

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra veterinárních disciplín



Embryotransfer v chovu skotu

Bakalářská práce

Autor práce: Jana Zemanová

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

© 2015 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci "Embryotransfer v chovu skotu" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 17. 4. 2015

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala Ing. Jirímu Šichtaři Ph.D. za příkladné vedení a poskytnuté podklady a cenné rady při tvorbě této bakalářské práce.

Embryotransfer v chovu skotu

Souhrn

Úkolem této práce bylo popsat jednotlivé kroky a nejnovější poznatky v oblasti embryo transferu u skotu. Embryo transfer se sestává z přípravy dárkyně a příjemkyně. Dále navazuje výplach, izolace, hodnocení, přenos a nakonec i uchovávání embryí.

První telete vzniklé embryo transferem se narodilo v roce 1950, pod vedením E. L. Willeta a jeho kolektivu na Universitě ve Wisconsinu. Komerčně se embryo transfer začal využívat o dvacet let později k rozmnožování evropských masných plemen, která byla dovážena do Ameriky.

Příprava dárkyně zahrnuje následující kroky: synchronizace estrálních cyklů, synchronizace vzniku folikulární vlny, superovulace a inseminace. Synchronizace estrálních cyklů se provádí za účelem načasování superovulace, a to zkracováním nebo prodlužováním luteální fáze pomocí hormonálních přípravků. Následuje synchronizace vzniku folikulární vlny, která se provádí hormonálně nebo mechanicky ablací. Superovulace je zahájena 24-36 hodin po folikulární ablací. K vyvolání superovulace se používají gonadotropiny, mezi které patří hypofyzární extrakty, eCG a hMG, které se uplatňují v nejrůznějších superovulačních protokolech. Superovulované krávy se inseminují několikrát v průběhu říje.

Příprava příjemkyně zahrnuje pouze synchronizaci estrálního cyklu tak, aby byla ve stejné fázi cyklu jako dárkyně v době výplachu. Synchronizaci estrálního cyklu provádíme buď stejnými hormonálními přípravky jako u dárkyně, nebo můžeme využít protokoly, které nevyžadují detekci říje. Mezi takové protokoly patří například protokol s názvem Ovsynch, který byl vyvinut pro pevné načasování inseminace, ale nyní je s úspěchem využíván i pro synchronizaci estrálních cyklů příjemkyň s dárkyněmi.

Výplach embryí provádíme 6 – 7 dní po inseminaci dárkyně za pomoci katetru, výplachového média a filtrů k zachycení embryí. Výplach je možné provést dvěma způsoby, a to výplachem děložního těla nebo děložních rohů.

Další krok, který následuje po výplachu embryí, je jejich izolace. Embrya je možné při výplachu zachytit společně s médiem do odběrného válce, nebo se médium nechá odtéct a embrya se zachytí na filtr. Z filtru nebo válce se přenáší do Petriho misek a následuje jejich hodnocení.

Embrya jsou hodnocena podle jejich vývojové etapy a podle kvality. Embrya se třídí bodovým systémem, kdy pro vývojovou fázi je stupnice 1 – 9 a pro kvalitu stupnice 1 – 4. Podle fáze vývoje jsou nejvíce životaschopná embrya v etapě číslo 4 (kompaktní morula), 5 (raná blastocysta) a 6 (blastocysta). Z hlediska kvality jsou nejkvalitnější embrya ve skupině číslo jedna. Tato embrya jsou vhodná k zmrazování a mezinárodnímu obchodu. Po hodnocení jsou embrya nasáta do 0,25ml pejety a přenášejí se do příjemkyň nebo se zamrazují.

Přenos se uskutečňuje pomocí přenosové zbraně, do příjemkyň, které jsou ve stejné nebo co nejpodobnější fázi cyklu, jako dárkyně ze které byla vajíčka vypláchnuta. Dnes se u skotu používá pouze nechirurgický způsob přenosu a výplachu embryí přes děložní krček, zatím co v minulosti se využíval chirurgický způsob přes břišní stěnu nebo bok krávy.

Embrya se dají uchovávat jako čerstvá nebo jako zmrazená. V čerstvém stavu lze embrya uchovávat v médiu pouze pár hodin. K dlouhodobému skladování a mezinárodnímu obchodu slouží kryokonzervace. Dnes se ke kryokonzervaci využívá systému postupného ochlazování až na teplotu tekutého dusíku nebo vitrifikace. Ke kryokonzervaci se využívají embrya v etapě vývoje 4 – 7 a stupně kvality 1.

Klíčová slova: skot, embryotransfer, embryo, superovulace, dárkyně, příjemkyně

Embryotransfer in cattle breeding

Summary

The main task of this seminary work has been the closer look on the each step of the process of the embryotransfer of cattle and the newest information in this specialization. The own procedure has the several parts - the preparation of the donor cow and the recipient cow and the subsequent flushing, isolation, evaluation, transfer and also the freezing (cryoconservation) of the embryos for the storage.

The first calf from ET was born in 1950, managed by Mr.E. L. Willeta and his team in the University of Wisconsin. The embryotransfer became the commercially used 20 years later for the breeding of the European beef for the export to North America.

The management of the recipient is following: the synchronization of the oestrus, synchronization of the follicles' formation, superovulation and insemination. The main aim of the synchronization of the oestrus is the timing of the superovulation, by the shortening or the protraction of the luteal phase using the hormonal treatment. The following step is the synchronization of the follicles' formation, which is made hormonally or mechanically by the ablation.

The superovulation begins 24 – 36 hours after the follicle' ablation. The gonadotropins (hypophysis extracts, eCG, hMG and so on) are used to cause the superovulation. The donor cows are inseminated several times during the heat.

The management of the recipient include only the synchronization of the oestrus to be in the same phase of the cycle as the donor cow in the time of the flushing. We can use the same hormonal threatment as for the donor cows or the different way, which does not need the detection of the heat. One way is called Ovsynch, which has been developed for the fixed timing of the insemination, but now Ovsynch is successfully used for the synchronization of the cycles of the recipients and the donors.

The flushing of the embryos si made 6-7 days after the insemination using the catheter, the flushing medium and the filters to catch the embryos. The flushing can be made using 2 ways, the flushing of the uterine body or uterine horn.

The ensuing step, after the flushing, is the isolation of the embryos. The embryos can be catched together with the fushing medium to the cylinder, we let the medium drain off and

the embryos will stay on the filter. We transfer the embryos to the petri dish and we evaluate them there.

The embryos are evaluated on the base of their evolutionary stage and their quality. The system of the points is used to select the embryos. The evolutionary stage has the scale 1-9 and for the quality 1-4.

The most viable embryos are in their evolutionary stage numbers: 4 (compact morula), 5 (early blastocyst) and 6 (blastocyst). The highest quality embryos are carrying the number 1. These embryos are suitable for the freezing and the international market. After the evaluation the embryos are collected to 0,25ml pejets and can be transfered to the recipient or to be freeze.

The transfer weapon is used for the transmission of the embryos to the recipient cows, which are in the same or the most like same stage of the heat as the donor cow. We use only non-surgical technique of the embryotransfer and the flushing now (neck of the womb (uterine)), in comparison to the surgical method (through the abdominal wall or the side of the cow) in the past.

The embryos are preserved as the fresh or the frozen. The fresh embryos can be preserved in the medium only several hours. The freezing (cryoconservation) is used for the long-term storage or the international trade. The system of the progressive cooling down to the temperature of the liquid nitrogen or the vitrification is used these days for the cryoconservation. Only the embryos in the evolutionary stage 4-7 and the quality 1 can be utilized for this process.

Keywords: cattle, embryotransfer, embryo, superovulation, donor, recipient

Obsah

1 Úvod	10
2 Cíl práce.....	11
3 Anatomie samičích pohlavních orgánů.....	12
4 Hormonální řízení pohlavního cyklu.....	15
4.1 Hormony a jejich struktura	15
4.2 Hypotalamické hormony – neurohormony.....	15
4.3 Hypofyzární pohlavní hormony.....	16
4.4 Hormony adenohipofýzy.....	16
4.5 Hormony neurohipofýzy.....	18
4.6 Extrahypofyzární gonadotropní hormony.....	18
4.7 Epifyzární hormony	19
4.8 Ovariální a steroidní pohlavní hormony	20
4.9 Sekundární hormony reprodukce	22
5 Oogeneze	23
6 Folikulogeneze.....	24
7 Embryogeneze	26
8 Estrální cyklus.....	27
8.1 Proestrus	28
8.2 Estrus.....	29
8.3 Metestrus.....	29
8.4 Diestrus.....	30
8.5 Folikulární vlny	30
9 Historie přenosu embryí.....	32
9.1 Superovulace a synchronizace	33
9.2 Metody získávání a přenosu embryí.....	33
9.3 Krátkodobé uchovávání.....	34
9.4 Zmrazování embryí.....	35
10 Příprava dárkyně.....	35
10.1 Synchronizace estrálních cyklů.....	36
10.2 Synchronizace vzniku folikulární vlny.....	37
10.3 Folikulární ablace.....	37
10.4 Gonadotropiny a superovulace	38
10.5 Protokoly používané k aplikaci gonadotropinů	39
11 Příprava příjemkyně	42

12 Výplach embryí	43
12.1 Výplach těla	44
12.2 Výplach rohů	44
13 Izolace embryí	45
14 Hodnocení embryí.....	45
14.1 Fáze vývoje.....	46
14.2 Kvalita	46
15 Přenos embryí.....	47
16 Uchování embryí.....	48
16.1 Kryokonzervace.....	48
17 Závěr	49
18 Seznam použité literatury	50
18.1 Ostatní zdroje	53

1 Úvod

Reprodukční schopnost je nejdůležitější vlastnost plemenic, která zajišťuje úspěšnost chovu a je nezbytná k produkci mléka, masa a jiných živočišných produktů. Každá nově narozená jalovička má teoreticky schopnost vyprodukovat až 300 tisíc vajíček. V přirozené reprodukci je však schopna využít jen zlomek z nich, protože může porodit jen jedno tele ročně. V současnosti, kdy je délka produkčního života krávy ve velkochovu na úrovni 2 – 3 let je jedna kráva schopna vyprodukovat asi jen 2 – 3 telata.

Alespoň částečného využití tohoto potenciálu se může dosáhnout pomocí biotechnologických metod v chovu skotu. Jednou z těchto metod je embryotransfer. Touto technologií je možno zněkolikanásobit počet potomků získaných od jedné krávy. Hlavní využití embryotransferu spočívá v rozmnožování vynikající genetiky. V důsledku pokroku v oblastech jako je kryokonzervace embryí, je možné tuto vynikající genetiku šířit po celém světě. V podobě zmrazených embryí je také možno uchovávat genetickou informaci plemen skotu, která jsou zařazena mezi genové zdroje.

2 Cíl práce

Cílem práce je sepsat literární rešerši shrnující nejnovější poznatky o embryotransferu u skotu.

3 Anatomie samičích pohlavních orgánů

Pohlavní orgány plemenic mají důležité funkce, zejména tvorbu pohlavních buněk, hormonů, probíhá v nich páření, složí jako prostředí, v němž dochází k oplození, vývoji embrya a plodu až po jeho vypuzení s těla matky při porodu (Říha a kol., 2003). Pohlavní orgány samice se dělí na vnitřní a vnější. Mezi vnitřní pohlavní orgány patří vaječník, vejcovod, děloha a pochva, zevní pohlavní orgány jsou poševní předsíň, vulva a pošťeváček (Marvan a kol., 2011).

Vulva představuje vstup do samičích pohlavních orgánů (Říha a kol., 2003) a uzavírá předsíň poševní (Grolig a kol., 1963). Je umístěna pod řitním otvorem. Krajina mezi vulvou a řitním otvorem se nazývá hrázka (Říha a kol., 2003). Vulvu tvoří dva stydké pysky, které mezi sebou svírají stydkou štěrbinu a stýkají se v horní zaoblené a dolní ostré spojce (Grolig a kol., 1963). Vnější kůže přechází ve stydké štěrbině ve sliznici poševní předsíně (Říha a kol., 2003).

Poševní předsíň je 8 – 10 cm dlouhá dutina (Marvan a kol., 2011.), která začíná stydkou štěrbinou a v místě vyústění močové roury přechází v pochvu. U jalovic bývá v této části i příčná slizniční řasa, zvaná panenská blána (Říha a kol., 2003). Na dně poševní předsíně před ústím krátké močové roury je *suburetrální* výduť hluboká 3 až 4 cm (Marvan a kol., 2011).

Pochva neboli vagína je široká, svalovitá trubice, která je uložena v dutině pánevní pod konečníkem. Je dlouhá 15 až 35 cm a společně s poševní předsíní představuje kopulační orgán a porodní cestu (Říha a kol., 2003). Pochva má pružnou, třívrstevnou stěnu skládající se z *adventicie*, hladké svaloviny a sliznice (Marvan a kol., 2011).

Děloha je dutý orgán, který slouží k vývoji plodu z oplozeného vajíčka a na kterém rozeznáváme děložní krček, děložní tělo a dva děložní rohy (Grolig a kol., 1963), tento typ dělohy se nazývá děloha dvourohá (Marvan a kol., 2011). Celá děloha je zavěšena na dvou širokých děložních vazech, které se po stranách upínají na stropu břišní dutiny a odtud sestupují k děložním rohům a děložnímu krčku. Vpředu přechází široký děložní vaz v závěsný vaz vaječníku. Široké děložní vazy přivádějí do dělohy cévy a nervy (Říha a kol., 2003).

Stěna dělohy se skládá ze tří vrstev a to z pobřišnice neboli perimetria, která se nachází na povrchu a po stranách přechází v široké děložní vazy. Střední vrstvu představuje hladká svalovina, která je uspořádaná podélně i kruhově jako tzv. myometrium. Uvnitř dělohy je narůžovělá sliznice zvaná endometrium. Endometrium obsahuje četné tubulózní děložní žlázy dlouhé až 2 mm, které se v období říje zvětšují a vyměšují hlen a je tvořeno

vícevrstevným epitelem z cylindrických buněk (Říha a kol., 2003). Barva endometria je šedorůžová až hnědočervená a je složená v četné podélné a příčné řasy (Marvan a kol., 2011). U přežvýkavců vyváří endometrium vyvýšené světlejší hrbolky zvané karunkuly, ty jsou u krávy rozloženy ve čtyřech řadách v děložních rozích po 10 až 14. Jejich celkový počet je 80 až 120 (Grolig a kol., 1963). Vznikají v embryonálním životě a během březosti jako oválné okrsky bez žláz nažloutlé barvy z řídkého vaziva protkaného krevními cévami a buňkami hladké svaloviny. Karunkuly jsou dlouhé asi 10 až 18 mm, široké 4 až 10 mm a vysoké 2 až 5 mm, během březosti se zvětšují do velikosti švestky. Na jejich povrchu jsou četné prohlubeniny, ke kterým se přikládají klky klkové blány. Placentony vznikají spojením karunkulů s choriovými kotyledony a předávají výživu z krve matky do krve plodu v plodových obalech (Říha a kol., 2003).

Děložní krček je silný, svalnatý útvar, dlouhý 5 – 10 cm spojující pochvu s děložním tělem. Průměr je 2 až 5 cm a jeho povrch tvoří pobřišnice, po které následuje vrstva podélných vláken hladké svaloviny. Poté je zde nezřetelná vrstva rozvětvených cév a nervů a pod ní je silně vyvinutá vrstva s kruhovými vlákny hladké svaloviny a s elastickými vlákny. Vnitřek je tvořen sliznicí děložního krčku, která je tvořena jednovrstevným cylindrickým epitelem, který v době říje vyměšuje hlen (Říha a kol., 2003). Tato sliznice není hladká, ale vytváří čtyři vysoké kruhové záhyby s podélnými řasami, na kterých jsou ještě nižší sekundární řasy (Marvan a kol., 2011). Středem děložního krčku probíhá úzký, klikatý kanálek, jehož délka je až 20 cm (Říha a kol., 2003). Tento kanálek je trvale uzavřený stahem silné vrstvy hladké svaloviny a zátkou hustého čírého hlenu (Marvan a kol., 2011). Fyziologicky se tento kanálek otevírá pouze ve dvou případech a to při říji a při porodu. Při přechodu do pochvy se krček 2 až 4 cm vychlipuje a tvoří růžici děložního krčku tzv. děložní čípek (Říha a kol., 2003), jehož sliznice je paprskovitě zřasena (Marvan a kol., 2011) a přechází v podélné řasy (Říha a kol., 2003). Toto zřasení dává čípku při pohledu z kaudální strany vzhled růžice (Marvan a kol., 2011). Otvor do kanálku děložního krčku se většinou nachází v horní levé čtvrtině děložního čípku a je označován jako zevní branka kanálku děložního krčku (Říha a kol., 2003).

Děložní tělo je nepárový dutý orgán, který vede od interní branky krčku děložního po interní uterinní bifurkaci a je dlouhý pouze 2 až 5 cm. V kranální části je rozděleno svalnatou přepážkou na dvě samostatné dutiny, které přecházejí v dutiny děložních rohů (Říha a kol., 2003).

Děložní rohy jsou pokračováním děložního těla. Z bifurkace probíhají samostatně jako pravý a levý děložní roh a jejich délka je 30 až 35 cm, tloušťka stěny děložních rohů je asi 2

mm (Říha a kol., 2003). Děložní rohy nejprve probíhají vedle sebe, zde jejich mediální stěny srůstají. Následně se děložní rohy vidlicovitě rozdělují a stácejí tak, že opisují asi tři čtvrtiny kruhu (Marvan a kol., 2011). V místě kde se děložní rohy rozdvoují, jsou mezi sebou spojeny horním a dolním vazem. Mezi těmito vazy ze zesílené pobřišnice, která má mezi svými lištami četná svalová vlákna, je dopředu otevřená dutinka, která je dobrým vodičkem při vyšetření dělohy (Říha a kol., 2003).

Vejcovody jsou párové tenké trubičky dlouhé 25 – 30 cm s tloušťkou 2 mm, které probíhají mírně klikatě v závěsných děložních vazech od vaječníku a děložním otvorem vejcovodu ústí do děložního rohu (Říha a kol., 2003). U vaječníku se vejcovod rozšiřuje v nálevku, jejíž volný slizniční okraj vytváří třásně (Grolig a kol., 1963). Sliznice vejcovodu je vystlána víceřadým epitelem z cylindrických buněk s řasinkami a vytváří vysoké podélné řasy, na kterých jsou ještě sekundární a terciální řasy. V období říje vyměšuje sliznice ovidukální tekutinu, která představuje optimální kultivační prostředí (Říha a kol., 2003). Nad sliznicí se nachází svalová vrstva a na povrchu vejcovodu se nachází pobřišnice (Grolig a kol., 1963). V horní třetině vejcovodu dochází k oplození a k prvním vývojovým stádiím embrya (Říha a kol., 2003).

Vaječníky jsou párové samičí pohlavní žlázy (Grolig a kol., 1963) šedorůžové barvy a tuhoelastické konzistence (Marvan a kol., 2011). Ve vaječnících dorůstají a dozrávají pohlavní buňky a tvoří se zde pohlavní hormony (Říha a kol., 2003). Vaječníky jsou zavěšené na řase pobřišnice, jež odstupuje od stropu dutiny břišní za ledvinami (Grolig a kol., 1963) a jsou částečně ukryty v tzv. vaječnickovém vaku, což je prohlubeň, tvořená vaječnickovým okružím, vaječnickovým vazem, kterým je připojen k děložnímu rohu a okružím vejcovodu (Marvan a kol., 2011). Velikost a tvar vaječnicků se mění podle jejich funkčního stavu, u skotu mají tvar švestky a délku asi 2 až 3 cm, šířku 1 až 2 cm (Říha a kol., 2003) a hmotnost 15 – 20 g. Povrch vaječnicku je většinou hladký (Marvan a kol., 2011), jen na ovulační ploše vaječnicků můžeme nahmatat různé velké folikuly, žlutá tělíška a jejich zbytky (Říha a kol., 2003). Cévy a nervy do vaječnicku vstupují v místě zvaném vaječnicková branka, ke které přirůstá i vaječnickové okružím a ke kraniálnímu konci se připojují třásně vejcovodu (Marvan a kol., 2011). Vaječnick se skládá ze zárodečného epitelu, bílého vazivového obalu, korové a dřevné vrstvy (Říha a kol., 2003). Epitel je u mladých samic jednovrstevný cylindrický, později se mění na kubický a u starých samic na dlaždicový. Pod epitelem je bělavý obal z kolagenního vaziva, který obaluje vlastní tkáň vaječnicku, která je složena z povrchové korové vrstvy a z vnitřní dřevné vrstvy. Základem korové vrstvy je vazivová kostra neboli stroma, které obsahuje fibrocyty, které se účastní většiny pochodů ve vaječnicku jako je výživa

vaječnickových buněk, nebo tvorba pohlavních hormonů a dále obsahuje malé množství kolagenních a retikulárních vláken. Ve stromatu jsou rozmístěny folikuly a jejich deriváty. Dřeň se skládá z řídkého kolagenního vaziva, obsahuje buňky hladké svaloviny a je protkána cévami a nervy (Marvan a kol., 2011).

4 Hormonální řízení pohlavního cyklu

Hormonální systém je regulační systém, vysílající informaci chemickou cestou a je regulován zpětnovazebními smyčkami a impulsy z nervového systému a některých orgánů. Hormony můžeme definovat jako chemickou látku, kterou produkuje žláza nebo tkáň a která evokuje specifickou reakci v hormonálně senzitivní tkáni (Říha a kol., 2004). Hormony se dle vztahu k pohlavním funkcím dělí do dvou skupin. První skupinou jsou primární hormony reprodukce, to jsou takové hormony, které bezprostředně řídí pohlavní funkce. Patří sem: hypotalamické neurohormony nebo gonadotropiny uvolňující hormony, hypofyzární a extrahypofyzární gonadotropiny a gonadální a placentární sexageny. Druhou skupinu tvoří sekundární hormony reprodukce, což jsou ostatní hormony tvořené v těle, které mají nepřímý vztah k pohlavním funkcím. Řízení pohlavních funkcí dále ovlivňují látky nehormonální povahy, mezi které patří neurotransmitery, prostaglandiny a feromony (Kudláč a kol., 1987).

4.1 Hormony a jejich struktura

Podle chemické struktury jsou hormony reprodukce rozděleny do čtyř skupin: Proteiny což jsou polypeptidové hormony v rozsahu molekulové hmotnosti od 300 do 70000 daltonů, např. oxytocin, folikuly stimulující hormon (FSH) a luteinizační hormon (LH). Dále steroidy, které jsou odvozeny od cholesterolu a mají molekulovou hmotnost 300 až 400 daltonů, např. testosteron. Mastné kyseliny, jež jsou odvozeny od kyseliny arachidonové a mají molekulovou hmotnost asi 400 daltonů. A nakonec aminy, které jsou odvozeny od tyrozinu a tryptofanu a patří sem např. melatonin (Hafez, E. S. E. a kol., 2000).

4.2 Hypotalamické hormony – neurohormony

Hypotalamus zaujímá pouze velmi malou část mozku (Hafez, E. S. E. a kol., 2000). Je součástí mezimozku a tvoří dno a částečně i strany třetí mozkové komory. Nervové buňky jsou zde sloučeny do skupin zvaných jádra. Těchto jader se zde nachází více než dvacet a každé produkuje jiné hormony. Tyto hormony ovlivňují především endokrinní činnost hypofýzy (Kliment a kol., 1989). Existuje nervové spojení mezi hypotalamem a zadním

lalokem hypofýzy přes hypotalamo-hypofyzární ústrojí a cévní spojení mezi hypotalamem a předním lalokem hypofýzy (Hafez, E. S. E. a kol., 2000). Hypotalamické hormony nevykazují druhově specifické rozdíly (Kudláč a kol., 1987). Rozdělujeme je podle svého účinku na spouštěcí hormony – releasing hormons, zkráceně RH, nebo inhibiční hormony – inhibiting hormons, zkráceně IH (Kliment a kol., 1989), které řídí činnost adenohipofýzy, a na neurohypofyzární hormony (Kudláč a kol., 1987). Hypotalamické spouštěčové hormony gonadotropinů jsou produkovány dvěma centry jader a to centrem cyklickým a centrem tonickým (Kliment a kol., 1989).

Hypotalamické hormony zasahující do reprodukčních funkcí jsou tři. Gonadotropin releasing hormons (GnRH) je decapeptid (10 aminokyselin) s molekulovou hmotností 1183 daltonů, který je syntetizován a pak uložen v mediálním bazálním hypotalamu. GnRH poskytuje humorální spojení mezi nervovým a endokrinním systémem. (Hafez, E. S. E. a kol., 2000). GnRH je transportován hypotalamo-hypofyzárním portálním systémem do předního laloku hypofýzy a zde stimuluje gonadotropní buňky například k sekreci FSH a LH. GnRH je uvolňován v pulzech (Říha a kol., 2004). Dalším hormonem je thyreotropin releasing hormon, který stimuluje sekreci LTH (Kliment a kol., 1989) a proto, že je schopen indukovat i uvolňování prolaktinu je nazýván některými autory jako prolaktin uvolňující hormon (Kudláč a kol., 1987). Prolaktin inhibiting hormon inhibuje sekreci LTH. Všechny tyto hormony působí na adenohipofýzu (Kliment a kol., 1989). Spouštěčové hormony přecházejí do krve v nepatrném množství a biologický poločas GnRH je krátký a s určitou druhovou rozdílností $t/2 = 4 - 8$ min (Kudláč a kol., 1987).

4.3 Hypofyzární pohlavní hormony

Hypofýza se nachází v tureckém sedle, kostnaté prohlubni, ve spodní části mozku (Hafez, E. S. E. a kol., 2000). Je to endokrinní žláza dvojího původu dělicí se na dvě části, adenohipofýzu a neurohipofýzu. Každá část má jinou strukturu a jinou sekretorickou činnost. Buňky neurohipofýzy mají charakter nervových buněk, buňky adenohipofýzy mají charakter buněk žlázových, které se zde vyskytují ve čtyřech druzích: acidofilní, bazofilní a chromofobní (Kliment a kol., 1989).

4.4 Hormony adenohipofýzy

Přímý vztah k reprodukci mají tři adenohipofyzární hormony (Kliment a kol., 1989), tzv. gonadotropiny. Patří sem folikuly stimulující hormon (FSH) nazývaný též jako prolactin A, folikulizační hormon, gonadotropin I nebo thyloakentrin (Kudláč a kol., 1987). Chemicky se

jedná o glykoprotein, který je produkovaný bazofilními buňkami adenohypofýzy (Kliment a kol., 1989). Další je luteinizační hormon (LH) označovaný také jako prolán B, gonadotropin II nebo metakentrin (Kudláč a kol., 1987), který je chemicky také glykoprotein (Kliment a kol., 1989) a je produkovaný amfofilními buňkami (Kudláč a kol., 1987). Oba tyto hormony mají molekulovou hmotnost 32000 daltonů a skládají ze dvou různých podjednotek nazývaných alfa a beta. Alfa podjednotka je společná pro FSH a LH v rámci druhu, zatímco beta podjednotka je odlišná a uděluje specifitu každému gonadotropinu. Alfa a beta podjednotka kteréhokoliv z těchto hormonů nemají sami o sobě žádnou biologickou aktivitu (Hafez, E. S. E. a kol., 2000). Třetím adenohypofyzárním hormonem je luteotropní hormon (LTH) jehož synonyma jsou prolaktin P, gonadotropin III, mamotropin (Kliment a kol., 1989), laktogenní hormon, luteotropin nebo galaktin (Kudláč a kol., 1987). Chemickým složením se jedná o protein, který je produkovaný acidofilními aminofilními buňkami adenohypofýzy (Kliment a kol., 1989).

FSH svým účinkem stimuluje růst a zrání vaječnickových folikulů a Graafova folikulu (Hafez, E. S. E. a kol., 2000). Jeho účinek na vaječníky se projevuje mitotickým dělením buněk granulózy, jakož i přeměnou buněk stromatu v buňky théky a tvorbou folikulární tekutiny. Společně s LH ovlivňuje tvorbu estrogenů. Biologický poločas $t/2$ činí asi 2h (Kudláč a kol., 1987).

LH navazuje na účinek FSH (Kudláč a kol., 1987) a dokončuje u samic zrání Graafova folikulu (Kliment a kol., 1989). Preovulační vlna LH je zodpovědná za prasknutí stěny folikulu a ovulaci (Hafez, E. S. E. a kol., 2000). Dále zasahuje pozitivně do syntézy steroidních hormonů v Graafově folikulu a vznikajícím žlutém tělísku (Kliment a kol., 1989) jehož formování stimuluje. U krávy stimuluje LH žluté tělísko k tvorbě progesteronu (Kudláč a kol., 1987) a po oplození se spolu s FSH podílejí na udržení žlutého tělíska ve funkci a na zabránění nástupu dalších pohlavních cyklů (Kliment a kol., 1989). Je to glykoprotein složený z alfa a beta podjednotky s molekulární hmotností 30000 daltonů (Hafez, E. S. E. a kol., 2000) a biologickým poločasem $t/2$ asi $\frac{1}{2}$ h (Kudláč a kol., 1987).

LTH (prolaktin) je velmi důležitým hormonem pro funkční rozvoj mléčné žlázy (Kliment a kol., 1989) a je nezbytně nutný k vyvolání a udržení laktace (laktogeneze a laktopoeza) (Kudláč a kol., 1987). Kromě toho působí společně s LH v navození syntézy steroidních hormonů v pohlavních žlázách (Kliment a kol., 1989). Jeho sekreci upravuje inhibiční hormon nazývaný prolaktin inhibující faktor (PIF) (Hafez, E. S. E. a kol., 2000). Biologický poločas je velmi krátký a činí $t/2 = 7$ min (Kudláč a kol., 1987). Prolaktin má sezónní a laktační efekt v reprodukci hospodářských zvířat (Hafez, E. S. E. a kol., 2000).

Obsah jednotlivých gonadotropních hormonů v hypofýze je druhově rozdílný, velký rozdíl je zvláště v poměru FSH a LH. Z domácích zvířat hypofýza krávy obsahuje nejméně FSH, ale nejvíce LTH. Tyto rozdíly v produkci gonadotropních hormonů způsobují rozdíly v průběhu pohlavního cyklu. Zvláště ovlivňují délku a intenzitu projevů říje, a také dobu nástupu ovulace. Obsah těchto hormonů ovlivňuje i některé poruchy pohlavního cyklu jako je tichá říje či vznik ovariálních cyst (Kudláč a kol., 1987).

4.5 Hormony neurohypofýzy

Z neurohypofýzy neboli zadního mozku jsou do krevního řečiště uvolňovány dva hormony a to oxytocin a vazopresin neboli antidiuretický hormon. Skutečným místem jejich tvorby je hypotalamus, oxytocin vzniká v *nucleus paraventricularis* (Kudláč a kol., 1987) a je skladován a uvolňován z neurohypofýzy (Kliment a kol., 1989). Vazopresin vzniká v *nucleus supraopticum* (Kudláč a kol., 1987). Tyto hormony nejsou přiváděny z hypotalamu k zadní hypofýze přes cévní systém, ale putují podél axonů nervového systému (Hafez, E. S. E. a kol., 2000).

Vazopresin má k reprodukci jen velmi malý vztah, ale je významný pro hospodaření s vodou v organismu (Kliment a kol., 1989). Po chemické stránce se jedná o oktapeptid (Kudláč a kol., 1987).

Naopak velký význam pro reprodukci má oxytocin (Kliment a kol., 1989). Oxytocin je také produkován žlutým tělískem, takže má dvě místa původu (Hafez, E. S. E. a kol., 2000). Oxytocin vyvolává kontrakce hladké svaloviny pohlavního ústrojí a to zejména ve vypuzovací fázi při porodu (Kliment a kol., 1989) nebo napomáhá transportu gamet. Roztažení děložního hrdla při porodu způsobené průchodem plodu stimuluje reflexní uvolnění oxytocinu (Fergusnův reflex). Dále na základě vizuálních a hmatových stimulů spojených s kojením nebo dojením (Hafez, E. S. E. a kol., 2000) způsobuje kontrakce myoepiteliálních buněk mléčné žlázy a tím ejekci mléka (Kudláč a kol., 1987). Chemickou stavbou se jedná o nonapeptid (Kliment a kol., 1989).

Ovariální oxytocin je zapojen do luteální funkce. Působí na děložní sliznici k vyvolání uvolnění prostaglandinu $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$), který působí luteoliticky (Hafez, E. S. E. a kol., 2000).

4.6 Extrahypofyzární gonadotropní hormony

Placenta vylučuje řadu hormonů buď stejné, nebo podobné biologické aktivity, mezi které patří koňský choriový gonadotropin (eCG), lidský choriový gonadotropin (hCG), placentární laktogen (PL) a protein B (Hafez, E. S. E. a kol., 2000)..

Koňský choriový gonadotropin (eCG, PMSG) je glykoprotein s α a β podjednotkou podobné LH a FSH, ale s vyšším obsahem sacharidů, zejména kyseliny sialové. Čím vyšší je obsah kyseliny sialové, tím více se prodlouží poločas rozpadu. Tudíž, jedna injekce eCG má biologický účinek na cílové žlázy více než týden (Hafez, E. S. E. a kol., 2000). Jeho zdrojem je koňská placenta, tedy konkrétně endometriální pohárky (Frandsen a kol., 2009). Pohárky vznikají asi 40 den březosti a přetrvávají až do 85 dne (Hafez, E. S. E. a kol., 2000). Během tohoto období dochází k folikulárnímu vývoji na vaječnicku březí klisny a eCG podporuje luteinizaci těchto folikulů. Tato příslušná žlutá tělíska slouží jako sekundární zdroje progesteronu (Frandsen a kol., 2009). eCG má biologický účinek LH i FSH, FSH převažuje. eCG cirkuluje v krvi březích klisen a není vylučován močí. eCG byl jeden z prvních komerčně dostupných gonadotropinů používaných k vyvolání superovulace u hospodářských zvířat (Hafez, E. S. E. a kol., 2000).

Lidský choriový gonadotropin (hCG) je glykoprotein, který se skládá z podjednotek α a β s molekulovou hmotností 40000 daltonů. α podjednotka je podobná α podjednotce lidského, prasečího, ovčího a kravského LH. hCG je primárně luteinizační a luteotropní a má malou FSH aktivitu. hCG syntetizují syncytiotropoblastické buňky v placentě primátů a je přítomný jak v krvi, tak i v moči. Jeho přítomnost v moči v raném stádiu těhotenství je základem různých laboratorních testů pro zjištění těhotenství (Hafez, E. S. E. a kol., 2000).

4.7 Epifyzární hormony

Epifýza je malá endokrinní žláza (Kliment a kol., 1989), která vzniká jako neuroepiteliální evagination ze střechy třetí komory pod zadním koncem *corpus callosum* (Hafez, E. S. E. a kol., 2000). Epifýza produkuje řadu biologicky aktivních látek. Z nich je pro reprodukci významný melatonin, který patří mezi indoly a arginin vázotocin, řadící se k peptidům. Oba tyto hormony mají depresivní vliv na rozvoj pohlavních orgánů a na funkci gonád. Endokrinní funkce epifýzy je výrazně ovlivňována světlem, přičemž světlo tlumí sekreci obou hormonů a tma naopak jejich sekreci stimuluje (Kliment a kol., 1989). Žláza převádí neuronové informace o délce denního světla z očí do endokrinní produkce melatoninu, který je vylučován do krevního řečiště a mozkomíšního moku (Hafez, E. S. E. a kol., 2000). Epifýza ovlivňuje všechny žlázy, tedy i pohlavní a je tedy odpovědná za denní a roční rytmy v procesu reprodukce (Kliment a kol., 1989).

4.8 Ovariální a steroidní pohlavní hormony

Ovaria hrají u samic dvojí roli: tvorbu zárodečných buněk (gametogeneze) a sekreci pohlavních hormonů (Hafez, E. S. E. a kol., 2000). Hormony vytvářející se během pohlavního cyklu v ovariích jsou estrogény, gestageny, relaxin a v nepatrné míře též androgeny. Estrogény, gestageny a androgeny patří mezi steroidní hormony (Kudláč a kol., 1987), zatímco relaxin je protein (Hafez, E. S. E. a kol., 2000). Steroidní hormony jsou rozpustné v tucích, a ačkoliv jsou podobného chemického složení, značně se liší svými fyziologickými účinky (Kudláč a kol., 1987). Steroidní pohlavní hormony vznikají v pohlavních žlázách, kůře nadledvin a v placentě. Jsou odvozeny od benzenového jádra, ze kterého vzniká napojením dalších jader steran. Takto vzniká velký počet hormonů s různými účinky nejen na reprodukční orgány a tkáně, ale i na celkový látkový metabolismus. Steroidní hormony vznikají z acetátu přes cholesterol a do své biologicky účinné podoby jsou syntetizovány specifickými enzymy. Tvorba steroidních hormonů je ovlivněna nejen druhově, ale i pohlavím (Kliment a kol., 1989). Biosyntetické dráhy ve všech endokrinních orgánech, které produkují steroidní hormony, jsou podobné. Orgány se liší pouze v enzymových systémech, které obsahují, a jejich sekreční aktivita steroidních hormonů pohlavních žláz je pod endokrinní kontrolou předního laloku hypofýzy. Poločas rozpadu přirozeně se vyskytujících steroidů v těle je velmi krátký (Hafez, E. S. E. a kol., 2000).

Estrogény jsou hormony, které vznikají v buňkách granulózy a theky interny zrajícího folikulu a v intersticiu vaječníku (Kudláč a kol., 1987). Z estrogenů je nejdůležitější estradiol 17β , dalšími méně biologicky aktivními hormony jsou estron a estriol. U jednotlivých druhů zvířat je různé estrogenní spektrum např. u březí krávy převládá estradiol 17β (Kliment a kol., 1989). Ze všech steroidů mají estrogény nejširší škálu fyziologických funkcí (Hafez, E. S. E. a kol., 2000). Stimulují růst vývodných pohlavních cest, vytvoření sekundárních pohlavních znaků, růst a vývoj vývodného systému mléčné žlázy a u krávy i alveolárního systému (Kudláč a kol., 1987). Říjové chování u samic vyvolává CNS, ale u krav je k tomu zapotřebí malé množství progesteronu a estrogenu. Dále působí na dělohu a to tak, že zvyšuje amplitudu a frekvenci kontrakcí a zesiluje účinek oxytocinu a $\text{PGF}_{2\alpha}$ (Hafez, E. S. E. a kol., 2000). Estrogény ovlivňují aktivitu enzymů v cílových tkáních (Kliment a kol., 1989) a zasahují do látkového metabolismu, dále mají zpětnou vazbu na hypotalamus a hypofýzu (Kudláč a kol., 1987). Negativní vliv je na tonické centrum v hypotalamu, pozitivní efekt na preovulační centrum. Estrogény lze použít k přerušení březosti u krav a ovcí, protože mají luteolytické vlastnosti (Hafez, E. S. E. a kol., 2000).

Mezi nejdůležitější gestageny patří progesteron, který je asi 10000 krát méně biologicky účinný než estrogény a 17 α hydroxyprogesteron. Progesteron je vylučován buňkami placenty, adrenálními žlázami (Hafez E. S. E. a kol., 2000), ale jeho nejdůležitějším zdrojem jsou buňky granulózní vrstvy Graafova folikulu (Kliment a kol., 1989) a hlavně žluté tělísko (Kudláč a kol., 1987). Progesteron je transportován krví vázaný na globulin pro androgeny. Sekreci progesteronu primárně stimuluje LH (Hafez E. S. E. a kol., 2000). Progesteron svým biologickým účinkem navazuje na změny na pohlavním ústrojí vyvolané estrogény, dále se podílí na vývoji alveolárního systému mléčné žlázy a při vzniku mateřského pudu a při ovulaci (Kudláč a kol., 1987). Jeho účinek na organismus se mění podle reprodukční fáze, před zabřeznutím posiluje anabolický účinek androgenů a při graviditě oslabuje zásahem do enzymatické činnosti účinek estrogenů konverzí aktivních estrogenů na méně aktivní estriol (Kliment a kol., 1989), čímž chrání březost. Také připravuje endometrium pro implantaci a udržení březosti zvýšením aktivity sekrečních žláz v endometriu a tím, že inhibuje pohyblivost myometria (Hafez E. S. E. a kol., 2000). Má také termogenní efekt a je nositelem zpětné vazby na hypotalamus (Kudláč a kol., 1987). Syntetické progestiny jsou k dispozici pro synchronizaci estrálního cyklu přežvýkavců (Hafez E. S. E. a kol., 2000).

Androgeny jsou hormony, které vznikají ve vmezeřené tkáni vaječníku jen v malém množství. Nejvíce jsou produkovány kůrou nadledvin a u samců ve vmezeřené tkáni varlat. Mezi androgeny řadíme testosteron a androstendion. Mají mohutný anabolický účinek na sexuálně laděnou tkáň (Kliment a kol., 1989). Chemicky se jedná o 19C steroidy s hydroxylem nebo kyslíkem na polohách 3 a 17 a dvojnou vazbou na poloze 4 (Hafez E. S. E. a kol., 2000).

Relaxin nepatří mezi steroidní hormony, svým chemickým složením se jedná o polypeptid (Kudláč a kol., 1987), sestávající se z α a β podjednotky, které jsou spojeny dvěma disulfidickými vazbami, s molekulovou hmotností 5700 daltonů (Hafez E. S. E. a kol., 2000). Vzniká ke konci březosti ve žlutém tělísku (Kliment a kol., 1989) a u některých druhů jej vylučují také placenta a děloha (Hafez E. S. E. a kol., 2000). Jeho úkolem je hlavně příprava porodních cest k porodu, jako je uvolnění symfýzy pánevní a vazů křížokyčelního kloubu (Kudláč a kol., 1987). Dále uvolňuje a rozšiřuje děložní krček (Kliment a kol., 1989). S estrogény a progesteronem se podílí na stimulaci růstu mléčné žlázy (Kudláč a kol., 1987).

Inhibin produkují folikulární granulózní buňky u samic a je přítomen ve folikulární tekutině. Inhibin je protein o molekulové hmotnosti přibližně 32 000 daltonů a skládá se z α (18 900) a z β podjednotky (Peters a Ball, 1995). Inhibin hraje důležitou roli v hormonální regulaci ovariální folikulogeneze během estrálního cyklu. Funguje jako chemický signál na

hypofýzu a na počet rostoucích folikulů ve vaječniku, čímž ovlivňuje druhově specifický počet ovulací (Hafez, E. S. E. a kol., 2000).

Aktiviny jsou silné FSH uvolňující dimery, které jsou přítomny v pohlavních tekutinách, např. ve folikulární tekutině. Tyto heterodimerní hormony se skládají z α -podjednotky a jedné nebo dvou β -podjednotek (β A nebo β B). Aktivin je plně funkčním členem růstových faktorů (Hafez, E. S. E. a kol., 2000).

4.9 Sekundární hormony reprodukce

Prostaglandiny jsou po chemické stránce mastné kyseliny (Kliment a kol., 1989), které zasahují do průběhu mnoha reprodukčních procesů (Kudláč a kol., 1987). Vylučují je téměř všechny tělesné tkáně a nejsou lokalizovány v konkrétní tkáni. Do cílové tkáně jsou dopravovány krví. Všechny prostaglandiny jsou z 20C nenasyčeného hydroxyly mastné kyseliny s cyklopentanovým kroužkem (Hafez E. S. E. a kol., 2000). Jejich účinek je podobný hormonům, jsou označovány jako tkáňové nebo místní hormony (Kudláč a kol., 1987) a to proto, že většina prostaglandinů působí lokálně v místě jejich výroby v interakci buňka – buňka (Hafez E. S. E. a kol., 2000) tak, že zesilují nebo zeslabují účinek hormonů. Tyto hormony zároveň kontrolují jejich sekreci (Kliment a kol., 1989). Největší vztah k reprodukci má $\text{PGF}_{2\alpha}$ (Kudláč a kol., 1987), a částečně i PGE_2 , které jsou deriváty kyseliny arachidonové. $\text{PGF}_{2\alpha}$ je tvořen ve folikulech, endometriu, myometriu a v tzv. placentárním komplexu a nervové tkáni. $\text{PGF}_{2\alpha}$ má velký účinek na činnost vaječníků a mechanismus porodu (Kliment a kol., 1989). Dokáže způsobit regresi žlutého tělíska (Kudláč a kol., 1987) a inhibuje produkci progesteronu u nepravého žlutého tělíska i u žlutého tělíska březosti (Kliment a kol., 1989). Žluté tělísko je citlivé na $\text{PGF}_{2\alpha}$ jen v určité části pohlavního cyklu (Kudláč a kol., 1987). Na začátku porodu vyvolává kontrakce myometria a usnadňuje porod zvyšováním hladiny oxytocinu. Jeho další uplatnění je při ovulaci, také tlumí tvorbu progesteronu v placentě a kůře nadledvin. U obou pohlaví napomáhá sekreci GnRH v hypotalamu, sekreci gonadotropinů v hypofýze a produkci steroidů v pohlavních žlázách. Existují mezidruhové rozdíly v sekreci $\text{PGF}_{2\alpha}$, např. u krávy je v endometriu produkována kyselina arachidonová, která je ve žlutém tělísku přeměněna v $\text{PGF}_{2\alpha}$, který přivodí jeho regresi (Kliment a kol., 1989). Schopnost $\text{PGF}_{2\alpha}$ indukovat luteolýzu se využívá k manipulaci s estrálním cyklem a k vyvolání porodu (Hafez E. S. E. a kol., 2000).

5 Oogeneze

Oogeneze je proces, kterým *oogonie* rostou a dospívají, až se z nich stanou dospělé samičí pohlavní buňky – vajíčka (Kliment a kol., 1989). Proces probíhá ve třech obdobích, je to období rozmnožování, růstu a zrání (Jelínek a kol., 2003).

Produkce vajíček probíhá ze skupiny buněk na oogoniích, které se vyvíjejí v pásy v zárodečném epitelu kolem vaječniku plodu (Peters a Ball, 1995). Tyto buňky se nazývají gonocyty a mnohonásobným mitotickým dělením z nich vznikají oogonie (Kliment a kol., 1989). Z poslední generace velkého počtu oogonií vznikají oocyty I. řádu (Jelínek a kol., 2003), jež sousední buňky obklopi a poskytují jim živiny (Peters a Ball, 1995). Stádium rozmnožování probíhá pouze v embryonálním vývoji, po narození se oogonie již nemnoží (Kliment a kol., 1989).

Hlavní růstu oogonií pokračuje až v období pohlavní dospělosti (Kliment a kol., 1989) a urychluje se v průběhu pohlavních cyklů (Jelínek a kol., 2003). Roste jen část oogonií, ostatní podléhají atrezii. Oocyty I. řádu se v období růstu nacházejí v rostoucích a Graafových folikulech (Kliment a kol., 1989). V období růstu dochází k zmnožování cytoplazmy oocytů a folikulárních buněk a k vytvoření vaječné blány (Jelínek a kol., 2003), v jádře oocytů I. řádu nastávají změny, které jsou stejné s profází I. meiotického dělení. V této fázi se proces zastaví (Kliment a kol., 1989).

Období zrání (Jelínek a kol., 2003), někdy též nazývané, jako období meiózy (Kliment a kol., 1989) je poslední stádium vývoje vajíčka, které charakterizují dvě po sobě následující zrací dělení. V prvním zracím neboli redukčním dělení dochází v jádře oocytu ke konjugaci chromozomů a výměně genového materiálu (první meiotické dělení). Při něm se primární oocyt rozdělí na dvě nestejně velké buňky s haploidním počtem chromozomů (Jelínek a kol., 2003). V jedné z buněk zůstává všechna cytoplazma a té říkáme oocyt II. řádu, druhou buňku představuje jen jádro s nepatrným množstvím cytoplazmy a označuje se jako první pólóvé tělísko (Kliment a kol., 1989).

Druhé zrací nebo též ekvační dělení nastupuje bezprostředně po dokončení prvního, avšak k jeho dokončení dochází až po ovulaci ovocytu II. řádu a závisí to na tom, zda bylo vajíčko oplozeno (Jelínek a kol., 2003). Pokud ano, oocyt II. řádu se znovu rozdělí na dvě nestejně velké buňky s haploidním počtem chromozomů. Jedna buňka obsahující velké množství cytoplazmy tvoří zralé vajíčko a druhá s nepatrným množstvím cytoplazmy druhé pólóvé tělísko, které zaniká. Obvykle zaniká i druhé pólóvé tělísko, jen někdy se rozdělí (Kliment a kol., 1989) a pak má vajíčko i tři pólóvá tělíška (Frandsen a kol., 2009). Jestli-že nedojde

k oplození oocyty II. řádu, druhé zrací dělení se nedokončí a buňka zaniká (Jelínek a kol., 2003).

Výsledkem oogeneze je tedy pouze jedno zralé vajíčko (Frandsen a kol., 2009), které v průběhu jeho růstu vyživují sousední folikulární buňky (Kliment a kol., 1989).

6 Folikulogeneze

Folikul je prostor ve vaječniku, který umožňuje vaječniku plnit jeho dvojí funkci a to gametogenezi a steroidogenezi (Hafez, B. a Hafez, E.S.E., 2000a).

Prvotní zásoba folikulů je vytvořená během fetálního života nebo brzy po narození (Frandsen a kol., 2009). Primordiální folikuly tvoří jedna vrstva plochých epitelových buněk ze šňůry zárodečných buněk, která kondenzuje kolem oocytů (Adams a kol., 2008). Primordiální folikuly obsahují v průměru $6,44 \pm 0,21$ zploštělých granulózních buněk a mají průměr $35,23 \pm 12,37$ μm . Zahájení růstu folikulů zahrnuje přechod primordiálních folikulů z klidové do růstové fáze a je charakterizován změnou tvaru granulózních buněk z dlaždicového na kvádrový, proliferací granulózních buněk a rozšířením oocyty. Takto vzniká primární folikul, který obsahuje $19,93 \pm 0,81$ kvádrových granulózních buněk, které tvoří jednu nebo jednu a půl vrstvy buněk kolem vajíčka. Průměr primárních folikulů byl $55,06 \pm 1,22$ μm (Braw-Tal a Yossefi, 1997).

V době narození má jalovička až 300 000 primárních folikulů (Jelínek a kol., 2003). U všech zvířat obvykle začíná svůj vývoj v průběhu jednoho estrálního cyklu více primárních folikulů. U krávy se jeden folikul obvykle vyvíjí rychleji než ostatní a během ovulace se uvolní pouze jedno vajíčko. Zbytek rozvíjejících se folikulů ustoupí a vytváří atretický folikul (Frandsen a kol., 2009). Konečný folikulární růst u krav se pohybuje mezi 12 až 32 dny, celková délka růstu folikulů je delší než 20 dní a podle všeho je to asi 6 měsíců (Hafez, B., Hafez, E.S.E. a kol. 2000a). Uniparní zvířata mají obvykle jen jeden nebo dva folikuly za estrální cyklus, které rostou a vyvíjejí se rychleji než ostatní, těmto folikulům říkáme dominantní folikuly (Frandsen a kol., 2009).

Během života krávy dozraje a uvolní se asi 50 vajíček, jejichž celkový počet při narození je 75 000 na každém vaječniku. Tento počet se do tří let zmenší na 21 000 a mezi 12. a 14. rokem života je na každém vaječniku ještě 2 500 vajíček. Ne všechny folikuly dozrají a uvolní se z nich vajíčko, většina z nich během vývoje degeneruje (Říha a kol., 2004).

Další rozvoj primárních folikulů zahrnuje rozšíření oocyty a replikaci okolních folikulárních buněk, které vytvářejí kolem oocyty několikvrstevný obal a začínají vytvářet

kolem oocytu průhlednou zónu pellucidu (Frandsen a kol., 2009). Ta u skotu tvoří kompletní kruh kolem vajíčka až v pozdní preantrální fázi folikulu. Počáteční vývoj k tomuto bodu je nezávislý na hormonální stimulaci gonadotropiny (FSH a LH) (Braw-Tal a Yossefi, 1997).

Rozvoj folikulu je označován jako sekundární folikul, kdy je oocyt rozšířen a obklopen rozvíjející se granulózou (Frandsen a kol., 2009), která je v této fázi tvořena dvěma až šesti vrstvami (Adams a kol., 2008). V této fázi se vytváří theca sestávající se z vrstev theca externa a theca interna. Theca externa obsahuje hodně fibrózní tkáň, zatímco vnitřní vrstva je mobilní a obsahuje mnoho krevních cév (Peters a Ball, 1995).

Granulosa a theca sekundárních folikulů vedou v konečném důsledku ke zvýšení schopnosti folikulů produkovat estradiol a reagovat na gonadotropiny. Produkce estradiolu určuje, který folikul získá FSH a LH receptory nezbytné pro ovulaci a luteinizaci (Hafez, B., Hafez, E.S.E. a kol. 2000a). Od tohoto bodu, je potřeba koordinované účinky FSH a LH pro normální vývoj folikulů (Frandsen a kol., 2009). Poruchy v reakcích granulosa a theky na gonadotropní signály vedou k zastavení růstu folikulu a zahájení folikulární atresie (Hafez, B., Hafez, E.S.E. a kol. 2000a).

Pod vlivem LH se množí thekální buňky a produkují androgeny (androstendion a testosteron), které difundují do granulózy (Frandsen a kol., 2009). FSH vyvolává citlivost granulózních buněk na LH zvýšením počtu receptorů LH (Hafez, B., Hafez, E.S.E. a kol. 2000a), podporuje vývoj buněčných enzymů nezbytných pro přeměnu androgenů na estrogény (estradiol) a sekreci některých dalších látek potřebných pro parakrinní folikuly a dále hraje důležitou roli při zahájení tvorby antra. Gonadotropin stimuluje granulózní buňky k mitóze a tvorbě folikulární tekutiny (Frandsen a kol., 2009).

Vyvíjejí se terciální (Graafovy) folikuly, mají více než 6 vrstev granulózních buněk a kapalinové antrum (Adams a kol., 2008). Graafův folikul výrazně vystupuje nad povrch vaječníku a u krávy jej lze nahmatat při rektální palpaci. U krávy jeho průměr činí 1 – 2 cm a většinou je na vaječníku jen jeden Graafův folikul (Kudláč a kol., 1987).

Estrogény produkované granulózními buňkami podporují vývoj folikulu, kterým jsou produkovány. Tento pozitivní efekt zpětné vazby je jedním z faktorů v procesu výběru, který určuje, který z rozvojových folikulů bude nakonec ovulovat. Druhým faktorem je, že cirkulující estrogény a inhibin mají negativní zpětnovazebný účinek na sekreci FSH z adenohipofýzy. Pokles FSH v tomto období přispívá k atresii pomalu se vyvíjejících folikulů (Frandsen a kol., 2009).

Vývoj folikulů je ukončen ovulací nebo atresii, což je degenerativní změna vedoucí k jejich zániku. U skotu dochází ke spontánní ovulaci (Hafez, B., Hafez, E.S.E. a kol. 2000a).

7 Embryogeneze

Vývoj nového jedince začíná oplozením vajíčka spermií. Po oplození se vytvoří zygota, která podstoupí divizi, migraci a diferenciaci buněk a postupně se z ní stane morula, blastula, gastrula a pak embryo (Frandsen a kol., 2009). Březost je rozdělena do třech etap a to na etapy vajíčko (den 0 – 13), embryo a plod (Peters a Ball, 1995). Doba embrya končí po vytvoření různých orgánů a orgánových soustav, pak se embryo stává plodem. U skotu k tomu dochází přibližně na konci druhého měsíce březosti. Plod se po narození nazývá novorozencem (Frandsen a kol., 2009).

Jednobuněčné zygoty krátce po oplodnění podstupují první mitotické dělení, známé jako rýhování (Frandsen a kol., 2009). Rýhování znamená postupný nárůst počtu buněk, zvaných blastomery, geometrickou řadou, vzniká 2, 4, 8, 16 atd. blastomer (Jelínek a kol., 2003), ale nezvyšuje se objem vyvíjejícího se embrya (Frandsen a kol., 2009). Rýhování pokračuje tak, že po pěti až šesti dnech se vytvoří pevný shluk blastomer známý jako morula (Peters a Ball, 1995).

S dalším množením blastomer vzniká v morule dutinka naplněná tekutinou zvaná blastocel (Jelínek a kol., 2003), takto vznikající dutá koule se nazývá blastula (Frandsen a kol., 2009). Ta se skládá z jedné vrstvy kulových buněk trofoblastu, s dutým centrem, ale také ze skupiny buněk vnitřní buněčné hmoty. Vnitřní buněčná hmota je určena k vytvoření embrya, zatímco trofoblast poskytuje živiny (Peters a Ball, 1995) a vyvine se do extra embryonálních tkání, včetně placenty. Část vnitřní buněčné hmoty, která je nejbližší trofoblastu se nazývá epiblast a část přiléhající k blastocelu je hypoblast (Frandsen a kol., 2009). V průběhu prvních pěti až osmi dní rýhování zůstává zachována zona pellucida, která v důsledku dalšího dělení buněk a zvětšující se dutiny blastocysty praská a dochází k tzv. vyklubání (Jelínek a kol., 2003). Ve fázi blastuly jsou embrya vyplachovány z dárcovských zvířat pro přenos embryí (Frandsen a kol., 2009).

Před koncem druhého týdne vývoje, začne na podélné ose embrya pomocí proliferujících buněk houstnout epiblast. Toto zahuštění je primitivní pruh a zde buňky epiblastu migrují do vnitřku embrya, usídlí se hluboko do vnější vrstvy buněk nyní nazývané ektoderm a přemístěním hypoblastu vytvoří hluboké vrstvy zvané endoderm. Mezi ektodermem a endodermem je založena třetí zárodečná vrstva buněk mezoderm. Tato migrace buněk je gastrulace, tím embryo stanoví tři primární buněčné linie, které se vedou do všech tkání v těle dospělého (Frandsen a kol., 2009).

Z ektodermu vznikají externí struktury, jako je kůže, vlasy, kopyta, mléčná žláza a také nervový systém (Peters a Ball, 1995). Endoderm je zárodečná buněčná linie předurčená aby se stala vnitřkem gastrointestinálního a dýchacího systému, částí epitelu žláz spojených s trávicím systémem a částí reprodukčního systému. Z mezodermu vznikají svaly, kosti, močové cesty, kardiovaskulární systém a část reprodukčního systému (Frandsen a kol., 2009).

8 Estrální cyklus

Od doby dosažení pohlavní dospělosti dochází u samic k periodicky se opakujícím změnám na pohlavních orgánech, ale i v celém organismu, které přetrvávají až do zániku pohlavní aktivity (Říha a kol., 2003). Soubor těchto změn se nazývá pohlavní nebo estrální cyklus, jehož nejvýraznějšími příznaky jsou projevy pohlavního pudu a svolnosti k páření (Jelínek a kol., 2003). Estrální cyklus je řízen neurohormonálně, hlavním řídicím orgánem je centrální nervová soustava a dále se uplatňují hormony (Říha a kol., 2003), které produkuje hypofýza, vaječníky a děloha (Říha a kol., 2004).

Puberta je v podstatě výsledkem postupného přizpůsobení mezi zvýšením aktivity gonadotropinu a schopností gonád současně převzít steroidogenezi a gametogenezi (Hafez B. a Hafez E. S. E., 2000b). U skotu je nástup puberty ovlivněn především výživou a podmínkami chovu (Frandsen a kol., 2009) dále pak věkem, plemenem a tělesnou hmotností. V běžných podmínkách chovu u skotu puberta nastává přibližně ve 12 měsících věku (Hafez B. a Hafez E. S. E., 2000b). Puberta nastává, když jalovice doroste asi do dvou třetin velikosti dospělého těla, měřeno spíše délkou a výškou než hmotností (Frandsen a kol., 2009).

Estrální cyklus je období od jedné říje do další (Říha a kol., 2003) a rozdělujeme ho do několika fází podle změn v chování nebo podle změn na vnitřních a vnějších genitáliích (Frandsen a kol., 2009). Tyto fáze jsou čtyři a nazývají se proestrus, estrus, metestrus a diestrus (Peters a Ball, 1995). Proestrus je období před říjí, pozorovatelný 20. až 21. den cyklu, estrus neboli říje je 1. až 2. den cyklu (Říha a kol., 2003), tyto dvě fáze se označují jako estrogenní neboli proliferační a to proto, že v nich v organismu převažuje hladina 17β -estradiolu a na pohlavním ústrojí dochází k proliferativním změnám (Jelínek a kol., 2003). Metestrus je období po říji, které trvá od 2. do 5. dne cyklu a diestrus je období mezi říjemi trvající 6. až 19. den cyklu (Říha a kol., 2003), obě tyto fáze pohlavního cyklu jsou souhrnně nazývány jako progesteronová neboli sekreční fáze, protože během těchto fází převažuje v těle hormon progesteron a na pohlavním ústrojí probíhají sekreční změny (Jelínek a kol.,

2003). Někdy může u krav dojít i k tzv. poporodnímu anestru, což je období bez pohlavní aktivity, jehož délka závisí na životním prostředí, genetických, fyziologických a metabolických faktorech, jako je např. nutriční úroveň, produkce mléka, rychlost involuce dělohy a hladiny hormonů. U kojícího masného skotu se interval od porodu do první říje pohybuje od 60 do 100 dní (Hafez B. a Hafez E. S. E., 2000b).

Cyklus můžeme také rozdělit z hlediska funkce vaječníků a převažující funkce steroidních hormonů na folikulární a luteální fázi (Peters a Ball, 1995). Folikulární fáze zahrnuje proestrus a estrus a luteální fáze metestrus a diestrus. Sledování změn probíhajících během estrálního cyklu je důležité k určení stádia estrálního cyklu a ke stanovení optimální doby pro inseminaci (Říha a kol., 2003).

Kráva je polyestrické zvíře (Peters a Ball, 1995), to znamená, že u ní říjové cykly probíhají během celého roku a jsou přerušeny jen v době březosti a krátce po porodu. Průměrná délka estrálního cyklu je u krávy 21 dní (Jelínek a kol., 2003), s možným rozpětím délky cyklu od 17 do 25 dnů. U jalovic je většinou o jeden den kratší (Říha a kol., 2003).

8.1 Proestrus

První fáze estrálního cyklu je charakterizována řadou fyziologických procesů a morfologických změn (Říha a kol., 2003), kdy se pod vlivem FSH a LH zvětšují ovariální folikuly a začínají vylučovat estrogény (Frandsen a kol., 2009). Dále pod vlivem $\text{PGF}_{2\alpha}$ probíhá regrese žlutého tělíska z předchozího cyklu (Jelínek a kol., 2003) a na povrch ovaria vystupuje rostoucí folikul o průměru asi 10 mm (Říha a kol., 2003).

Estrogény jsou absorbovány z folikulů do krve (Frandsen a kol., 2009). Zvyšují přívod krve do pohlavního ústrojí a dochází ke zduření a silné proliferaci sliznic vývodných cest (Říha a kol., 2003) v souvislosti s přípravou na říji a březost (Frandsen a kol., 2009). Dále se uvolňuje tonus hymenálního prstence, otevírá se děložní krček (Jelínek a kol., 2003), zvyšuje se epitel endometria, roste vaginální epitel a zvyšuje dráždivost svalové vrstvy vývodných pohlavních cest (Jelínek a kol., 2003). Sliznice poševní předsíně se překrvuje a stává se narůžovělou (Říha a kol., 2003), na zevním genitálu se může zvýšit prokrvení, objevuje se otok a zarudnutí a začíná tvorba cervikálního hlenu (Jelínek a kol., 2003). Dochází k zvýšení pohlavního pudu samic, hlavní psychickou změnou je zvýšená erotizace, neklid (Jelínek a kol., 2003), bučení, plemenice mají menší zájem o krmivo, a může docházet ke snižování dojivosti. Objevují se také pokusy o naskakování na jiná zvířata, ale tyto plemenice ještě nejsou ve stadiu svolnosti k páření. Toto stadium trvá u skotu 2 až 4 dny a vnější projevy jsou pozorovatelné 5 až 15 hodin (Říha a kol., 2004).

8.2 Estrus

Estrus je doba sexuální vnímavosti, která je iniciována zvýšením hladiny estrogenů ze zralých folikulů těsně před ovulací (Frandsen a kol., 2009). Estrogeny zpětně působí na hypotalamus tak, že GnRH dá povel hypofýze a ta sníží sekreci a uvolňování FSH a spustí sekreci a uvolňování LH (Říha a kol., 2003), jehož hladina se krátkodobě zvýší a zapříčiní dozrání folikulů a jejich ovulaci. K ovulaci u krav dochází až po říji a dostavuje se spontánně (Jelínek a kol., 2003).

V estru dojde k dokončení proliferativních změn na pohlavním ústrojí (Jelínek a kol., 2003), na vaječníku je dokončena regrese žlutého tělíska, folikul dorostl do Graafova folikulu, který má průměr 15 až 25 mm a vyklenuje se na povrch ovaria. Děložní krček je otevřen a děloha vykazuje na pohmat silné kontrakce, vulva je edematická (Říha a kol., 2003) a vytéká z ní čirý a táhlý hlen. Vrcholí pohlavní podráždění a dostavuje se říje (Jelínek a kol., 2003). Chování plemence v estru se oproti proestru stává pasivním, kráva na sebe nechává skákat ostatní zvířata, což je tzv. reflex nehybnosti a zaujímá postoj k páření (Říha a kol., 2004). Tyto viditelné změny se používají k určení času vhodného pro inseminaci (Peters a Ball, 1995). Obecně se krávy, které se říjí ráno zapouští odpoledne a ty které se říjeli večer, se zapouští druhý den ráno (Frandsen a kol., 2009). Říje trvá v průměru 24 ± 12 hodin (Jelínek a kol., 2003) a u jalovic je o něco kratší než u krav (Frandsen a kol., 2009).

8.3 Metestrus

Metestrus je charakterizován snížením hladiny estrogenů (Říha a kol., 2003), zvýšením hladiny progesteronu (Frandsen a kol., 2009) a vysokou aktivitou LH, které při optimálním poměru s FSH vyvolá za 10 až 12 hodin po skončení říje ovulaci. Na místě prasklého Graafova folikulu se vytvoří žluté tělísko (Říha a kol., 2003), které je tvořeno luteinovými buňkami (Jelínek a kol., 2003) a které produkuje progesteron (Říha a kol., 2003).

Plně rozvinuté žluté tělísko má pozoruhodný vliv na dělohu. Endometriální sliznice dělohy zhoustne, děložní žlázy se zvětší a děložní svaly vykazují zvýšený rozvoj (Frandsen a kol., 2009), nastupuje tzv. sekreční stádium. Mizí překrvení vnitřních i vnějších samičích pohlavních orgánů (Říha a kol., 2003), uzavře se děložní krček a děloha ztrácí svůj zvýšený tonus a stává se méně drážditelnou (Jelínek a kol., 2003). Z vulvy vytéká snížené množství houstnouceho hlenu a za 24 až 48 hod. po skončení říje se objevuje krvavý výtok, který se vyskytuje u všech plemenic (Říha a kol., 2004). Tento jev se nazývá metestrické krvácení (Frandsen a kol., 2009). Sexuální chování zvířat je charakterizováno uklidněním, plemence

na sebe již nenechá skákat, ale snáší ještě očichávání jinými plemenicemi a ojedinele se vyskytují i pokusy o skákání na ostatní zvířata, tato fáze trvá 3 až 4 dny (Říha a kol., 2004).

8.4 Diestrus

Diestrus je typický aktivitou progesteronu (Říha a kol., 2003) a dokončením vývoje žlutého tělíska (Jelínek a kol., 2003), které se od 8. do 15. dne cyklu rozvíjí a dosahuje velikosti 18 až 30 mm. Progesteron připraví dělohu na přijetí časného embrya, a pokud dojde k zabřeznutí (Říha a kol., 2004), vyvíjející se blastocysta drážděním receptorů děložní sliznice zamezí uvolňování luteolyticky působícího $\text{PGF}_{2\alpha}$ a žluté tělísko zůstává na vaječnicích a produkuje progesteron až do porodu (Jelínek a kol., 2003). V případě, že nedošlo k oplození a samice nezabřezla, dochází okolo 17. dne (Říha a kol., 2004) k produkci prostaglandinu z endometria, který vyvolá regresi žlutého tělíska, přeruší produkci progesteronu (Jelínek a kol., 2003) a tak dojde k uvolňování negativní zpětné vazby na systém hypotalamo-hypofyzární a pod vlivem FSH k růstu folikulu dalšího estrálního cyklu (Říha a kol., 2003).

8.5 Folikulární vlny

Studie, které pomocí ultrazvuku sledovali folikulové populace prokázaly, že folikulární růst u skotu se vyskytuje ve vlnovém způsobu. Vznik folikulární vlny u skotu se vyznačuje náhlým (během 2-3 dnů) růstem 8-41 malých folikulů, které jsou nejprve zjištěné ultrasonograficky v průměru 3-4 mm. Tempo růstu je podobné u všech folikulů ve vlně až do cca 2. dne (Adams a kol., 2008), kdy je z kohorty vybrán tzv. dominantní folikul (DF), který stanoví dominanci (Lucy, 2007), zatímco zbytek se stává atretický a ustoupí (podřízené folikuly) (Adams a kol., 2008).

Bylo prokázáno, že více než u 95% estrálních cyklů u skotu je složeno buď ze dvou, nebo tři folikulárních vln, jejichž poměr ve skupině krav je různý. Jedno vlnné cykly byly pozorovány u jalovic v době puberty a u dospělých krav během prvního intervalu po porodu. Čtyř vlnné cykly jsou pozorovány příležitostně u skotu *Bos indicus*. Podíl zvířat s dvěma nebo třemi vlnami v cyklu se liší (Mapletoft a kol., 2002). Opakovatelnost stejných vzorů cyklů je více než dvojnásobně vyšší, než je podíl cyklů, které změnilly vzory (70% oproti 30%) a není ovlivněna obdobím roku. Zvýšení podílu tří vlnných vzorů je spojena s nízkou úrovní výživy a tepelného namáhání (Adams a kol., 2008). Na počet folikulárních vln má největší vliv individualita jedinců (Mapletoft a kol., 2002).

Jednoduše řečeno, vzorec vlny folikulů se vztahuje na pravidelné, synchronně rostoucí skupiny antrálních folikulů. U skotu, se vznik folikulární vlny vyznačuje náhlým (během 1 až

2 dnů) růstem více než 20 malých folikulů. Asi 2 dny je růstová rychlost podobná u celé vlny folikulů, pak je jeden folikul zvolen tak, aby i nadále rostl (dominantní folikul), zatímco zbytek se stal atretický (Mapletoft a kol., 2002). U obou dvou a tří vlnných estrálních cyklů dochází ke vzniku první folikulární vlny v den ovulace (den 0). Ke vzniku druhé vlny dochází 9. nebo 10. den u dvou vlnných cyklů, a 8. nebo 9. den u tří vlnných cyklů. Ve třech vlnných cyklech, se třetí vlna objevuje 15. nebo 16. den (Adams a kol., 2008). Krávy s dvěmi vlnami mají z druhé vlny dominantní folikul, který jde k ovulaci, u krav se třemi vlnami vzniká ovulační folikul až z třetí vlny (Lucy, 2007).

Postupné folikulární vlny zůstanou neovulované až do luteolýzy, po té se dominantní folikul stane ovulačním folikulem, a vznik další vlny je zpožděn až do dne ovulace (Mapletoft a kol., 2002). Dominantní folikul je fyziologický projev koordinace vývoje na mateřskou péči u uniparních zvířat. Základní funkce dominantního folikulu je živit a nakonec uvolnit vajíčko a syntetizovat hormony, které řídí reprodukci. Dominantní folikul se liší od ostatních folikulů proto, že může uniknout atrézii (osud všech ostatních folikulů), a pokud je vystaven LH, jeho buňky se diferencují do žlutého tělíska. Pokud dominantní folikul dozrává v průběhu luteální fáze, podléhá také atrézii. Dominantní folikul lze řídit farmakologicky do protokolů pro časovanou inseminaci a synchronizaci říje (Lucy, 2007). Vaječník, na kterém se vyvíjí dominantní folikul je vybrán náhodně, bez vlivu předchozího dominantního folikulu nebo CL (Adams a kol., 2008). CL se dříve objeví ve dvou vlnných cyklech (den 16), než ve třech vlnných cyklech (den 19), což vede k odpovídajícím rozdílům mezi délkou estrálních cyklů (20 – 23 dní) (Mapletoft a kol., 2002). Z toho důvodu, tzv. 21 denní estrální cyklus dobytka existuje pouze jako průměr dvou a tří vlnných cyklů (Adams a kol., 2008).

Maximální počet folikulů během folikulární vlny byl v průměru $21,5 \pm 0,8$ (rozmezí 8 – 54 folikulů) a byla podobná u jalovic ($20 \pm 1,1$, rozpětí = 8 – 42) a krav ($22,8 \pm 1,3$, rozsah = 11 – 54). Krávy mají ve srovnání s jalovicemi delší intervaly mezi ovulacemi ($23,7 \pm 0,6$ vs. $21,3 \pm 0,8$ den), větší dominantní folikuly ($15,8 \pm 0,3$ vs. $14,7 \pm 0,5$ mm) a delší období dominance ($7,6 \pm 0,3$ vs. $6 \pm 0,6$ den). Opakovatelnost počtu folikulů během vlny pro jednotlivce je 0,86 - 0,96, bez ohledu na ročním období, počet folikulárních vln v estrálním cyklu, fázi laktace. Tak je tomu do 8 – 10 let, po té se počet folikulů snižuje, zřejmě v důsledku vyčerpání primordiálních folikulů. Tato pozorování naznačují, že existují vyrovnávací mechanismy, které udržují vysokou opakovatelnost počtu folikulů během folikulární vlny. Průměr folikulů byl v rozmezí 3-20 mm během folikulárních vlny a nejvyšší počet folikulů byl ve velikosti od 3 do 3,9 mm (tři až pětinasobně více) (Burns, 2005).

Termíny recruitment, selekce a dominance se obvykle používají k popisu procesu, jehož prostřednictvím se dominantní folikul rozvíjí. Recruitment znamená, že folikul (y) začíná zrát v prostředí s dostatečnou stimulací hypofyzárních gonadotropinů, umožňuje pokrok směrem k ovulaci. Kohorta může mít různou velikost. Selekcce je proces, při kterém je vybrán jeden folikul a pokud je kompetentní k dosažení včasné ovulace, může se vyhnout atrezii. Dominance zahrnuje prostředky, které vybírají (dominantní) folikul, nebo jeho nástupce, žluté tělísko. Folikul trvá na své dominanci bilaterálně nad všemi ostatními folikuly, určuje dění v hypotalamu, hypofýze a na vaječnicích (Lucy, 2007).

Další dva pojmy, emergence a deviace popisují další vlastnosti procesu. Emergence je poslední den nebo vyšetření (pokud je více než jedna zkouška na den) a budoucí dominantní folikul je velký 4 mm. Deviace je začátek největšího rozdílu v tempech růstu mezi dvěma největšími folikuly při nebo před vyšetřením, kdy druhý největší folikul dosáhne svého maximálního průměru (Lucy, 2007).

Vznik folikulární vlny předchází nárůstu plazmatických koncentrací FSH (Adams a kol., 2008). Volba dominantního folikulu zahrnuje změnu ve volném IGFI a zvýšení LH exprese receptoru v granulózní buněčné vrstvě. Prostřednictvím těchto mechanismů, dominantní folikul přesouvá svou závislost z FSH na LH a následně potlačuje FSH k vyvolání atrezie u dalších folikulů v rámci kohorty. Poté, co se stane dominantní folikul LH-závislý, jeho osud je atrezie nebo ovulace (Lucy, 2007).

9 Historie přenosu embryí

První pokusy o přenos embryí byly provedeny v druhé polovině 19. století. V dubnu roku 1980 se Waltrovi Heapovi podařilo provést první úspěšný embryo transfer a to u králíka plemene angora a belgický zajíc (Betteridge, 2003). Heape popsal svou techniku pro manipulaci s králíčími embryi, která nabodával na špičku jehly a převáděl je do příjemkyně bez jejich držení v médiu (Hasler, 2014).

První zaznamenané použití embryo transferu u hospodářských druhů bylo na Zemědělské a strojní Vysoké škole v Texasu, kde Warwick, Berry a Horlacher v roce 1932 a 1933 použili tuto techniku u ovcí a koz. Úspěšně vyjmuli vajíčko, ale protože neměli připravenou žádnou příjemkyni, vložili vajíčko zpět do jeho matky, která ho úspěšně donosila a po 147 dnech porodila. První přenos embryí v pravém slova smyslu proběhl u ovcí až v roce 1950 v Sovětském svazu a v roce 1957 v Polsku (Betteridge, 2003).

První telete vzniklé embryo transferem se narodilo v roce 1950, pod vedením E. L. Willeta a kolektivu na Univerzitě ve Wisconsinu. U koně byl proveden první přenos embryí v roce 1974 v Japonsku (Hasler, 2014).

První komerční přenosy embryí u skotu byly prováděny v Severní Americe a v Anglii v roce 1970. Pokrok v embryo transferu výrazně ovlivnil dovoz evropských masných plemen do USA a Kanady. Protože byla tato zvířata velmi žádaná a drahá, začal se k jejich množení využívat ve velké míře embryo transfer. Od roku 1973 až 1975, se zde po embryo transferu narodilo 1500 simentálských telat (Hasler, 2014). V Československu se první tele vzniklé přenosem čerstvého embrya narodilo v roce 1976 a v roce 1982 se narodilo první tele po přenosu zmrazeného embrya (Říha, 1996).

Aby mohlo dojít k úspěšnému provádění embryo transferu, muselo dojít k pokroku v několika jeho oblastech jako je superovulace a synchronizace, metody získávání a přenosu embryí, krátkodobé uchovávání a kryokonzervace (Hasler, 2014). Po roce 1980 došlo také k doprovodnému pokroku v oblastech, jako je embryonální mikromanipulace, oplodnění in vitro a molekulární biologie, či určování pohlaví embrya (Betteridge, 2003).

9.1 Superovulace a synchronizace

Většina postupů u embryotransferu skotu obvykle začíná superovulací dárkyň. K vyvolání se využívá buď komerčně dostupné FSH, které bylo získáno z hypofýzy prasat nebo eCG (Hasler, 2014). eCG bylo poprvé objeveno na Univerzitě v Kalifornii a za druhé světové války bylo vynaloženo velké úsilí na jeho produkci, avšak ne za účelem superovulace, ale za účelem růstu telat v Británii (Betteridge, 2003). eCG začal používat P. Elsdon v Austrálii, kde FSH nebylo k dispozici, a tak udělal svůj vlastní extrakt z koňské hypofýzy a krve klisen v 80 – 120 dni březosti. Výsledná séra mohla být použita jen jednou, protože zde bylo riziko vzniku anafylaktického šoku. (Hasler, 2014).

Dalším významným pokrokem bylo po roce 1970 používání $\text{PGF}_{2\alpha}$ a jeho analogů k synchronizaci říje u hospodářských zvířat. Synchronizace umožnila to, že embryo transfer nebyl závislý na přirozeném cyklu zvířat, a tak nemusela být chována velká a drahá stáda potenciálních příjemkyň (Betteridge, 2003).

9.2 Metody získávání a přenosu embryí

Chirurgické metody získávání embryí byly nejprve vyvinuty u psů a byly použity v počátcích embryo transferu u ovcí, koz a skotu (Betteridge, 2003). U skotu byla embrya téměř výhradně přenášena chirurgicky přes břišní stěnu. Bohužel, tato metoda neumožňovala

provádět embryo transfer jinde, než v dobře vybavených ordinacích. Další nevýhodou bylo to, že přenos nešel provést u laktujících krav a někdy mohl způsobit i neplodnost. Do roku 1980 byl využíván přenos embryí přes bok krávy, který byl mnohem rychlejší než předešlý způsob, bylo možné ho provést přímo na farmě a vyžadoval minimální vybavení. Tento způsob měl vysokou úspěšnost a byl poměrně snadný (Hasler, 2014).

Nicméně už od roku 1950 se Rowson a jeho tým snažili provádět přenosy embryí u skotu přes děložní čípek, což však bylo komplikováno problémy s infekcí a vyloučením vajíček. První zpráva o narození telete z nechirurgických metod přenosu embrya přišla až v roce 1964. V Japonsku Sugie pod vedením Moora a Rowsona v roce 1965 také dosáhl úspěchu s transvaginálním přenosem a to tak, že procházel děložním čípkem ve spojení s insuflací CO₂, aby se ujistil, že jehla sloužící k uložení embrya byla skutečně v děložní dutině. Navzdory určitým úspěchům, transcervikální přenos dočasně ztratil na popularitě v konfrontaci s mnohem lepšími výsledky dosaženými chirurgickými metodami v Cambridge na konci roku 1960 (Betteridge, 2003).

Nechirurgické vyplachování od roku 1975 prakticky nahradilo komerční chirurgické přenosy embryí. Přechod z chirurgických metod na nechirurgické byl poměrně složitý, a to proto, že nebyly ještě zcela vyvinuty nástroje na jeho provedení a také byly zapotřebí odborné znalosti pracovníků hlavně z oblasti rektální palpce a inseminace. Z počátku se využívali upravené Foley katetry, které nahradili silikonové katetry vyráběné v různých délkách a velikostech (Hasler, 2014).

9.3 Krátkodobé uchovávání

Pincus a Kirsch v roce 1936 zjistili, že embryo může být na určitou dobu přeneseno do vejcovodu králíka, bez nutnosti synchronizace (Betteridge, 2003). Tato technika se v malém měřítku používala pro převážení embryí skotu na delší vzdálenosti. Embryo mohlo být takto umístěno ve vejcovodu králíka až čtyři dny a po té úspěšně přeneseno do příjemkyně (Hasler, 2014).

V začátcích embryotransferu se často používalo na vyplachování a uchovávání embryí homologní sérum (Hasler, 2014). V roce 1969 Rowson a jeho kolektiv srovnávali toto homologní sérum a TCM 199, které vybrali jako alternativní médium proto, že bylo snadno k dispozici v laboratořích. Výsledek byl překvapivý, protože po použití séra nebylo dosaženo žádné březosti. Naopak TCM 199 mělo velký úspěch (Betteridge, 2003). Někteří odborníci si také vyráběli své vlastní sérum na vyplachování a uchovávání embryí (Hasler, 2014).

9.4 Zmrazování embryí

V roce 1947 M. C. Chang úspěšně přenesl králičí embrya, která ochladil na 10°C. O dva roky později byl v Anglii Ch. Polgem objeven kryokonzervační vliv glycerolu na savčí spermie a měl nesmírný dopad na živočišnou výrobu a zvláště pak na embryo transfer (Betteridge, 2003).

V roce 1972 byla zmražena embrya myši, která byla následně rozmražena a úspěšně přenesena. Na tento úspěch navázali v roce 1973 Wilmut a Rowwson a to narozením prvního telete po přenosu kryokonzervovaného embrya (Hasler, 2014). Nicméně, s aplikací v praxi byl problém, protože mladší embrya ve fázi štěpení nebo brzké moruly, která byla v té době přenášena, tento postup nepřežila. Praktická aplikace přišla až později v tomto desetiletí, kdy Trounson a Willadsen a jejich tým v Cambridge přešli k transcervikálnímu výplachu a přenosu pozdní moruly a brzké blastocysty, které mnohem lépe snáší zmrazování a rozmrazování (Betteridge, 2003).

V roce 1977 se vyvinula technologie zmrazování ve skleněných ampulích, sériově plněných zředěným DMSO a dvoustupňové, tří hodinové programy, zahrnující zchlazování o 0,1°C a 0,3°C za minutu. V roce 1980 se začalo využívat mrazení v 0,5 ml pejetách, embrya ekvilibrovala přímo v 10 % glycerolu a byl jen jednostupňový program chlazení klesající asi o 0,4°C za minutu, který trval jen hodinu a půl (Hasler, 2014).

10 Příprava dárkyně

Příprava dárkyně zahrnuje několik kroků. Prvním z nich je synchronizace estrálních cyklů, následuje synchronizace vzniku folikulární vlny, superovulace a nakonec inseminace. Embryo transefer se využívá nejen u různých plemen, ale i u různých druhů skotu, jako je *Bos taurus* nebo *Bos indicus* (Baruselli a kol., 2006). Mezi těmito druhy však existují významné rozdíly v reprodukční fyziologii, které mohou mít vliv na účinnost superstimulačních programů (Baruselli a kol., 2011). Konkrétně, *B. indicus* je citlivější na gonadotropiny, má kratší říje s častějším průběhem v noci (Baruselli a kol., 2006). *B. indicus* má oproti *B. Taurus* více folikulů přijatých do folikulární vlny (30 – 60 ve srovnání s 15 – 33), menší průměr dominantního folikulu (6,0 oproti 8,5 mm) a menší maximální průměr dominantního folikulu (10 – 12 proti 14 – 20 mm) a s tím spojený menší průměr žlutého tělíska (17 - 21 oproti 20 - 30 mm). Tyto rozdíly mezi *B. taurus* a *B. indicus* je třeba vzít v úvahu při plánování programů superovulace a embryo transferu. Krávy používané jako dárkyně by měly být

reprodukčně zdravé, 50 – 120 dní po porodu a měly by u nich proběhnout alespoň dva říjové cykly (Baruselli a kol., 2011).

10.1 Synchronizace estrálních cyklů

K synchronizaci estrálních cyklů využíváme hormonální přípravky na bázi prostaglandinů, syntetického progesteronu (P4) nebo progestiny. Synchronizace říje znamená manipulaci s estrálním cyklem (Islam, 2011). Synchronizací je možno zkrátit interval mezi dvěma říjemi (z 21 dnů na méně než 5). Existují dva základní postupy synchronizace říje a to zkracování nebo prodlužování luteální fáze cyklu (Králová a Šichtař, 2014).

Zkracování luteální fáze cyklu se provádí aplikací přípravků s luteolytickým účinkem. Tím je vyvolána regrese žlutého tělíska, pokles hladiny progesteronu a následně se zahájí růst a zrání Graafova folikulu (Murugavel a kol., 2003).

Podání $\text{PGF}_{2\alpha}$ a jeho analogů je jeden z nejstarších způsobů synchronizace říje. $\text{PGF}_{2\alpha}$ působí jako luteolytické činidlo, ale je účinný pouze při aplikaci v 8. – 17. dni estrálního cyklu, kdy je přítomno žluté tělísko (Islam, 2011). Podání $\text{PGF}_{2\alpha}$ v jedné dávce je dostačující, pokud je na vaječniku přítomno funkční CL (Murugavel a kol., 2003). Pokud není známa fáze estrálního cyklu, doporučuje se aplikovat dvě injekce prostaglandinů v rozmezí 10 až 14 dnů. Všechny cyklující krávy by měly reagovat na druhou aplikaci $\text{PGF}_{2\alpha}$, nezávisle na fázi cyklu ve kterém byla léčba zahájena.

Prodlužování luteální fáze nebo umělé navození luteální fáze se provádí aplikací látek s progestačním účinkem, jako jsou progestiny, např. melengestrolacetát - MGA nebo syntetický progesteron (P4) (Islam, 2011).

Melengestrolacetát (MGA) je progesteron, který se podává v krmivu a existuje několik variant jeho podávání (Patterson a Smith, 2007). Nejjednodušší je podávání 0,5 mg/ks/den po dobu 14 dnů (Islam 2011), kdy se říje dostavuje v průměru za 10 dní po ukončení léčby (Patterson a Smith, 2007). Další variantou je podání injekce prostaglandinu za 15 až 19 dnů po odstranění MGA z krmiva (Islam 2011). Při aplikaci $\text{PGF}_{2\alpha}$ jsou zvířata v pozdní luteální fázi, což zkracuje dobu synchronizace (Patterson a Smith, 2007). Říje by se měla u plemenic objevit 48 hodin po vysazení MGA (Wood a kol., 2007). Také je možno aplikovat dvě injekce prostaglandinu, jednu v době ukončení podávání MGA a další za 15 dnů. Tím se snižuje čas na detekci říje a dochází k lepší synchronizaci (Islam 2011). Existují i další variaty aplikace MGA (Wood a kol., 2007).

Progesteron (P4) a jeho deriváty je další způsob jak regulovat funkci žlutého tělíska (Peters a Ball, 2004). Synchronizace říje progestogeny, udržuje vysoké hladiny progesteronu

v těle samice i po regresi žlutého tělíska (Islam 2011), potlačuje uvolňování gonadotropinů a tím zraní folikulů. Pokud je progesteron podáván skupině plemenic v náhodné fázi estrálního cyklu, je nejvhodnější zvolit léčbu trvající 16 dní (délka luteální fáze cyklu). Progesteron je možné podávat i 18-21 dní nebo jen 7-12, ale tyto způsoby nemají tak dobré výsledky (Peters a Ball, 2004). Říje se dostavuje za 2-5 dní po odstranění progestinu (Islam 2011).

Progesteron lze aplikovat pomocí podkožních (např. Crestar) nebo intravaginálních insertů, které se využívají častěji. Mezi intravaginální inserty patří PRID-Delta (progesterone-releasing intravaginal device) obsahující 1,55g P4 a CIDR (controlled internal drug release), obsahující 1,38g P4 (Králová a Šichtař, 2014), který je navržen tak, aby zvýšil koncentraci progesteronu v krvi alespoň na 2 ng/ml po dobu až 10 dnů. CIDR se snadno vkládá do pochvy a má pružnou šňůrku k snadnému vyjmutí. CIDR se aplikuje na 7 dní a po vyjmutí vyvolá rychlý pokles hladiny progesteronu v plazmě, což vede k synchronizaci říje (Islam 2011). Tyto výrobky lze úspěšně využít pro cyklující i necyklující krávy (Králová a Šichtař, 2014).

10.2 Synchronizace vzniku folikulární vlny

Variabilita superovulační odpovědi a čas a úsilí potřebné k ošetření a detekci říje byly hlavními limitujícími faktory ovlivňující úspěšnost technologie embryo transferu v genetických šlechtitelských programech (Bó a kol., 2008). Hlavním zdrojem variability v superovulační odpovědi u skotu je vývojový stav ovariálních folikulů v době zahájení podávání gonadotropinů. I přesto, že byly vyvinuty protokoly, kterými je řízen vznik folikulární vlny, nebyla kompletně odstraněna variabilita superovulační reakce. (Mapletoft a kol., 2002).

Nejčastěji používaný přístup k synchronizaci vzniku folikulární vlny pro superovulaci je estradiolová léčba, kterou nelze použít v mnoha zemích kvůli obavám z účinku estrogenních látek v potravinovém řetězci (Bó a kol., 2008). Kromě estradiolu se k vyvolání folikulární vlny pro synchronizaci využívá ještě GnRH, LH, hCG a progesteron (P4). Možné je i mechanické ovládní pomocí folikulární ablace (Baruselli a kol., 2011). Tyto metody se využívají u skupiny skotu *Bos taurus* i *Bos indicus* (Baruselli a kol., 2006). Alternativou také může být použití FSH nebo eCG k zahájení nové vlny, bez ohledu na přítomnost dominantního folikulu, po kterém následuje superovulační ošetření (Bó a kol., 2008).

10.3 Folikulární ablace

Alternativou k použití estradiolu v superovulačních protokolech je odstranit supresivní účinek dominantního folikulu (Mapletoft a Bó, 2015). K tomu se využívá folikulární ablace

provedená za pomoci transvaginálního ultrazvukového vyšetření (Bergfelt a kol., 1997). Při folikulární ablaci je možno odstranit všechny folikuly $\geq 5\text{mm}$, nebo jen dva největší folikuly (Bó a kol., 2008). Bylo zjištěno, že ablace pouze dvou největších folikulů je dostačující k vyvolání nové vlny, která se vyskytuje o 24 až 36 hodin později. V této době je zahájena superovulace (Mapletoft a Bó, 2015). Folikulární ablaci lze elektivně odstranit dominantní folikul v kterékoli fázi estrálního cyklu, bez předchozí znalosti o jeho stavu, a vyvolat vznik vlny s vysokým stupněm konzistence (Bergfelt, 1997). Nevýhodou folikulární ablace je, že vyžaduje ultrazvukové zařízení a vyškolený personál, což limituje její využití v terénu (Mapletoft a Bó, 2015). Po té co je provedena folikulární ablace následuje podání gonadotropinů

10.4 Gonadotropiny a superovulace

Faktory spojené s podáváním exogenních gonadotropinů, které mají vliv na superovulační reakci zahrnují zdroj, dávky a biologickou aktivitu gonadotropinu. K vyvolání superovulace se používají tři různé druhy gonadotropních přípravků. Jsou to gonadotropiny získané z výtažků hypofýzy prasat, nebo jiných domácích zvířat, koňský choriových gonadotropin (eCG) nebo lidský menopauzální gonadotropin (Mapletofta kol., 2002). Lidský menopauzální gonadotropin nenabízí žádné výhody u skotu a nepoužívá se v komerčních přenosech embryí. Naopak nejčastěji se využívají výtažky z hypofýzy prasat (Mapletoft a Bó, 2015).

Hypofyzární extrakty obsahují FSH a LH. Jejich biologický poločas u krávy se odhaduje na 5 nebo méně hodin. K úspěšnému vyvolání superovulace musí být aplikován dvakrát denně (Mapletoft a Bó, 2015). Obvyklý léčebný režim FSH je intramuskulární ošetření dvakrát denně na 4 nebo 5 dní v celkové dávce 28 – 50 mg z surového extraktu hypofýzy (Mapletoft a kol., 2002), nebo 260 – 400 mg NIH-FSH-PI částečně čištěného extraktu hypofýzy (Folltropin®-V, Bioniche Animal Health Inc., Belleville, Ontario, Kanada). Za 48 nebo 72 hodin po zahájení léčby, je podáván $\text{PGF}_{2\alpha}$ na indukci luteolýzy. Říje se dostaví za 36 až 48 hodin po podání prostaglandinu a ovulace začíná o 24 až 36 hodin později (Mapletoft a Bó, 2015).

Koňský choriový gonadotropin je komplexní glykoprotein jak s FSH tak i LH aktivitou. Jeho poločas rozpadu u skotu činí 40 hodin a v krevním oběhu skotu přetrvává až po dobu 10 dnů (Mapletoft a kol., 2002). Obvykle se tedy aplikuje jednorázově, ve formě intramuskulární injekce, po které za 48 hodin následuje injekce $\text{PGF}_{2\alpha}$. Tento dlouhý poločas může způsobit i řadu vedlejších účinků, jako je trvalá stimulace vaječnicků, neovulování

folikulů, abnormální endokrinní profily a snížená kvalita embryí. Tyto problémy lze do značné míry překonat podáním intravenózní injekce protilátek proti eCG v době první inseminace, 12 – 18 hodin po nástupu říje. Doporučené dávky eCG jsou v rozsahu 1500 – 3000 IU (Mapletoft a Bó, 2015).

V několika pokusech zkoumajících působení FSH a eCG bylo zjištěno, že superovulační odezva po použití eCG je nižší, než při použití FSH (Hasler, 2014). V jiných pokusech však nebyl zjištěn výrazný rozdíl mezi těmito hormony (Mapletoft a Bó, 2015). Například ve studii krav opakovaně superovulovaných v intervalu šedesáti až devadesáti dní, více než 1 rok pomocí hypofýzárních extraktů (Folltropin®-V nebo FSH-P) a eCG, a to s nebo bez použití protilátky k eCG (Neutra-PMSG, Intervet, Boxmeer, Holandsko). I přesto však bylo po použití Folltropin®-V získáno více embryí než s eCG (Mapletoft, 2002).

Folikulogeneze u savců vyžaduje jak FSH, tak LH. V komerčně vyráběných přípravcích existuje variabilita v obsahu FSH a LH. Pomocí testů byl zjištěn různý poměr FSH a LH v eCG. Tento poměr se lišil jak u jednotlivých březích klisen mezi sebou, ale i v rámci stejné klisny v různých časech v průběhu březosti (Murphy a Martinuk, 1991).

Vyčištěné hypofýzární výtažky s nízkým obsahem LH mají lepší superovulační odezvu. Vysoké dávky LH mají za následek horší kvalitu embryí a může způsobit předčasnou aktivaci oocyty. Několika experimenty bylo zjištěno (Mapletoft a Bó, 2015), že LH v přípravcích FSH ovlivňuje superovulační reakci a že maximální přijatelné množství LH se zdá být mezi 15 a 20%. Ideální poměr FSH/LH je tedy 5:1 (Willmott a kol., 1990).

10.5 Protokoly používané k aplikaci gonadotropinů

V současné době existuje mnoho komerčních přípravků používaných k superovulaci dárkyň, například přípravek Stimufol® (Stimufol®, Reprobiol SPRL, Lorcé, Stoumont, Belgie) a Pluset® (Pluset®, Laboratories Calier, S.A., Barcelona, Španělsko).

Stimufol® je lyofilizovaná látka obsahující 500 µg prasečího FSH a 100 µg prasečího LH. Podávání a dávkování: lyofilizovaná látka se rozpustí v 10ml rozpouštědla a aplikuje se intramuskulárně v 8 frakcích. Aplikace se provádí dvakrát denně po 12 hodinách po dobu 4 dnů od 9. do 12. dne estrálního cyklu. Dávka může být rozdělena na 8 stejných dávek nebo na 8 dávek, které se v průběhu podávání zmenšují. Podávání Stimufolu doplňuje luteolytická léčba.

Pro krávy se doporučuje dávka 450-500 µg prasečího FSH pro 4-denní léčbu. Při rozdělení dávky na 8 stejných částí to odpovídá 1,1 až 1,25 ml v každé injekci. Pokud se Stimufol® aplikuje v protokolu se snižující se dávkou, může se využít následujících schémat:

1. příklad:

- 1. den: 1,7 až 1,9 ml v každé z obou injekcí,
- 2. den: 1,4 až 1,6 ml v každé z obou injekcí,
- 3. den: 0,8 až 0,9 ml v každé z obou injekcí,
- 4. den: 0,6 ml v každé z obou injekcí.

2. příklad:

- 1. den: 1,4 až 1,6 ml v každé z obou injekcí,
- 2. den: 1,2 až 1,4 ml v každé z obou injekcí,
- 3. den: 1,0 ml v každé z obou injekcí,
- 4. den: 1,0 ml v každé z obou injekcí.

Pro jalovice je doporučená celková dávka na 4 denní protokol 320-360 µg prasečího FHS, kdy při 8 stejných dávkách je v jedné injekci 0,8 do 0,9 ml. Pro snižující se dávku je doporučeno toto schéma podávání:

- 1. den: 1,1 až 1,2 ml v každé z obou injekcí,
- 2. den: 0,9 až 1,0 ml v každé z obou injekcí,
- 3. den: 0,6 až 0,7 ml v každé z obou injekcí,
- 4. den: 0,6 až 0,7 ml v každé z obou injekcí.

Pluset[®] je lyofilizovaný prášek, jehož jedna lahvička obsahuje 500 IU prasečího FSH a 500 IU prasečího LH. Tento prášek se před aplikací rozpustí v 10,5ml rozpouštědla. Podávání je intramuskulární a mělo by být zahájeno mezi 9. – 12. dnem estrálního cyklu, přičemž nejlepších výsledků je dosaženo při zahájení aplikace v 11. dni. Za 60 anebo 72 hodin po první aplikaci Plusetu by se měla intramuskulárně aplikovat luteolytická dávka PGF_{2α}. Říje se dostaví 40-48 hodin po aplikaci PGF_{2α} a inseminace by se měla provést 12 hodin po nástupu říje s následnou reinseminací po 12 hodinách.

Celková doporučená dávka je v rozsahu 800 až 1000 IU, přičemž 800 IU je doporučená dávka pro jalovice a masný skot. Dojnicím je možno aplikovat až dávku 1000 IU. Pluset[®] se podává 4-5 dní, dvakrát denně s odstupem mezi aplikacemi 12 hodin.

Doporučené dávkovací schéma při aplikaci 800 IU, které budou podány v průběhu 4 dnů je:

- 1. den: 1. dávka – 3,0ml (150 IU FSH + 150 IU LH); 2. dávka – 3,0ml (150 IU FSH + 150 IU LH)
- 2. den: 1. dávka – 2,5 ml (125 IU FSH + 125 IU LH); 2. dávka – 2,5 ml (125 IU FSH + 125 IU LH)

- 3. den: 1. dávka – 1,5 ml (75 IU FSH + 75 IU LH); 2. dávka – 1,5 ml (75 IU FSH + 75 IU LH)
- 4. den: 1. dávka – 1,0 ml (50 IU FSH + 50 IU LH); 2. dávka – 1,0 ml (50 IU FSH + 50 IU LH)

Doporučené dávkovací schéma při aplikaci 1000 IU, které budou podány v průběhu 5 dnů je:

- 1. den: 1. dávka – 3,0ml (150 IU FSH + 150 IU LH); 2. dávka – 3,0ml (150 IU FSH + 150 IU LH)
- 2. den: 1. dávka – 2,5 ml (125 IU FSH + 125 IU LH); 2. dávka – 2,5ml (125 IU FSH + 125 IU LH)
- 3. den: 1. dávka – 2,0 ml (100 IU FSH + 100 IU LH); 2. dávka – 2,0 ml (100 IU FSH + 100 IU LH)
- 4. den: 1. dávka – 1,5 ml (75 IU FSH + 75 IU LH); 2. dávka – 1,5 ml (75 IU FSH + 75 IU LH)
- 5. den: 1. dávka – 1,0 ml (50 IU FSH + 50 IU LH); 2. dávka – 1,0ml (50 IU FSH + 50 IU LH)

Tradiční protokoly, při kterých se aplikují intramuskulární injekce dvakrát denně, jsou časově náročné a dochází při nich k nežádoucímu stresování dárce. Proto byly vyvinuty zjednodušené superovulační protokoly (Mapletoft a Bó, 2015).

Byly provedeny studie, které zkoumaly účinek použití Folltropin®-V jako jediné subkutánní bolusové injekce na vyvolání superovulace u skotu. Tato injekce aplikovaná v dávce, která odpovídá 400 mg NIH-FSH-P1 vyvolává srovnatelnou superovulační odezvu, jako tradiční protokol, s aplikací dvakrát denně po 4 dny. Dobrých výsledků bylo dosaženo, pokud tato injekce byla aplikována za rameno (Mapletoft a kol., 2002). Tento způsob podání však dosáhl dobrých výsledků pouze u dárkyň s bodem tělesné kondice více než tři (na stupnici do pěti). Aby se superovulační odpověď zlepšila i u krav s nižším bodovým ohodnocením, byla tato jedna dávka rozdělena do dvou. První den léčby bylo subkutánně aplikováno 75% dávky FSH a zbývajících 25% bylo podáno o 48 hodin později (Mapletoft a Bó, 2015). V jedné studii u jalovic *Bos indicus* vyvolala jedna podkožní injekce Folltropin®-V podstatně větší superovulační odezvu než aplikace dvakrát denně v tradičním léčebném režimu. Tento rozdíl by mohl být způsoben výrazným snížením stresu u ošetřovaných zvířat (Mapletoft a kol., 2002).

Další alternativou pro vyvolání superovulace s jedinou injekcí FSH je kombinace extraktu hypofýzy s látkami, které způsobují postupné uvolňování hormonu v průběhu několika dní.

Tyto látky se označují jako polymery a jedná se o biologicky rozložitelné látky, které jsou nereaktivní ve tkáních, což usnadňuje jejich použití u zvířat (Baruselli a kol., 2011).

Byla provedena série pokusů, ve kterých FSH bylo zředěno 2 % roztokem hyaluronanu a bylo aplikováno ve formě jedné intramuskulární injekce. Tato aplikace vyvolala stejnou superovulační odezvu jako tradiční superovulační protokol. Protože se však 2 % hyaluronan obtížně míchal s FSH a nižší koncentrace byla méně účinná, došlo k vyvinutí nového protokolu. V tomto protokolu došlo k rozdělení jedné injekce na dvě dávky v rozestupu 48 hodin, FSH je rozředěno 10 ml 1 % nebo 0,5 % roztoku hyaluronanu. Dvě třetiny dávky FSH jsou podány první den a zbývající jedna třetina dávky se aplikuje o 48 hodin později. Použití tohoto protokolu vyvolává stejnou superovulační odpověď jako použití tradičních protokolů a navíc roztoky hyaluronanu se snadno míchají s FSH.

Inseminace se provádí za 12 až 24 hodin od začátku říje a většinou následuje reinseminace za dalších 12 hodin (Mapletoft a Bó, 2015).

11 Příprava příjemkyně

Jako příjemkyně jsou většinou používány jalovice, a to z důvodu lepšího zabřezávání. Pokud jsou jako příjemkyně zvoleny krávy, měly by být alespoň 45 dní po otelení. U krav je výhodou znát jejich reprodukční historii. Předpokladem pro úspěšné přijetí embrya je jejich dobrý zdravotní stav a tělesná kondice (Robertson, 2015). Příjemkyně embryí mohou být vybrány po přirozené říji nebo je možno vyvolat říji pomocí synchronizačních postupů. Synchronizaci je nutno zahájit tak, aby příjemkyně byla ve stejné fázi cyklu jako dárkyně při výplachu (Peters a Ball, 1995). Bez ohledu na použitou metodu synchronizace říje je důležitá správná a častá detekce říje. Pro synchronizaci příjemců se využívají stejné hormonální přípravky jako pro synchronizaci estrálních cyklů u dárců. Jedná se o prostaglandin, progesteron a melengestrolacetát, jejichž použití je popsáno výše. Příjemkyně synchronizované s PGF_{2α} jsou ošetřeny 12-24 hodin před dárkyněmi, protože k PGF_{2α} vyvolané říji dojde za 60-72 hodin, zatím co u superovulovaných dárcyň dojde k říji už za 36 až 48 hodin.

Techniky embryo transferu byly dále zdokonaleny, tak aby nepotřebovaly detekci říje. U dárkyně se k tomuto účelu používá synchronizace folikulární vlny. U příjemkyně je možno využít protokoly k načasování inseminace na bázi GnRH nebo estradiolu (Mapletoft, 2006). Jak již bylo uvedeno, používání estradiolu je v mnoha zemích zakázáno (Bó a kol., 2008).

Na bázi použití GnRH je založen protokol nazvaný "Ovsynch". Sedm dní po první injekce GnRH je aplikována injekce PGF_{2α}, po které za 48 hodin následuje injekce GnRH. Za 0-24 hodin je samice v říji. Ovsynch protokol dosahuje lepších výsledků u krav než u jalovic. To může být zapříčiněno tím, že až u 56 % jalovic nemusí GnRH vyvolat ovulaci dominantního folikulu. Jistého zlepšení výsledků lze dosáhnout po přidání CIDR k tomuto protokolu (Mapletoft, 2006).

12 Výplach embryí

Výplach se provádí za 6 – 7 dní poté, co dárkyně byla inseminována, protože v tento čas embrya nejlépe snáší manipulaci (Robertson, 2015). V tuto dobu už také sestoupila do dělohy a tak je možno je získat nechirurgickou metodou přes děložní čípek.

Dárkyně je fixována v kleci a má přední nohy o 30 až 35 cm výše než zadní (Peters a Ball, 1995). Tímto postavením se orgány posunou dozadu a děloha má tendenci zvednout se nahoru, což usnadňuje přístup pro manipulaci. Nejprve se vyšetří oba vaječníky a odhadne se počet žlutých tělísek (Robertson, 2015). Pokud je na vaječnicích pozorována pozitivní reakce na superovulaci aplikuje se krávkě epidurální anestezie (Peters a Ball, 1995), například 3-5 ml 2% Lidocainu. Někdy se ještě před epidurální anestézií aplikují sedativa (např. 0,1 ml Rompun (Xylazin)). Po té se omyje nebo otře perineální oblast a ocas se přiváže na stranu. Tímto je kráva připravena k výplachu (Robertson, 2015).

K nechirurgickému výplachu embryí potřebujeme katetr, mandrén, filtry na zachycení embryí a vyplachovací médium. Volba katétru je ovlivněna typem výplachu (rohy nebo tělo) a věkem krávy (Robertson, 2015). Katetry jsou vyráběny v různých délkách a velikostech (Hasler, 2014). V současné době se používají např. 52cm silikonové 16 nebo 18 French katetry s 5 ml balónem, vhodné pro všechny výplachy (Bioniche). 5 ml balónek se v případě potřeby nafoukne až do objemu 20 – 30 ml (Robertson, 2015). K průchodu děložním hrdlem se používá kovový mandrén, který se vkládá do katétru (Hasler, 2014). Průchod katétru je podobný jako u umělé inseminace, s výjimkou, že katetr je podstatně větší. Během zavádění katétru je třeba být opatrný a vyhnout se zranění dělohy. Pro průchod zakřiveným děložním hrdlem lze použít cervikální dilatátor (Robertson, 2015).

Pokud je katetr zaveden a upevněn balónkem, může se přejít k výplachu médiem. V současné době existuje řada firem, které vyrábějí médium určené k vyplachování, uchovávání a kryokonzervaci embryí skotu (Hasler, 2014). Např. médium z Bioniche nazývané Vigro

Complete Flush™, které obsahuje povrchově aktivní látky (polyvinyl alkohol) a antibiotika (gentamicin a kanamycin). Všechna používaná zařízení musí být sterilní (Robertson 2015).

12.1 Výplach těla

Usazení katetrizačního balonku je nejdůležitější součástí úspěšného výplachu. Při výplachu těla se balónek nafoukne tak, aby zabránil úniku média přes děložní čípek. Aby došlo k správnému vypláchnutí je důležité správné nafouknutí balonku. Přefouknutý nebo podhuštěný balónek může způsobit potíže. Když se balónek nafoukne a správně umístí, mandrén se vyjme (Robertson 2015).

Jakmile je katétr správně usazen, může být proplachovací médium podáváno gravitačně, injekční stříkačkou, nebo čerpadlem (Hasler, 2014). Robertson (2015) doporučuje použít celkem 400 ml proplachovacího média k výplachu obou rohů najednou. Pět proplachů je prováděno s těmito částkami: První a druhá infuze - každá 50 ml (25 ml do každého rohu), třetí infuze - 100 ml (50 ml do každého rohu), čtvrtá infuze - 150 ml (75 ml do každého rohu) a pátá infuze - 50 ml (25 ml do každého rohu). Po každé infuzi se celá děloha masíruje a pak se odstraní proplachovací médium. Přibližně polovina média vytéká pomocí gravitace, zatímco druhá polovina se musí vytlačit pomocí prstů.

12.2 Výplach rohů

Klíčem k úspěšnému výplachu rohů je mít perfektně sedících katetr. Přehuštěný balónek způsobuje trhání endometria. Pokud bude balónek podhuštěn, dojde k posunutí katetru až k děložnímu čípku. K výplachu rohů je vhodnější zploštělý a protáhlý balónek.

Správné umístění manžety je dole v rohu. Rohy se obvykle proplachují pětkrát až šestkrát do špičky každého rohu. Množství média je takové, aby bylo dosaženo mírné expanze rohu (15 – 50 ml v závislosti na velikosti rohu). V průběhu každé infuze se provádí masáž špičky rohu. Většina média odtéká samospádem. Po dokončení prvního rohu se katétr vyjme, vloží se mandrén a katétr se zavede do druhého rohu.

Po výplachu se krávkě podávají prostaglandiny, aby nedošlo k nechtěné březosti. Alternativou je podávat prostaglandiny intramuskulárně dvakrát denně po dobu tří dnů (Robertson 2015).

13 Izolace embryí

Vyplachovací médium může být po výplachu zachytáváno dvěma způsoby. Jedním z nich je zachytávání embryí do sterilních filtrů pro odběr embryí (např. EZ Way filter, SPI™, PETS, Canton, TX, USA), přičemž výplachové médium odtéká (Stringfellow a Givens, 2010). Další možnost je, že se embrya i výplachové médium zachytí do litrového, plastového, autoklávovatelného odměrného válce, nebo Erlenmeyerovy baňky (Hasler, 2014).

Na filtrech se vyhledají embrya pomocí stereomikroskopu a umístí se do Petriho misky s uchovávajícím médiem (např. Vigro™ Holding Plus, Bioniche Animal Health Europe Ltd., Dublin, Irsko) (Stringfellow a Givens, 2010).

Při použití válce nebo baňky se médium nechá usadit po dobu přibližně 45 minut (Hasler, 2014). Během této doby embrya klesnou na dno a většina média se odčerpá, až zbyde jen 10 až 20 milimetrů. Nyní se i s malým množstvím embrya přesunou do Petriho misek (Peters a Ball, 1995). Po izolaci embryí následuje jejich hodnocení (Stringfellow a Givens, 2010).

14 Hodnocení embryí

Hodnocená embryí před zmrazením nebo před přenesením do příjemkyně je jedním z nejdůležitějších faktorů spojených s úspěchem a rozšířením používání embryu transferu. Vyhodnocení embryí skotu se obvykle provádí pod stereomikroskopem při 50 až 100x zvětšení. Embrya jsou umístěna v malé sběrné misce, přičemž je nutné, aby embrya a zonu pelucidu bylo možno prohlédnout z různých stran. Průměr embrya u skotu je 150 až 190 μm a od jednobuněčné fáze do fáze blastocysty se prakticky nemění (Bó a Mapletoft, 2013).

Embrya by svým vývojem měla odpovídat fázi, která by měla být přítomna v den odběru. Například sedmý den (nejčastější den vyplachování) po inseminaci by to mělo být stádium kompaktních morul nebo blatocyst (Říha, 1996). Ideální embryo je kompaktní a kulaté se zrnitou nebo vezikulární cytoplazmou. Prerivitellinní prostor je jasný a neobsahuje zbytky buněk, zona pellucida by měla být jednotná a bez nečistot. Kvalita embryí se posuzuje na základě morfologické integrity (Bó a Mapletoft, 2013).

Podle IETS Manuálu se embrya třídí bodovým systémem, kdy pro fázi vývoje je stupnice 1 – 9 a pro kvalitu 1 – 4. Zařazení do stupnice není vždy stejné, protože závisí na zkušenostech hodnotitele.

14.1 Fáze vývoje

- 1. Etapa - neoplozené embryo
- 3. Etapa - morula: Obsahuje nejméně 16 buněk, jednotlivé blastomery jsou obtížně rozeznat od sebe a buněčná hmota embrya zabírá většinu perivitellinního prostoru.
- 4. Etapa - kompaktní morula: Jednotlivé blastomery již splynuly, tvoří kompaktní hmotu, která zabírá 60 – 70 % z perivitellinního prostoru.
- 5. Etapa - raná blastocysta: Embryo má vytvořena dutinu nebo blastocel naplněný kapalinou, zabírá 70 až 80 % z perivitellinního prostoru a obvykle vypadá jako pečeti prsten.
- 6. Etapa - blastocysta: Je viditelná výrazná diference vnější vrstvy trofoblastu a tmavší, kompaktnější vnitřní buněčná hmota. Blastocel je velmi výrazný, s embryem zabírá většinu perivitellinního prostoru, v této fázi je možná vizuální diference mezi trofoblastem a vnitřní buněčnou hmotou.
- 7. Etapa - rozšířená blastocysta: Celkový průměr embrya se výrazně zvyšuje a asi o dvě třetiny se ztenčuje zona pellucida.
- 8. Etapa - vylíhlá blastocysta: Embrya získaná v této vývojové fázi mohou být v procesu líhnutí, nebo může mít zcela odvrženou zonu pellucidu. Vylíhlá blastocysta může být kulovitá s dobře definovaným blastocelem nebo může být zhroucená.

Nejvíce životaschopná jsou embrya v etapě 4, 5 a 6. Tato embrya jsou vhodná i k zmrazování a rozmrazování.

14.2 Kvalita

- Kód 1 - výborný nebo dobrý: Embrya v této kvalitě jsou symetrická a mají kulovitou hmotu s jednotlivými blastomery, jejichž velikost, barva i hustota je stejná. Embryo je v odpovídajícím stupni vývoje s malými nepravidelnostmi. Minimálně 85% buněčného materiálu by mělo být intaktní, životaschopná zárodečná hmota a zona pellucida by měla mít hladký povrch. Tyto embrya jsou vhodná pro zmrazování a mezinárodní obchod.
- Kód 2 – uspokojivá: Tato embrya mají mírné nesrovnalosti v celkovém tvaru embryonální tkáně, nebo ve velikosti, barvě a hustotě jednotlivých buněk. Alespoň 50% z embryonální tkáně, by mělo být neporušené. Tato embrya nejsou vhodná pro zmrazování, ale lze je úspěšně přenášet jako čerstvá.

- Kód 3 – špatná: Tato embrya mají zásadní nesrovnalosti ve tvaru embryonální tkáně, nebo ve velikosti, barvě a hustotě jednotlivých buněk. Nejméně 25% z hmoty embryí musí být neporušená. Tato embrya zmrazení nepřežijí a i jejich přenesení jako čerstvých není příliš úspěšné.
- Kód 4 - mrtvá nebo degenerovaná: To jsou embrya, oocyty nebo jednobuněčná embrya, která nejsou životaschopná a musí být zničena. (Stringefellow a Givens, 2010).

Po hodnocení jsou embrya nasáta do pejety o objemu 0,25 ml a dále se přenášejí nebo kryokonzervují (Stringefellow a Givens, 2010).

15 Přenos embryí

Ideální příjemkyně se vyznačuje tím, že její reprodukční orgány se nacházejí ve fázi, která odpovídá 7 dnům po říji. Je však možné použít i samice, které jsou po říji v rozmezí 5. až 8. dne. Větší rozdíly v synchronizaci lépe snáší čerstvá embrya, než ta rozmrazená (Robertson, 2015).

Před přenosem je příjemkyně fixována (hlavová fixace) a provede se vyšetření vaječníků na přítomnost žlutého tělíska. Pokud je žluté tělísko dobré a děloha je přijatelná na pohmat, aplikuje se příjemkyni epidurální anestezie ve formě injekce s 3 – 5 ml 2 % Lidocainu. Přenos se provádí pomocí IMV 52 cm embryo transfer zbraně s modrým pláštěm (Robertson, 2015), balónkovým katetrem nebo jinou embryo transfer zbraní (Kimura a Matsuyama, 2014). Nechirurgické přenos embryí se provádí přes děložní čípek. Embrya by měla být uložena do děložního rohu, na stejnou stranu jako je žluté tělísko (Peters a Ball, 1995), tak hluboko, jak je to možné, aniž by bylo způsobeno trauma. Poranění děložní stěny ztěžuje uchycení embrya (Robertson, 2015).

Přenos zmrazených embryí je stejný jako u čerstvých, s tím rozdílem, že embrya po rozmrazení musí být okamžitě přenesena, zatímco čerstvá embrya mohou být přenesena až za 6-8 hodin. Rozmrazování lze provádět pomocí vody, vzduchu nebo jejich kombinací (Robertson, 2015) a rychlost rozmrazení, by se měla rovnat rychlosti zmrazení (Peters a Ball, 1995).

16 Uchování embryí

Embrya lze uchovávat jako čerstvá nebo pomocí kryokonzervace. Čerstvá embrya mohou být uchována po dobu pouze několika hodin. Uchovávají se uložená v čerstvém, sterilním roztoku v kultivačním médiu, které má tělesnou teplotu. (Peters a Ball, 1995)

16.1 Kryokonzervace

Kryokonzervace embryí umožňuje celosvětovou přepravu embryí, uchování genofundu matky, zvýšený selekční tlak plemenné genetiky, regeneraci chovné linie a záchranu genetických rezerv (Dobrinskya, 2002).

V současnosti se až 70% vypláchnutých embryí zmrazuje. Embrya vybraná pro zmrazení jsou ta nejkvalitnější v rozmezí od 4. do 7. etapy. Embrya zmrazená v jednotlivých stupních vývoje mají různou úspěšnost přenosu: 4. stupeň (53,7%), 5. (55,3%), 6. (52,1%) a 7. stupeň (43,8%).

Po více než 10 let, byl glycerol oblíbeným kryoprotektantem u embryí skotu. Protokoly se velmi zkrátily a zjednodušili. 0,25 ml pejetý s embryi byly vystaveny 10 % glycerolu po dobu asi 10 minut a dány do programovatelného mrazáku do - 6,0°C. Po ustálení byla snížena teplota o 0,4°C až 0,6°C za minutu do - 32°C a následně byly pejetý ponořeny do tekutého dusíku. Nevýhodou tohoto systému je, že po rozmrazení musely být embrya vyjmuta z pejetý a rehydratována sacharózou a pak nabrána do pejetý pro přenos do příjemkyně. V roce 1992 byl objeven přímý přenos (DT) kryokonzervačního systému, kde se jako kryoprotektant používá ethylenglykol. Tento způsob je velmi podobný glycerolovému, ale pejetý použité k zmrazení se používají i k přenosu, což šetří čas a potřebu mikroskopu (Hasler, 2014). Dnes je systém postupného ochlazování až na teplotu kapalného dusíku řízený počítačem (Peters a Ball, 1995).

Vitrifikace je alternativou k zmrazování embryí. Vitrifikace je fyzikální proces, při kterém je roztok převeden na stabilní amorfní sklo rychlým ochlazením, netvoří se při ní ledové krystaly, a roztok si zachová vlastnosti kapaliny ve zpevněné formě. Aplikace vitrifikace do polních podmínek snižuje nároky na vybavení, technické dovednosti, čas a snižuje náklady na přenos embryí. Úspěšnost přenosu embryí při pokusu byla 44,5% u vitrifikace a 45,1% u konvenčně mražených embryí. Byla vytvořena modifikace vitrifikace s názvem open pulled straw (OPS). Při této metodě se využívá pejeta se zmenšeným průměrem a tím se zvýší rychlost chlazení při vitrifikaci (Dobrinskya, 2002).

17 Závěr

Embryo transfer můžeme využít pro různá plemena, ale i druhy skotu jako je *Bos taurus* a *Bos indicus*. Pro úspěch embryotransferu je však třeba respektovat jejich mírné reprodukční rozdíly.

Příprava dárkyně je prováděna v několika krocích. Prvním krokem je synchronizace estrálních cyklů, kterou provádíme dvěma způsoby. Zkracování luteální fáze se provádí aplikací PGF_{2α} a jeho analogů, k prodloužení luteální fáze provádíme aplikaci progestinů (MGA, nebo syntetického progesteronu).

Dalším krokem je synchronizace vzniku folikulární vlny, která se provádí hormonálně nebo mechanicky ablací. Při ablací dojde k odstranění dvou největších folikulů nebo všech folikulů větších než 5 mm. Následně dojde ke vzniku nové folikulární vlny za 24 až 36 hodin, v tuto dobu je zahájena superovulace.

Superovulace je vyvolána podáním gonadotropinů, mezi které patří hypofyzární extrakty, eCG a hMG. Všechny tyto gonadotropiny obsahují různý poměr FSH/LH, přičemž byl zjištěn ideální poměr pro vyvolání superovulace, který je 5:1. Nejpoužívanější jsou prasečí hypofyzární extrakty, které se ve formě různých komerčních výrobků aplikují různými způsoby. Tradiční způsob je aplikace dvakrát denně po dobu 4 – 5 dnů, kdy celková dávka a její rozložení závisí na volbě konkrétního protokolu. Nyní jsou zkoušeny nové protokoly, ve kterých je FSH aplikováno jednorázově subkutánně nebo intramuskulárně v závislosti na zvoleném protokolu a přípravku. Další alternativou je rozložení této jedné dávky do dvou, kdy v první dávce je podáno 75 % přípravku a v druhé o 48 hodin později zbývajících 25 %. Aplikace může být opět subkutánní nebo intramuskulární. Inseminace se provádí za 12 – 24 hodin po nástupu říje s následnou reinseminací o 12 hodin později.

Příprava příjemkyně zahrnuje pouze synchronizaci estrálního cyklu s dárkyní, kterou provádíme buď stejnými hormonálními přípravky jako u dárkyně, nebo můžeme využít protokoly, které nevyžadují detekci říje, jako Ovsynch, který byl vyvinut pro pevné načasování inseminace. Nyní je s úspěchem využíván i pro synchronizaci estrálních cyklů příjemkyň s dárkyněmi.

Výplach embryí provádíme 6 – 7 dní po inseminaci dárkyně za pomoci katetru, výplachového média a filtrů k zachycení embryí. Bezprostředně po výplachu následuje izolace embryí, na kterou navazuje jejich hodnocení, po kterém jsou embrya pomocí přenosové zbraně přenesena do příjemkyně, nebo jsou kryokonzervována.

18 Seznam použité literatury

Hafez, E. S. E., Jainudeen M. R., Rosnina, I. 2000. Hormones, Growth Factors, and Reproduction. In: Hafez, B., Hafez, E. S. E. (eds.). Reproduction in Farm animals. 7th edition. Lippincott Williams Wilkins. Meryland. p. 33-54. ISBN: 0683305778.

Říha, J., Petelíková, J., Čerovský, J., Bažant, J., Bochenek, M., Pytloun, J. 2003. Plemenitba hospodářských zvířat. Rapotín. 151 s. ISBN: 80-903143-4-1.

Říha, J., Jakubec, V., Jílek, F., Illek, J., Kvapilík, J., Hanuš, O., Čermák, V. 2004. Reprodukce v procesu šlechtění skotu. Rapotín. 144 s. ISBN: 809031435-X.

Marvan. F., Hampl. A., Hložánková. E., Kresan. J., Massanyi. L., Vernerová. E., Jelínek. K. 1992. Morfologie hospodářských zvířat. Brázda. Praha. 328 s. ISBN: 80-20902260.

Kudláč, E., Elečko, J. (eds.). 1987. Veterinární porodnictví a gynekologie. Státní zemědělské nakladatelství. Praha. 576 s. ISBN: 07-053-87.

Kliment. J., Hintnaus. J., Novák. J., Rob. O., Šťastný. P. 1983. Reprodukcia hospodárskych zvierat. Príroda. Bratislava. 378 s.

Grolig. A., Kopecký. J., Šatava. M. 1963. Zootechnický slovník. SZN. Praha. 712 s. ISBN: 0709463

Jelínek. P., Koudelka. K., Doskočil. J., Illek. J., Kotrbáček. V., Kovářů. F., Kroupová. V., Kučera. M., Kudláč. E., Trávníček. J., Valent. M. 2003. Fyziologie hospodářských zvířat. Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně. Brno. 414 s. ISBN: 8071576441.

Frandsen. R. D., Wilke. W. L., Fails. A. D. 2009. Anatomy and physiology of farm animals. Blackwell Publishing. Iowa. p. 512. ISBN: 9780813813943.

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

Hafez, E. S. E., Hafez. B. 2000b. Reproductive Cycles. In: Hafez, B., Hafez, E. S. E. (eds.). Reproduction in Farm animals. 7th edition. Lippincott Williams Wilkins. Meryland. p. 55-67. ISBN: 0683305778.

Hafez, E. S. E., Hafez. B. 2000a. Folliculogenesis, Egg Maturation, and Ovulation. In: Hafez, B., Hafez, E. S. E. (eds.). Reproduction in Farm animals. 7th edition. Lippincott Williams Wilkins. Meryland. p. 68-81. ISBN: 0683305778.

Ball, P. J. H., Peters, A. R. 2004. In: Králová, K., Šichtař, J. 2014. Současné trendy v synchronizaci ovariální dynamiky u krav. Veterinářství. 64 (8). s. 620 – 624.

Mapletoft, R. J., Bennett Steward, K., Adams, G. P. 2002. Recent advances in the superovulation in cattle. *Reprod. Nutr. Dev.* 42 (6). 601 – 611.

Betteridge, K. J. 2003. A history of farm animal embryo transfer and some associated techniques. *Animal Reproduction Science.* 79. 203 -244.

Hasler, J. F. 2014. Forty years of embryo transfer in cattle: A review focusing on the journal *Theriogenology*, the growth of the industry in North America, and personal reminiscences. *Theriogenology.* 81. 152-169.

Patterson, D. J., Smith, M. F. In: Králová, K., Šichtař, J. 2014. Současné trendy v synchronizaci ovariální dynamiky u krav. *Veterinářství.* 64 (8). s. 620 – 624.

Braw-Tal R., Yossefi S. 1997. Studies in vivo and in vitro on the initiation of follicle growth in the bovine ovary. *Journal of Reproduction and Fertility.* 109. 165-171.

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

Lucy M.C. 2007. The bovine dominant ovarian follicle. *Journal of Animal Science.* 85. E89–E99.

Burns D. S., Jimenez-Krassel F., Ireland J. L. H., Knight P. G., Ireland J. J. 2005. Numbers of antral follicles during follicular waves in cattle: evidence for high variation among animals, very high repeatability in individuals, and an inverse association with serum follicle-stimulating hormone concentrations. *Biology of Reproduction*. 73. 54–62.

Králová, K., Šichtař, J. 2014. Současné trendy v synchronizaci ovariální dynamiky u krav. *Veterinářství*. 64 (8). s. 620 – 624.

Robertson, E. G. 2015. Embryo Collection and Transfer. In: Hopper R. M. (eds.). *Bovine reproduction*. Wiley Blackwell. s. 696 – 702. ISBN:9781118470831

Mapletoft, R. J., Bó G. A. 2015. Superovulation in Cattle. In: Hopper R. M. (eds.). *Bovine reproduction*. Wiley Blackwell. s. 696 – 702. ISBN:9781118470831.

Bó, G. A., Mapletoft, R. J. 2013. Evaluation and classification of bovine embryos. *Anim. Reprod.* 10 (3). s. 344 – 348.

Říha, J. 1996. Reprodukce ve stádě skotu. Výzkumný ústav pro chov skotu. Rapotín. s. 125. ISBN: 000026312.

Kimura, K., Matsuyama, S. 2014. Successful Nonsurgical Transfer of Bovine Elongation Conceptuses and Its Application to Sexing. *Journal of reproduction and development*. 60 (3). s. 210 – 215.

Dobrinskya, J. R. 2002. Advancements in cryopreservation of domestic animal embryos. *Theriogenology*. 57. s. 285 – 302.

Bo', G. A., Guerrero, D.C., Adams G. P. 2008. Alternative approaches to setting up donor cows for superstimulation. *Theriogenology*. 69. s. 81 – 87.

Baruselli, P. S., Ferreira, R. M., Sales, J. N. S., Gimenes, L. U., Sá Filho, M. F., Martins, C. M., Rodrigues, C. A., Bó, G. A. 2011. Timed embryo transfer programs for management of donor and recipient cattle. *Theriogenology*. 76. s. 1583–1593.

Islam, R. 2011. Synchronization of Estrus in Cattle: A Review. *Vet World*. 4 (3). s. 136 – 141.

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

Murphy, B., Martinuk, S. 1991. Equine chorionic gonadotropin. *Endocrine Rev.* 12. s. 27 – 44.

Bergfelt, D. R., Bó, G. A., Mapletoft, R. J., Adams, G. P. 1997. Superovulatory response following ablation-induced follicular wave emergence at random stages of the oestrous cycle in cattle. *Animal Reproduction Science*. 49. s. 1 – 12.

Mapletoft, R. J. Bovine embryo transfer. In: *IVIS Reviews in Veterinary Medicine, I.V.I.S.* (Ed.). International Veterinary Information Service, Ithaca NY (www.ivis.org), Last updated: 17-Nov-2006; R0104.1106.

Murugavel, K., Yániz, J. L., Santolaria, P., López-Béjar, M., López-Gatius, F. 2003. In: Králová, K., Šichtař, J. 2014. Současné trendy v synchronizaci ovariální dynamiky u krav. *Veterinářství*. 64 (8). s. 620 – 624.

Wood, S. L., Lucy, M. C., Smith, M. F., Patterson, D. J. 2001. In: Králová, K., Šichtař, J. 2014. Současné trendy v synchronizaci ovariální dynamiky u krav. *Veterinářství*. 64 (8). s. 620 – 624.

Stringfellow, D. A., Givens, M. D. 2010. In: Bó, G. A., Mapletoft, R. J. 2013. Evaluation and classification of bovine embryos. *Anim. Reprod.* 10 (3). s. 344 – 348.

18.1 Ostatní zdroje

Stimufol®(Stimufol®, ReprobioL SPRL, Lorcé, Stoumont, Belgie)

Pluset®(Pluset®, LaboratoriesCalier, S.A., Barcelona, Španělsko)