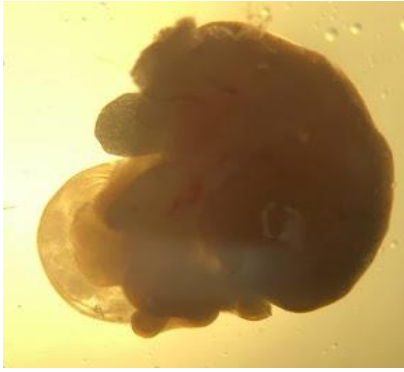
Pod světelnou binolupou byl z ampule vejcovodu (viz obr. č. 11, 12) izolován kumulo-oocytární komplex. Tento „shluk“ oocytů a kumulárních buněk byl následně po dobu několika sekund promýván v 0,1% roztoku hyaluronidázy, která umožní odloučení kumulárních buněk (viz obr. č. 13). Ty byly následně odstraněny pomocí skleněné kapiláry s vnitřním průměrem jen o málo větším, než je samotný oocyt. Samotné oocyty byly poté znovu promyty v manipulačním médiu M2 (viz obr. č. 14). Je důležité oocyty zbavit zbytkové hyaluronidázy ještě před tím, než jsou přemístěny do kultivačního média KSOM. V kultivačním médiu jsou přesunuty do inkubátoru, kde je vhodné je nechat před mikromanipulací zotavit z procesu izolace.



Obrázek 9: izolace vaječníků (foto autor)



Obrázek 10: izolované vaječníky v kapkách M2 (foto autor)



Obrázek 11: vaječník s nálevkou s ovulovanými oocyty (foto autor)



Obrázek 12: protržení nálevky a vyplavení oocytů (foto autor)



Obrázek 13: izolované oocyty s kumulárními buňkami (foto autor)



Obrázek 14: oocyty zbyvené kumulárních buněk (foto autor)

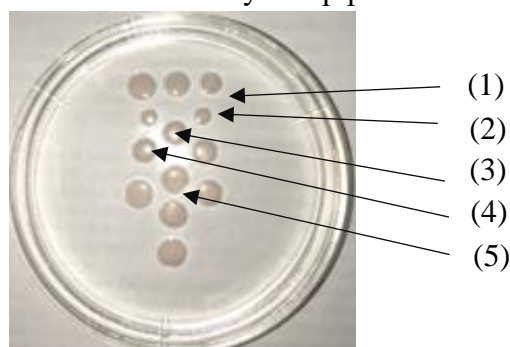
4.2.4 Příprava spermií pro ICSI

V pokusu byly využity tři skupiny kryoprezervovaných spermií. Konkrétně se lišily použitým ředidlem (AndroMed/BullXCell) a způsobem odběru (umělá vagina nebo elektroejakulace). Před každou ICSI byla uříznuta přibližně 0,5 cm dlouhá část pejety, která byla přibližně na 10-15 sekund vyjmuta z ze zásobního kontejneru. Větší část pejety určená k dalšímu uchování byla poté vložena zpět. Sperma z odříznuté části určené pro ICSI bylo rozmrazeno a rozředěno v 100 μ l čistého manipulačního média M2. Tento roztok byl následně v 500 μ l zkumavce centrifugován. Sediment obsahující spermie byl následně pomocí pipety odebrán, znovu naředěn v čistém médiu a centrifugován. Potřebujeme jednotlivé spermie, neřešíme koncentraci ale oplach spermií od ředidla s kryoprotektivní složkou.

Z takto přečištěného sedimentu spermií bylo poté těsně před ICSI odebíráno 20 μ l spermií (řádkově stovky spermií- pro zachování přehlednosti a možnosti výběru konkrétní spermie), které bylo následně využito pro samotnou manipulaci v kapkách média na manipulační Petriho misce.

4.2.5 Příprava na mikromanipulaci

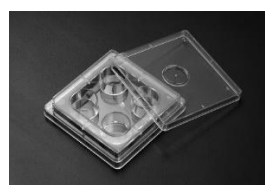
Pro mikromanipulaci byly využívány plastové Petriho misky (Nunclon Delta Surface). Do těchto misek bylo napipetováno několik kapek (viz obr. č. 15).



Obrázek 15: 1 – promývací kapky M2; 2 – PVP; 3 - centrovací kapka M2; 4 – kapky M2 se spermiemi; 5 – manipulační kapky (foto autor)

Petriho miska s kapkami se poté zalije minerálním olejem tak, aby kapky zůstaly pod hladinou minerálního oleje. Do takto připravené manipulační misky byly poté přesunuty spermie a oocyty určené k injikování.

Dále kultivační 4-well misky (viz obr. č. 16) obsahující v každé jamce cca 700 μ l kultivačního média. Tři z těchto jamek slouží k promývání oocytů po manipulaci a jedna pro finální kultivaci oocytů.



Obrázek 16: kultivační 4-well miska (<http://www.spllifesciences.com/en/m21.php?cate=1&idx=236>)

Injekce spermií (ICSI) byla prováděna na manipulátoru (viz obr. č. 17) při laboratorní teplotě. Ještě před umístěním oocytů do kapek manipulační misky, bylo provedeno seřízení (optimální hladina, úhel, vzdálenost rtuti od špičky injekční pipety, atd.) holdingové a mikroinjekční pipety v centrovací kapce M2. Po seřízení byla mikroinjekční pipeta přesunuta do PVP a několikanásobným nasátím roztoku byla lubrikována pro snazší manipulaci se spermiemi. PVP ulpí na vnitřní stěně pipety, proto je nutné veškeré zbytkové PVP z pipety vypustit ještě před samotnou manipulací. Zabrání se tak injikování množství PVP do oocytu a jeho následné apoptóze.

Je vhodné zmínit, že samotné detaily tohoto procesu, jako například rozmístění a počet kapek nebo tvar a úhel kapilár, jsou velmi individuální a odvíjí se od preference laboranta.



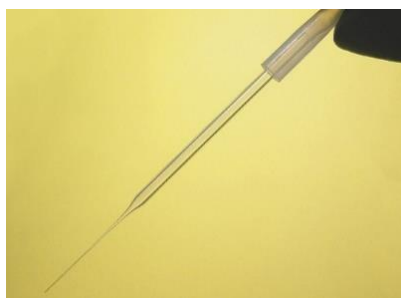
Obrázek 17: mikromanipulátor Eppendorf (foto autor)

4.2.6 ICSI

Při této práci byl zvolen postup, kdy byly pomocí mikroinjekční pipety spermiím odděleny bičíky a jejich hlavičky byly přesunuty do manipulačních kapek s M2. Výhoda tohoto postupu byla spatřena v eliminaci působení případných zbytkových kryoprotektantů a jiných pro oocyt toxických látek.

Po rozmístění hlaviček spermií do jednotlivých manipulačních misek byly oocyty z inkubátoru přesunuty do kapek promývacích (postupně do všech) a následně do kapek manipulačních.

Umístění spermií a oocytů a jejich přesuny nejen mezi médii, ale i inkubátorem a manipulátorem, jsou kritické kroky. Je nutné dbát opatrnosti při práci se skleněnou kapilárou (vhodná velikost, bez poškození) a počítat s různými hustotami a viskozitami roztoků, které mohou veškeré manipulace zkomplikovat. Například PVP se využívá pro jeho lubrikační vlastnosti, které umožňují hladší pohyb spermií uvnitř pipety, ale jeho složení a viskozita negativně působí na oocyty a komplikuje manipulaci, díky čemuž může docházet k poškození nebo ztrátě oocytů. Pro přemísťování oocytů byly používány skleněné kapiláry s gumovou dutinkou (viz obr. č. 18) pro ruční regulaci tlaku v kapiláře, které umožňují jemné nasátí oocytu a jeho opětovné vypuštění. Tyto kapiláry musí být optimálně široké a bez jakéhokoli poškození a práce s nimi vyžaduje cit a preciznost laboratorního technika. Umožňuje však rozdíl od elektronických či mechanických pipet velmi kontrolované a pro oocyty vhodnější zacházení.

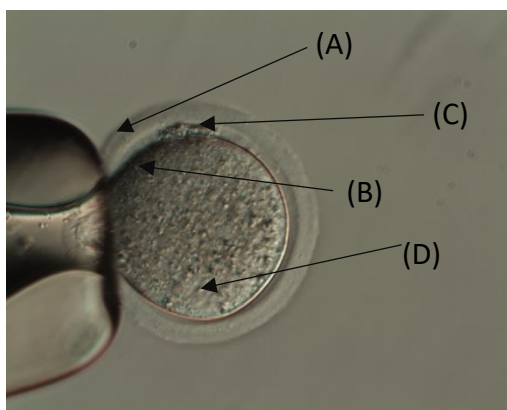


Obrázek 18: skleněná kapilára pro ruční manipulaci s oocyty
<https://www.hilgenberg-gmbh.de/en/products/pipettes/mini-pipettes/>

Pro samotnou mikromanipulaci byly využity již zmíněné holdingové a mikroinjekční pipety. Holdingová pipeta byla umístěna na levé rameno manipulátoru, mikroinjekční pipeta pak na pravé rameno s Piezo systémem.

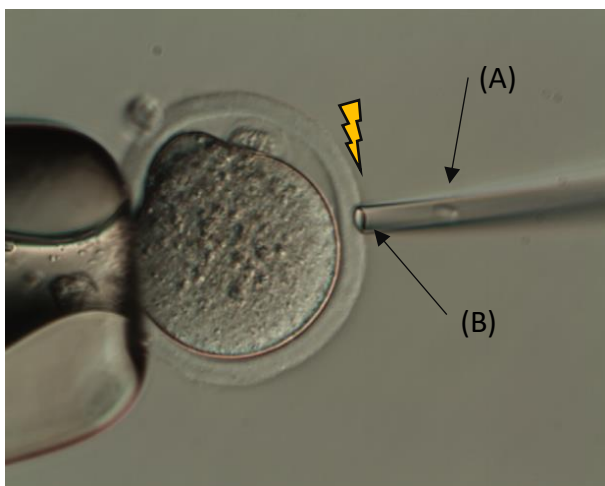
Ještě před samotnou manipulací je nutné do mikroinjekční pipety aplikovat malé množství rtuti, která slouží jako vodící materiál pro elektrický pulz. Následně je tato pipeta již pomocí mikromanipulátoru naplněna z kapky PVP, které slouží pro lubrikaci vnitřní stěny kapiláry a usnadňuje tak manipulaci se spermii. PVP je pro oocyty toxický, je tedy třeba pipetu před samotnou injekcí řádně propláchnout v kapkách manipulačního média M2.

Následně jsou oocyty pomocí holdingové pipety jemným nasátím zachyceny nejen za zona pellucida (ZP), ale i za cytoplazmatickou membránu (viz obr. č. 19). Přichycením cytoplazmatické membrány je zajištěno, aby nedošlo k nežádoucímu pohybu při mikroinjekci. Velmi důležitá je při manipulaci také poloha dělicího vřeténka. To by se po zachycení oocytu mělo optimálně nacházet na pozici 12 nebo 6 hodin.

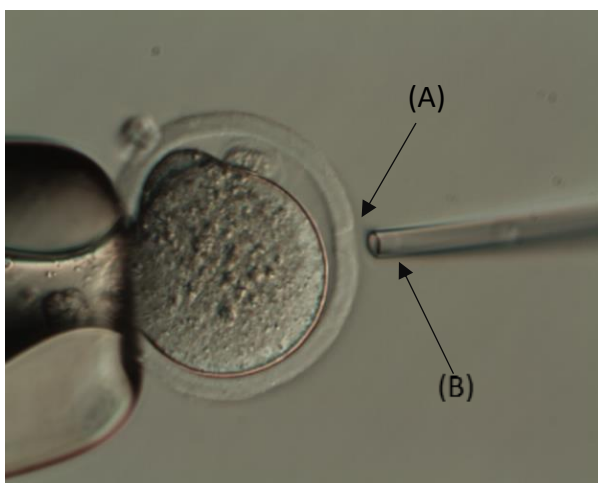


Obrázek 19: A – zona pellucida; B – cytoplazmatická membrána; C – pólóvé tělísko; D – oblast dělicího vřeténka (foto autor)

Pomocí mikroinjekční pipety jsou spermie následně přitlačeny ke dnu Petriho misky a vertikálními a horizontálními pohyby je jim odstraněn bičík. Hlavička spermie je následně nasáta do mikroinjekční pipety (viz obr. č. 20 – A).

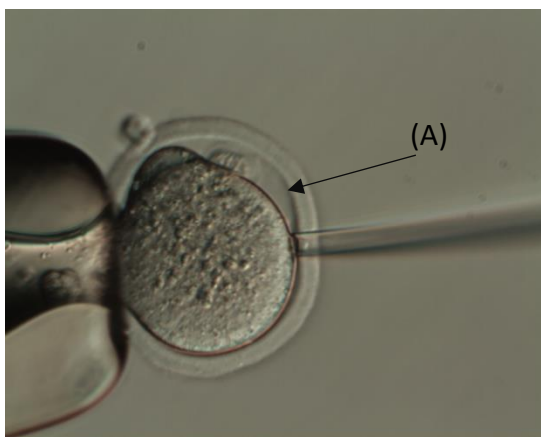


Obrázek 20: A – spermie v injekční pipetě; B – místo průniku injekční pipety (foto autor)

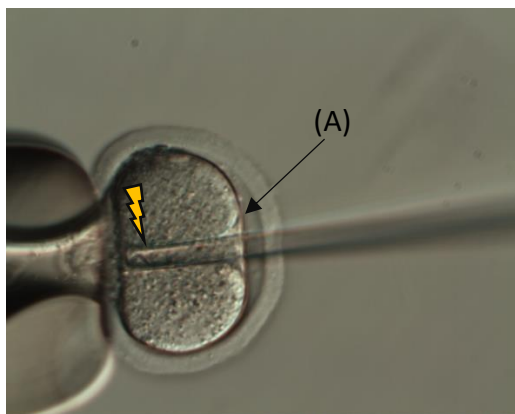


Obrázek 21: A – místo narušení ZP; B -

Mikroinjekční pipeta se jemně přiloží k zona pellucida (viz obr. č. 20 – B) a je aktivován silnější elektrický pulz (piezzo), který naruší ZP (viz obr. č. 21 – A) a umožní průnik pipety do oocytu. Je důležité, aby byla mikroinjekční pipeta zbavena části ZP (viz obr. č. 21 – B) ještě před samotnou injekcí spermie.



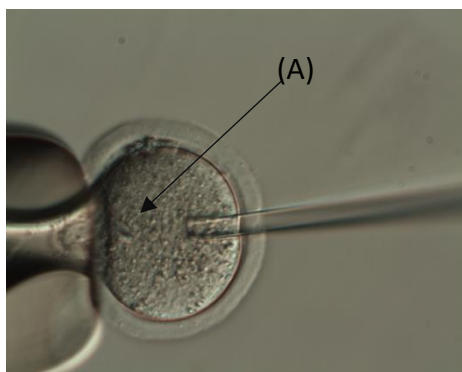
Obrázek 22: A – injekční pipeta přiložená k cytoplazmatické membráně (foto autor)



Obrázek 23: A – prohnutí cytoplazmatické membrány oocyty (foto autor)

Pipeta se přiloží k cytoplazmatické membráně (viz obr. č. 22 – A) a jemným tlakem dojde k jejímu prohnutí (viz obr. č. 23 – A), během kterého je pak aktivován pulz slabší pro porušení membrány tak, aby nedošlo k destrukci cytoplazmatické membrány a vylití cytoplazmy.

Následně je hlavička spermie vypuštěna do cytoplazmy oocyty s co nejmenším množstvím manipulačního média, a to co nejbližší směrem k holdingové pipetě (viz obr. č. 24 – A), spermie by tedy měla být umístěna na opačný konec oocyty vůči místu průniku injekční pipety. Mikroinjekční pipeta je následně opatrně a pomalu vytažena z oocyty a poté je možné uvolnit celý oocyt z holdingové pipety. Někdy je doporučováno během vytahování injekční pipety jemně nasát cytoplazmu a vytvořit pomocí ní “zátku” v otvoru po injekční pipetě (viz obr. č. 25 – A).

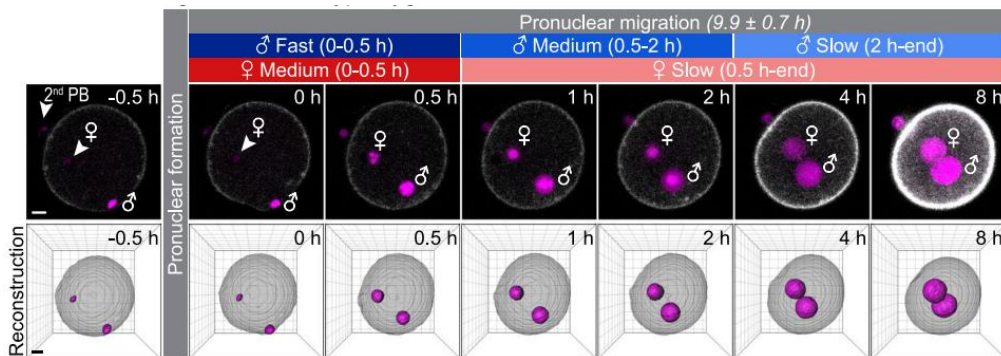


Obrázek 24: A – hlavička spermie v cytoplazmě oocyty (foto autor)



Obrázek 25: A – vytažení injekční pipety a vytvoření zátky (foto autor)

Oocyty byly následně po ICSI omyty od manipulačního média M2 a přemístěny do média kultivačního (KSOM) a uloženy na 8-9 hodin do inkubátoru. Po uplynutí této doby by se oocyty měly nacházet ve vývojové fázi PN5 (viz obr. č. 26). V této fázi jsou poté vyjmuty z kultivačního média, podrobena fixaci a imunofluorescenčnímu barvení.

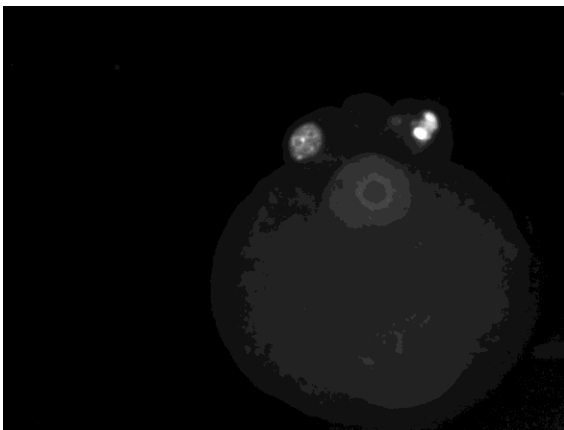


Obrázek 26: znázornění vývoje oplozeného oocyty (Scheffler K. et al. Two mechanisms drive pronuclear migration in mouse zygotes. *Nat Commun* **12**: 841)

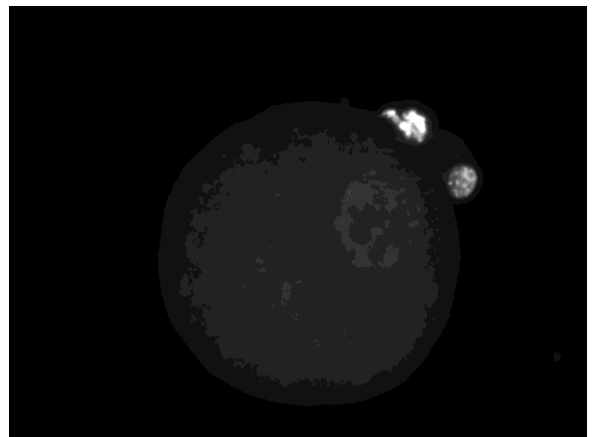
Důvodem pro využití metody ICSI v tomto pokusu byl fakt, že poškození DNA je nejlépe vyhodnocováno za podmínek, ke kterým dochází při splynutí gamet - rozvinutí chromozomů/dekondenzace. Po vytvoření zygoty je možné pomocí fluorescenčního barvení rozlišit samčí a samičí prvojádru a na základě intenzity fluorescence následně vyhodnotit míru poškození DNA.

4.2.7 Fixace oocytů a imunofluorescenční barvení

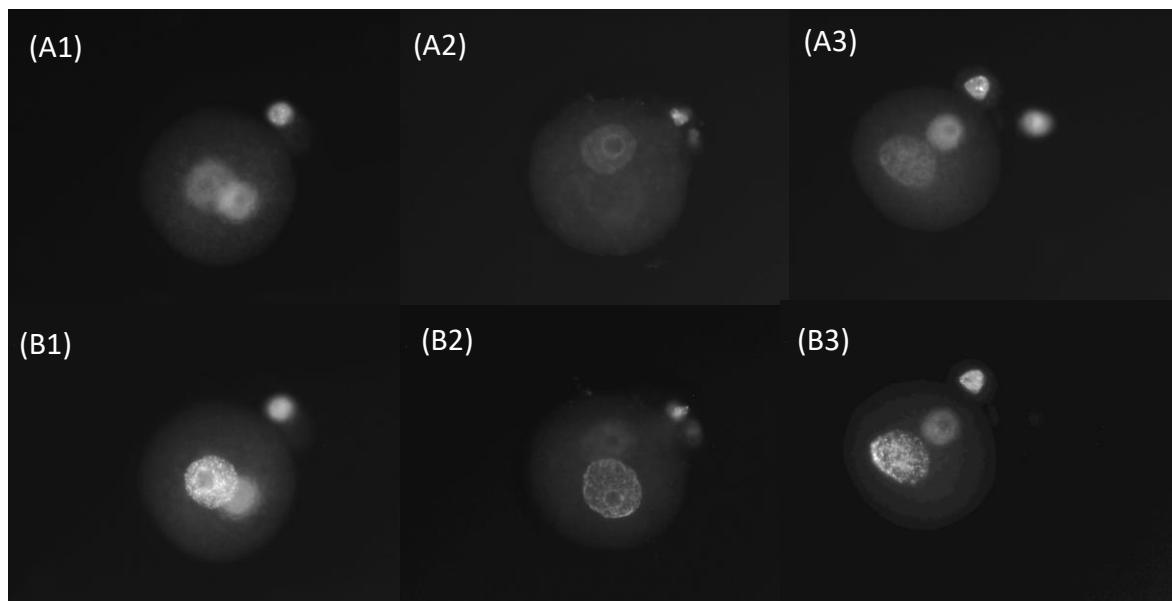
Důvodem pro využití metody ICSI v tomto pokusu byl fakt, že poškození DNA spermií je nejlépe vyhodnocováno za podmínek, ke kterým dochází při splynutí gamet - rozvinutí chromozomů/dekondenzace. Optimální fází vývoje je fáze PN5, které je ale zygota schopna dosáhnout pouze za předpokladu, že nedošlo k jejímu poškození a samotná injekce spermie a následná kultivace oocytů byla provedena precizně. Po vytvoření zygoty je možné pomocí fluorescenčního barvení rozlišit samčí a samičí prvojádru, zviditelnit struktury zygoty a vyhodnotit její vývoj. Vzhledem ke komplikovanosti celé procedury byly zaznamenány různé výsledky.



Obrázek 26: zygota v neoptimální fázi (PN4) (foto autor)



Obrázek 27: partenogeneticky aktivovaný oocyt (foto autor)



Obrázek 28: reprezentativní příklady intenzity fluorescence, A – DAPI, B - γ H2AX (foto autor)

Přibližně 8-9 hodin po ICSI byla prováděna fixace injikovaných oocytů, a to za použití 4% PFA (paraformaldehyd).

Fixace je základním procesem v histochemických a cytochemických výzkumech, při kterých lze pozorovat mikroskopické struktury, jež byly vhodně zpracovány a ošetřeny proti autolytickým jevům. Paraformaldehyd je polymerizovaná forma formaldehydu (FA) a je obecně upřednostňován před FA, jelikož zasítuje aminoskupiny bez změny terciární struktury proteinů. Buněčné struktury tak zůstávají relativně dobře zachovány a zároveň si zachovávají prostupnost pro specifické protilátky (Celikkan et al. 2020).

V roztoku PFA byly oocyty ponechány po dobu 15 minut. Dalším krokem byla permeabilizace membrány oocytu pomocí 0,2% Tritonu, také 15 minut.

Neiontový detergent Triton X-100 je jedním z nejčastěji využívaných činidel využívaných pro zachování prostupnosti membrány, jelikož interaguje s lipidovými dvojvrstvami, které tvoří membrány buněk (Mattei et al. 2011)

Následná blokace po dobu 1 hodiny byla realizována v 3% PBS BSA.

Oocyty byly následně imunofluorescenčně barveny pomocí primární protilátky (ozn. Phospho-Histone H2A.X – Rabbit mAb). Tato protilátka byla naředěna v poměru 1:800 v 1% roztoku PBS/BSA. Do tohoto roztoku s primární protilátkou byly umístěny injikované oocyty a poté kultivovány po dobu 12 hodin při teplotě 4 °C. Po uplynutí této doby byly zygoty znovu propláchnuty v 1% roztoku PBS/BSA a následně po dobu 1 hodiny kultivovány v sekundární protilátce (Alexa Fluor donkey anti rabbit - 1:1000 v 1% PBS/BSA). Důležité je také, aby byly jednotlivé kroky barvení prováděny v temnu. Poté byla sekundární protilátka znovu třikrát odmyta v 1% roztoku PBS/BSA (3x15 minut).

Fluorescenčně barvené zygoty byly následně umístěny do kapky montovacího média ProLong s DAPI (pro zobrazení fluorescence). Tyto preparáty pak byly vyhodnocovány fluorescenčním mikroskopem Olympus BX51.

5 Výsledky

5.1.1 Hormonální stimulace samic - ovulace oocytů

V tomto experimentu bylo použito 45 myších samic (BDF1). Bylo provedeno 24 ICSI procedur (viz. tabulka č.3: Výchozí data jednotlivých procedur). Dvě myši slouží jako pojistka pro případ, že by u jedné z nich selhala hormonální stimulace a myš tak nebyla v optimální fázi cyklu pro získání oocytů ve fázi MII. Pokud byla použita jedna myš, bylo to z důvodu omezeného počtu laboratorních zvířat.

Z ovulovaných oocytů, které byly vyjmuty z ampule vejcovodu, se daly přibližně dvě třetiny z nich označit jako morfologicky kvalitní a v optimální fázi - tedy metafázi II. V některých případech šlo o oocyty s žádným nebo více než jedním pólovým tělískem, nefyziologicky vypadající cytoplazmou (viz obr. č. 29), nebo neoptimálním stádiem vývoje (přítomnost zárodečného váčku). Tyto oocyty byly z dalšího zpracování automaticky vyřazeny.



Obrázek 29: nevhodné oocyty (foto autor)



Obrázek 30: optimální oocyt (foto autor)

5.2 Úspěšnost ICSI

Celkem bylo v rámci tohoto experimentu provedeno 24 ICSI procedur. Jak bylo zmíněno, oocyty byly pro injikování vybírány na základě fáze jejich vývoje, stavu pólového tělíska, cytoplazmy a cytoplazmatické membrány. Optimální fáze vývoje oocyty je pro ICSI metafáze II (viz obr. č. 30) je tedy na oocyty viditelná oblast se zvýšeným obsahem aktinu - je oproti zbytku cytoplazmy mírně vypouklá a nachází se zde dělicí vřeténko. Korektní oocyty zůstávají kompaktní, jsou pravidelného kruhovitého tvaru a jejich cytoplazma vyplňuje většinu oblasti pod ZP.

Na základě těchto aspektů bylo ICSI provedeno celkem u 714 oocytů. Manipulaci a samotnou injekci spermie do ooplasmy přežilo 521 oocytů. Je však potřeba zmínit, že samotná životaschopnost injikovaného oocyty velmi úzce souvisí nejen s použitím nejmodernějších nástrojů a podmínkami prostředí laboratoře, ale i dovednostmi technika, který proceduru ICSI provádí. Od toho se odvíjí i statistické zpracování dat. V případě tohoto experimentu bylo jedním z cílů praktické provedení ICSI a získání zkušeností. Fakt, že zkušenosti byly rozvíjeny spolu s experimentem, hraje důležitou roli při jeho vyhodnocování. Ovlivňuje totiž výsledky natolik, že nebylo možné jednoznačně prokázat vliv studovaných aspektů jednotlivých skupin, jako je druh ředidla a způsob odběru.

Byla však prokázána možnost využití metody ICSI pro hodnocení integrity DNA. Díky této mikromanipulační technice je možné studovat a hodnotit stav DNA během raných procesů oplození. Během něj totiž dochází k dekonenzaci chromozomů, díky čemuž je umožněno navázání fluorescenčně značených protilátek, které se specificky vážou na místa tzv. zlomů DNA. Následně je pomocí fluorescenční mikroskopie možné měřit intenzitu fluorescence a vyhodnotit tak míru poškození vláken DNA.

Další kapitola obsahuje výchozí číselná data, konkrétně počty myší, izolovaných oocytů, injikovaných oocytů, oocytů přeživších ICSI, fixovaných oocytů a zygot.

Následuje stručné statistické vyhodnocení rozdílů mezi skupinami a základní statistická charakteristika.

5.2.1 Statistické vyhodnocení výchozích dat

Tabulka 3: výchozí data

Výchozí data jednotlivých procedur						
skupina (číslo proc.)	počet myší	izolované oocyty	Injikované oocyty	živé inj. oo. (1h)	fixované oo.	zygoty
A (1)	2	25	19	10	7	4
A (2)	2	29	23	12	8	3
A (3)	2	33	22	17	13	7
A (4)	1	17	10	5	1	0
A (5)	2	31	24	14	9	3
A (6)	2	37	29	19	15	6
A (7)	2	30	20	11	6	3
A (8)	2	34	23	14	10	5
Σ (A)	15	236	170	102	69	31
\bar{x} (A)	2	30	21	13	9	4
B (9)	2	26	20	15	9	4
B (10)	2	33	25	13	9	6
B (11)	2	29	18	16	12	5
B (12)	2	34	27	13	10	5
B (13)	2	28	19	11	8	3
B (14)	1	20	17	5	3	1
B (15)	2	38	28	14	10	4
B (16)	2	32	23	18	12	5
Σ (B)	15	240	177	105	73	33
\bar{x} (B)	2	30	22	13	9	4
C (17)	2	29	18	12	8	6
C (18)	2	34	24	15	10	4
C (19)	1	18	14	6	4	2
C (20)	2	31	25	17	12	5
C (21)	2	30	23	15	11	4
C (22)	2	31	20	13	9	5
C (23)	2	36	27	16	11	5
C (24)	2	29	23	15	9	3
Σ (C)	15	238	174	109	74	34
\bar{x} (C)	2	30	22	14	9	4
Σ (A,B,C)	45	714	521	316	216	98
\bar{x} (A,B,C)		30	22	13	9	4

Tabulka 4: statistické vyhodnocení přeživších injikovaných oocytů

Počet živých injikovaných oocytů				
Výběr	Počet	Součet	Průměr	Rozptyl
A	8,00	102,00	12,75	18,79
B	8,00	105,00	13,13	15,27
C	8,00	139,00	17,38	28,27

Tabulka 5: Anova (statistické vyhodnocení přeživších injikovaných oocytů)

ANOVA						
Zdroj variability	SS	Rozdíl	MS	F	Hodnota P	F krit
Mezi výběry	105,6	2,0	52,8	2,5	0,1027	3,467
Všechny výběry	436,3	21,0	20,8			
Celkem	541,8	23,0				

Tabulka 6: statistické vyhodnocení fixovaných oocytů

Počet fixovaných oocytů				
Výběr	Počet	Součet	Průměr	Rozptyl
A	8,00	69,00	8,63	18,55
B	8,00	73,00	9,13	8,13
C	8,00	74,00	9,25	6,21

Tabulka 7: Anova (statistické vyhodnocení fixovaných oocytů)

ANOVA						
Zdroj variability	SS	Rozdíl	MS	F	Hodnota P	F krit
Mezi výběry	1,8	2,0	0,9	0,1	0,9236	3,467
Všechny výběry	230,3	21,0	11,0			
Celkem	232,0	23,0				

Tabulka 8: statistické vyhodnocení zygot

Počet zygot				
Výběr	Počet	Součet	Průměr	Rozptyl
A	8,00	31,00	3,88	4,70
B	8,00	33,00	4,13	2,41
C	8,00	34,00	4,25	1,64

Tabulka 9: Anova (statistické vyhodnocení zygot)

ANOVA						
Zdroj variability	SS	Rozdíl	MS	F	Hodnota P	F krit
Mezi výběry	0,6	2,0	0,3	0,1	0,9053	3,467
Všechny výběry	61,3	21,0	2,9			
Celkem	61,8	23,0				

6 Diskuze

Jak již bylo zmíněno, intracytoplazmatická injekce spermie (ICSI), je mikromanipulační technika umožňující injekci jedné spermie do ooplasmu oocyty v příslušné fázi vývoje (Plermo et al., 1992). V lidské asistované reprodukci se ICSI využívá již více než čtvrt století a stává se populární i v asistované reprodukci domácích nebo ohrožených zvířat. Metoda ICSI totiž umožňuje překonávat anatomické či fyziologické aspekty spermie, které zabraňují jejímu úspěšnému oplodnění oocyty. Může se jednat například o nedostatečnou motilitu spermie, nebo anatomické změny v podobě poškození či ztráty bičíku. Využití metody ICSI je vhodné také v případech, kdy je počet dostupných oocytů omezený a je tak potřeba zvýšit šanci na jejich oplození a následný embryonální vývoj jedince, jehož genetický materiál je cenný, ale z různých důvodů není přirozeně schopný oplození.

Dalo by se tedy říci, že jediným požadavkem pro úspěšnou ICSI je spermie s intaktní DNA. I patologický jev, jako je globozoospermie, je možné díky ICSI překonat. Globozoospermie je strukturální abnormalita spermií, spojená s nedostatkem specifické fosfolipázy C (PLC ζ) a nepřítomností akrozomů, jejichž reakce jsou esenciální při splynutí gamet. ICSI tedy umožňuje oplození i spermiím, které by ho za přirozených okolností nikdy nedosáhly. To vyvolává diskuse ohledně bezpečnosti této metody ve smyslu „obcházení“ přirozených bariér a nechtěnému poškození DNA či přenosu defektního paternálního genomu (Castro et al. 2019). Existují obavy, zda využívání této techniky nepovede k reprodukci potomků, u nichž dojde ke zvyšování výskytu případné poruchy, která se přenáší skrze otcovský genom. Pokud má tedy samčí neplodnost příčinu genetického původu, může po ICSI dojít k přenosu genetického základu pro neplodnost do následné generace.

Negativním aspektem je možnost přenosu infekčních onemocnění, jejichž přenos je právě díky ICSI umožněn. Aby měly patogeny vliv na oocyt, musí proniknout ZP, aby mohly působit na cytoplazmatickou membránu. Otvor, který vzniká po injekci spermie tedy tuhle přirozenou bariéru oocyty narušuje a zvyšuje tak riziko kontaminace. Tomu lze ale relativně účinně předcházet očištěním od semenné plazmy, nebo použitím antimikrobiální léčby (Bielanski, 2007).

Technika ICSI se provádí za použití různých procedurálních postupů a její provedení se může mezi laboratořemi, v závislosti na preferencích, lišit (Lazzari et al. 2020). K samotné ICSI je potřeba inverzní mikroskop s dvouramenným mikromanipulačním systémem. Jedno z těchto ramen slouží pro manipulaci s holdingovou (přidržovací) pipetou a druhé pro injekční pipetu. Velikost spermií se mezidruhově liší a je třeba ji zohlednit při výběru mikromanipulačních pipet. Například pro býčí a prasečí spermie jsou vhodné pipety s průměrem 9 μm , pro koně s průměrem 7 μm .

Samotná ICSI se provádí v kapkách manipulačního média v Petriho misce. Tato manipulační média jsou často na bázi HEPES pufovaného média obsahujícího albumin, laktát a pyruvát, jako zdroj energie pro oocyty. Kapky manipulačního média obsahující oocyty a spermie, jsou poté zalaty minerálním olejem, aby nedocházelo k evaporaci média a změně jeho

pH. Spermie je naproti tomu vhodné umístit do kapky polyvinylpyrrolidonu (PVP), jehož viskozita snižuje motilitu spermií a umožňuje lubrikaci injekční pipety pro hladší průchod spermie (Hyakutake et al. 2015). Spermie je před samotným nasátím injekční pipetou zbavena bičíku a následně vpravena do cytoplazmy oocyty.

Je důležité zmínit, že ICSI je v dnešní době stále mnohem efektivnější v asistované reprodukci člověka než domácích zvířat. Mezi hlavní důvody patří fakt, že se vývojem metody ICSI a její implementací u různých živočišných druhů zabývá relativně málo výzkumníků. Fyziologické vlastnosti a jim odpovídající technologické postupy se mezi jednotlivými živočišnými druhy často výrazně liší. Existuje stále velké množství aspektů oplození, které nejsou dostatečně prozkoumány a které omezují možnosti využití ICSI a jejího úspěšného provedení.

Mezi tyto aspekty patří například vlastnosti plazmatické membrány spermií, které jsou u některých druhů přívětivější než u jiných. Pokud jsou plazmatické membrány spermií velmi stabilní a odolné, zachovávají si jejich neporušenost i několik hodin. To může mít za následek úplné selhání ICSI, respektive značné zpoždění aktivace oocyty. Tento problém se týká například spermií beranů, které mají odolné membrány a po jejich injekci do oocyty nedochází k jejímu narušení a tím pádem nedochází ani k aktivaci oocyty nebo utvoření cytoskeletárního systému. V některých případech byl tento problém vyřešen odstraněním plazmatické membrány spermie před samotnou injekcí. Při tomto postupu je nezbytné, aby nedošlo k poškození jádra, jelikož i samotným odstraněním plazmatické membrány dochází k jeho destabilizaci. Spermie bez plazmatické membrány přežívají déle v médiích bohatých na draslík (Yanagimachi 2004).

Membrány jsou ale důležitým faktorem i z hlediska oocyty. Oolema nezralých oocytů ve stádiu zárodečného váčku (GV) jsou extrémně náchylné k mechanickému poškození, a proto je provedení ICSI u GV oocyty téměř nemožné. Schopnost hojení oolemy se výrazně zvyšuje po rozpadu zárodečného váčku oocyty, ale i tak se její celková schopnost regenerace mezi druhy liší. Podle Kishigamiho a kol. (2004) je oolema aktivovaného myšího oocyty odolnější vůči mechanickému poškození než v případě oocytů neaktivovaných. Aktivace oocyty před samotnou ICSI tedy může zvýšit šanci na úspěch.

Mezi další řešené problémy patří struktury akrozomu a akrozomální reakce. Akrozom spermie obsahuje množství hydrolyzujících enzymů, k jejichž uvolňování dochází před průnikem ZP oocyty. Během průniku ZP spermie většinu akrozomu ztrácí, a do ooplazmy vstupují během přirozeného oplození pouze vnitřní akrozomální membrána a část vnější akrozomální membrány. Naopak při konvenční ICSI se zavádí spermie s celým akrozomem. To například v případě lidských či myších spermií a oocytů nedělá větší problémy, ale v případě živočišných druhů jako je např. křeček zlatý, nedochází z důvodu přítomnosti akrozomu k dekondukcí jádra spermie a nemůže tak dojít k oplození. Ideálním řešením by tedy byla injekce spermií s fyziologicky aktivovaným akrozomem, ale rozlišování těchto spermií mezi ostatními by bylo obtížné u druhů, jejichž akrozomy zabírají pouze malou část hlavičky spermie (Nakai et al. 2003).

Již zmíněná aktivace oocyty je dalším komplikovaným aspektem. Ke zpoždění aktivace tedy dochází jednak kvůli pomalému rozpadu plazmatické membrány spermii, ale také například kvůli přítomnosti manipulačního média kolem injikované hlavičky spermie. To může zpomalovat interakce mezi intracelulárními složkami spermii a ooplasmu. Aktivace oocyty probíhá přirozeně díky faktorům obsaženým ve spermii. Při ICSI je vhodné tyto faktory stimulovat a usnadnit tak aktivaci a následný embryonální vývoj. Reagencie používané ke stimulaci zahrnují ethanol, ionofor vápníku, stroncium a další. Další z možností je aktivace pomocí elektrického pulzu (Briski & Salamone 2022).

Využití elektrického pulzu souvisí i s modifikací ICSI pomocí piezo-drill (PD) systému. Použití piezo systému zahrnuje tupou injekční mikropipetu s piezoelectrickou vibrační kapacitou, která umožňuje průnik do ZP a porušení plazmatické membrány. To má za následek snadnější provedení postupu. Autoři jako Wei a Fukui (2002), nebo Yoshida a Perry (2007) se shodují na lepší účinnosti této techniky, ve srovnání s klasickým provedením ICSI. Například u živočišných druhů jako je skot, jsou plazmatické membrány oocyty odolnější a představují větší překážku pro mikroinjekční pipetu. Piezo systém je pro průnik membránou efektivnější.

Morozumi et al. 2006 zmiňuje, že využití piezo systému by mohlo pomoci při narušení integrity membrány spermii a následným uvolněním pro aktivaci oocyty potřebné fosfolipázy C. Anzalone et al. 2016 prokázal narušení integrity plazmatické membrány spermie po imobilizaci piezo systémem pomocí barviv, která za normálních okolností membránou neprostoupí. Kitamura (2015) poukazuje na zlepšení schopnosti tvorby prvojadra po použití piezo systému.

Vybavení s piezo systémem je však poměrně drahé a jeho efektivní použití vyžaduje školení a praxi. Výkon piezo systému a jeho účinnost může být ovlivněna použitím kapalné rtuti ve špičce injekční mikropipety. Jedná se však o neurotoxicky působící látku. Fluorinert, perfluorovaný olej byl testován jako náhrada rtuti, nicméně i ten má toxické vlastnosti.

V současné době se ICSI v asistované reprodukci zvířat nejlépe uplatňuje v chovu koní. Přesto, že byly provedeny studie u mnoha druhů zvířat, mezi něž patří například králíci (Iritani & Hosoi 1989), skot (Goto et al. 1990), myši (Kimura & Yanagimachi 1995), ovce (Catt et al., 1996), kozy (Keskintepe et al. 1997), kočky (Pope et al. 1998), japonské opice (Hosoi et al. 1998), psi (Fulton et al. 1998), prasata (Kolbe & Holtz 2000), gorily (Loskutoff et al. 2004), lvi (Damiani et al. 2004) a vombati (West et al. 2007), je v současné době ICSI efektivní, ekonomicky rentabilní a perspektivní metodou hlavně v zájmovém chovu sportovních koní.

Provedení ICSI u koní poprvé zaznamenal Squires () a následné použití piezo systému bylo dalším průlomem. ICSI nahradilo neúspěšné konvenční IVF a umožnilo využití spermatu špatné kvality nebo dostupného ve velmi malém množství, pro produkci embryí. Kultivace embryí do stádia blastocyt je důležitou fází úspěšné ART. V případě koňských embryí je například možné kryokonzervovat in vitro embrya a tím eliminovat potřebu monitorování a kontroly velkého počtu příjemkyň pro přenos čerstvého embrya. Výhodou je také možnost nechirurgického přenosu embrya v rané fázi vývoje do dělohy klisny příjemkyně. K jejich přenosu byla v průběhu let s dobrou úspěšností používána řada médií, což poukazuje na relativní toleranci embryí vůči stresu a na to, že se dokáží přizpůsobit in vitro podmínkám (Squires et al. 1996).

Počet in vitro produkovaných embryí u skotu může být až dvojnásobný, díky efektivní superovulaci a technice OPU, která ve spojení s IVF tvoří hodnotnou technologii, která je velmi efektivní a vhodná pro využití v chovech živočišné produkce skotu. Na rozdíl od koní, kde superovulace není kvůli anatomickým vlastnostem ovarií tak efektivní (Viana 2018). Začala se tedy v klinické praxi reprodukce koní uplatňovat tzv. OPU-ICSI, která zahrnuje odběr oocytů z vaječnicků klisny dárkyně a jejich in vitro oplození pomocí ICSI (Galli 2016). Bylo navíc zjištěno, že koňské oocyty mohou být uchovávány při pokojové teplotě (22°C) po dobu až 24 hodin bez ztráty životaschopnosti. To umožňuje jejich snadný a bezpečný transport na specializované pracoviště. Mezi další výhody patří flexibilita, kterou OPU-ICSI zprostředkovává. Lze ji provádět kdykoli během roku a dá se pro ni využít sperma pro přirozené oplození nepoužitelné. Otevírá tak nové možnosti pro genetické zlepšení populací koní a také využívá komerční potenciál spolehlivě mrazených embryí a celosvětového obchodu s nimi (Squires 2019).

Mikromanipulační technika ICSI umožňuje také využití transgeneze. Té se dnes nejčastěji dosahuje injekcí žádoucího genu do samčího prvojádra zygoty a následným přenosem výsledných embryí matkám. Při tomto postupu ale často dochází k chimérismu transgenu, což znamená, že dochází k jeho integraci před i po prvním štěpení zygot. Účinnost se v tomto případě pohybuje okolo 3 %. Transgeneze zprostředkovaná pomocí ICSI lze dosáhnout injekcí spermie se zabudovaným žádoucím genem do neoplozeného zralého oocytu. Účinnost tohoto postupu stoupá k 7 % a k chimérismu ve většině případů nedochází. To poukazuje na fakt, že je požadovaný transgen integrován do genomu před prvním štěpením. Využití tohoto postupu také umožňuje přenos větších fragmentů transgenu (>170 kb) (Perry 1999).

Tato technika byla použita pro produkci transgenních embryí u hospodářských zvířat, jako je skot (Sekhavati et al. 2018), ovce (Gou et al. 2002), koně (Zaniboni et al. 2013) a prasata (Lai et al. 2001).

Zajímavé možnosti představují kombinace ICSI s některými již vyvinutými technologiemi. Mezi ně patří například technologie pro konzervaci samčích gamet – lyofilizace. První ICSI s využitím mrazem vysušené spermie provedli u myši Wakayama a Yanagimachi (1998). Následně se povedlo vyprodukovat životaschopná myší mláďata (Kaneko et al. 2003). Tyto úspěšné pokusy vedly k vývoji využití u velkých zvířat, konkrétně u prasat (Nakai et al. 2007), skotu (Lee 2006), ovcí (Palazzese et al. 2017) a koní (Choi et al. 2011). Byl dokonce proveden jakýsi futuristický experiment, kdy bylo lyofilizované myší sperma v rámci vesmírného výzkumu transportováno na Mezinárodní vesmírnou stanici, během čehož bylo devět měsíců uchováváno při -95 °C a vystaveno kosmické radiaci, která je více než stokrát vyšší než na Zemi. Tento vzorek spermatu byl následně transportován z vesmíru zpět a použit pro oplození myších oocytů. Výsledkem byli zdraví potomci, shodní s kontrolní skupinou (Wakayama et al. 2017).

ICSI by mohla být nápomocnou také při výzkumu nových technologií pro zlepšení reprodukce hospodářských zvířat, jako je derivace zárodečných buněk z buněk kmenových, což obvykle vede ke vzniku gamet s pro oplození nedostatečnými vlastnostmi. Hayashi et al. (2012) během výzkumu takto vzniklých gamet produkoval živá myší mláďata, což vedlo k dalším výzkumům využití u hospodářských zvířat (Goszczynski et al. 2019). U těchto druhů je ale in vitro gametogeneze stále v raných experimentálních fázích vývoje. Teoreticky by ale bylo

možné produkovat celé in vitro generace, a to díky genomickým technologiím, jako jsou SNP a next-gen sekvenování. To by umožnilo urychlit genetický pokrok v populacích hospodářských zvířat.

V této práci bylo popsáno využití ICSI jako nástroje pro vyhodnocování míry poškození paternální DNA. Během fáze splynutí buněk a následného štěpení dochází k jedinečným jevům souvisejícím s replikací DNA. Dochází k dekondukcii chromozomů, a to umožňuje efektivnější navázání fluorescenčně značených protilátek na požadovaná místa DNA.

Účelem této práce tedy bylo představení metody ICSI a jejích mezidruhových specifikací. Způsoby jejího využití, výhody a nevýhody aplikace této metody. Praktická část byla postavena na základě experimentu souvisejícím s vyhodnocováním poškození paternální DNA. Tento způsob využití je nejen materiálně nenáročný (dobře dostupné myší oocyty a kozlí spermie), ale i časově. V případě cílení na vývoj zygoty, dochází k jejímu vývoji relativně rychle a případné výsledky lze tak v krátké době zpracovat a vyhodnotit.

Mikromanipulační technika ICSI tedy představuje technologii, která má velký potenciál a vývoj jejího využití v asistované reprodukci hospodářských zvířat by mohl pomoci při zachování genové variability populací a urychlení genetického zisku. Umožňuje totiž využití i za normálních okolností oplození neschopných spermií.

7 Závěr

- Mikromanipulační technika ICSI bezesporu hraje důležitou roli v asistované reprodukci nejen u lidí, ale v poslední době i v chovu hospodářských zvířat. Její uplatnění je možné nalézt ve výzkumných programech zaměřených na buněčné procesy jako je oplození, replikace DNA, nebo monitorování fyziologického stavu pohlavních buněk a posléze raného vývoje embryí.
- Jeden ze způsobů takového využití byl popsán v této práci. Bohužel se vzhledem k náročnosti metody a postupnému získávání zkušeností nepodařilo ověřit výchozí hypotézu. To ovšem vypovídá o náročnosti metody na kvalifikované osoby provádějící zmíněnou proceduru, nevylučuje to však její využití při experimentech podobného zaměření.
- Hlavním cílem této práce bylo seznámení s mikromanipulační technikou ICSI a
- Využití v asistované reprodukci u lidí je široce rozšířené a provádí se zcela komerčně. U zvířat je dosažení cíle produkce živých potomků limitovaná anatomickými a fyziologickými rozdíly, které se výzkumné týmy snaží překonávat.
- ICSI se v současné době začíná efektivně využívat v chovu koní. Je však potřeba zmínit, že koně jsou v dnešní době chováni především jako zájmová zvířata a jejich produkce není primárně cílena na produkci živočišnou. Cílem chovatelů je získání geneticky hodnotných jedinců a jejich využití v reprodukci i během sportovního života koně. Toto umožňuje ICSI v kombinaci s OPU, kdy je možné získávat oocyty geneticky či výkonnostně kvalitních klisen (dárkyň), jejich oplození a následnou březost i porod pomocí klisen příjemkyň.
- Za využitím ICSI v chovu koní stojí především fakt, že hodnoty geneticky či výkonnostně kvalitních jedinců se pohybují v řádech sta tisíců a chovatelé vítají možnost reprodukce takto hodnotných zvířat bez rizika přenosu infekcí, zranění či nutnosti transportu na dlouhé vzdálenosti. Metoda ICSI navíc umožňuje využití samčích pohlavních buněk, které by za normálních okolností již nebyly oplození schopné. Chovatelé díky tomu mohou nadále reprodukovat jedince, kteří jsou například v pokročilém věku, nebo jsou jejich pohlavní buňky různým způsobem pro reprodukci znevýhodněné.
- V případě jiných hospodářských druhů je stále nutné překonat velké množství překážek. Mezi ně patří například problémy s aktivací oocytů, akrozomovou reakcí nebo dekonzenzací chromozomů.
- Obecně se ale dá říct, že je metoda ICSI velmi perspektivní a je stále zdokonalována a optimalizována. Představuje důležitou součást výzkumných procedur a usiluje se o její efektivní využití v asistované reprodukci nejen u hospodářských zvířat, ale i divoce žijících ohrožených druhů.

8 Literatura

- Agarwal A, Nallella KP, Allamaneni SS, Said TM. 2004. Role of antioxidants in treatment of male infertility: an overview of the literature. *Reproductive biomedicine online* **8**: 616-627.
- Aguila L, Felmer R, Arias ME, Navarrete F, Martin-Hidalgo D, Lee HC, Visconti P & Fissore R. 2017. Defective sperm head decondensation undermines the success of ICSI in the bovine. *Reproduction* **154**: 207–218.
- Aitken RJ. 1999. The Amoroso Lecture. The human spermatozoon—a cell in crisis? *Journal of Reproduction and Fertility* **115**:1-7.
- Arias ME, Sanchez S, Felmer R. 2016. Effect of anisomycin, a protein synthesis inhibitor, on the in vitro developmental potential, ploidy and embryo quality of bovine ICSI embryos. *Zygote* **24**: 724–732.
- Arias ME, Risopatron J, Sanchez R, Felmer R. 2015. Intracytoplasmic sperm injection affects embryo developmental potential and gene expression in cattle. *Reproductive Biology* **15**: 34–41.
- Barnes FL, First NL. 1991. Embryonic transcription in in vitro cultured bovine embryos. *Molecular Reproduction Dev* **29**:117-123.
- Castro LS, Siqueira AFP, Hamilton TRS, Mendes CM, Visintin JA, Assumpção MEOA. 2019. Effect of bovine sperm chromatin integrity evaluated using three different methods on in vitro fertility. *Theriogenology* **107**:142-148.
- Catt SL, Catt JW, Gomez MC, Maxwell WM, Evans G. 1996. Birth of a male lamb derived from an in vitro matured oocyte fertilized by intracytoplasmic injection of a single presumptive male sperm. *Veterinary Record* **16**: 494–495.
- Celikkan FT, Mungan C, Sucu M et al. 2020. PFA is superior to glyoxal in preserving oocyte, embryo, and stem cell proteins evidenced by super-resolution microscopical surveys of epitopes. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* **37**: 369–384.
- Cochran R, Meintjes M, Reggio B, Hylan D, Carter J, Pinto C, Paccamonti D, Godke RA. 1998. Live foals produced from sperm-injected oocytes derived from pregnant mares. *Journal of Equine Veterinary Science* **18**: 736–740.
- Conti M, Franciosi F. 2018. Acquisition of oocyte competence to develop as an embryo: integrated nuclear and cytoplasmic events, *Human Reproduction Update* **24**:245–266.
- Coy P, Romar R. 2002. In vitro production of pig embryos: a point of view. *Reproduction, Fertility and Development* **14**: 275–286.
- Dinnyes A, Dai Y, Jiang S, Yang X. 2000. High developmental rates of vitrified bovine oocytes following parthenogenetic activation, in vitro fertilization, and somatic cell nuclear transfer. *Biol Reprod* **63**: 513-518.
- Edwards R. 1965. Maturation in vitro of Mouse, Sheep, Cow, Pig, Rhesus Monkey and Human Ovarian Oocytes. *Nature* **208**: 349–351.
- Farrell JA, O’Farrell PH. 2014. From egg to gastrula: how the cell cycle is remodeled during the *Drosophila* mid-blastula transition. *Annu Rev Genet* **48**: 269–294.

- First NL, Leibfried-Rutledge ML, Sirard MA. 1988. Cytoplasmic control of oocyte maturation and species differences in the development of maturational competence. *Prog Clin Biol Res* **267**: 1-46.
- Freour T, Vassena R. 2017. Transcriptomics analysis and human preimplantation development. *J Proteomics* **162**: 135–140.
- Fujii Y, Endo Y, Mitsuhashi S, Hayashi M, Motoyama H. 2020. Evaluation of the effect of piezo.intracytoplasmic sperm injection on the laboratory, clinical, and neonatal outcomes. *Reproductive Medicine and Biology* **19**: 198-205.
- Galli C, Colleoni S, Claes A, Beitsma M, Deelen C, Necchi D, et al. 2016. Overnight shipping of equine oocytes from remote locations to an ART laboratory enables access to the flexibility of Ovum Pick Up-ICSI and embryo cryopreservation technologies. *Journal of Equine Veterinary Science* **41**: 82.
- Galli C, Colleoni S, Duchi R, Lagutina I. and 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**: 39-55.
- 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**: 138–151.
- Galli C, Vassiliev I, Lagutina I, Galli A, Lazzari G. 2003. Bovine embryo development following ICSI: effect of activation, sperm capacitation and pre-treatment with dithiothreitol. *Theriogenology* **60**:1467-80. .
- Gardner DK, Lane M, Watson AJ. 2004. *A Laboratory Guide to the Mammalian Embryo*. Oxford University Press USA. p. 409.
- Gomez MC, Catt JW, Evans G, Maxwell WM. 1998. Cleavage, development and competence of sheep embryos fertilized by intracytoplasmic sperm injection and in vitro fertilization. *Theriogenology* **49**: 1143–1154.
- Goto K, Kinoshita A, Takuma Y, Ogawa K. 1990. Fertilization of bovine oocytes by the injection of immobilized, killed spermatozoa. *Veterinary Research* **139**: 494–495.
- Gou KM, An XR, Tian JH, Chen YF. 2002. Sheep transgenic embryos produced by intracytoplasmic sperm injection. *Shi Yan Sheng Wu Xue Bao* **35**: 103-108.
- Hampl A, Eppig JJ. 1995. Analysis of the mechanism(s) of metaphase I arrest in maturing mouse oocytes. *Development* **121**: 925-933.
- Hawley LR, Enders AC, Hinrichs K. 1995. Comparison of equine and bovine oocyte-cumulus morphology within the ovarian follicle. *Biology of Reproduction* **1**: 243–252
- Hinrichs K, Choi YH, Love CC, Spacek S. 2014. Use of in vitro maturation of oocytes, intracytoplasmic sperm injection and in vitro culture to the blastocyst stage in a commercial equine assisted reproduction program. *J. Equine. Vet. Science* **34**: 176.
- Hinrichs K. 2005. Update on equine ICSI and cloning. *Theriogenology* **64**: 535–541.
- Hinrichs, K. 2010. The equine oocyte: factors affecting meiotic and developmental competence. *Mol. Reprod. Development* **77**: 651–661.

- Hosoi Y, Iritani A. 1993. Rabbit microfertilization. *Molecular Reproduction and Development* **36**: 282–284.
- Hyakutake T, Suzuki H, Yamamoto S. 2015. Effect of viscosity on motion characteristics of bovine sperm. *Journal of Aero Aqua Bio Mechanisms* **4**: 63–70.
- Choi YH, Love CC, Love LB, Varner DD, Brinsko SP, 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 sperm. *Reproduction* **123**: 455-465.
- Choi YH, Love CC, Varner DD, Love LB & Hinrichs K. 2003. 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**: 1219–1229.
- Choi YH, Varner DD, Hartman DL, Hinrichs K. 2006. Blastocyst production from equine oocytes fertilized by intracytoplasmic injection of lyophilized sperm, *Animal Reproduction Science* **94**: 307-308.
- Jacobson CC, Choi YH, Hayden SS, Hinrichs K. 2010. Recovery of mare oocytes on a fixed biweekly schedule, and resulting blastocyst formation after intracytoplasmic sperm injection. *Theriogenol.* **73**: 1116–1126.
- Jennings TA. 2002: Lyophilization. In: *Introduction and Basic Principles* (ed.) Interpharm CRC. New York.
- Kaneko T, Whittingham DG, Overstreet JW, Yanagimachi R. 2003. Tolerance of the mouse sperm nuclei to freeze-drying depends on their disulfide status. *Biology of reproduction* **69**: 1859-1862.
- Kimura Y, Yanagimachi R. 1995. Intracytoplasmic sperm injection in the mouse. *Biology of Reproduction* **52**: 709–720.
- Kolbe T, Holtz W. 2000. Birth of a piglet derived from an oocyte fertilized by intracytoplasmic sperm injection (ICSI). *Animal Reproduction Science* **64**: 97–101.
- Kren R, Kikuchi K, Nakai M, Miyano T, Ogushi S, Nagai T, Fulka Jr J. 2003. Intracytoplasmic sperm injection in the pig: where is the problem? *Journal of Reproduction and Development* **49**: 271-273.
- Lazzari G, Colleoni S, Crotti G, Turini P, Fiorini G, Barandalla M, Landriscina L, Dolci G, Benedetti M, Duchi R, Galli C. 2020. Laboratory Production of Equine Embryos. *Journal of Equine Veterinary Science* **89**: 97–103.
- Lee KB, Niwa K. 2006. Fertilization and development in vitro of bovine oocytes following intracytoplasmic injection of heat-dried sperm heads. *Biology of reproduction* **74**: 146-152.
- Li X, Morris LH, Allen WR. 2000. Effects of different activation treatments on fertilization of horse oocytes by intracytoplasmic sperm injection. *Journal of Reproduction and Fertility* **119**: 253-260.
- Li X, Morris LH, 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**: 925– 932.

- Malcuit C, Kurokawa M, Fissore RA. 2006. Calcium oscillations and mammalian egg activation. *Journal of Cellular Physiology* **206**: 565–573.
- Mattei B, Lira RB, Perez KR, Riske KA. 2011. Membrane permeabilization induced by Triton X-100: The role of membrane phase state and edge tension. *Chem Phys Lipids* **202**: 28-37.
- Moro LN, Sestelo AJ, Salamone DF. 2014. Evaluation of cheetah and leopard spermatozoa developmental capability after interspecific ICSI with domestic cat oocytes. *Reproduction in Domestic Animals* **49**: 693-700.
- Morozumi K, Shikano T, Miyazaki S, Yanagimachi R. 2006. Simultaneous removal of sperm plasma membrane and acrosome before intracytoplasmic sperm injection improves oocyte activation/embryonic development. *PNAS* **103** 17661–17666.
- Morozumi K, Yanagimachi R. 2005. Incorporation of the acrosome into the oocyte during intracytoplasmic sperm injection could be potentially hazardous to embryo development. *Proc Natl Acad Sci* **102**:14209-14.
- Morris LHA. 2018. The development of in vitro embryo production in the horse. *Equine Vet Journal* **50**: 712-720.
- Munne S, Tomkin G, Cohen J. 2009. Selection of embryos by morphology is less effective than by a combination of aneuploidy testing and morphology observations. *Fertil Steril* **91**: 943–945.
- Nakai M, Kashiwazaki N, Takizawa A, Maedomari N, Ozawa M, Noguchi J, et al. 2007. Effects of chelating agents during freeze-drying of boar spermatozoa on DNA fragmentation and on developmental ability in vitro and in vivo after intracytoplasmic sperm head injection. *Zygote* **15**:15–24.
- Nakai M, Koshiwizaski N, Takizawa A et al. 2003. Viable piglets generated from porcine oocytes mature in vitro and fertilized by intracytoplasmic sperm head injection. *Biology of Reproduction* **68**: 1003–1008.
- Nottle MB, Nagashima H, Verma PJ, Du Z-T, Grupen CG, Ashman RJ and MacIlpatrick S. 1997. Developments in transgenic techniques in pigs. *Journal of Reproduction and Fertility* **52**: 237–244.
- Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem AC. 1992. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet* **340**: 17–18.
- Penfold LM, Jost L, Evenson DP, Wildt DE. 2003. Normospermic versus teratospermic domestic cat sperm chromatin integrity evaluated by flow cytometry and intracytoplasmic sperm injection. *Biology of reproduction* **69**: 1730-1735.
- Pereyra Bonnet F, Fernandez-Martin R, Olivera R, Jarazo J, Vichera G, Gibbons A & Salamone D. 2008 A unique method to produce transgenic embryos in ovine, porcine, feline, bovine and equine species. *Reproduction, Fertility and Development* **20**: 741–749.
- Perry AC, Wakayama T, Kishikawa H et al. 1999. Mammalian transgenesis by intracytoplasmic sperm injection. *Science* **284**: 1180–1182.
- Pope CE, Johnson CA, McRae MA, Keller GL & Dresser BL. 1998. Development of embryos produced by intracytoplasmic sperm injection of cat oocytes. *Animal Reproduction Science* **53**: 221–236.

- Rader K, Choi YH, Hinrichs K. 2016. Intracytoplasmic sperm injection, embryo culture, and transfer of in vitro-produced blastocysts. *Vet. Clin. N. Am.: Equine Pract.* **32**: 401– 413.
- Roldan ER. 2006. Better intracytoplasmic sperm injection without sperm membranes and acrosome. *Proc Natl Acad Sci* **103**: 17585-6.
- Rychtarova J, Langerova A, Fulka H, Loi P, Benc M, Fulka J Jr. 2021. Interspecific ICSI for the Assessment of Sperm DNA Damage: Technology Report. *Animals* **11**:1250
- Salamone DF, Canel NG, Rodríguez MB. 2017. Intracytoplasmic sperm injection in domestic and wild mammals. *Reproduction* **154**: 111-124.
- Sekhavati MH, Hosseini SM, Tahmoorespur M, Ghaedi K, Jafarpour F, Hajian M, Dormiani K, Nasr-Esfahani MH. 2018. PhiC31-based site-specific transgenesis system for production of transgenic bovine embryos by somatic cell nuclear transfer and intracytoplasmic sperm injection. *Cell Journal* **20**: 98–107.
- Sekhavati MH, Shadanloo F, Hosseini MS, Tahmoorespur M, Nasiri MR, Hajian M & Nasr-Esfahani MH. 2012. Improved bovine ICSI outcomes by sperm selected after combined heparin-glutathione treatment. *Cell Reprogram* **14**: 295–304.
- Shamsi MB, Imam SN, Dada, R Sperm. 2011. DNA integrity assays: Diagnostic and prognostic challenges and implications in management of infertility. *Journal of Assisted Reproduction Genetic* **28**: 1073–1085.
- Shirazi A, Derakhshan-Horen M, Pilvarian AA, Ahmadi E, Nazari H & Heidari B. 2011. Effect of pre-treatment of ovine sperm on male pronuclear formation and subsequent embryo development following intracytoplasmic sperm injection. *Reproduction in Domestic Animals* **46**: 87–94.
- Scheffler K, Uraji J, Jentoft I. et al. 2021. Two mechanisms drive pronuclear migration in mouse zygotes. *Nat Commun* **12**: 841
- Simopoulou M, Giannelou P, Bakas P, Gkoles L, Kalampokas T, Pantos K & Koutsilieris M. 2016. Making ICSI safer and more effective: a review of the human oocyte and ICSI practice. *In Vivo* **30**: 387–400.
- Sirard MA, Richard F, Blondin P, Robert C. 2006. Contribution of the oocyte to embryo quality. *Theriogenology* **65**: 126– 136.
- Smits K, Govaere J, Hoogewijs M, Piepers S, Van Soom A. 2012. A pilot comparison of laser-assisted vs piezo drill ICSI for the in vitro production of horse embryos. *Reproduction in Domestic Animals* **47**: e1–e3.
- Spano M, Bonde JP, Hjollund HI, Kolstad HA, Cordelli E, Leter G. 2000. Sperm chromatin damage impairs human fertility. The Danish First Pregnancy Planner Study Team. *Fertil Steril* **73**:43-50.
- Squires EL, Wilson JM, Kato H, Blaszczyk A. 1996. A pregnancy after intracytoplasmic sperm injection into equine oocytes matured in vitro. *Theriogenology* **45**: 306.
- Squires EL. 2019. Perspectives on the development and incorporation of assisted reproduction in the equine industry. *Reproduction Fertility and Development* **31**: 1753e7.

- Stein P, Schultz RM. 2012. ICSI in the mouse. *Methods in Enzymology* **476**: 251–262.
- Swann K, Lai FA. 2016. Egg activation at fertilization by a soluble sperm protein. *Physiological Reviews* **96**: 127–149.
- 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**: 467–470.
- Valenzuela OA, Couturier-Tarrade A, Choi YH, Aubrière MC, Ritthaler J, Chavatte-Palmer P, Hinrichs K. 2018. Impact of equine assisted reproductive technologies (standard embryo transfer or intracytoplasmic sperm injection (ICSI) with in vitro culture and embryo transfer) on placenta and foal morphometry and placental gene expression. *Reproduction, Fertility and Development* **30**: 371-379.
- Vanderzwalmen, P., Bertin, G., Lejeune, B., Nijs, M., Vandamme, B. and Schoysman, R. 1996. Two essential steps for a successful intracytoplasmic sperm injection: injection of immobilised spermatozoa after rupture of the oolema. *Hum. Reprod.* **11**: 540– 547.
- Viana J. 2018. Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals. *Embryo Technol News* **34**: 7-25.
- Wakayama S, Kamada Y, Yamanaka K, Kohda T, Suzuki H, Shimazu T, Tada MN, Osada I, Nagamatsu A, Kamimura S, Nagatomo H. 2017. Healthy offspring from freeze-dried mouse spermatozoa held on the International Space Station for 9 months. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **114**: 5988-5993.
- Wang B, Baldassarre H, Pierson J, Cote F, Rao KM & Karatzas CN. 2003. The in vitro and in vivo development of goat embryos produced by intracytoplasmic sperm injection using tail-cut spermatozoa. *Zygote* **11**: 219–227.
- Wang Q, Chi MM, Schedl T, Moley KH. 2012. An intercellular pathway for glucose transport into mouse oocytes. *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism* **302**: 1511– 1518.
- Ware CB, Barnes FL, Maiki-Laurila M, First NL. 1989. Age dependence of bovine oocyte activation. *Gamete Research* **22**: 265-275.
- Watanabe H, Suzuki H, Fukui Y. 2010. Fertilizability, developmental competence, and chromosomal integrity of oocytes microinjected with pre-treated spermatozoa in mice. *Reproduction* **139**: 513.
- Wei H, Fukui Y. 2002. Birth of calves derived from embryos produced by intracytoplasmic sperm injection without exogenous oocyte activation. *Zygote* **10**: 149–153.
- Wildt DE, Monfort SL, Donoghue AM, Johnston LA, Howard J. 1992. Embryogenesis in conservation biology—or, how to make an endangered species embryo. *Theriogenology* **37**: 161-184.
- Yoon SY, Fissore RA. 2007. Release of phospholipase C zeta and (Ca²⁺)_i oscillation-inducing activity during mammalian fertilization. *Reproduction* **134**: 695–704.
- Yoshida N, Perry AC. 2007. Piezo-actuated mouse intracytoplasmic sperm injection (ICSI). *Nature Protocols* **2**: 296–304.

- Zander-Fox D, Lam K, Pacella-Ince L, Tully C, Hamilton H, Hiraoka K, O'McPherson N, Tremellen K. 2021. PIEZO-ICSI increases fertilization rates compared with standard ICSI: a prospective cohort study. *Reproductive BioMedicine Online* **43**: 404-412.

9 Seznam použitých zkratek a symbolů

ICSI – intracytoplasmatic sperm injection (intracytoplazmatická injekce spermií)

HZ – hospodářská zvířata

IVF – in vitro fertilization (in vitro oplození)

iICSI – interspecifická ICSI

OPU – ovum pick up

HEPES - N-2-hydroxyethylpiperazine-N-2-ethane sulfonic acid

PLC ζ – fosfolipáza C

ART – asisted reproduction technologies

PB – polar body (pólové tělíčko)

PVP – polyvinylpyrrolidon

ATB – antibiotika

hCG – human chorionic gonadotropin

PMSG – pregnant mare serum gonadotropin

PBS – phosphate buffered saline

BSA – bovinní sérum albumin

PFA – paraformaldehyd

ZP – zona pellucida

FA – formaldehyd

