

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra chovu hospodářských zvířat**



**Fakulta agrobiologie,  
potravinových a přírodních zdrojů**

**Výsledky metody ovum pick-up ve vztahu k energetické  
bilanci dojnic**

**Diplomová práce**

**Adéla Krylová**

**Chov hospodářských zvířat**

**Doc. Ing. Luděk Stádník, Ph.D**

**© 2024 ČZU v Praze**

## **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Výsledky metody ovum pick-up ve vztahu k energetické bilanci dojnic" jsem vypracoval(a) samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 16.4.2024

---

## **Poděkování**

Rád(a) bych touto cestou poděkoval(a) panu Doc. Ing. Luďku Stádníkovi, PhDr. za trpělivost a pomoc při psaní diplomové práce.

# Výsledky metody ovum pick-up ve vztahu k energetické bilanci dojnic

## Souhrn

Diplomová práce se věnuje výsledkům metody ovum pick-up (OPU) ve vztahu k energetické bilanci dojnic. V první části práce porovnává výsledky jiných zahraničních studií týkající se této problematiky. Popisuje fyziologii samičí pohlavní soustavy a poté uvádí do problematiky negativní energetické bilance po otelení a jejím následném vlivu na schopnost tvořit folikuly. Práce dále popisuje vliv krmné dávky na plodnost, úspěšnost OPU a uvádí příklady jejího zvýšení jako např. stimulace folikulostimulačním hormonem, počty a frekvence odběrů, či výběr nejvhodnější kategorie dojnic. Následně se práce zabývá celosvětovým problémem tepelného stresu a jeho negativním vlivem na plodnost.

Dojivost, reprodukční schopnost, dobrý zdravotní stav a nenáchylnost na mastitidy jsou základní kameny kvalitního chovu dojného skotu. Existují však různé biotechnologické metody, které zlepšují míru zabřezávání. V České republice metoda ovum pick up (aspirace oocytů) není příliš využívána.

Do měření této studie bylo vybráno 65 dojnic holštýnského skotu na první laktaci, z nich se odebralo 59 dojnic. Výsledky byly vyhodnoceny metodou ANOVA. Výsledky odkazují na trend, kdy při vyšší produkční užitkovosti klesá reprodukční užitkovost. To je způsobené vysokými energetickými nároky na produkci mléka. Dojnice se tak dostávají do negativní energetické bilance. Dojnicím s denními nádoji do 25,43 kg bylo odebráno 11,48 folikulů, kdežto u dojnic s denním nádojem od 25,43 kg do 29,81 kg byl celkový počet odebraných folikulů nižší (9,03 folikulů na OPU). S nádoji nad 29,81 kg bylo odebráno 9,93 folikulů. Experiment vyhodnocuje efekt denního nádoje a průměrného poměru tuku a bílkovin v mléce do 1. výplachu.

Naměřené hodnoty (počet žlutých tělísek, celkový počet folikulů, počet folikulů nad 0,5 cm a výtěžnost) slabě negativně korelují s denními nádoji, ale výsledky nebyly průkazné. Kromě folikulů o průměru do 0,5 cm slabě pozitivně korelovaly, ale opět výsledky nebyly průkazné. Ovšem byl pozorován trend při zvyšující se denní užitkovosti klesá výtěžnost a počet odebraných folikulů, což bylo potvrzeno i v porovnání poměru tuku a bílkovin. Rozdíl

byl u aspirovaných folikulů o průměru do 0,5 cm, kdy tyto folikuly produkovaly dojnice s poměrem tuku a bílkovin nad 1,51 v porovnání s dojnicemi s nižším poměrem.

Se stále se zvyšující užítkovostí je nutné se zaměřit i na zlepšení reprodukce. Biotechnologické metody umožňují lépe využít reprodukční potenciál dojnic a následně také zvýšit výtěžnost nadprůměrných zvířat.

**Klíčová slova:** říje, oocyt, dojnice, vaječníky, laktace

# The results of the ovum pick-up method in dairy cows in relation to their energy balance

## Summary

This thesis compares the results of the ovum pick-up (OPU) in relationship to the energy balance in dairy cows. In the first part it compares the results of other foreign studies. It described the effects of physiology of the female reproductive system and then introduces the issue of negative energy balance after calving and its effect on the ability to produce follicles. The thesis then describes the effect of the ration on fertility, success OPU and gives examples of increased reproduction, such as stimulation with follicle-stimulating hormone, frequency of samples or the selection of the most suitable category of dairy cows. The thesis deals with the global problem of heat stress and its negative effect on fertility.

Milk yield, reproduction, good health and resistance to mastitis are the cornerstones of quality dairy cattle breeding. However, there are biotechnological methods that improve conception rates. In the Czech Republic, the ovum pick-up method (aspiration of oocytes) is not used widely.

65 Holstein dairy cows on their first lactation were selected for the measurement of this study. 59 of them were aspirated. The results were evaluated by the ANOVA method. The results show a trend of decreased reproduction with higher production efficiency. This is due to the high energy requirements for milk production. Thus, dairy cows reach a negative energy balance. 11,48 follicles were collected from dairy cows with a daily milk yield up to 25,43 kg. While fewer follicles (9,03 per OPU) were collected from dairy cows with a daily milk yield of 25,43-29,81 kg. 9,93 follicles were collected from dairy cows with a milk yield over 29,81 kg. The experiment evaluates the effects of the daily milk yield and the average of fat and protein in milk on the first OPU.

The measured values (number of corpora lutea, total number of follicles, number of follicles over 0,5 cm and yield) were weakly negatively correlated with daily lactations, but the results were not conclusive. Except for follicles with a diameter up to 0,5 cm, they were

weakly positively correlated but the results were not conclusive, too. However, a trend was observed as the yield and number of oocytes collected decreased with increasing daily production. Which was also confirmed in the comparison of the ratio of fat and protein. The difference was for aspirated follicles up to 0,5 cm. These follicles produced dairy cows with a fat and protein ratio above 1,51 compared with cows with lower ratio.

With increase milk yield it is important to focus on improving the reproduction. Biotechnological methods make it possible to utilize reproductive potential of dairy cows, as well as higher than average animals.

**Keywords:** period, oocyte, dairy cow, ovaries, lactation

# Obsah

<b>1 Úvod.....</b>	<b>10</b>
<b>2 Vědecká hypotéza a cíle práce.....</b>	<b>11</b>
<b>3 Literární rešerše.....</b>	<b>12</b>
<b>3.1 Charakteristika plemene .....</b>	<b>12</b>
<b>3.2 Fyziologie pohlavní soustavy.....</b>	<b>14</b>
3.2.1 Vnější orgány .....	14
3.2.2 Pochva.....	14
3.2.3 Děloha.....	14
3.2.4 Vejcovody .....	14
3.2.5 Vaječníky.....	15
3.2.6 Proestrus.....	15
3.2.7 Estrus .....	15
3.2.8 Metestrus.....	16
3.2.9 Diestrus .....	16
<b>3.3 Vývoj folikulu na vaječníku.....</b>	<b>16</b>
<b>3.4 Negativní energetická bilance .....</b>	<b>17</b>
3.4.1 Mastné kyseliny .....	19
3.4.2 Krmná dávka .....	20
<b>3.5 Metody.....</b>	<b>21</b>
3.5.1 ICSI .....	21
3.5.2 OPU-IVF.....	21
3.5.3 ET .....	22
3.5.4 LOPU .....	22
3.5.5 IVEP .....	22
<b>3.6 Průběh OPU .....</b>	<b>23</b>
<b>3.7 Tepelný stres .....</b>	<b>24</b>
<b>3.8 Úspěšnost.....</b>	<b>26</b>
3.8.1 Den aspirace oocytů .....	28
3.8.2 Vliv plemene .....	29
3.8.3 Zlepšení kvality oocytů .....	29
3.8.3.1 Stimulace FSH .....	30
3.8.4 Kvalita oocytů v závislosti na kategorii krav .....	31
3.8.5 Kvalita oocytů v závislosti na tepelném stresu.....	33
<b>4 Metodika.....</b>	<b>35</b>
<b>4.1 Charakteristika ŠZP Lány .....</b>	<b>36</b>



<b>4.2</b>	<b>Sběr dat .....</b>	<b>36</b>
<b>4.3</b>	<b>Statistické vyhodnocení.....</b>	<b>36</b>
4.3.1	Základní statistiky .....	38
<b>5</b>	<b>Výsledky .....</b>	<b>40</b>
<b>5.1</b>	<b>Vliv průměrného poměru tuku a proteinu v mléce na hodnocené parametry</b>	<b>40</b>
<b>5.2</b>	<b>Vliv průměrného nádoje na hodnocené parametry .....</b>	<b>41</b>
<b>5.3</b>	<b>Korelace .....</b>	<b>42</b>
<b>6</b>	<b>Diskuze .....</b>	<b>45</b>
<b>7</b>	<b>Závěr .....</b>	<b>49</b>
<b>8</b>	<b>Literatura.....</b>	<b>50</b>

# 1 Úvod

Chov dojeného skotu má v České republice dlouholetou tradici. V 70. a 80. letech byly malé chovy skotu rozesety po celé České republice. V posledních letech dojný skot zaznamenal velký progres. Rapidně se zvýšila užitkovost a optimalizovaly se podmínky chovu, kdy je kladen důraz na welfare zvířat. Kravíny jsou vzdušné a otevřené, dojnice jsou ustájeny na volno a proti tepelnému stresu jsou v objektech větráky.

Ovšem při vyšší užitkovosti se snižuje reprodukční schopnost, jelikož jsou po otelení kladené vysoké energetické nároky na produkci mléka. Dojnice se tak dostávají do negativní energetické bilance (Matoba et al. 2011). Následkem toho ztrácejí na váze a hůře zabřezávají, čímž se prodlužuje laktace a mezidobí. Rentabilita začíná klesat vlivem vyššího inseminačního indexu, zhoršené kvality mléka ke konci laktace, díky zvýšenému počtu somatických buněk.

Biotechnologické metody zlepšují reprodukci, a tak se v posledních letech uvádějí do praxe po celém světě. Metoda ovum pick-up aspiruje oocyty z vaječníku dárkyně (Oikawa et al. 2016). Tato metoda zvyšuje výtěžnost reprodukce, jelikož z jedné dojnice jsme schopni aspirovat více oocytů a tím snížit generační interval vysokoprodukčních dojnic.

Práce vyhodnocuje výsledky metody ovum pick-up ve vztahu k negativní energetické bilanci dojnic po otelení a porovnává je se zahraničními studii.

## **2 Vědecká hypotéza a cíle práce**

Cílem diplomové práce bylo vyhodnotit výsledky metody OVUM PICK-UP. Od předem vybraných dojnic na první laktaci byly odebrány oocyty, na základě kterých se porovnávalo množství a jejich kvalita. Práce porovnávala výsledky aspirace oocytů ku průběhu energetické bilance dojnic po otelení a vyhodnotila hypotézu, ve které předpokládáme, že při negativní energetické bilance po otelení, bude počet odebraných oocytů nižší. Energetická bilance je po otelení záporná, tudíž práce porovnávala výtěžnost OPU při rozdílné užítkovosti.

## 3 Literární rešerše

### 3.1 Charakteristika plemene



Obrázek 1 upraveno podle Svaz chovatelů holštýnského skotu ČR, z.s. 2024. O plemeni. Svaz chovatelů holštýnského skotu ČR, z.s. Available from <https://www.holstein.cz/cz/o-plemeni> (accessed January 2024)

Holštýnský skot je jedno z nejrozšířenějších plemen na světě. Jedná se o plemeno s vysokou mléčnou užitkovostí. Pochází z Německa (oblast: Fríska, Šlesvicko-Holštýnska). Chová se po celém světě, ale zejména v Severní Americe, Evropě a Austrálii. Typické zbarvení je černo-bílé a v malém procentu recesivně homozygotní červeno-bílé zbarvení tzv. red holštýn. Mají velký tělesný rámec. V České republice je v současné době nejvíce zastoupeným plemenem dojného skotu. V kontrolním roce 2021/2022 činil podíl 60,8 % z celkového stavu dojených krav. V kontrole užitkovosti (KU) bylo evidováno celkem 209 046 krav holštýnského skotu včetně kříženek z převodného křížení. Z toho bylo čistokrevných černostrakatých holštýnských krav 179 301 a 5 891 červených holštýnských.

**Výška dospělých krav v kříži:** 151 – 155 cm

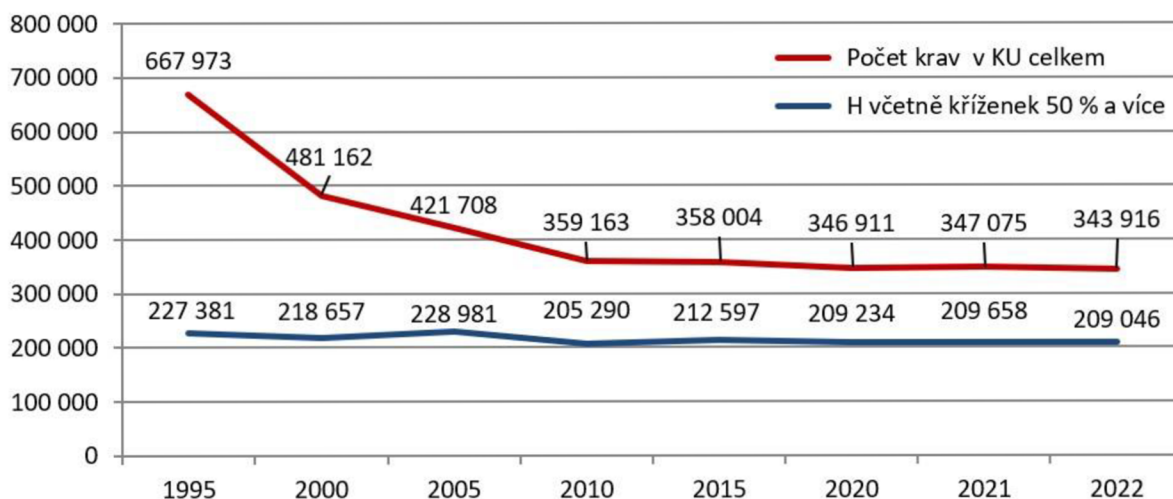
**Hmotnost dospělých krav:** 680 – 720 kg

**Věk při prvním otelení:** 23 – 27 měsíců

**Mezidobí:** 394 dní (KU 2021/2022)

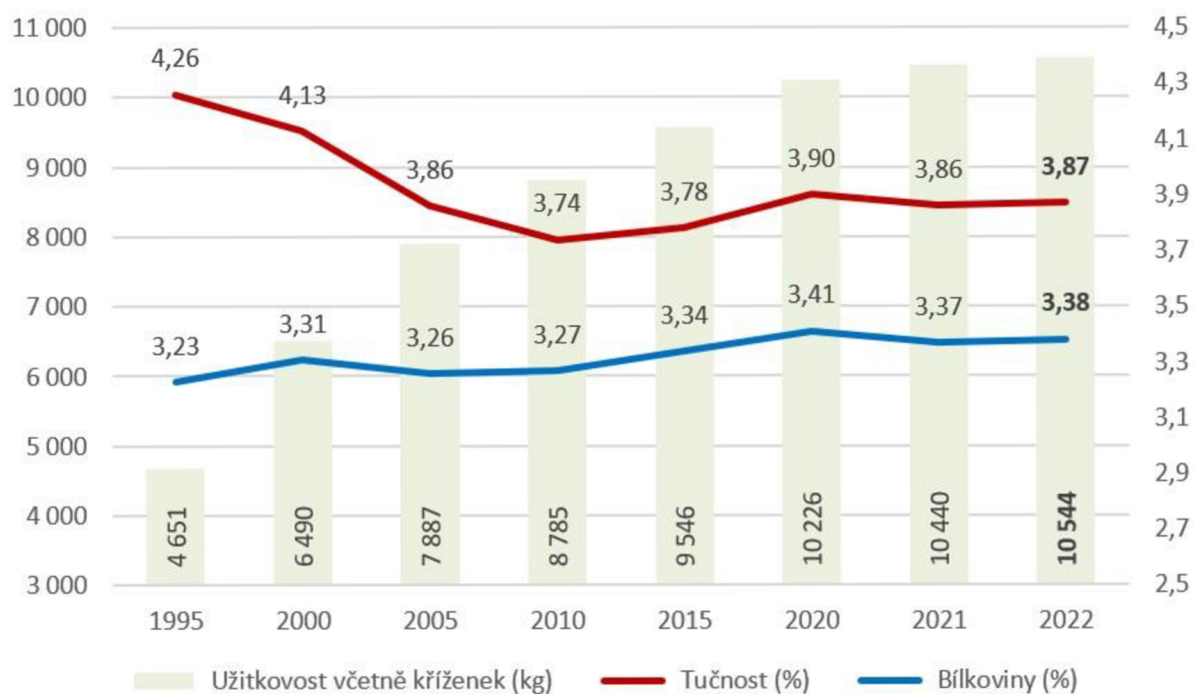
**Průměrná užitkovost v ČR:** 10 544 kg, 3,87 % tukku a 3,38 bílkovin (KU 2021/2022) (Svaz chovatelů holštýnského skotu ČR, z.s. 2024)

## Počet krav celkem a krav holštýnského plemene včetně kříženek v KU



Obrázek 2 upraveno podle Svaz chovatelů holštýnského skotu ČR, z.s. 2024. O plemeni. Svaz chovatelů holštýnského skotu ČR, z.s. Available from <https://www.holstein.cz/cz/o-plemeni> (accessed January 2024)

## Vývoj užitkovosti a obsahu mléčných složek



Obrázek 3 upraveno podle Svaz chovatelů holštýnského skotu ČR, z.s. 2024. O plemeni. Svaz chovatelů holštýnského skotu ČR, z.s. Available from <https://www.holstein.cz/cz/o-plemeni> (accessed January 2024)

## 3.2 Fyziologie pohlavní soustavy

Samičí pohlavní soustava se skládá z vnějších (vulva, poševní předsíň a klitoris) a vnitřních (pochva, děloha, vejcovody a vaječníky) orgánů.

Hlavní funkcí samičí pohlavní soustavy je vytvářet folikuly a následně prostředí, ve kterém je uhnížděné vajíčko schopno se vyvíjet.

### 3.2.1 Vnější orgány

Vulva je tvořena stydkou štěrbinou, která je ohraničena stydkými pysky.

Poštěváček je zakryt nejspodnější částí vulvy. Má topořivou tkáň a senzitivní nervové zakončení. Jedná se o samičí rudimentární analog penisu.

### 3.2.2 Pochva

Pochva spojuje dělohu s vulvou a slouží pro příjem samčího penisu během kopulace. Je vystlána sliznicí s vrstevnatým dlaždicovým epitelem. Na rozhraní mezi pochvou a poševní předsíní ústí močová trubice.

### 3.2.3 Děloha

Děloha se skládá z krčku, těla a dvou rohů. Krček dělohy je hladkosvalový svěrač, který je oevně uzavřen s výjimkou říje a porodu. Hlen viditelný při říji je sekretem žlázových pohárkových buněk a zabraňuje proniknutí infekce vaginy do dělohy. Děloha je vystlána bohatě žlázatou sliznicí (endometrium). Žlázy jsou roztroušeny po celém endometriu s výjimkou přežvýkavců, kterým vznikají výběžky houbovitého tvaru (karunkuly). Ty zajišťují spojení s obaly plodu a jsou nežláznaté.

Myometrium je střední svalová vrstva děložní stěny a skládá se z hladkosvalových buněk. Během březosti hypertrofuje. Jeho hlavní funkcí je napomáhat při vypuzování plodu při porodu.

Serózní povrch dělohy (perimetrium) přechází ze závěsného ústrojí děložního okruží (mesometrium) a je tvořeno tenkou vrstvou pobřišnice. Mesometrium vytváří závěs u nebřezí dělohy. Gravidní děloha se zvětšuje a její hlavní oporu poskytuje břišní stěna.

### 3.2.4 Vejcovody

Vejcovod je párová zvlněná hladkosvalová trubice vystlaná sliznicí, která přivádí vajíčka od vaječníku do příslušného děložního rohu. Dochází zde k fertilizaci vajíček spermii. Část vejcovodu, která přiléhá k vaječníku, se rozšiřuje a vytváří infundibulum neboli nálevku vejcovodu. Ználezky vyčnívají třásně a jejich funkcí je naměrování vajíčka do vejcovodu při ovulaci.

### 3.2.5 Vaječníky

Vaječníky jsou párové žlázy, ve kterých se vyvíjejí vajíčka a produkují hormony. Jsou zavěšeny na vlastním okruží (mesovarium) v dutině břišní za pravou a levou ledvinou. Volnější zavěšení umožňuje snadnou manipulaci při rektální palpaci u krav a u klisen.

Na povrchu mají epitelovou vrstvu. Pod ní je bělavý obal (tunica albuginea). Jedná se o kolagenní vazivo, které pokrývá celý vaječník. Pod bělavým obalem je korová vrstva obsahující velké množství folikulů v různém stádiu vývoje. Dřeň je umístěna centrálně a obsahuje řídké kolagenní vazivo, krevní a lymfatické cávy a nervy.

### 3.2.6 Proestrus

Folikulostimulační hormon stimuluje růst folikulů ( $\varnothing$  10 mm). Na vaječníku pokračuje regrese žlutého tělíska. Zvyšuje se přívod krve do pohlavních orgánů, dochází ke zduření a silné proliferaci sliznic vývodných cest, uvolňuje se děložní krček a z vulvy začíná vytékat řídký hlen. Toto období trvá 2 dny. (Burdych et al. 2021)

Proestrus začíná zahájením luteolýzy a končí zahájením říje a nárůstu gonadotropin releasing hormonem a luteinizačním hormonem. V tomto období zároveň klesá progesteron. Nedostačující luteolýza je příčinou snížené plodnosti zejména u umělé inseminace. Zvýšení estradiolu během proestru závisí na přítomnosti, velikosti a funkci dominantního folikulu. Nedostatečná hladina estradiolu může omezit plodnost a zvýšit zmetání například u krav s nízkým BCS nebo u krav v tepelném stresu (Wiltbank et al. 2014).

Sekundární příznaky říje definoval Sveberg et al. (2011) jsou jimi čichání ke genitáliím, opírání brady o záď, pokus o skok, skákání na plemence a flémování.

### 3.2.7 Estrus

Estrus neboli říje trvá 12 až 36 hodin, během nichž je na vaječníku dokončena regrese žlutého tělíska, folikul dorostl do Graafova folikulu, který má průměr 15 až 25 mm. Aktivní chování plemence přechází do pasivního, kdy na sebe nechá skákat ostatní zvířata – stadium ochoty často označované jako „standing heat“ neboli reflex nehybnosti. Plemence má zvýšenou teplotu, sníženou chuť ke krmivům a z vulvy vytéká čirý hlen o vyšší viskozitě. V tuto dobu se z adenohipofýzy vyplavuje luteinizační hormon, který dokončuje zrání Graafova folikulu (Burdych et al. 2021).

Snížená koncentrace estradiolu u krav zkracuje trvání říje v porovnání s jalovicemi (Martins & Pursley 2016).

Míra detekce říje je u krav 36 % a 70 % u jalovic. Tento velký rozdíl lze přičíst změnám v hladině estrogenu, prostředí a také tomu, že krávy jsou náchylnější na tepelný stres v porovnání s jalovicemi. Ovšem detekce říje je u krav zvyšována pomocí programu Ovsynch (Martins & Pursley 2016).

Ovsynch je protokol pro synchronizaci vývoje folikulů na vaječnicích. Způsobuje ovulaci a umožňuje inseminaci. Tento program předpokládá, že první aplikace gonadotropin releasing hormonu (GnRH) vede k ovulaci ovariálního folikulu a následně k rozvoji žlutého tělíska. Účinnost aplikace GnRH se pohybuje mezi 66 % a 85 %. Zavisí však na fázi zrání folikulu (Nowicki et al. 2017).

### 3.2.8 Metestrus

Na místě prasklého Graafova folikulu je prasklina, která je vyplněna krví. Na tomto místě začíná růst žluté tělísko a následně dochází k produkci progesteronu. Hlen vytékající z vulvy je lepkavý a může být kouřově kalný. Ovulované vajíčko se dostává z nálevky vejcovodu do vejcovodu, kde dochází k oplození. Na začátku této fáze je možné ještě plemenici inseminovat, ovšem později se pravděpodobnost zabřeznutí snižuje. Druhý až třetí den po skončení estru se objevuje poestrální krvavý výtok a ten může přispět k hodnocení správnosti momentu inseminace. Pokud plemenice nezabřezla, měla by přijít další říje za 18 dní po krvi.

Metestrus trvá 4 dny.

### 3.2.9 Diestrus

Toto období trvající  $\pm 14$  dní je typické aktivitou progesteronu. Na vaječniku roste žluté tělísko, které od 8. do 15. dne cyklu dosahuje velikosti 10-30 mm v průměru. Dále se v té stejné době vyskytuje na vaječniku tzv. meziovulační folikul. Tento folikul podléhá atrezii, ale mohou se objevit příznaky nepravé říje kolem 10. dne cyklu. Pokud nedojde k oplození přichází z dělohy kolem 18. dne cyklu signál v podobě prostaglandinu F2 alfa ( $PGF_{2\alpha}$ ), který působí na zánik žlutého tělíska. Následkem toho se zvyšuje hladina FSH, na vaječniku začíná růst nový folikul a celý cyklus se opakuje. (Burdych et al. 2021)

Koncentrace progesteronu během diestrus je u krav poloviční než u jalovic. Tento výrazný rozdíl je pravděpodobně kvůli větším folikulům a výskytu dvojité ovulaci ve srovnání s jalovicemi. S tím souvisí i větší průměr žlutého tělíska (Martins & Pursley 2016).

## 3.3 Vývoj folikulu na vaječniku

U skotu se během ovariálních cyklů nepřetržitě rekrutují skupiny folikulů s vývojem dvou nebo tří dominantních folikulů na cyklus. Nicméně se pouze jeden dominantní folikul vyvíjí až do ovulace v poslední folikulární vlně, zatímco se ostatní folikuly stávají atretickými během fáze růstu (Da Silva et al. 2019).

Folikulární dominance je spojena se snížením koncentrace FSH v plazmě. Následně podřízené folikuly přerušují svůj růst, stávají se atretickými a produkce nových folikulů je blokována. Tím se snižuje počet a kvalita původně aspirovaných folikulů (Da Silva et al. 2019).

Folikulogeneze je komplexní proces, který zahrnuje tvorbu a vývoj primordiálních folikulů až do stádia preovulačních folikulů. Období potřebné pro dosažení terciálního



stádia z primordiálního folikulu se pohybuje od 80 do 100 dnů (preantrální fáze) a období potřebné pro terciární folikul k dosažení předovulačního stavu (antrální fáze) je 42 dnů (Gardinal et al. 2016).

Folikulární tekutina poskytuje vyživující mikroprostředí pro vývoj oocyt tím, že jim umožňuje přístup k různým živinám a hormonům, které jsou produkovány z okolních somatických buněk. Folikulární tekutina je produkt obou složek krevní plazmy, které procházejí přes krevní folikulární bariéru a sekrety z granulózy a theca buňky (Hailay et al. 2019).

Aby bylo možné použít životaschopnou gametu pro oplodnění, musí oocyt dokončit řadu kritických procesů během přechodu z primordiálního stádia až do preovulačního stádia. Tyto změny zahrnují proliferaci a diferenciaci cytoplazmatických organel, syntézu a skladování mRNA a proteinů potřebných k řízení počáteční buňky v cyklu embryogeneze, dále je nutné obnovení a dokončení meiózy a dokončení epigenetických modifikací. Jeden z epigenetických procesů je přeprogramování genomu, ke kterému dochází během růstu oocytu. Tento proces zahrnuje přeprogramování mateřského genomu prostřednictvím metylace DNA diferenciatně methylovaných oblastí, k vyvolání exprese malé skupiny genů známé jako imprintované geny (O'Doherty et al. 2014).

Kvalita oocytu se zlepšuje během růstu folikulu, ale velikost folikulu negativně koreluje s mírou zotavení u krav a jalovic (Viera et. al 2014).

### **3.4 Negativní energetická bilance**

Selekce dojivosti u dojnic v posledních 70 letech vedla k výraznému zvýšení dojivosti a k současnému snížení plodnosti. U vysokodojných plemen je míra otelení jalovic mezi 55 % a 60 %. U krav v laktaci se snižuje na 35-40 %. Jednou z hlavních příčin snížené plodnosti je poporodní negativní energetická bilance (NEB) během rané laktace. NEB byla zdokumentována jako nejvýznamnější důvod klesající plodnosti (Hailay et al. 2019).

Dojnice obvykle vstupují do stavu NEB po porodu, kdy energetické požadavky organismu pro produkci mléka převyšují energetický příjem, což je jedna z nevýhod spojená s normovanou laktací (305 dní), kdy je kladen důraz na zabřeznutí v době, kdy jsou dojnice ve vrcholné laktaci, která se často shoduje s NEB (Matoba et al. 2011).

Folikulární prostředí oocytu je klíčové pro jeho správné zrání a získání epigenetických znaků. Laktující krávy vlivem NEB vykazují alternativní metabolický profil spojený s fenotypovými změnami týkající se folikulogeneze a ovulace, což vede ke špatné kvalitě oocytů (Poirier et al. 2020).

Metabolický profil dojnic v laktaci je charakterizován nižšími koncentracemi progesteronu a estradiolu a zvýšenou koncentrací neesterifikovaných mastných kyselin a b-hydroxybutyrátu, což je spojováno se suboptimálním folikulárním mikroprostředím, které ohrožuje kvalitu oocytů a vede k selhání zabřeznutí (Viera et. al 2014).

To potvrzují Matoba et al. (2011) kteří uvedli že, NEB po otelení koreluje s intervalem obnovení ovulační aktivity po porodu a s tím spojené snížené koncentrace inzulínu, IGF-I a glukózy oproti zvýšené koncentraci NEFA a BHBA spojeny s poruchou reprodukční výkonnosti (Matoba et al. 2011).

Faktory prostředí, jako je teplotní stres, zhoršují následky NEB u vysoce užitkových dojnic změnou biochemických vlastností koncentrace ve folikulární tekutině dominantních folikulů (Hailay et al. 2019).

Využitím hmotnostní spektrometrie plynovou chromatografií k posouzení hladin metabolitů folikulární tekutiny byly zjištěny vyšší koncentrace NEFA a  $\beta$ -hydroxybutyrátu a nižší koncentrace glukózy, inzulínu a IGF-I u laktujících krav ve srovnání s nelaktujícími krávkami a jalovicemi. Navíc suplementace NEFA během zrání oocytů in vitro měla negativní vliv na zrání, fertilizaci, štěpení, míru blastocyst a počet buněk pozdního apoptického kumulu (Hailay et al. 2019).

Raná laktace tedy negativně ovlivňuje kvalitu oocytů a endokrinní činnost u mléčného skotu vlivem NEB (Matoba et al. 2011).

Podmínky, kterým je oocyt vystavován v tomto bodě laktace, mohou být důležitější než ty bezprostředně před inseminací (Matoba et al. 2011).

Při období třech týdnů před porodem a třech týdnů po porodu dochází k metabolickým a hormonálním změnám, které zvyšují nároky na živiny pro produkci mléka. Nicméně kapacita DMI zaostává za energetickými požadavky, a tak se během rané laktace krávy dostávají do negativní energetické bilance. Negativní energetická bilance se vyznačuje mobilizací tělesných rezerv se zvýšením neesterifikovaných mastných kyselin, které narušují reprodukční činnost (Gardinal et al. 2016).

Hailay et al. (2019) prokázali souvislost mezi metabolickým stavem a extracelulárními vezikuly spjatými s mikro RNA profily ve folikulární tekutině po porodu.

Extracelulární vezikuly jsou velké molekuly nesoucí informace uvolněné jak z prokaryotických, tak z eukaryotických buněk. Tyto vezikuly byly detekovány v různých biologických tekutinách včetně tekutin z nosní sliznice, mozkomíšního moku, mateřského mléka, slin, pupeční tekutiny, moči, plodové vody, folikulární tekutině skotu a spermatu. Extracelulární vezikula je obecný termín zahrnující několik typů vezikul (exozomů, mikrovezikul, apoptických váčků). Exozomy se tvoří z internalizovaných endocytárních váčků, zatímco ektozomy jsou všudypřítomné vezikuly uvolněné z plazmy. Extracelulární vezikuly hrají zásadní roli v komunikaci mezi buňkami a nesou obrovské množství proteinů, lipidů, mRNA a mikroRNA, které mohou být dodány do jiných buněk a fungovat v nich.

Několik potenciálních miRNA jsou identifikátory negativního energetického stavu a zároveň jsou potenciálními biomarkery pro přechod do pozitivní energetické bilance.

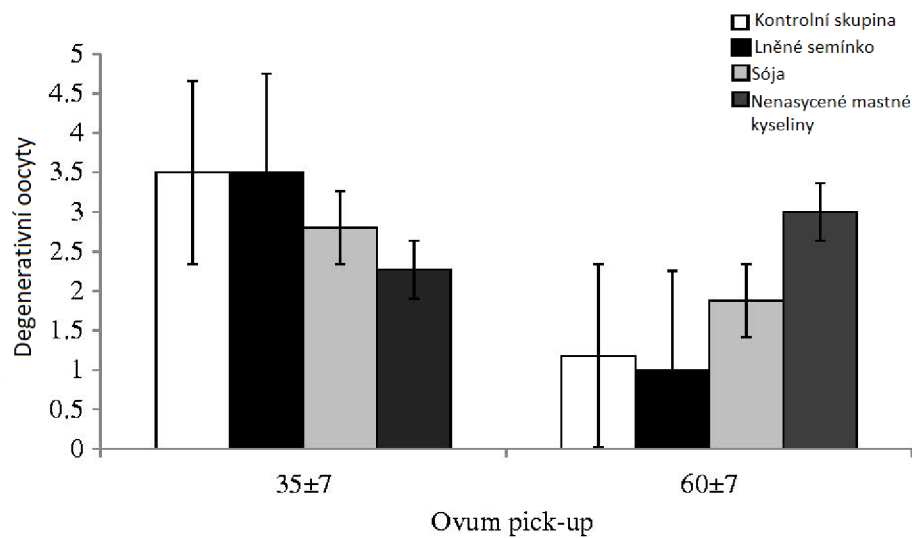
Nepříznivé metabolické prostředí vyvolané laktací mění metabolický, steroidogenní a transkriptomický profil ovariálních folikulů během jejich vývoje. Ve srovnání s nelaktujícími krávkami mají dojnice po otelení vyšší koncentrace nasycených mastných kyselin, jako je kyselina palmitová a stearová, nižší koncentrace n-3 polynenasycených mastných kyselin, vyšší hladiny glycinu a L-glutaminu a nižší hladiny L-alaninu a oxoprolinové folikulární

tekutině. Toto změněné prostředí u laktujících krav bylo spojeno se sníženou syntézou estradiolu a progesteronu dominantního folikulu při diferenciaci respektive luteinizaci (O'Doherty et al. 2014).

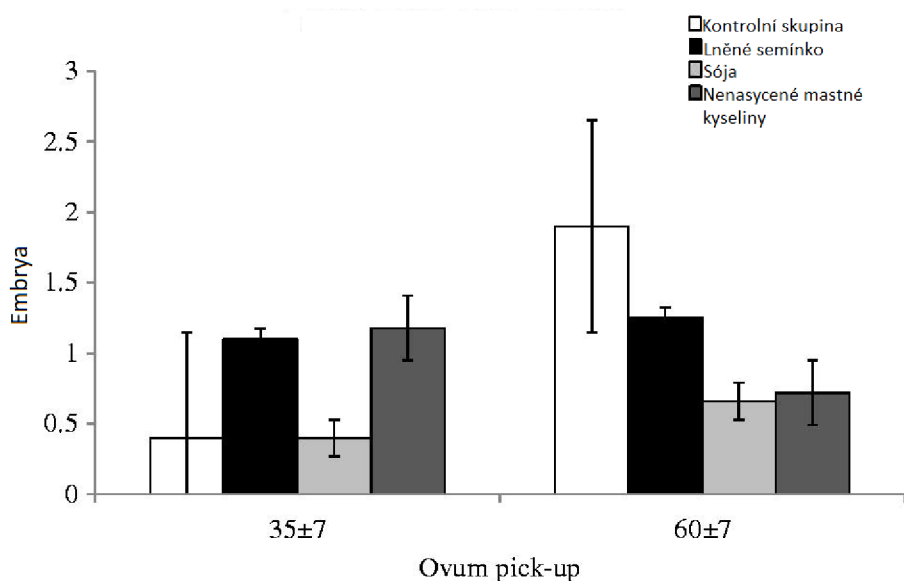
Pro optimalizaci plodnosti je nutné zajistit aby krávy měly BCS větší než 2,5 (Carvalho et al. 2014).

Krávy se vrací do pozitivní energetické bilance kolem 41. dne po otelení (Poirier et al. 2020).

### 3.4.1 Mastné kyseliny



Obrázek 4 upraveno podle Gandra JR, Verdurico LC, Mingoti RD, Takiya CS, Gardinal R, Vendramini THA, Barletta RV, Visintin JA, Rennó FP. 2017. Whole flaxseed, soybeans, and calcium salts of fatty acids supplementation for transition cows: follicle development and embryo quality. *Italian Journal of Animal Science* **16**:538-545.



Obrázek 5 upraveno podle Gandra JR, Verdurico LC, Mingoti RD, Takiya CS, Gardinal R, Vendramini THA, Barletta RV, Visintin JA, Rennó FP. 2017. Whole flaxseed, raw soybeans, and calcium salts of fatty acids supplementation for transition cows: follicle development and embryo quality. *Italian Journal of Animal Science* 16:538-545.

### 3.4.2 Krmná dávka

Nutriční faktory mohou působit na mnoha úrovních hypofyzární osy vaječníků a hypotalamu, což se může přímo odrážet na reprodukční činnosti. Kromě toho akutní či chronické změny ve výživě, nebo změny tělesného stavu mohou změnit uvolňování a syntézu reprodukčních hormonů, kvalitu oocytů a růst folikulů (Sales et al. 2015).

Takové změny mohou podporovat nerovnováhu některých metabolitů a hormonů jako jsou např. inzulín, IGF-I a leptin (Sales et al. 2015).

Po 60. dnu otelení snížilo krmivo s nadměrnou energetickou hodnotou počet blastocyst u krav *Bos indicus*. Naopak u *Bos taurus* tato krmná dávka neměla žádný vliv na produkci blastocyst (Sales et al. 2015).

Ovšem studie Baruselli et al. (2012) prokázala i u *Bos taurus* snížení počtu blastocyst 60dní po podávání vysokoenergetické krmné dávky. Koncentrace glukózy v plazmě a folikulární tekutině a také koncentrace inzulínu byly vyšší u krav s vysokoenergetickou krmnou dávkou.

S čímž nekoresponduje pozdější pozorování Baruselli et al. (2016), kdy nezjistili žádné interakce mezi účinky plemene (*Bos indicus* × *Bos taurus*) a energetické úrovně krmné dávky na kvalitativní (životaschopné oocyty, stupeň a index kvality oocytů) a kvantitativní (získané oocyty) proměnné. NEB způsobená nízkým příjmem sušiny vede ke snížení koncentrace inzulínu, glukózy a IGF-I, což ovlivňuje vývoj folikulů a následně vede ke snížení počtu oocytů získaných od krav během teplejšího období (Takuma et al. 2010).

## 3.5 Metody

Programy umělého oplodnění poskytují organizovaný přístup ke zvýšení využití umělé inseminace, genetickému pokroku a zlepšení reprodukční schopnosti mléčného skotu. Úspěch biotechnologií závisí na vývoji ovariálních folikulů a jejich manipulaci. Konečný růst folikulu a jeho průměr jsou klíčové faktory, které mohou významně ovlivnit kvalitu oocytů, ovulaci, prostředí dělohy a následné výsledky březosti. Použití superovulace následované umělou inseminací je technika, která generuje větší počet embryí na dárkyni. Tyto techniky využívající přenos embryí jsou nástroji šířící vysokou genetickou kvalitu a zlepšující reprodukční výkonnost (Baruselli et al. 2012).

### 3.5.1 ICSI

ICSI je metoda vytvářející embrya pomocí přímé aplikace spermií do ooplazmy. U skotu patří mezi výhody efektivní využití spermií pro zlepšení genetiky stáda a využívání tak nadprůměrných zvířat. Dále lze ICSI použít k získání embryí s menším počtem spermií. Oikawa et al. (2016) uvádí, že imobilizace spermií těsně před injekcí pomocí kombinace piezo-mikromanipulátoru a aktivace ethanolem čtyři hodiny po ICSI je užitečná pro vytváření blastocyst. ICSI oproti konvenčnímu IVF vloží spermie přímo do ooplazmy bez nutnosti akrozomové reakce.

Obecně, když spermie vstoupí do ooplazmy, disulfidové vazby v jádře hlavičky spermie začnou být redukovány glutathionem. Po snížení disulfidových vazeb v protaminech jsou nahrazeny histony. Následně membrána spermií zmizí a vytvoří se samčí pronukleus a splyne se samicím pronukleus. Ve srovnání několika jiných druhů (člověk, myš a křeček) je býčí spermie stabilnější a nemůže snadno dekonenzovat v oocyту. Některé chemikálie jako je heparin, kofein a vápenné ionty jsou schopny zvýšit propustnost membrány spermií. Z tohoto důvodu se běžně používají při IVF. Naopak dithiothreitol vykazuje snížení protaminových sulfidů vázaných na hlavičku spermie. Tudiž předběžné ošetření spermií výše uvedenými chemikáliemi může napomáhat vývoji embryí získaných metodou ICSI (Oikawa et al 2016).

### 3.5.2 OPU-IVF

OPU-IVF umožňuje odběr oocytů z vaječníků dárkyň s nízkou gonadotropinovou odpovědí. Rychlost vývoje embrya se však pomocí této metody vždy nezlepší a problémem je nízká míra úspěšnosti (Oikawa et al. 2016).

Aktuálně je 36,5 % embryí produkovaných in vitro (Baruselli et al. 2012).

### 3.5.3 ET

Embryotransfer (ET) je široce využíván v chovech skotu jako nástroj pro zlepšování genetiky stáda. Ovšem nutnost superstimulační léčby zůstává velkým omezením. Alternativou ET je produkce embryí *in vitro* (IVEP). Tato biotechnologie umožňuje produkci velkého množství embryí od dárkyň s vysokým genetickým potenciálem během zkráceného období. Rovněž umožňuje použití sexovaných spermií bez podstatného ohrožení embryí (Oliviera et al. 2016).

### 3.5.4 LOPU

Laparoskopická aspirace oocytů je alternativa klasického OPU a je využívána zejména u menších hospodářských zvířat např. ovce, kozy. Důvodem je jejich malý tělesný rámec v porovnání se skotem. Hlavním zájmem je urychlený genetický zisk prostřednictvím exponenciální reprodukce samic vynikající produktivity a genetické hodnoty. LOPU-IVEP je u malých přežvýkavců využívánější než mnohočetná ovulace a přenos embryí (MOET). Zejména kvůli špatným výsledkům superovulační odpovědi, nedostatku oplodnění a předčasné luteolýze (Baldassarre 2021).

LOPU je minimálně invazivní a ukázal se jako velmi bezpečný, konkrétně bez intraoperačních komplikací ani následků s narušením reprodukční budoucnosti zvířat. U prepubertálního skotu bylo provedeno mezi 6 a 9 LOPU během 3-4 měsíců a žádná z jaloviček neměla v dospělosti problémy produkovat více embryí pomocí OPU nebo zabřeznout (Baldassare 2021).

Technologie LOPU-IVEP k produkci „telat z telat“ byla navržena na počátku 90. let 20. století s četnými publikacemi ukazující vysoké výtěžky oocytů z jaloviček ve věku 2-6 měsíců. Tento zájem ovšem zanikl díky nemožnosti předpovědi kvality zvířete a velmi špatné vývojové kompetenci těchto oocytů v porovnání s oocyty z dospělých krav. Nyní zájem zase vzrůstá a to díky genomickým testům, které jsou schopny odhalit potenciál zvířete v raném věku (Baldassare 2021).

Boni (2012) ukázal několik výhod LOPU v porovnání s OPU: aspirace primárně povrchových folikulů; přímý pohled na vaječník a postup odsávání; snížené riziko poranění vaječníků. Ovšem OPU umožnilo shromáždit výrazně vyšší podíl oocytů stupně 1, které vedou k vyššímu štěpení než u LOPU.

### 3.5.5 IVEP

Opakovaný odběr oocytů transvaginálně ultrazvukem řízenou folikulární punkcí (OPU), implicitně spojenou s produkcí embryí *in vitro* (IVEP), se staly alternativní a konkurenceschopnou oproti superovulaci při produkci embryí u skotu. Lze ji úspěšně aplikovat bez ohledu na reprodukční stav dárkyň např. březí; acyklická; zvířata s infekcí genitálního traktu a necitlivá na superovulační stimulaci. Na rozdíl od ostatních metod je

možné od jednoho zvířete odebrat více oocytů. Limity aplikace OPU zůstávají kvůli nižší míře zabřezávání produkovaných embryí nebo neoptimální spolupráce mezi praktiky OPU a IVF laboratoří (Boni 2012).

Při použití této metody se vybírají zvířata s vysokou zootechnickou hodnotou, protože se maximalizuje reprodukční schopnost stáda (Berling et al. 2022).

Úspěšná realizace IVEP závisí na mnoha faktorech včetně genetického potenciálu dárkyně, podtlaku během aspirace, typu jehly během odběru oocytů (OPU) a počtu folikulů. Tyto faktory mohou ovlivnit kvalitu odebraných oocytů, úspěch zrání *in vitro* či následný vývoj embryí (Oliviera et al. 2016).

Samice tak může vytvořit v průměru 36 potomků za rok, zatímco přirozeně byl jen 1 potomek (Berling et al. 2022).

V severní Americe použití IVEP vzrostl pravděpodobně díky zlepšení genetiky, reprodukční výkonnosti a poměru pohlaví potomků, které lze touto metodou dosáhnout. Brazílie IVEP primárně využívá u *Bos Indicus* kvůli většímu počtu antrálních folikulů než u *Bos Taurus*. Ovšem v posledních letech se využití IVEP zvýšilo i u mléčného skotu (Oliviera et al. 2016).

### 3.6 Průběh OPU

V roce 1988 byla transvaginálně ultrazvukem řízená aspirace oocytů poprvé zavedena holandským týmem. Tito výzkumníci prokázali, že opakovaný odběr oocytů pomocí OPU je možné provádět bez ohrožení zdraví a reprodukční činnosti. V této studii bylo OPU prováděno jednou týdně u deseti krav. Z 36 výkonů bylo získáno ze 197 propíchnutých folikulů 54 oocytů. Průměrná návratnost byla 27,4 % a 1,5 oocytu/kráva (Boni 2012).

Před každým zákrokem byly z konečníku odstraněny výkaly a perineální oblast vyčištěna vodou a 70% ethanolem. Pro lepší provedení, snížení peristaltiky a nepohody krávy dostávaly epidurální anestezii (Cavalieri et al. 2018).

Ovariální folikuly byly aspirovány jedenácti japonským kravám v 7-denních intervalech pomocí transvaginálního ultrazvukově naváděného zařízení vybaveného 7,5 MHz konvexní sondou a nerezovým jehlovým vodítkem. K penetraci vaginální stěny a ovariální tkáně byla použita echogenní jehla dlouhá 60 cm pro aspiraci folikulů. Obsah folikulů byl odsát do jednocestné hadičky za použití konstantního odsávacího tlaku 100 mmHg. Folikulární aspirační tekutiny byly shromažďovány v 50 ml kuželových centrifugačních zkumavkách zahřátých na 30 °C pomocí ohřívače zkumavek. Aspiračním médiem byl fyziologický roztok pufovaný fosfátem doplněný 10 IU/ml heparinu sodného a 0,05 mg/ml gentamicinu. Aspirovány byly pouze folikuly o průměru > 2 mm. Po odsátí byl použit Em-Con filtr k oddělení jakýchkoli krevních složek a odebrání oocytů z aspirátu folikulární tekutiny (Oikawa et al. 2016).

Bezprostředně po OPU byly oocyty vyšetřeny a klasifikovány podle jejich morfologie (počet vrstev, oocyt kumulární-komplex a vzhled cytoplazmy z hlediska barvy, homogenity a integrity) (Cavalieri et al. 2018).

Podíl oocytů obklopen kompaktními kumuly a in vitro produkovanými blastocystami postupně klesal při zvyšování podtlaku. Ovšem faktory jako je opačný tlak přítomný ve vagíně a pobřišnici zhoršují vyhodnocení optimálního vakua pro oocyty. Také úhel a ostrost jehly ovlivňuje obnovu oocytů. Větší návratnost je při použití dlouhých jehel (Boni 2012).

V porovnání tří jehel s různými průměry (18; 19 a 21 G) s různými hodnotami podtlaku je nejvhodnější jehla o průměru 18 G (Boni 2012).

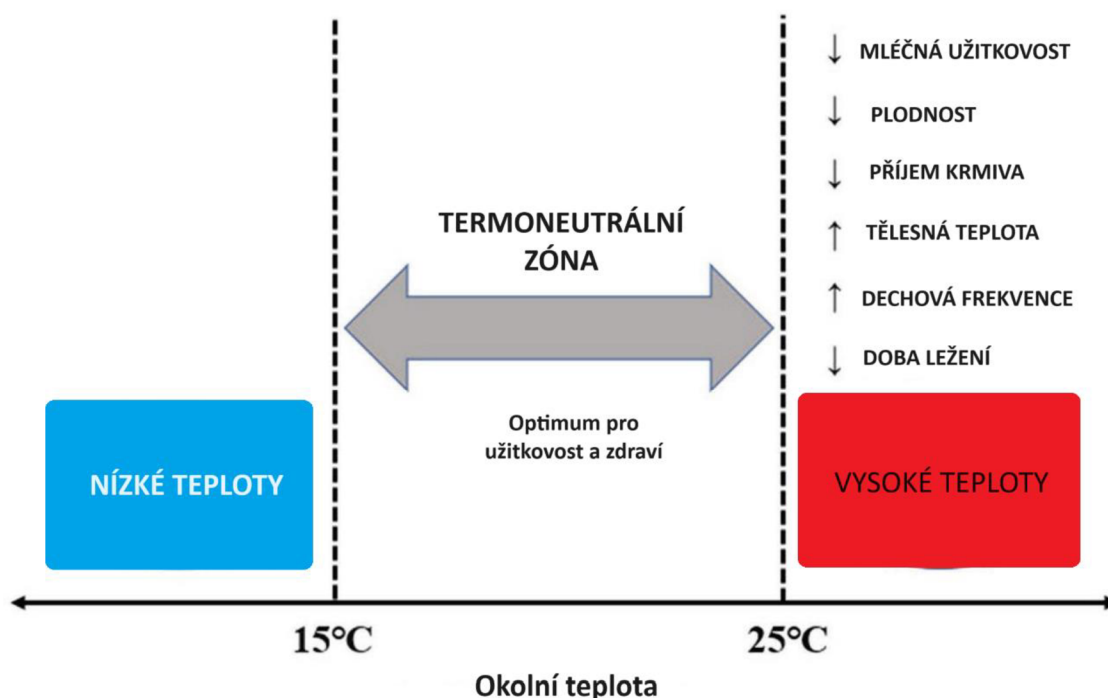
Citlivost ultrazvukového zařízení představuje významný parametr pro účinnost OPU. Při porovnání lineárního pole s mechanickým víceúhlovým sektorem (MAP) se MAP ukázal jako vhodnější. Je schopen vizualizovat menší folikuly a tím byl získán větší počet oocytů ( $14,2 \times 7,4$ ) (Boni 2012).

### 3.7 Tepelný stres

Změna klimatu je celosvětový problém a negativně ovlivňuje produkci i reprodukci skotu. Na skot působí přímo i nepřímo. Přímé účinky zahrnují vzestup teploty, kolísání fotoperiody i srážek. Nepřímé účinky negativně ovlivňují kvalitu krmiva a jeho množství, menší dostupnost vody a vyšší náchylnost k nemocem. Vyšší teplota spolu s vlhkostí způsobuje tepelný stres skotu, který má širokou škálu škodlivých dopadů např. snížený růst, snížená produkce mléka, menší přírůstky a narušená reprodukce (Angel et al. 2018).

Tepelný stres je definován jako součet vnějších podnětů způsobující zvýšení tělesné teploty a následnou odezvu organismu. Nadměrné zvýšení teploty vede k vyčerpání energie potřebné pro laktaci a růst a může vést ke zhoršení životních podmínek, snížené kvalitě života a v extrémních případech i smrt. Fyziologické projevy dojnic při tepelném stresu jsou zrychlené dýchání, pocení, snížená dojivost a reprodukční výkonnost jak je vidět na Obr. 6 (Polsky & von Keyserlingk 2017).





Obrázek 6 upraveno podle Polsky L, von Keyserlingk MAG. 2017. Invited review: Effects of heat stress on dairy cattle welfare. *Journal of Dairy Science* **100**:8645-8657.

Skot, vystavený vysokým teplotám a relativní vlhkosti, může mít poruchy homeostázy, které negativně ovlivňují jak produkční, tak i reprodukční výkonnost. *Bos taurus* je méně odolnější vůči tepelnému stresu v porovnání s *Bos indicus*, vzhledem k jejich nižší schopnosti odvádět teplo do okolí a vysokým metabolismem vysoce produkčních krav. V důsledku toho mají oocyty nižší schopnost generovat blastocysty (Berling et al. 2022).

Holštýnský skot má schopnost odvádění tepla odpařováním omezenou jeho relativně nízkým poměrem plochy povrchu těla k jeho tělesné hmotnosti a jeho nedostatečně vyvinuté potní žlázy a krátká, hustá srst také příliš nepomáhají organismu při tepelném stresu (Liu et al. 2019).

U dojnic vystavených tepelnému stresu je snížena funkce některých tkání a orgánů, což brání v syntéze proteinů a hormonů spojených s reprodukcí (Liu et al. 2019).

Touto problematikou se zabývali Wolfenson et al. Již v roce 1995, kteří prokázali, že počet dominantních folikulů u krav zatížených tepelným stresem začal klesat dříve než u krav ve chladnějších podmínkách.

Tepelný stres (TS) má velký vliv na celkové roční ekonomické ztráty v USA v rozmezí od 1,69 do 2,36 miliardy dolarů (Berling et al. 2022).

TS se může vyskytnout ve všech klimatických pásmech. Regiony v Kanadě a na severu Spojených států mají sice krátké teplé léto, ale v těchto oblastech dobytek být fyziologicky adaptován na podmínky tepelného stresu, což zvířatům ztěžuje vyrovnání s TS. Nicméně dojnice v tropických a subtropických pásmech zažívají prodloužené období TS, a proto se nemohou tak rychle zotavit z negativních účinků jako dojnice v mírném podnebí (Becker et al. 2020).

Za posledních 60 let se snížila míra zabřezávání u vysokoprodukčních krav na 55-35% (Schüller et al. 2014).

Tento pokles pravděpodobně souvisí s fyziologickými změnami, změnami v managementu chovu a zvýšení mléčné užitkovosti. Ovšem v období tepelného stresu míra zabřezávání klesá pod 35 % (Becker et al. 2020).

Pereira et al. (2013) měřili rektální teplotu během umělé inseminace a zjistili, že při naměření rektální teploty nad 39,1 °C se procento zabřeznutí snižuje z 21 % na 15 %.

Atrian & Shahryar (2012) popsali několik bodů, které ovlivňuje tepelný stres a mezi nimi byli i změny hladiny hormonů v těle a špatná reprodukční výkonnost a deprese plodnosti:

a) Změny hladiny hormonů v těle

Dobytěk, který v teplém klimatu chová na pastvinách, kde není dostatek stínu, má nižší hladinu estrogenu. Další hormonální změny vedly k nižší míře početí.

b) Špatná reprodukční výkonnost a deprese plodnosti

Jalovice, které jsou vystaveny tepelnému stresu, mají obvykle výrazné zpoždění růstu a zpoždění první ovulace. S tím úzce souvisí zvyšování tělesné teploty.

Ve studii Çizmeci et al. (2022) rozdělili dojnice do 3 skupin, kdy ve skupině 1 byla teplota < 10 °C, ve skupině 2 10-25 °C a ve skupině 3 > 25 °C. Na OPU byl počet oocytů 8,72; 6,32 a 6,85 ve skupinách 1; 2 a 3 v tomto pořadí. Počet životaschopných oocytů na OPU byl 6,83 (skupina 1), 4,64 (skupina 2) a 4,65 (skupina 3) jak je vidět v tab. 1.

Tabulka 1 upraveno podle Çizmeci SÜ, Dinç DA, Yesilkaya OF, Çiftçi MF, Takci A, Bucak MN. 2022. Effects of Heat-Stress on Oocyte Number and Quality and In Vitro Embryo Production in Holstein Heifers. *Acta Scientiae Veterinariae* 50:1870 <https://doi.org/10.22456/1679-9216.122371>

Okolní teploty	< 10 °C	10-25 °C	>25 °C
<b>OPU</b>	18	25	26
<b>Počet oocytů celkem</b>	157	158	178
<b>Oocyty na OPU</b>	8,72	6,32	6,85
<b>Životaschopné oocyty na OPU</b>	6,83	4,64	4,65
<b>Počet blastocyst na OPU</b>	1,39	0,64	0,81
<b>Četnost blastocyst %</b>	20,33	13,79	17,36

### 3.8 Úspěšnost

Úspěšná realizace IVEP závisí na mnoha faktorech včetně genetického potenciálu dárkyně, podtlaku během aspirace, typu jehly během odběru oocytů (OPU) a počtu folikulů.

Tyto faktory mohou ovlivnit kvalitu odebraných oocytů, úspěch zrání *in vitro* či následný vývoj embryí (Oliviera et al.2016).

Jak kvalita, tak kvantita aspirovaných oocytů jsou základními faktory úspěchu produkce embryí. Nejkomerčnější programy (OPU/IVP) provádějí folikulární aspiraci v náhodný den estrálního cyklu a všechny folikuly viditelné ultrazvukovým vyšetřením jsou propíchnuty. Aspirace folikulů byly provedeny 3 – 5 dní po objevení estru nebo v raných fázích vzniku folikulů, kdy jsou folikuly menší, což vede k lepší obnově a větší kvalitě oocytů (Cavalieri et al. 2018).

Velikost folikulu může ovlivnit úspěch IVEP po OPU. Např. u krav v náhodný den estrálního cyklu, byly oocyty velké 8 mm a více klasifikovány jako zdravější než ty které byly menší než 7 mm. Krávy, kterým byl podáván p-FSH, měly větší podíl středních folikulů (6-10 mm) než krávy z kontrolní skupiny. Z toho vyplývá, že hormonálním ošetřením před OPU lze dosáhnout ideálního stádia folikulů pro IVEP(Oliviera et al. 2016).

Ovšem přítomnost žlutého tělíska redukuje ovariální oblast dostupnou pro folikulární vývoj a brzdí folikulární aspiraci (Sales et al. 2015).

Oliviera et al. (2016) zjistili, že průměrný počet embryí na dárkyni a rychlost vývoje oocytů na blastocysty byli vyšší u folikulů odebraných v růstové fázi.

Během pěti měsíců se ve 3-4 denních intervalech aspirovaly oocyty. Po celou dobu nebyly pozorovány žádné škodlivé účinky. Výsledky se mezi jednotlivými oocyty od jednoho zvířete nelišily, což naznačuje, že lze provádět tuto biotechnologii dlouhodobě (Boni 2012).

Což potvrdili i Takuma et al. (2010), kdy opakované OPU během prvního trimestru březosti nemělo škodlivé účinky na vývoj plodu.

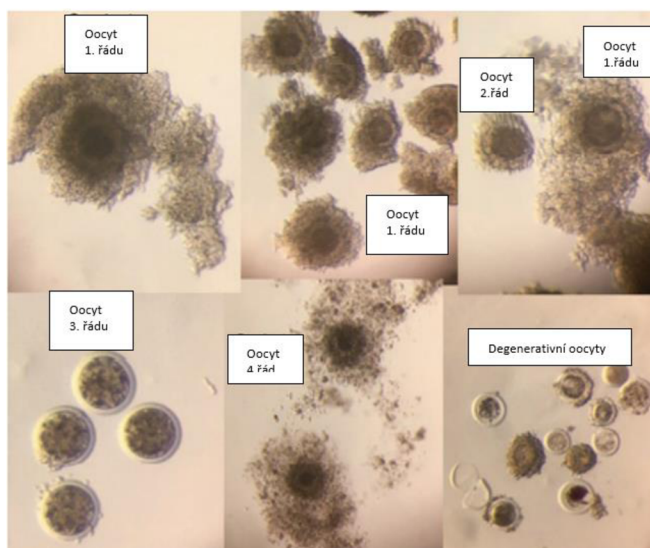
Ovšem nadměrné zvýšení koncentrace inzulínu v krvi, hlavně u dojnic později v laktaci, negativně ovlivňuje kvalitu oocytů (Baruselli et al. 2016).

Stejně jako u krav s vysokým BSC může být *in vitro* vývojová kompetence oocytů ohrožena. Vlivem hyperinzulinémie, periferní rezistence na inzulín a IGF-I mohou interferovat transport glukózy v buňkách embrya a zvýšit výskyt apoptózy (Bruselli et al. 2012).

Účinnost OPU závisí na rychlosti zotavení, kterou ovlivňuje několik faktorů např. superstimulace zvířat, typ jehly, frekvence vpichu, fáze estrálního cyklu, podtlak aspirace a zkušenost technika. Navzdory pokroku v OPU procento produkce blastocyst je stěla nízká (25-35 %). Oocyty pocházející z OPU vykazují nižší morfologickou kvalitu ve srovnání s oocyty získaných aspirací z jatečných vaječníků (Balboula et al. 2022).

Embrya, která tak dosahují kompaktní moruly 5. den, stádia blastocysty 6. den a expandované blastocysty nebo vyššího stádia 7. den, mají větší šanci na zabřeznutí (Demetrio et al. 2022).

Dále agar neovlivňuje vývoj embryí získaných pomocí OPU. Proto počet předpokládaných zygot na kapku agaru může být hlavním určujícím faktorem vývoje a následné úspěšnosti (Deb et al. 2011).



Obrázek 7 upraveno podle Demetrio D, Demetrio C, Oliviera M, Reis R, Santos R. 2022. From oocyte to calf: practical aspects of bovine in vitro embryo production. *Clinical Theriogenology* 14:193-201.

V kulturách vícenásobných embryí určuje hustota a vzdálenost mezi embryi účinnost vývoje. Přínos kultivace více embryí je pravděpodobně způsoben sekrecí embryotrofních faktorů embryi během jejich vývoje (Deb et al. 2011).

### 3.8.1 Den aspirace oocytů

Největší počet odebraných folikulů byl během třetího až čtvrtého dne estrálního cyklu v porovnání s odběry mezi devátým a desátým dnem, nebo během 15. a 16. dne estrálního cyklu (Boni 2012).

Aspirace oocytů ve 14denních intervalech neovlivnily počet folikulů přítomných ve vaječnicích na rozdíl od 7denního intervalu. Postupné folikulární aspirace podporují mechanické poškození, které vede ke změnám ovariálního parenchymu (degenerace, fibróza nebo adherence), nebo steroidogeneze oocytů a metabolické změny (zvýšení lokálních zánětlivých faktorů). Ovšem při 14denním intervalu mezi OPU se nesnižovaly počty rekrutovaných folikulů (Sales et al. 2015).

Což potvrzuje i Boni (2012): aspirace dvakrát týdně přináší vyšší počet životaschopných oocytů a přenosných embryí než aspirace jednou týdně.

Fáze říjového cyklu v době OPU ovlivňuje rychlost zotavení, kvalitu oocytů a IVP. Vyšší míra obnovy byla pozorována, pokud bylo OPU provedeno v blízkosti folikulární vlny (Baruselli et al. 2012).

Boni (2012) navrhl aplikaci OPU dvakrát týdně při zvýšené frekvenci folikulárních vln a následnou zástavou estrálního cyklu, zrání folikulů a ovulací. Jakmile odběr vzorků pomocí OPU přestal, do 6 dnů proběhla ovulace. Avšak následné zvýšení frekvence odběrů nebylo

přínosné. Způsobilo to snížení počtu propíchnutých folikulů, i když byla zaznamenána vyšší rychlost zotavení a větší kvalita oocytů.

Různé intervaly vzorkování pomocí OPU, tj. 1)dvakrát týdně; 2)každých pět dní; 3)jednou týdně; 4)každých deset dní; 5)jednou za dva týdny, získali embrya do stádia blastocysty z: 1) 23,1 %; 2) 15 %; 3) 10,9 %; 4) 4,9 %; 5) 29 %. Tyto výsledky naznačují, že při rozdílných intervalech OPU je vývojový potenciál folikulů od téže dárkyně také rozdílný (Boni 2012).

### 3.8.2 Vliv plemene

Plemeno může mít významný vliv na úspěšnost programu OPU-IVP. Holštýnský skot produkuje kvalitnější oocyty než dánské červené a bílé krávy. Nicméně v tropickém prostředí na pastvinách Aberdeen Angus byly odebrány větší počty oocytů, které vykazovaly větší *in vitro* kompetence než holštýnské krávy. Lepší výsledky také prokázal skot Bos indicus. Jejich zvýšený počet antrálních folikulů silně koresponduje se zvýšeným počtem oocytů vhodných pro IVP (Baruselli et al. 2012).

Mezi reprodukčními biotechnologiemi byla za velmi důležitou považována produkce embryí *in vitro*. Účinnost této metody byla vyšší u masných plemen skotu než u mléčných plemen. Synchronizace folikulárních vln a superstimulace před OPU může být alternativa ke zlepšení účinnosti této biotechnologie u mléčných plemen (Da Silva et al. 2019).

Jersey příjemkyně, které dostaly embryo po 65 dnu laktace měly vyšší úspěšnost zabřeznutí (54,8 %) než ty, které ho dostaly do 65 dne (46,7 %). A příjemkyně na první a druhé laktaci měly vyšší četnost zabřeznutí (56,6 %) oproti dojnicím na třetí a čtvrté laktaci (46,1 %) (Demetrio et al. 2022).

V roce 2020 bylo v RuAnn a Madox přeneseno 4 088 embryí holštýnského skotu, což vedlo k 1 952 zabřeznutím (48 %) zjištěných před 40. dnem březosti. Výsledkem bylo 1 578 živě narozených telat (81 %). Většina abortů nastala v prvním trimestru březosti (Demetrio et al. 2022).

### 3.8.3 Zlepšení kvality oocytů

Synchronizace folikulární vlny dárkyň před OPU zvyšuje efektivitu produkce embryí *in vitro*. Dárkyním, které podstoupili hormonální stimulaci, se zvýšila reprodukční výkonnost. Následkem hormonální synchronizace byl počet embryí o 7,3 % vyšší než u dárkyň bez hormonální stimulace (Cavalieri et al. 2018).

Synchronizace dárkyň umožnila aspirovat více homogenních folikulů ve vztahu k velikosti a vývojové fázi, což podporuje obnovu kompetentnějších oocytů. Ovšem míra zabřeznutí byla u kontrolní skupiny krav a u krav s hormonální stimulací podobná. U IVF embryí se pohybovala od 33 % do 36 %. V komerčním měřítku se pro IVF aspirují oocyty v náhodný den estrálního cyklu. Při těchto odběrech je prakticky nemožné rozlišit folikuly, které se vyvíjejí a ty, které podstupují atrézii. Tím se snižuje účinnost oocytů jejich kvalita a

následná produkce embryí. Naproti tomu při synchronizaci dárkyň je možné určit nejlepší dobu pro aspiraci folikulů, které jsou v růstové fázi (Cavalieri et al. 2018).

U dárkyň, které podstoupily hormonální stimulaci, byla lepší míra konverze embryí a zabřeznutí ve vztahu ke kontrolní skupině (Cavalieri et al. 2018).

Zvýšení obnovy oocytů lze dosáhnout kroucením jehly ve folikulu. Tato technika vykazala 30% návratnost díky lepšímu oddělení oocyty kyretáží folikulární stěny během aspirace (Boni 2012).

### 3.8.3.1 Stimulace FSH

Oliviera et al. (2016) zjistili, že superstimulace FSH nezlepšila kvalitu oocytů odebraných metodou OPU. Holštýnské dojnice byly rozděleny do dvou skupin. První skupině bylo podáno 6 dávek FSH po 40 mg v rozmezí 12 hodin. Aspirace oocytů byla provedena 44 hodin po poslední dávce FSH. Počet odebraných oocytů a jejich životaschopnosti se nelišili mezi skupinami.

Získání vývojového potenciálu oocytů souvisí s růstem folikulů. Vzhledem k tomu, že tyto geny souvisejí s transkripcí a regulací buněčného cyklu, stimulace exogenním FSH by mohla umožnit akumulaci většího množství messengeru, což by vedlo k zachování kvality oocyty před OPU (Viera et. al 2014).

Aplikace FSH může být použita jako alternativa k obnově oocytů prostřednictvím odběru, aby se minimalizovaly negativní účinky vyplývající z usazování dominantního folikulu. FSH tudíž oddaluje výběr dominantního folikulu, stejně jako atrézií, a tím se zvyšuje průměr folikulů (Da Silva et al. 2019).

Stimulace p-FSH zvýšila průměrný počet středně velkých folikulů, ale nižší výtěžnost snížila celkový přínos superstimulace (Viera et. al 2014).

I Oliviera et al. (2016) potvrzuje že, superstimulace FSH zvýšila počet velkých folikulů v růstové fázi, ale zároveň také snížila rychlost vývoje blastocyst z těchto folikulů. Nicméně by superstimulace měla být kombinována s obdobím „coastingu“ (doba mezi poslední dávkou FSH a OPU). Po dobu 48 hodin se produkovalo více folikulů 5-10 mm než při 33 hodinách před OPU. Ovšem přidání LH 6 hodin před OPU vedlo ke zvýšené produkci blastocyst v oocytech odebraných po 33 hodinách, ale ne v oocytech odebraných po 48 hodinách (Oliviera et al. 2016)

Přestože se FSH podílí na kvalitě oocytů, ve studii Da Silva et al. 2019 nedošlo k žádnému výraznému zvýšení počtu nebo procenta životaschopných oocytů.

Ovšem Boni (2012) při hormonální stimulaci pomocí PMSG s cílem zlepšit kvalitu folikulů výrazně zvýšil počet aspirovaných folikulů. Na druhou stranu stimulace snížila hodnotu návratnosti. U březích krav, kterým bylo podáváno 40 mg p-FSH bylo zjištěno nejvyšší procento životaschopných oocytů v porovnání s březími dojnicemi, kterým bylo aplikováno 20 mg p-FSH, či v porovnání s nestimulovanými dojnicemi (Boni 2012).

Jalovice, kterým byl podáván p-FSH, ve srovnání s jalovicemi bez hormonální stimulace produkovaly více folikulů. Navzdory těmto pozitivním účinkům byl počet blastocyst podobný v obou skupinách (Baruselli et al. 2016).

Jedna ze strategií pro zlepšení účinnosti OPU je stimulace vaječnicků pomocí gonadotropinů. Vyšší počty oocytů byly získány od stimulovaných krav *Bos taurus*. IVP se zlepšilo, když bylo OPU provedeno po synchronizaci folikulárních vln ( pomocí P4+E2 nebo folikulární ablace). Navíc došlo ke zlepšení IVP při použití FSH ve čtyřech stejných dávkách dvakrát denně v době vzniku folikulární vlny. V tomto případě bylo OPU provedeno 24 hodin po poslední dávce FSH (Baruselli et al. 2012).

Účinnost produkce embryí in vitro se měří z hlediska kvality, která odráží procento embryí a míru zabřeznutí. Nízká účinnost byla přičítána nízké kompetenci hovězích oocytů z antrálních folikulů podrobených nucenému zrání in vitro. Nicméně, navzdory použitím FSH u jedné skupiny krav plemene Girolando byla míra produkce embryí in vitro podobná jako u krav kterým FSH podáván nebyl (Da Silva et al. 2019).

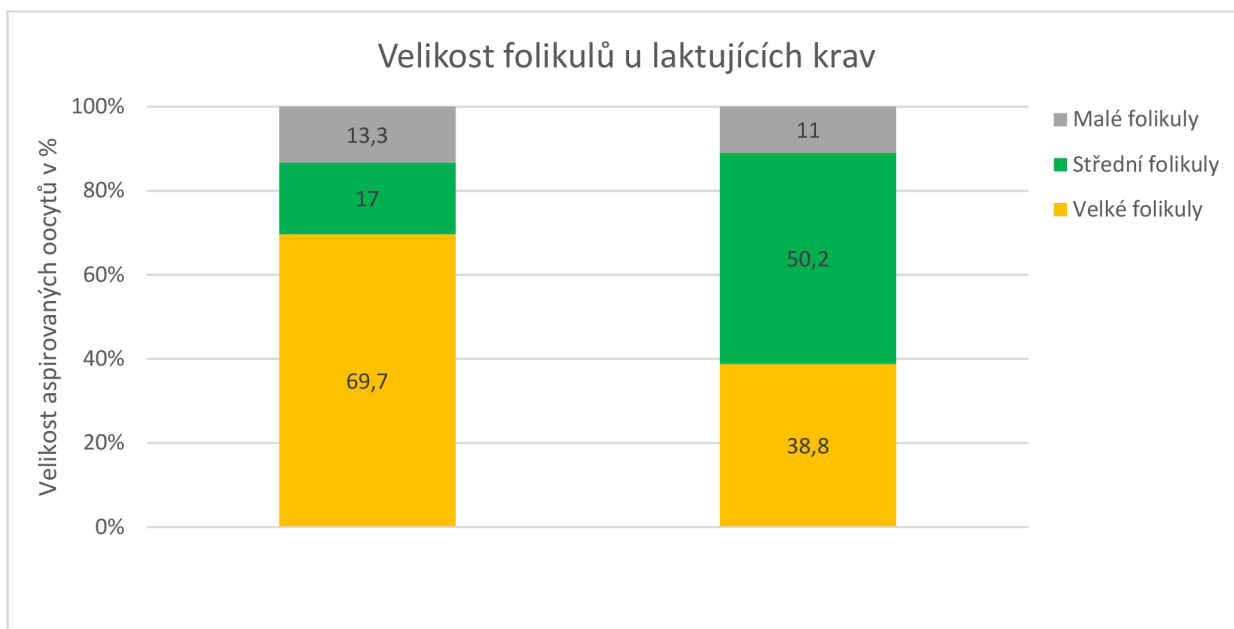
FSH se oproti PMSG musí aplikovat dvakrát denně po dobu 4-5 dnů, což je pro dojnice stresující, jelikož je to vyžaduje častější injekce a zvyšuje se tak i množství práce a náklady. PMSG je komplexní glykoprotein obsahující kyselinu sialovou. Jeho podávání stimuluje sekundární folikuly ke kvalitnějšímu vývoji folikulárních oocytů (Son et al. 2022).

Po aplikaci FSH Blondin et al. 2012 zjistili, že mezi 44 a 68 hodinách odebrali nejkvalitnější folikuly pro produkci embryí a to folikuly od 7 mm do 10 mm. Pro folikuly nad 10 mm je náročné se po aspiraci zotavit. Tyto folikuly se nejvíce tvořily 92 hodin po stimulaci FSH.

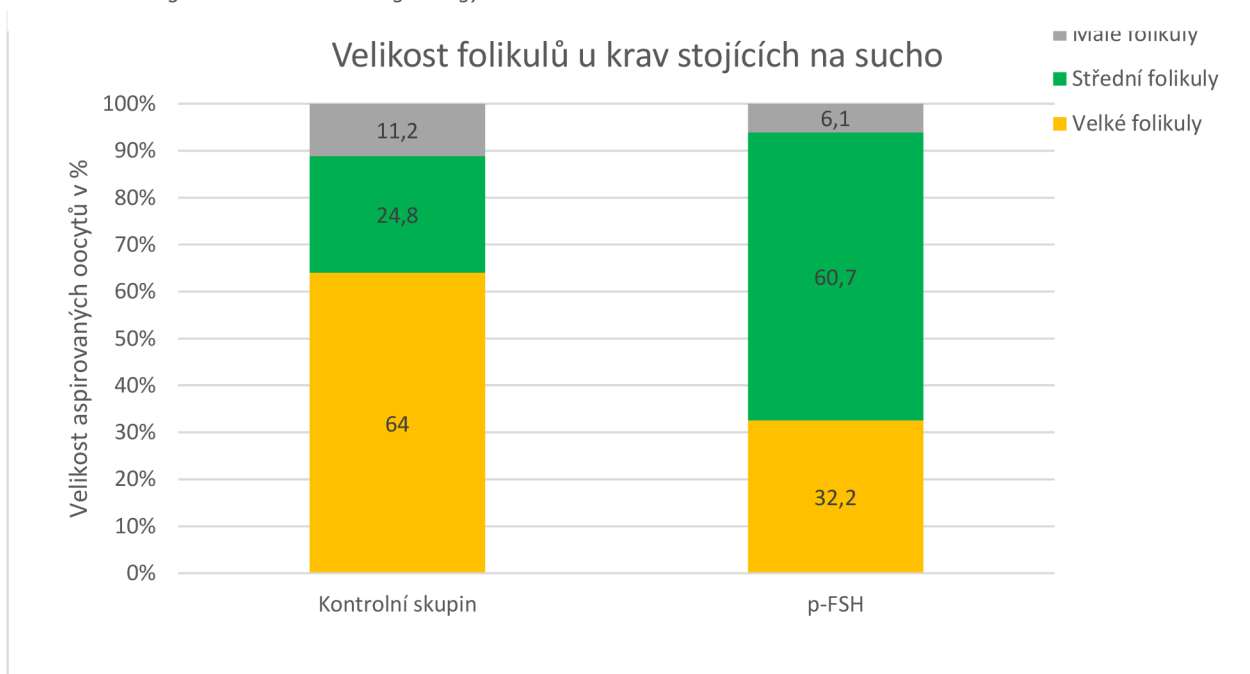
#### **3.8.4 Kvalita oocytů v závislosti na kategorii krav**

Předpubertální dárkyně měly nižší rychlost štěpení a nižší míru blastocyst ve srovnání s dospělými krávami. Což dokazuje nízkou kompetenci pro in vitro produkci embryí (prepubertální: 0,0 %; pubertální: 9,7 %; dojnice: 28,6 %; nelaktující krávy: 32,7 %). Z toho vyplývá, že nejefektivnější kategorie pro IVP jsou nelaktující krávy (Baruselli et al. 2016).

Viera et al (2014) nezjistili žádné významné interakce mezi stimulací p-FSH a fází laktace dárkyně. Celkový počet aspirovaných folikulů byl podobný, avšak krávy stimulované p-FSH měly nižší podíl malých a velkých folikulů a vyšší podíl středních folikulů, jak je znázorněno na obrázku 8 a 9. Zároveň stimulované krávy produkovaly vyšší procento oocytů vhodných ke kultivaci. A v porovnání laktujících a zaprahnutých krav ty nelaktující produkovaly vyšší počet blastocyst a přenosuschopných embryí.



Obrázek 8 upraveno podle Viera LM, Rodrigues CA, Castro Netto A, Guerreiro BM, Silveira CRA, Moreira RJC, Sá Filho MF, Bó GA, Mapletoft RJ, Baruselli PS. 2014. Superstimulation prior to the ovum pick-up to improve in vitro embryo production in lactating and non-lactating Holstein cows. *Theriogenology* 82:318-324



Obrázek 9 upraveno podle Viera LM, Rodrigues CA, Castro Netto A, Guerreiro BM, Silveira CRA, Moreira RJC, Sá Filho MF, Bó GA, Mapletoft RJ, Baruselli PS. 2014. Superstimulation prior to the ovum pick-up to improve in vitro embryo production in lactating and non-lactating Holstein cows. *Theriogenology* 82:318-324

Baruselli et al. (2016) vyhodnotili 3 kategorie jalovic (prepubertální, pubertální a březí jalovice), z nichž se březí jalovice ukázali jako efektivnější. Sice pubertální jalovice měly větší počet získaných oocytů, ale míra štěpení a byla srovnatelná s březími jalovicemi. Ovšem březí jalovice měly větší počet produkovaných embryí na OPU.

IVEP účinnost byla nižší u laktujících dojnic Holštýnského skotu ve srovnání se zaprahnutými krávami nebo masnými plemeny skotu. Bylo prokázáno, že období růstu oocytu a složení RNA je zásadní pro udržení prvních několika buněčných cyklů časného vývoje embrya (Viera et. al 2014).



Dojnice na konci laktace jsou náchylnější k inzulinové rezistenci, která snižuje životaschopnost oocytů během IVP (Baruselli et al. 2016).

Metabolický profil laktujících dojnic je charakterizován nižšími koncentracemi progesteronu a estradiolu a zvýšené koncentraci NEFA a BHBA. Tento metabolismus je spojený se suboptimálním folikulárním mikroprostředím ohrožující kvalitu oocytů a následnému selhání zabřeznutí. Za preferované dárce lze tedy považovat nelaktující krávy z důvodu vyšší výtěžnosti embryí na OPU. Nelaktující krávy produkovaly více blastocyst (41,9 %) než dojnice (13,4 %) a více přenositelných embryí (Baruselli et al. 2016).

Reprodukční trakt po porodu laktujících krav může být méně schopný podporovat rozvoj embrya než u nelaktujících krav důsledkem nižší koncentrace progesteronu v děloze (Rizos et al. 2010).

### **3.8.5 Kvalita oocytů v závislosti na tepelném stresu**

Zvyšující se teplota prostředí je jeden z důvodů snižující se reprodukční výkonnosti. Při tepelném stresu dochází ke zpomalenému vývoji folikulů, produkce steroidních hormonů a expresi genů (Takuma et al. 2010).

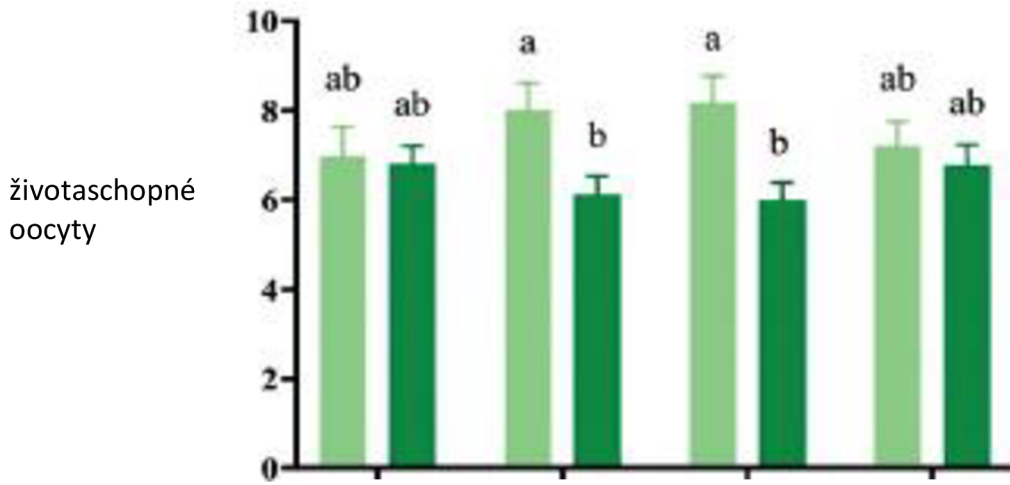
Rychlost produkce embryí in vitro pomocí OPU klesá, když jsou oocyty odebrány kravám, které byly dříve vystaveny tepelnému stresu (Takuma et al. 2010).

Oocyty odebrané během letních měsíců mají sníženou schopnost vyvinout se do stadia blastocysty. Krávy byly vystaveny tepelnému stresu a to teplotám 38,8 °C a 80% relativní vlhkosti během dne a 30,8 °C a 80% relativní vlhkosti během noci na 28 dní. Ve srovnání s krávami z termoneutrální zóny, tepelný stres zvýšil výskyt ovariální folikulární kodominance a snížil koncentraci P4. Ačkoli tepelný stres neměl žádný vliv na rychlost štěpení, vývoj blastocyst byl snížen. Účinky tepelného stresu se projevovaly až 105 dní po jeho ukončení (Baruselli et al. 2012).

Nelaktující krávy ve chladnějším období produkovaly kvalitnější oocyty než při vyšších teplotách. Nicméně sezónní vlivy nebyly pozorovány u březích krav stejně jako poměr oocytů 1. a 2. řádu (Takuma et al. 2010).

Berling et al. (2022) zjistili, že krávy vystavené tepelnému stresu 30 dní před aspirací produkovaly nejméně oocytů. Rozdělili krávy do 4 skupin podle data aspirace. Skupina vystavena tepelnému stresu 90 dní před OPU nevykazovala sníženou produkci oocytů stejně jako skupina, která byla v tepelném stresu až v den aspirace. Ovšem snížená produkce oocytů byla zaznamenána ve skupině krav podléhajícím tepelnému stresu 60 dní před aspirací, jak je vidět na obrázku 10.

### Životaschopné oocyty při OPU



Obrázek 10 upraveno podle Berling F, de Castro FC, dos Santos Oliviera AC. 2022. Influence of heat stress on in vitro oocyte and embryo production in high-yielding Holstein cows. *Ciência Animal Brasileira* <https://doi.org/10.1590/1809-6891v23e-71852E>

## 4 Metodika

Aspirace oocytů z vaječníku dojnic je biotechnologickou metodou, která se ve světě stává rutinní součástí plemenářské práce ve šlechtitelských stádech. V podmínkách ČR prozatím nebyla metodika rozpracována a zavedena do praxe. Diplomová práce vyhodnotí výsledky aspirace oocytů z vaječníků dojnic (množství, kvalita) v závislosti na průběhu jejich energetické bilance po otelení.

Do experimentu pro odběry oocytů byli vybrány krávy na první laktaci přibližně mezi 40-80 DIM v různém metabolickém stavu, který byl posuzován podle poměru tuku a proteinu (T/P) mezi 25-35 DIM (průměr poměru T/P z 22 dojení). Do testu se vybralo 65 prvotelek, s tím že 6 zvířat nebylo odebraných kvůli cystickým útvarům na vaječnicích nebo jiným zdravotním problémům. Nakonec se hodnocení zúčastnilo 59 dojnic od 36 do 82 DIM (průměr 60,11 DIM). Vybrané dojnice byly odebrané dvakrát s týdenním intervalem mezi odběry. Dohromady se uskutečnilo 5 odběrových období (prosinec 2020, květen 2021, listopad 2021, květen 2022 a říjen 2022).

Odběru oocytů předcházelo sonografické vyšetření na základě kterého se pokračovalo s odběrem, nebo byla dojnice vyřazená. Při sonografickém vyšetření taktéž proběhl popis nálezu na obou vaječnicích (přítomnost žlutého tělíska, množství a velikost folikulů, cysty). Dojnicím vhodným pro odběr se aplikovala lokální anestezie (Lidokain). Následně se rektálně lokalizovaly vaječnice a přes pochvu byla zavedená ultrasonografická sonda zakončená odběrovou jehlou, která byla napojená na vakuovou pumpu. Jehlou se propíchl stěna pochvy a vaječník s folikuly se lokalizoval pomocí sonografie. Po zavedení jehly do vaječníku a vyhledání folikulu se začali aspirovat oocyty. Přes hadičku se odebrané oocyty dostaly do 50 ml plastové odběrové zkumavky, v které bylo 10 ml média BoviPlus (OPU recovery médium, Minitube, USA). Po vyjmutí sondy s jehlou z dojnice se hadičky propláchly recovery médiem BoviPlus (OPU recovery médium, Minitube, USA) pro zabezpečení přechodu odebraných oocytů do odběrové zkumavky. Po každém odběru se vyměnila souprava – jehla, hadička a zkumavka.

Médium s odebranými oocyty se odstředilo přes síto pro izolaci oocytů a zbavení se krevních elementů. Oocyty na sítu se propláchly BoviPlus médiem (OPU recovery médium, Minitube, USA). Pipetou se oocyty ze ze síta přenesly do holding média (oocyte holding medium, TL HEPES, Minitube, Německo) pro mikroskopické pozorování (teplota 25-30 °C). Následně se spočítaly odebrané oocyty z každé krávy pomocí stereomikroskopu, které se následně přenesly do epondorfových zkumavek s holding médiem (oocyte holding medium, TL HEPES, Minitube, Německo). Po ukončení odběru zvířat na farmě se odebrané oocyty přenesly do laboratoře (Ústav Živočišné Fyziologie A Genetiky Akademie věd ČR, Liběchov) při teplotě okolo 30 °C pro další vyhodnocení oocytů.

## 4.1 Charakteristika ŠZP Lány

Pokus byl proveden v produkčním prostředí komerční farmy ve středočeském kraji. Školní zemědělský podnik Lány se ve středisku Ruda zaměřuje na chov holštýnského skotu. Nachází se v suché, mírně teplé bramborářské oblasti (412 m n. m.) Velikost produkčního stáda je okolo 480 kusů s průměrnou denní užitkovostí 33,4 kg a užitkovostí za laktaci 9967 kg. Průměr DIM stáda je 190 dní. Dojení probíhá dvakrát denně v rybinové dojárně 2×12 míst. Průtok pro automatické ukončení dojení je nastavený na 0,5 kg min<sup>-1</sup>. Pulzační poměr je 60:40 s 55 cykly za minutu s pod tlakem 43 kPa.

Kompletní krmná směs se skládá ze siláže, senáže, ječného šrotu minerálních doplňků a melasy v rozdílném poměru pro jednotlivé skupiny rozdělené podle fáze laktace. Krmení se zakládá dvakrát denně po dojení a během dne je pravidelně přihrnováno automatickým robotem.

Dojnice jsou ustájeny v hale s lehacími boxy ve třech řadách nastýlanými separátem s přístupem k elektrickému drpadlu. Hnojné chodby jsou shrnovány automatickými lopatami. Ostatní kategorie krav jsou na hluboké podestýlce.

Odchov telat probíhá do dvou měsíců věku ve venkovních individuálních boudách. Poté se přesouvají do skupinové odchovny do střediska v Novém Strašecí.

## 4.2 Sběr dat

Data o dojnicích v testu (pořadí laktace, DIM, datum otelení) a o sledování reprodukčních parametrech (dny do dostavení cyklu po odběru, počet cyklů k zabřeznutí po výplachu, zabřeznutí, úspěšnost zabřeznutí, počet říjí do zabřeznutí, inseminační interval, servis perioda, první estrus po otelení, interinseminační interval, inseminační index) byly zjišťované ze zootechnické dokumentace. Data o mléku byly dostupné z každého dojení v laktaci díky „in-line real-time“ analyzérem (Afifarm verze Afilab with software Afifarm 4.1; Afimilk; Afikim; Israel) a také s kontrolou užitkovosti vykonanou před a po odběru (nádoj, protein %, protein kg, tuk %, tuk kg, laktóza %, počet somatických buněk, močovina). Data a analýzy se zpracovaly a určily se sledované parametry (poměr T/P mezi 25-35 DIM, minimum T/P do 1. výplachu, maximum T/P do 1. výplachu, průměr T/P do 1. výplachu, průměrný denní nádoj do 1. výplachu v kg, průměrná konduktivita do 1. výplachu v mS ·m<sup>-1</sup>, nádoj v den výplachu v kg, T/P v den výplachu, tuk v den výplachu v %, protein v den výplachu v %, konduktivita v den výplachu mS ·m<sup>-1</sup>).

## 4.3 Statistické vyhodnocení

Pro stati stické vyhodnocení výsledků byl použit program SAS 9.4 (SAS ® 9.4, 2013). Pro stanovení základních parametrů souborů byla využita procedura UNIVARIATE. Pro stanovení vzájemných korelací byla využita procedura CORR. Pro vlastní vyhodnocení bylo uvažováno,

že všechny proměnné mají normální rozdělení. Pro vlastní vyhodnocení efektů byl použita procedura GLM, s následným detailním vyhodnocením pomocí Tukey-Kramerova testu. Pro statistické vyhodnocení byly v rámci hodnocení metabolického stavu využity průměrné poměry T/P od otelení do první aspirace (resp. v den výplachu). Tento efekt byl rozdělen do skupin <1; 1 až 1,15 a >1,15 (resp. v den aspirace <1,051; 1,05 až 1,151 a >1,151). Efekt průměrného nádoje byl taktéž rozdělen do tří skupin <25,43 kg; 25,43 až 29,81 kg a > 29,81 kg (resp. v den aspirace <25,81 kg; 25,81 až 30,21 kg a >30,21 kg). Modelová rovnice pro vyhodnocení reprodukčních parametrů obsahovala efekty skupiny průměrného poměru T/P, skupiny průměrného nádoje a lineární regresi na DIM při odběru.

Modelová rovnice má následující tvar:

$$y_{ijk} = \mu + skT/P_i + skNAD_j + b1*(DIM) + e_{ijk}$$

kde:

$y_{ijk}$  = závislé proměnné (výtěžnost, počet žlutých tělísek, počet folikulů celkem, počet folikulů do 0,5 cm, počet folikulů nad 0,5 cm);

$\mu$  = průměrná hodnota závislé proměnné;

$skT/P_i$  = fixní efekt  $i$ té skupiny průměrného poměru tuk/protein v mléce od otelení do první aspirace ( $j < 1$ ,  $n = 20$ ;  $j = 1 - 1,15$ ,  $n = 75$ ;  $j > 1,15$ ,  $n = 32$ );

$skNAD_j$  = fixní efekt  $j$ té skupiny průměrného nádoje od otelení do první aspirace ( $j < 25,43$  kg,  $n = 42$ ;  $j = 25,43$  až  $29,81$  kg,  $n = 42$ ;  $j > 29,81$  kg,  $n = 43$ );

$b1*(DIM)$  = lineární regrese na dny v mléce při aspiraci oocytů;

$e_{ijk}$  = náhodná chyba.

Pro stanovení průkaznosti byly využity následující úrovně:  $P < 0,05$ ,  $P < 0,01$ ,  $P < 0,001$ .

### 4.3.1 Základní statistiky

V tab. 2 je přehled sledovaných faktorů.

Tabulka 2 Základní statistiky sledovaných parametrů

proměnná	n	min.	max.	$\bar{x}$	s	s.e.	V (%)
počet oocytů	107	0	12	1,7	1,86	0,18	109,61
počet žlutých tělísek	120	0	3	0,89	0,62	0,06	69,42
počet folikulů celkem	102	0	31	9,87	4,56	0,45	46,2
folikuly do 0,5 cm	94	0	30	8,32	4,65	0,48	55,94
folikuly nad 0,5 cm	94	0	12	2,11	1,98	0,2	94,04
výtěžnost	104	0	12	2,21	1,97	0,19	89,04
průměrný poměr T/P do 1. výplachu	127	0,91	1,55	1,1	0,13	0,01	11,44
průměrný denní nádoj do 1. výplachu	127	14,42	46,12	27,44	4,99	0,44	18,18

**Vysvětlivky:** n = počet měření; min. = minimum; max. = maximum;  $\bar{x}$  = aritmetický průměr; s = směrodatná odchylka; s.e. = střední chyba aritmetického průměru; V = koeficient variace

Tabulka 3 předkládá sledované parametry v jednotlivých odběrových obdobích (prosinec 2020, květen 2021, listopad 2021, květen 2022 a říjen 2022).

Tabulka 3 Základní statistiky v závislosti na počtu porodů

Rok	proměnná	n	min.	max.	$\bar{x}$	s	s.e.	V (%)
2020	počet oocytů	17	0	3	1,06	1,03	0,25	97,18
	počet žlutých tělísek	27	0	3	0,85	0,77	0,15	90,37
	počet folikulů celkem	9	1	5	3,78	1,86	0,62	49,13
	počet folikulů do 0,5 cm	1	4	4	4,00	,	,	,
	počet folikulů nad 0,5 cm	1	1	1	1,00	,	,	,
	výtěžnost	13	1	4	2,00	0,91	0,25	45,64
	DIM odběru	28	45	73	59,57	8,83	1,67	14,82
	průměrný poměr T/P do 1. výplachu	28	1,01	1,55	1,18	0,15	0,03	12,74
	průměrný denní nádoj do 1. výplachu	28	14,42	36,57	26,63	5,40	1,02	20,26
2021	počet oocytů	39	0	4	1,13	1,20	0,19	106,01
	počet žlutých tělísek	41	0	2	0,95	0,55	0,09	57,35
	počet folikulů celkem	41	0	17	8,78	3,62	0,56	41,18
	počet folikulů do 0,5 cm	41	0	15	6,78	3,57	0,56	52,71
	počet folikulů nad 0,5 cm	41	0	7	2,05	1,94	0,30	94,49
	výtěžnost	39	0	7	2,00	1,75	0,28	87,36
	DIM odběru	47	36	82	62,62	12,17	1,78	19,44
	průměrný poměr T/P do 1.	47	0,91	1,28	1,07	0,08	0,01	7,73

	<b>výplachu</b>							
	<b>průměrný denní nádoj do 1. výplachu</b>	47	18,04	46,12	28,48	5,53	0,81	19,40
<b>2022</b>	<b>počet oocytů</b>	51	0	12	2,35	2,26	0,32	96,10
	<b>počet žlutých tělísek</b>	52	0	2	0,87	0,60	0,08	68,76
	<b>počet folikulů celkem</b>	52	3	31	11,79	4,38	0,61	37,12
	<b>počet folikulů do 0,5 cm</b>	52	0	30	9,62	5,05	0,70	52,51
	<b>počet folikulů nad 0,5 cm</b>	52	0	12	2,17	2,05	0,28	94,14
	<b>výtěžnost</b>	52	0	12	2,42	2,30	0,32	94,73
	<b>DIM odběru</b>	52	44	76	58,08	8,10	1,12	13,95
	<b>průměrný poměr T/P do 1. výplachu</b>	52	0,91	1,47	1,09	0,13	0,02	12,00
	<b>průměrný denní nádoj do 1. výplachu</b>	52	20,43	35,08	26,94	4,12	0,57	15,28

**Vysvětlivky:** n = počet měření; min. = minimum; max. = maximum;  $\bar{x}$  = aritmetický průměr; s = směrodatná odchylka; s.e. = střední chyba aritmetického průměru; V = koeficient variace; T = tuk; P = protein

## 5 Výsledky

### 5.1 Vliv průměrného poměru tuku a proteinu v mléce na hodnocené parametry

Metodou ANOVA byl hodnocen vliv poměru tuku a bílkovin v mléce na výtěžnost, počet žlutých tělísek, celkový počet folikulů, počet folikulů do 0,5 cm a počet folikulů nad 0,5 cm (viz tab. 3). Dojnice byly rozděleny do tří skupin dle poměru tuku a bílkovin v mléce (<1,0; 1,0 – 1,51; >1,51)

Tabulka 4 ukazuje, že nejvyšší výtěžnosti (3,02) dosahovaly zvířata ve skupině <1,0. Naopak dojnice zařazené do skupiny 1,0 – 1,51 vykazovaly nejnižší hodnoty (1,92), přičemž ve skupině s nejvyšším poměrem tuku a bílkovin byla výtěžnost 2,29.

Ovšem ve skupině 2 vyšší počet žlutých tělísek (0,97) v porovnání se zbylými dvěma skupinami (0,79).

Celkový počet folikulů byl nepatrně vyšší ve skupině 3 (10,61) než ve sk. 1 (10,38). Sk. 2 měla celkový počet folikulů nejmenší (9,45).

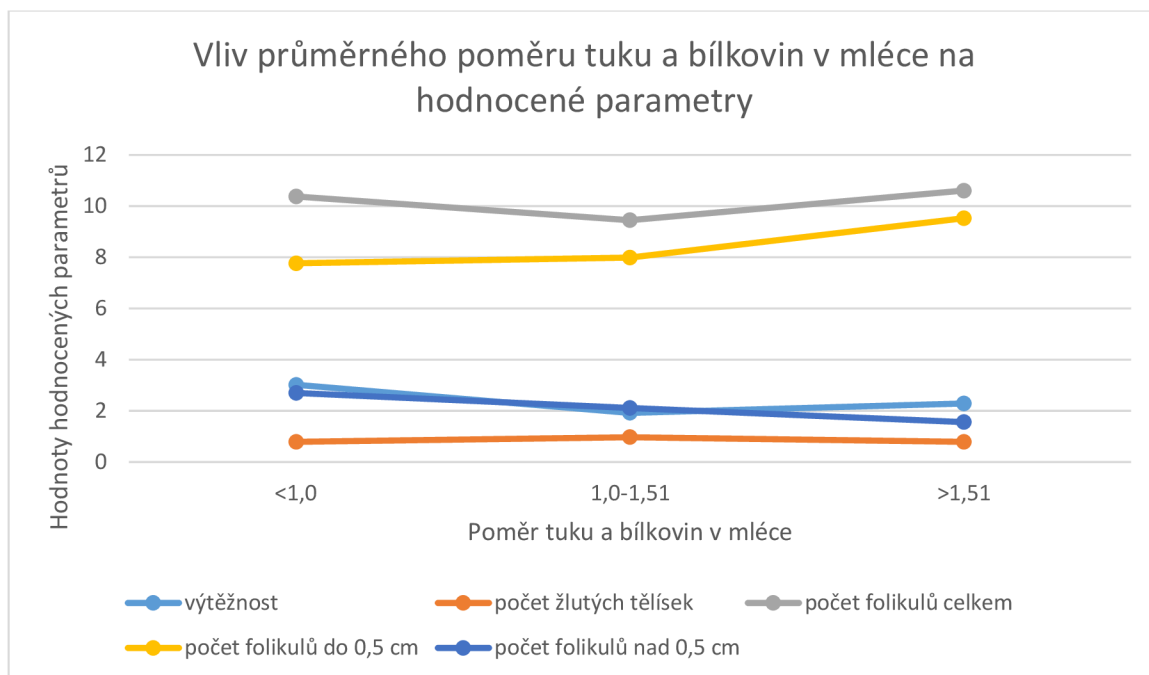
Rovněž počet folikulů do 0,5 cm nejvyšší u sk. 3. Mezi sk. 1 (7,77) a sk. 2 (7,99) byl malý rozdíl, ale folikuly nad 0,5 cm byly nejvíce zastoupeny ve sk. 1 (2,7) v porovnání se sk. 2 (2,12) a sk. 3 (1,56). Což graficky znázorňuje i obrázek 11.

Tabulka 4 vliv průměrného poměru tuku a bílkovin v mléce na hodnocené parametry

efekt	skupina	výtěžnost LSM ± SELSM	počet žlutých tělísek LSM ± SELSM	Počet folikulů celkem LSM ± SELSM	folikuly do 0,5 cm LSM ± SELSM	folikuly nad 0,5 cm LSM ± SELSM
průměrný poměr T/P do výplachu	<1,0 (1)	3,02 ± 0,44	0,79 ± 0,142	10,38 ± 1,023	7,77 ± 1,071	2,7 ± 0,453
	1,0 - 1,51 (2)	1,92 ± 0,258	0,97 ± 0,076	9,45 ± 0,586	7,99 ± 0,646	2,12 ± 0,273
	>1,51 (3)	2,29 ± 0,385	0,79 ± 0,111	10,61 ± 0,946	9,53 ± 1,032	1,56 ± 0,436

**Vysvětlivky:** T = tuk; P = bílkoviny; LSM = průměr opravený o metodu nejmenších čtverců; SELSM = standardní chyba průměru opraveného o metodu nejmenších čtverců





Obrázek 11 vliv průměrného tuku a bílkovin v mléce na hodnocené parametry

## 5.2 Vliv průměrného nádoje na hodnocené parametry

Metodou ANOVA byl taktéž hodnocen vliv průměrného nádoje dojnic rozdělených do tří skupin podle nádoje (<25,43; 25,43 – 29,81; >29,81), na výtěžnost, počet žlutých tělísek, celkový počet folikulů, počet folikulů do 0,5 cm a počet folikulů nad 0,5 cm (viz tab. 5).

Dojnice s denní užitkovostí 25,43 – 29,81 kg dosahovaly výtěžnosti 2,62. Podobné výsledky měly zvířata s průměrným nádojem nižším než 25,43 kg (2,52). Naopak při nádoji vyšším než 29,81 kg byla výtěžnost nejnižší (2,08).

Počet žlutých tělísek je obdobný ve všech třech skupinách ( sk. 1 = 0,87; sk. 2 = 0,8; sk. 3 = 0,87).

Sk. 1 měla jak nejvyšší celkový počet folikulů (11,48) tak i počet folikulů do 0,5 cm (9,22). Naproti tomu sk. 2 měla nejméně celkových folikulů (9,03) a folikulů do 0,5 cm. Sk. 3 měla celkem folikulů 9,93 a folikulů do 0,5 cm 8,38.

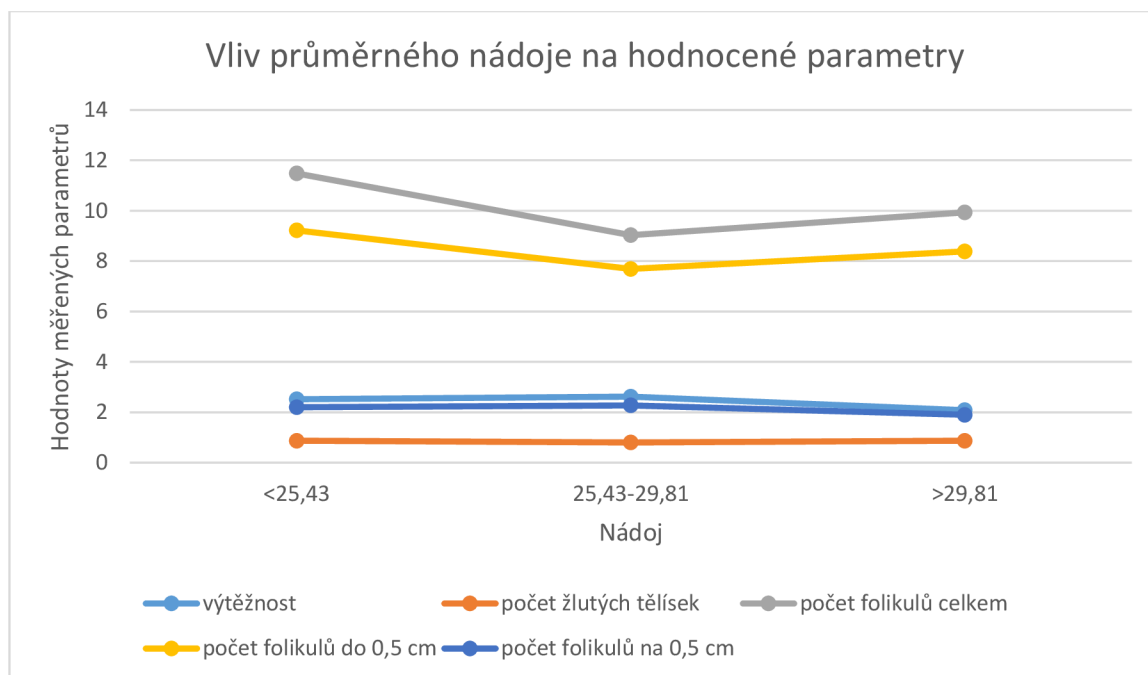
Nejvyšší počet folikulů nad 0,5 cm byl u dojnic ve druhé skupině (2,27), zatímco dojnice s nejnižším nádojem měly vyšší počet těchto folikulů (2,2) než dojnice s nejvyšším nádojem (1,9).

Tabulka 5 vliv průměrného nadoje na hodnocené parametry

efekt	skupina	výtěžnost LSM ± SELSM	počet žlutých tělísek LSM ± SELSM	počet folikulů celkem LSM ± SELSM	počet folikulů do 0,5 cm LSM ± SELSM	počet folikulů nad 0,5 cm LSM ± SELSM
průměrný nadoj do výplachu	<25,43 (1)	2,52 ± 0,327	0,87 ± 0,1	11,48 ± 0,827	9,22 ± 0,865	2,2 ± 0,366
	25,43 - 29,81 (2)	2,62 ± 0,376	0,8 ± 0,112	9,03 ± 0,84	7,69 ± 0,931	2,27 ± 0,393
	>29,81 (3)	2,08 ± 0,338	0,87 ± 0,1	9,93 ± 0,764	8,38 ± 0,835	1,9 ± 0,353

**Vysvětlivky:** LSM = průměr opravený o metodu nejmenších čtverců; SELSM = standardní chyba průměru opraveného o metodu nejmenších čtverců

Na obrázku 12 je graficky znázorněna tabulka 5. Kdy vidíme trend vyšších dosažených hodnot u dojnic s nejnižšími denními nadoji do 25,43 kg.



Obrázek 12 Vliv průměrného nadoje na hodnocené parametry

### 5.3 Korelace

V tabulce 6 jsou vzájemné korelace průměrného denního nadoje do 1. výplachu s hodnocenými parametry (počet žlutých tělísek, celkový počet folikulů, počet folikulů do 0,5 cm, počet folikulů nad 0,5 cm, výtěžnost).

Počet žlutých tělísek slabě negativně koreluje ( $r = -0,083$ ) s průměrným denním nadojem.

Stejně tak můžeme v tabulce vidět slabou negativní korelaci u celkového počtu folikulů (- 0,021), počtu folikulů nad 0,5 cm (-0,138) a výtěžnosti (-0,042).

Kromě slabé pozitivní korelace počtu folikulů do 0,5 cm (0,058) zde pozorujeme trend negativní korelace (čím nižší produkční užitkovost, tím vyšší reprodukční užitkovost).

Tabulka 6 korelace průměrného denního nádoje s hodnocenými parametry

	Počet žlutých tělísek		Počet folikulů celkem		Počet folikulů do 0,5 cm		Počet folikulů nad 0,5 cm		Výtěžnost	
	r	P	r	P	r	P	r	P	r	P
<b>Průměrný denní nádoj do 1. výplachu</b>	-0,083	0,369	-0,021	0,833	0,058	0,581	-0,138	0,185	-0,042	0,672

**Vysvětlivky:** r = korelační koeficient ; P = statistická průkaznost

Korelace v tabulce 7 ukazují vztah mezi průměrných poměrem tuku a bílkovin v mléce do výplachu a hodnocenými faktory. Počet žlutých tělísek slabě negativně koreluje (r = - 0,013).

Celkový počet folikulů (r = -0,078), počet folikulů do 0,5 cm (r = -0,035), počet folikulů nad 0,5 cm (r = -0,049) a výtěžnost (r = -0,078) také slabě negativně korelují.

Ani zde nemáme statisticky průkazné výsledky.

Tabulka 7 korelace průměrného poměru T/P s hodnocenými parametry

	Počet žlutých tělísek		Počet folikulů celkem		Počet folikulů do 0,5 cm		Počet folikulů nad 0,5 cm		Výtěžnost	
	r	P	r	P	r	P	r	P	r	P
<b>Průměrný poměr T/P do výplachu</b>	-0,013	0,892	-0,078	0,434	-0,035	0,741	-0,049	0,639	-0,087	0,381

**Vysvětlivky:** T = tuk; P = protein; r = korelační koeficient; P = statistická průkaznost

I v tabulce 8, která popisuje vztah DIM odběru s hodnocenými parametry pozorujeme slabě negativní korelaci, kromě vztahu mezi DIM odběru a počtu žlutých tělísek (r = 0,028).

Ostatní parametry celkový počet folikulů (r = -0,119), počet folikulů do 0,5 cm (r = - 0,053), počet folikulů nad 0,5 cm (r = -0,1) a výtěžnost (r = -0,035) korelují negativně a všechny hodnoty v tabulce jsou statisticky neprůkazné.

Tabulka 8 korelace DIM odběru s hodnocenými parametry

	Počet žlutých tělísek		Počet folikulů celkem		Počet folikulů do 0,5 cm		Počet folikulů nad 0,5 cm		Výtěžnost	
	r	P	r	P	r	P	r	P	r	P
<b>DIM odběru</b>	0,028	0,759	-0,119	0,233	-0,053	0,612	-0,1	0,336	-0,035	0,724

**Vysvětlivky:** DIM (days in milk)= den laktace; r = korelační koeficient; P = statistická průkaznost

## 6 Diskuze

Cílem práce bylo vyhodnotit výsledky metody ovum pick-up a ověřit zda při negativní energetické bilanci bude nižší počet odebraných oocytů. Hailay et al. (2019) popsal NEB jako nejvýznamnější důvod ovlivnění plodnosti.

Metabolický a oxidační stres časně po porodu má dlouhodobé účinky na funkci granulóznic buněk v preovulaci, což negativně ovlivňuje kvalitu odebraných oocytů u vysokoprodukčních dojnic (Walee et al. 2022) a dále s tím silně koreluje nadměrná mobilizace tuku a vysoká míra ztráty BCS (Sakaguchi 2011).

Výsledky práce odkazují na jistý trend, který ukazuje, že při nižší produkční užitkovosti jsou reprodukční výsledky lepší. Tento fakt nejvíce pozorujeme u porovnání průměrného nádoje, kdy dojnicím s denním nádojem do 25,43 kg bylo celkem odebráno nejvíce folikulů (11,48). Podobných výsledků dosáhli i Matoba et al. (2011), kteří odebrali v průměru na jednu aspiraci oocytů  $11,0 \pm 4,8$  folikulů.

Nejvíce folikulů ( $11,48 \pm 0,83$ ) bylo odebráno od dojnic s denní užitkovostí do 25,43 v porovnání s dojnicemi při užitkovosti nad 25,43 kg z tohoto lze usoudit, že užitkovost negativně ovlivňuje tvorbu folikulů na vaječnicích. Naproti tomu Snijders et al. (1999) uvádějí, že úroveň produkce mléka nemá žádný vliv na kvalitu oocytů. Ovšem studie Buckley et al. (2003) prokázala pozitivní spojitost mezi reprodukční výkonností a dojivostí. Vztahem mezi dojivostí a reprodukcí se zabýval i Morton (2001). Nenašel sice žádný vztah mezi těmito faktory, ale popsal vztah, kdy při větším obsahu mléčné bílkoviny na počátku laktace byla podstatně lepší reprodukční výkonnost. To potvrzují i naše výsledky, kdy při poměru tuku a bílkovin nad 1,51 bylo odebráno nejvíce folikulů  $10,61 \pm 0,946$ . Pokud budeme brát v úvahu velikost folikulů pak tyto výsledky nejsou tak jednoznačné, jelikož od této skupiny pocházelo nejnižší množství folikulů nad 0,5 cm ( $1,56 \pm 0,436$ ). Yaakub et al. (1997) uvádí že špatná kvalita oocytů byla zaznamenána u krav s vysokou produkcí mléka a slabým fyzickým stavem.

Toto tvrzení rozšířil Aysan et al. (2011). Při produkci nižší než 5000 kg mléka za laktaci bylo procento vhodných embryí 68,64 % ve srovnání s krávami o užitkovosti mezi 5000 a 7000 kg (57,46 %) a při produkci nad 7000 kg za laktaci (51,09 %), což by byl náš případ. To by by mohl být námět pro další studii. Nicméně v rozporu s těmito výsledky je studie Yaniz et al. (2008), který vyvrací negativní vliv vysoké užitkovosti na plodnost. V tomto experimentu byly zvoleny nepravidelné odběry při kterých byl vyšší celkový počet folikulů a malých folikulů. Obdobné výsledky zjistili i Sales et al. (2016) , kdy velké a střední folikuly byly pozorovány spíše u pravidelných týdenních aspirací. Tento výsledek ještě rozšířila Imai et al. (2006), kteří uvedli, že odběry dvakrát týdně vynesly o polovinu méně oocytů a následně i procento oocytů vyvinutých do stádia blastocyst bylo nižší. Boni (2012) analyzoval růst folikulů při kontinuálních odběrech 2× týdně po dobu třech měsíců. Počet folikulů se od těchto dojnic pohyboval od  $7,8 \pm 2,5$  do  $19,2 \pm 6$ . Při následných omezených odběrech se po dobu tří měsíců počty zvýšily na  $11,8 \pm 4,7$  a  $16,4 \pm 6,5$ . Pokud bychom tyto výsledky porovnali s výsledky našeho experimentu z roku 2022, byl počet folikulů  $11,79 \pm 4,38$  budou obdobné i při nepravidelných odběrech. Tyto rozdíly intervalů mohly ovlivnit další

proměnné jako např. klimatické podmínky, stres zvířat, rozdílnost krmných dávek, metabolický stav aj.

Po vysokém příjmu krmiva, kdy dojnice měly přírůsteky 950 g/den, se následně příjem omezil a na začátku tohoto období se reprodukční činnost zlepšila. Vliv krmné dávky, její složení a množství, nebyl v tomto experimentu započítán. Další výzkum by tedy mohl vzít v úvahu i tuto skutečnost.

Tepelný stres ovlivňuje všechen skot chovaný pro mléko a stává se tak celosvětovým problémem (Angel et al 2018). Dojnice vystavené 30 - 60 dní před OPU tepelnému stresu produkovaly méně života schopných oocytů než ty, které tepelnému stresu byly vystaveny v den aspirace či 90 dní před ní (Takuma et al. 2010). Při teplotě do 10 °C byl počet folikulů na OPU 8,72 v porovnání s teplotami v rozmezí 10 – 25 °C = 6,32 a s teplotou nad 25 °C = 6,85. Naše statistiky ukazují progres v závislosti roku. Ovšem v prosinci 2020 byla průměrná teplota 2,67 °C a tento měsíc se odebral 1,06 oocytu na OPU. V roce 2021 se odběry uskutečnily v květnu a v listopadu, kdy v květnu byla průměrná teplota 13,78 °C a v listopadu 5,18 °C. Za celý kalendářní rok byla průměrná teplota 10,15 °C. V tomto roce bylo odebráno 1,13 oocytu na OPU. V porovnání s rokem 2022 bylo získáno 2,35 oocytů na OPU, kdy OPU byly provedeno v květnu s průměrnou teplotou 17,25 °C a v říjnu s průměrnými 11,94 °C a celoročním průměrem 11,2 °C. Naproti tomu Cizmeci et al. (2022) získali celkem nejvíce oocytů od krav, které byly vystaveny teplotám nad 25 °C. Tyto výsledky by mohly být srovnatelné s našimi, pokud ale porovnáme ostatní údaje jejich studie jako jsou: oocyty na OPU; životaschopné oocyty; počet blastocyst na OPU; četnost blastocyst, uvidíme vyšší hodnoty u krav, které byly vystaveny méně jak 10 °C. Tyto výsledky potvrzují i Berling et al. (2022) a Liu et al. (2019), kteří dokládají, že vysokoprodukční dojnice *Bos taurus* v porovnání s *Bos indicus* mají nižší schopnost odvádět teplo do okolí. Tím je zatížena i reprodukce a snižuje se schopnost generovat blastocysty z aspirovaných oocytů. Jelikož teploty v našem experimentu nebyly měřeny přímo na místě, jsou tyto hodnoty pouze orientační. V roce 2022 bylo odebráno nejvíce oocytů, což by mohlo mít za následek nabývající zkušenosti postupem experimentu.

Pokud se zaměříme na problematiku hormonů, která přímo ovlivňuje reprodukční schopnost, zjistíme, že jiné studie (Cavaliere et al. 2018) a Boni (2012) dokazují zvýšený počet embryí z aspirovaných oocytů při hormonální synchronizaci říjovéhoho. Synchronizace dárkyň tak umožňuje aspirovat více homogenních folikulů ve vztahu k velikosti a vývojové fázi, což podporuje obnovu kompetentnějších oocytů. Je tedy možné, že při použití hormonální synchronizace by byl počet oocytů vyšší než v tomto experimentu bez hormonální synchronizace. Jednu ze synchronizací použili Da Silva et al. (2019). Aplikovali FSH jako alternativu k obnově oocytů při aspiraci. Blondin et al. (2012) odebrali po aplikaci FSH nejkvalitnější folikuly pro produkci embryí. Folikuly velké 7-10 mm se po aspiraci rychle zotavují.

Viera et al. (2014); Oliviera et al. (2016); Baruselli et al. (2016) s FSH neměli tak dobré výsledky. Stimulace FSH rovněž zvýšila počet středně velkých folikulů, ale jejich nižší

výtěžnost snížila přínos této superstimulace. Ovšem při aplikaci LH 6 hodin před OPU byla větší míra blastocyst.

Další možnou synchronizaci rozpracoval Boni (2012). Jedná o synchronizaci PMSG, při které zvýšil počet aspirovaných folikulů. PMSG zároveň snižuje míru stresu oproti FSH. A to zejména kvůli nižším počtům aplikací, což snižuje i množství práce a náklady (Son et al. 2022). Baruselli et al. (2012) stimuloval vaječníky pomocí goandotropinů.

Studie Lopez et al. (2005) popisuje vztah s kodominantními folikuly. Dojnice s kodominantními folikuly produkovaly více mléka ( $47,9 \pm 1,0$  kg/den) než krávy s jedním dominantním folikulem ( $37,8 \pm 0,7$  kg/den). Tyto výsledky naznačují ovlivnění spíše kodominancí než endokrinním prostředím.

V porovnání s jinými plemeny je celkový průměr počtu folikulů *Bos Indicus* ( $8,12 \pm 3,29$ ) srovnatelný s výsledky Boni (2012), který odebral  $8,0 \pm 2,7$  folikulů od holštýnských krav. Porovnával však ještě vliv plemene Gir od kterých aspiroval  $12,1 \pm 3,9$  folikulů. Největší počet folikulů získal od kříženek holštýnského skotu (1/2) a Gir (1/2). Dalo by se to vysvětlit nižší užitkovostí plemene Gir, kdy dojnice nepotřebují tolik energie na tvorbu mléka. Tato „zbytková“ energie se tím pádem využije v reprodukci. Baruselli et al. (2012) porovnává různá plemena v kvalitě oocytů. Holštýnský skot má kvalitnější oocyty odebrané metodou OPU než dánský skot, ovšem krávy plemene Aberdeen Angus, v tropech na pastvinách, měly kvalitnější oocyty než holštýnské dojnice. Z tohoto pokusu lze vyvodit, že tepelný stres nemá vliv na kvailtu oocytů v porovnání s plemenem. Při tomto pokusu je nutné brát v potaz, že masné plemeno Aberdeen Angus nemá tak velké energetické nároky jako mléčné plemeno Holštýnský skot. Da Silva et al. (2019) rovněž pozoroval kvalitu oocytů, přičemž lépe cvýšly masné krávy. Tudíž hormonální synchronizace by tyto rozdíly mohla vyrovnat.

V dalším výzkumu by bylo dobré zařadit do sledovaných parametrů ovlivnění krmnou dávkou reprodukční činnost, jelikož negativní energetická bilance je jeden z nejzásadnějších problémů ovlivňující dojnice po otelení. S NEB spojený pokles hormonů jako např. IGF-, inzulin, které snižují produkci folikulů jak dokazuje studie Sales et al. (2015). Jelikož se produkce mléka v posledních letech rapidně zvýšila a trend velkých konvenčních chovů tlačí podniky ke stále vyšší doživosti, je metoda ovum pick-up jedna z variant, jak zlepšit reprodukci u takto vysokoužitkových zvířat. Dojnice po otelení mají nedostatek glukózy, tudíž jejich organismus začíná metabolizovat tukové zásoby za vzniku neesterifikovaných mastných kyselin a betahydroxybutyrát, což jsou ukazatele NEB. Tyto ukazatele mají negativní vliv na folikulogenezi (Hailay et al. 2019). Dle těchto výsledků by pro OPU byly ideální kategorie dojnic čtvrtý měsíc po otelení, či přidávat suplement s obsahem glukózy do krmné dávky, jak dokládá Gardinal et al. (2016). Nicméně Baruselli et al. (2012) při podávání vysokoenergetické krmné dávky sledoval snížený počet blastocyst. Takuma et al. (2010) potvrdil výsledky Sales et al. (2015), že snížený příjem sušiny vede ke snížení počtu oocytů při teplejším období, což je spekulativní zda tyto výsledky ovlivňuje nízký příjem sušiny nebo tepelný stres.

V této návaznosti by bylo dobré využít hormonální léčbu pro zvýšení reprodukční činnosti např. superstimulací FSH, jak dokládají Viera et al. (2014); Da Silva et al. (2019);

Oliviera et al. (2016); Baruselli et al. (2016). Z ekonomického hlediska by tato stimulace znamenala další vstupy, ale díky všem biotechnologickým metodám se nejenže zlepšuje reprodukční činnost, ale zároveň se zvyšuje úroveň zvířat, díky výběru nadprůměrných dárkyň.

Vhodná volba dárkyň může značně ovlivnit úspěšnost OPU. Podle Baruselli et al. (2016) jsou nejvhodnější zaprahnuté krávy, které nejsou negativně ovlivněné produkcí mléka. K podobným výsledkům dospěl i Viera et al. (2014). Z prepubertálních, pubertálních a březích jalovic vyhodnotil Baruselli et al. (2016) a jako nejvhodnější se ukázaly březí jalovice, které měly větší počet produkovaných embryí na OPU. Zároveň Viera et al. (2014) porovnával laktující krávy s nelaktujícími a masnými plemeny. Laktující krávy měly nižší výsledky než ostatní kategorie krav. Baruselli et al. (2016) rovněž porovnával jalovice, dojnice a krávy stojící na sucho, kdy u jalovic byla výtěžnost 9,7 %, u dojnic 28,6 % a u krav stojících na sucho 32,7 %.

Do dalšího měření je třeba zahrnout i jiné kategorie krav. Dojnice, které dokončily růst, a tak nevyžívají energii na vývin a produkci mléka zároveň, dále dojnice v různých fázích laktace s různými energetickými nároky, krávy stojící na sucho či krávy jalové. Nejlepší výsledky by podle dostupných studií měly mít krávy stojící.

Výsledky experimentu ukazují a korespondují s mnoha předešlými studiemi, že produkční užitkovost negativně ovlivňuje reprodukční činnost. Jak už bylo zmíněno, dojnice zařazené do skupiny s nejnižším denním nádojem do 25,43 kg produkovaly nejvyšší množství folikulů v porovnání s dalšími dvěma skupinami. To potvrzují i korelace, kdy kromě počtu folikulů do 0,5 cm (slabá pozitivní korelace:  $r = 0,058$ ) nabývaly negativních slabých hodnot. Tak tomu bylo i u korelací průměrného poměru tuku a bílkovin v mléce. DIM v den odběru poukazuje na slabou pozitivní korelaci vůči počtu žlutých tělísek. Ostatní hodnocené parametry, taktéž slabě negativně korelují.

Vyhodnocení experimentu poukazuje na negativní závislost mezi užitkovostí a reprodukci. Je tedy nutné se zaměřit na dostupné varianty zlepšování reprodukce jako jsou zmíněné biotechnologické metody (FSH stimulace, kategorie krav – nelaktující krávy měli lepší výsledky než ostatní kategorie krav např. jalovice, laktující krávy atd. (Baruselli et al. 2016), či optimalizování podmínek chovu.

Navazující experiment by měl zahrnout také stres dojnic, kterému jsou vystaveny na dojárně, při sociálních vztazích, konkurenci u krmného stolu nebo při zdravotních potížích. Jelikož OPU bylo prováděno po ranním dojení, mohl stres při dojení ovlivnit i výsledky aspirace v experimentu.



## 7 Závěr

Cílem práce bylo vyhodnotit, zda při výrazněji negativní energetické bilanci bude počet odebraných oocytů nižší. Ačkoli korelace vycházejí slabě negativně, nebyly zjištěny statisticky významné výsledky, kde by se prokázala statistická průkaznost.

Experimentu se účastnilo 65 dojnic na první laktaci, ale 6 z nich nebylo aspirováno kvůli cystickým útvarům na vaječnicích nebo kvůli jiným zdravotním problémům. Dojnicím s nižší užitkovostí do 25,43 kg/den bylo odebráno nejvíce folikulů, ale dojnice, které měly denní nádoje mezi 25,43 a 29,81 kg, dosahovaly vyšší výtěžnosti, jelikož produkovaly větší počet folikulů nad 0,5 cm. Výsledky tedy odkazují na trend: čím vyšší produkce, tím nižší reprodukce. Biotechnologické metody jsou logisticky náročnější. Pokud se bude užitkovost nadále zvyšovat, je nutné rozvinout biotechnologické metody i v ČR.

Vzhledem k tomu, že výsledky nejsou průkazné, je možné, že byla vybrána jedna kategorie zvířat a to prvotelky s podobnými laktačními dny, tudíž výsledky není možné porovnat s ostatními kategoriemi krav, které v jiných studiích měly lepší výsledky naoř. Baruselli et al. (2016)

Úspěšnost ovlivňuje mnoho faktorů, kterým je třeba věnovat pozornost. Jedním z nejdůležitějších vlivů je kvalitní krmná dávka. Další faktory jako je hormonální stimulace či tepelný stres mohou značně ovlivnit reprodukční schopnost. Možností jak rozšířit výsledky by bylo vhodné zařadit v navazující studii další kategorie krav, pracovat s dostupnými synchronizačními programy a zabývat se tepelným stresem, který celosvětově ovlivňuje reprodukční schopnosti dojných plemen.

## 8 Literatura

- Angel SP, Amitha JP, Rashamol VP, Vandana GD, Savitha ST, Afsal A, Bagath M, Krishnan G, Sejian V. 2018. Climate change and cattle production: impact and adaptation. *Journal of Veterinary Medicine and Research* **5**:1134.
- Atrian P, Shahryar AH. 2012. Heat stress in Dairy Cows (A Review). *Zoology* **2**:31-37.
- Aysan T, Hizli H, Çamlıdag A, Kara U, Gök K, Karakozak E, Çoban S, Mutlu H, Kiliçalp N, Segmenoglu MS. 2011. Determination of relationship between milk production and the quality of embryo of donor cows. *Indian Journal of Animal Science* **81**:16-18.
- Balboula AZ, Aboelenain M, Sakatani M, Yamanaka KI, Bai H, Shirozu T, Kawahara M, Hegab AEO, Zaabel SM, Takahashi M. 2022. Effect of E-64 supplementation during *in vitro* maturation on the developmental competence of bovine OPU-derived oocytes. *Genes* **13**, 324 <https://doi.org/10.3390/genes13020324>
- Baldassare H. 2021. Laparoscopic ovum pick-up followed by *in vitro* embryo production and transfer in assisted breeding programs for ruminants. *Animals* **11**, 216 <https://doi.org/10.3390/ani11010216>
- Baruselli PS, Batista EOS, Vieira LM, Ferreira RM, Guerreiro BG, Bayeux BM, Sales JNS, Souza AH, Gimenes LU. 2016. Factors that interfere with oocyte quality for *in vitro* production of cattle embryos: effects of different developmental & reproductive stages. *Animal reproduction* **13**:264-272.
- Baruselli PS, Sá Filho MF, Ferreira RM, Sales JNS, Gimenes LU, Vieira LM, Mendanha MF, Bó GA. 2012. Manipulation of follicle development to ensure optimal oocyte quality and conception rates in cattle. *Reproduction in Domestic Animals* **47**:134-141.
- Berling F, de Castro FC, dos Santos Oliviera AC. 2022. Influence of heat stress on *in vitro* oocyte and embryo production in high-yielding Holstein cows. *Ciência Animal Brasileira* <https://doi.org/10.1590/1809-6891v23e-71852E>
- Becker CA, Collier RJ, Stone AE. 2020. *Invited review*: Physiological and behavioral effects of heat stress in dairy cows. *Journal of Dairy Science* **103**:6751-6770.
- Blondin P, Vigneault C, Nivet AL, Sirard MA. 2012. Improving oocyte quality in cows and heifers – What we learned so far? *Animal Reproduction* **9**:281-289.
- Boni R. 2012. Ovum pick-up in cattle: a 25yr retrospective analysis. *Animal Reproduction* **9**:362-369.
- Buckley FP, O’Sullivan K, Mee JF, Evans RD, Dillon P. 2003. Relationships among milk yield, body condition, cow weight and reproduction in spring-calved Holstein-Friesians. *Journal of Dairy Science* **86**:2308-2319.
- Burdych V, Kocmánek J, Holásek R, Andrlíková M, Kořínek D, Kučera J. 2021. Reprodukce skotu. Jiprint s.r.o., Jihlava.

- Carvalho PD, Souza AH, Amundson MC, Hackbart KS, Fuenzalida MJ, Herlihy MM, Ayres H, Dresch AR, Vieira LM, Guenther JN, Grummer RR, Fricke PM, Shaver RD, Wiltbank MC. 2014. Relationships between fertility and postpartum changes in body condition and body weight in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* **97**:3666-3683.
- Cavaliere FLB, Morotti F, Seneda MM, Colombo AHB, Anderazzi MA, Emanuelli IP, Rigolon LP. 2018. Improvement of bovine in vitro embryo production by ovarian follicular wave synchronization prior to ovum pick-up. *Theriogenology* **117**:57-60.
- Çizmecı SÜ, Dinç DA, Yesilkaya OF, Çiftçi MF, Takci A, Bucak MN. 2022. Effects of Heat-Stress on Oocyte Number and Quality and In Vitro Embryo Production in Holstein Heifers. *Acta Scientiae Veterinariae* **50**:1870 <https://doi.org/10.22456/1679-9216.122371>
- Da Silva BLM, Adona PR, Guemra S, Monzan PS, Dos Santos Miranda M. 2019. Ovum pick-up: cows treated with single doses of follicle stimulating hormone. *Journal of Agriculture Science* 10, 11 doi:10.5539/jas.v11n10p231.
- Deb GK, Jin JI, Kwon TH, Choi BH, Bang J, Dey SR, Cho IR, Kong K. 2011. Improved blastocyst development of single cow OPU-derived presumptive zygotes by group culture with agarose-embedded helper embryos. *Reproductive Biology and Endocrinology* 9, 121 <https://doi.org/10.1186/1477-7827-9-121>
- Demetrio D, Demetrio C, Oliviera M, Reis R, Santos R. 2022. From oocyte to calf: practical aspects of bovine in vitro embryo production. *Clinical Theriogenology* **14**:193-201.
- Gandra JR, Verdurico LC, Mingoti RD, Takiya CS, Gardinal R, Vendramini THA, Barletta RV, Visintin JA, Rennó FP. 2017. Whole flaxseed, rapeseed, and calcium salts of fatty acids supplementation for transition cows: follicle development and embryo quality. *Italian Journal of Animal Science* **16**:538-545.
- Gardinal R, Calomeni GD, Zanferari F, Vendramini THA, Takiya CS, Del Valle TA, Renno FP. 2016. Different durations of whole raw soybean supplementation during the prepartum period: Milk fatty acids profile and oocyte and embryo quality of early-lactating Holstein cows. *Journal of Dairy Science* **101**:675-689.
- Hailay T, Hoelker M, Poirier M, Gebremedhn S, Rings F, Saeed-Zidane M, Salilew-Wondim D, Dauben Ch, Tholen E, Neuhoff Ch, Schellander K, Tesfaye D. 2019. Extracellular vesicle-coupled miRNA profiles in follicular fluid of cows with divergent post-calving metabolic status. *Scientific Reports* 9, 12851 <https://doi.org/10.1038/s41598-019-49029-9>
- Liu J, Li L, Chen X, Lu Y, Wang D. 2019. Effects of heat stress on body temperature, milk production, and reproduction in dairy cows: a novel idea for monitoring and evaluation of heat stress – A review. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* **32**:1332-1339.
- Lopez H, Caraviello DZ, Satter LD, Fricke PM, Wiltbank MC. 2005. Relationship between level of milk production and multiple ovulations in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* **88**:2783-2793.

- Marei WFA, De Bie J, Xhonneux I, Andries S, Britt JH, Leroy JLMR. 2022. Metabolic and antioxidant status during transition is associated with changes in the granulosa cell transcriptome in the preovulated follicle in high – producing dairy cows at the time of breeding. *Journal of Dairy Science* **105**:6956-6972.
- Martins JPN, Pursley JR. 2016. Fertility programs for lactating dairy cows, their physiological basis, and the factors that are critical for their success. *Animal Reproduction* **13**:283-289.
- Matoba S, O’Hara L, Carter F, Kelly AK, Fair T, Rizos D, Lonergan P. 2011. The association between metabolic parameters and oocyte quality early and late postpartum in Holstein dairy cows. *Journal of Dairy Science* **95**:1257-1266.
- Morton JM. 2001. High genetic merit and high-producing dairy cows in commercial Australian herds don’t have substantially worse reproductive performance. *Br. Sc. Anim. Sci.* **26**:305-311.
- Nowicki A, Barański W, Baryczka A, Janowski T. 2017. OvSynch protocol and its modifications in the reproduction management of dairy cattle herds – an update. *Journal of veterinary* **61**:329-336.
- O’Doherty AM, O’Gorman A, al Naib A, Brennan L, Daly E, Duffy P, Fair T. 2014. Negative energy balance affects imprint stability in oocytes recovered from postpartum dairy cows. *Genomics* **104**:177-185.
- Oikawa T, Itahashi T, Numabe T. 2016. Improved embryo development in Japanese black cattle in vitro fertilization using ovum pick-up plus intracytoplasmic sperm injection with dithiotreitol. *Journal of Reproduction and Development* **62**:11-16.
- Oliviera LH, Sanches CP, Seddon AS, Veras MB, Lima FA, Monteiro PLI, Wiltbank MC, Sartori R. 2016. Short communication: Follicle superstimulation before ovum pick-up in vitro embryo production in Holstein cows. *Journal Dairy Science* **99**:9307-9312.
- Pereira MHC, Sanches CP, Guida TG, Rodrigues ADP, Aragon FL, Veras MB, Borges PT, Wiltbank MC, Vasconcelos JLM. 2013. Timing of prostaglandin F<sub>2α</sub> treatment in an estrogen-based protocol for timed artificial insemination or timed embryo transfer in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* **96**:2837-2846.
- Polsky L, von Keyserlingk MAG. 2017. *Invited review*: Effects of heat stress on dairy cattle welfare. *Journal of Dairy Science* **100**:8645-8657.
- Poirier M, Tesfaye DD, Hailay T, Salilew-Wondim D, Gebremedhn S, Rings F, Neuhoﬀ Ch, Schellander K, Hoelker M. 2020. Metabolism-associated genome-wide epigenetic changes in bovine oocytes during early lactation. *Scientific Reports* 10, 2345 <https://doi.org/10.1038/s41598-020-59410-8>
- Reece WO. 2010. *Fyziologie a funkční anatomie domácích zvířat*. Grada, Praha.

- Rizos D, Carter F, Besenfelder U, Havlicek V, Lonergan P. 2010. Contribution of the female reproductive tract to low fertility in postpartum lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* **93**:1022-1029.
- Sakaguchi M. 2011. Practical aspects of the fertility of dairy cattle. *Journal of Reproduction Development* **57**:17-33.
- Sales JNS, Iguma LT, Batista RITP, Quintão CCR, Gama MAS, Freitas C, Pereira MM, Camargo LSA, Viana JHM, Souza JC, Baruselli PS. 2015. Effects of a high-energy diet on oocyte quality and in vitro embryo production in *Bos indicus* and *Bos taurus* cows. *Journal of Dairy Science* **98**:3086-3099.
- Schüller LK, Burfeind O, Heuwieser W. 2014. Impact of heat stress on conception rate of dairy cows in the moderate climate considering different temperature-humidity index thresholds, periods relative to breeding, and heat load indices. *Theriogenology* **81**:1050-1057.
- Snijders SEM, Dillon P, O'Callaghan D, Boland MP. 1999. Effect of genetic merit, milk yield, body condition score and lactating number on in vitro oocyte development in dairy cows. *Theriogenology* **53**:984-989.
- Son Y-B, Jeong YI, Hossein MS, Yu X, Olsson PO, Kang M, Kim H, Bae Y, Tinson A, Singh KK, Rajesh S, Noura AS, Hwang WS. 2022. Influence of PMSG on superstimulation and embryo development following somatic cell nuclear transfer in Holstein cows in the United Arab Emirates. *Veterinary Science* **9**:895325  
<https://doi.org/10.3389/fvets.2022.895325>
- Svaz chovatelů holštýnského skotu ČR, z.s. 2024. O plemeni, Svaz chovatelů holštýnského skotu ČR, z.s. Available from <https://www.holstein.cz/cz/o-plemeni> (accessed January 2024).
- Sveberg G, Refsdal AO, Erhard HW, Kommisrud E, Aldrin M, Tvette IF, Buckley F, Waldmann A, Ropstad E. 2011. Behavior of lactating Holstein-Friesian cows during spontaneous cycles of estrus. *Journal of Dairy Science* **94**:1289-1301.
- Takuma T, Sakai S, Ezoe D, Ichimaru H, Jinnouchi T, Kaedei Y, Nagai T, Otoi T. 2010. Effects of season and reproductive phase on the quality, quantity and developmental competence of oocytes aspirated from Japanese black cows. *Journal of Reproduction and Development* **56**:55-59.
- Viera LM, Rodrigues CA, Castro Netto A, Guerreiro BM, Silveira CRA, Moreira RJC, Sá Filho MF, Bó GA, Mapletoft RJ, Baruselli PS. 2014. Superstimulation prior to the ovum pick-up to improve in vitro embryo production in lactating and non-lactating Holstein cows. *Theriogenology* **82**:318-324.
- Wiltbank MC, Baez GM, Vasconcelos JLM, Pereira M, Souza AH, Sartori R, Pursley JR. 2014. The physiology and impact on fertility of the period of proestrus in lactating dairy cows. *Animal Reproduction* **11**:225-236.

- Wolfenson D, Thatcher WW, Badinga L, . 1995. Effect of heat stress on follicular development during the estrous cycle in lactating dairy cattle. *Biology Reproduction* 52:1106-13 <https://doi.org/10.1095/biolreprod52.5.1106>
- Yaakub H, O'Callaghan D, O'Doherty JV, Boland MP. 1997. Effect of dietary intake on follicle numbers and oocyte morphology in unsuperovulated and superovulated ewes. *Theriogenology* **47**:182.
- Yaniz J, Lopez-Gatius F, Bech -Sabat G, Garcia-Inspuerto I, Serrano B, Santolaria P. 2008. Relationships between milk production, ovarian function and fertility in high-producing dairy herds in north-eastern Spain. *Reproduction in Domestic Animals* **43**:38-43.



