

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra veterinárních disciplín**



**Uchování savčích oocytů v komerčních médiích pro  
manipulaci s embryi**

**Diplomová práce**

**Autor práce: Bc. Petra Vedralová**

**Obor studia: Reprodukční biotechnologie**

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

© 2018 ČZU v Praze

### **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Uchování savčích oocytů v komerčních médiích pro manipulaci s embryi" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne \_\_\_\_\_

### **Poděkování**

Ráda bych touto cestou poděkovala Ing. Jiřímu Šichtařovi, Ph.D. za odborné vedení diplomové práce jakož i za pomoc při získávání výsledků. Dále bych chtěla poděkovat Ing. Davidovi Němečkovi a Ing. Šárce Prokešové za cenné rady.

# Uchování savčích oocytů v komerčních médiích pro manipulaci s embryi

## Souhrn

Cílem této práce bylo ověřit hypotézu, že si savčí oocyty zachovávají vývojovou kompetenci i po uchování v 17°C v manipulačním médiu pro embrya. Pro experiment byly použity vaječníky, které byly získány od pohlavně dospělých krav a prepubertálních prasniček poražených na lokálních jatkách. Po jejich převozu byly aspirovány oocyty z preantrálních folikulů. Zatímco první skupina oocytů byla kultivována ihned po aspiraci (kontrolní skupina), druhá skupina oocytů byla nejdříve ponechána po dobu 18-24 hodin v termoboxu při 17°C v 1 ml BoviHold médiu (holding medium pro bovinní embrya) a poté byly oocyty kultivovány (experimentální skupina). Kultivace oocytů vždy proběhla v inkubátoru při 38,2°C, 5% obsahu CO<sub>2</sub> a 95% vlhkosti. U bovinních oocytů inkubace trvala 24 h a u prasečích 48 hodin.

V první části experimentu bylo u oocytů hodnoceno jaderné zrání s použitím Vectashield Antifade Mounting Medium s DAPI, kdy se stanovovalo procentuální zastoupení oocytů ve stádiu zárodečného váčku, metafáze I a metafáze II. V druhé části experimentu se u oocytů po vyhodnocení jaderného zrání detekovaly buněčné formy reaktivního kyslíku (ROS) s použitím DCFDA (H<sub>2</sub>DCFDA (2',7' – dichlorofluorescein diacetate)) na základě intenzity fluorescence. V obou skupinách hodnocených prasečích oocytů došlo do stádia metafáze II 86,7 % oocytů. Bovinní oocyty uchované v BoviHold médiu dosáhly druhé metafáze v 90,3 %, což bylo ještě asi o 5 % více než ve skupině kontrolní. Mezi hodnocenými skupinami nebyl zjištěn žádný statisticky významný rozdíl ( $P > 0,05$ ).

V případě hodnocení ROS v experimentální skupině prasečích oocytů byla oproti kontrolní skupině naměřena průměrná intenzita fluorescence o 55 % vyšší, u bovinních oocytů v experimentální skupině byl oproti kontrolní skupině zjištěn nárůst intenzity fluorescence o 35 %. Experimentem byl tedy u oocytů zjištěn statisticky významný rozdíl v průměrné intenzitě fluorescence ( $P < 0,05$ ) mezi kontrolními a experimentálními skupinami prasečích a bovinních oocytů. Avšak při vzájemném porovnávání experimentálních skupin u prasečích a bovinních oocytů nebyl zjištěn žádný statisticky významný rozdíl v relativní intenzitě fluorescence ( $P > 0,05$ ). U obou druhů byla v experimentálních skupinách naměřena vyšší relativní průměrná intenzita. Tím se potvrdilo tvrzení, že čím déle bude s oocyty manipulováno v *in vitro* podmínkách, tím budou hladiny ROS narůstat.

Experimentem bylo prokázáno, že prasečí i bovinní oocyty byly i po několikahodinovém skladování za snížených teplot stále životaschopné a dozrávaly do metafáze II. Také bylo zjištěno, že skladování oocytů v holding médiu, zvyšuje hladinu ROS v cytoplazmě. Jako další postup v této oblasti *in vitro* produkce embryí lze doporučit experimenty týkající se *in vitro* fertilizace takto skladovaných oocytů, čímž lze odpovědět na otázku, zda se mohou tyto oocyty vyvinout do stádia blastocysty.

**Klíčová slova:** aspirace, folikul, *in vitro* zrání, oocyt

# **Holding of mammalian oocytes in commercial embryo holding medium**

## **Summary**

The aim of this work was to verify the hypothesis that mammalian oocytes retain developmental competence even after storage at 17 ° C in embryo manipulation medium. The ovaries were used for the experiment, which were obtained from sexually mature cows and prepubertal gilts slaughtered in local slaughterhouses. Oocytes from preantral follicles were aspirated after their transport. While the first group of oocytes was cultivated immediately after aspiration (control group), the second group of oocytes was first left for 18-24 hours in a thermobox at 17 ° C in 1 ml of BoviHold media (holding medium for bovine embryos) and then the oocytes were cultured experimental group). Oocyte culture was always incubated at 38.2 ° C, 5% CO<sub>2</sub> and 95% humidity. Bovine oocytes were incubated for 24 hours and for pigs 48 hours.

In the first part of the experiment, nuclear maturation was evaluated for oocytes using the Vectashield Antifade Mounting Medium with DAPI, where the percentage of oocytes in the stage of the embryo, metaphase I and metaphase II was determined. In the second part of the experiment, the reactive oxygen cellular forms (ROS) using DCFDA (H<sub>2</sub>DCFDA (2', 7'-dichlorofluorescein diacetate)) were detected in oocytes after evaluation of nuclear maturation based on the fluorescence intensity. In both groups of evaluated pig oocytes, 86.7% of the oocytes matured into the metaphase II stage. Bovine oocytes retained in BoviHold medium reached the second metaphase at 90.3%, which was still about 5% more than in the control group. No statistically significant difference ( $P > 0.05$ ) was found between the groups evaluated.

In the case of the ROS evaluation in the experimental group of pig oocytes, the mean fluorescence intensity was 55% higher than that of the control group, the bovine oocytes in the experimental group showed an increase in fluorescence by 35% compared to the control group. Thus, the oocyte found a statistically significant difference in mean fluorescence intensity ( $P < 0.05$ ) between control and experimental groups of pig and bovine oocytes. However, in the comparison of experimental groups in pigs and bovine oocytes, no statistically significant difference in relative fluorescence intensity ( $P > 0.05$ ) was found. For both species, higher relative mean intensity was measured in the experimental groups. This confirms the claim that the longer the oocytes will be manipulated in in vitro conditions, the ROS levels will increase.

The experiment has shown that both porcine and bovine oocytes were still viable after several hours of storage under reduced temperatures and matured in metaphase II. It has also been found that the storage of oocytes in the holding medium increases the level of ROS in the cytoplasm. As a further step in this field of in vitro embryo production, experiments concerning in vitro fertilization of oocytes stored in this way can be recommended to answer the question of whether these oocytes can develop into blastocysts.

**Keywords:** aspiration, follicle, *in vitro* maturation, oocyte

## Obsah

<b>1</b>	<b>Úvod</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Cíl práce</b> .....	<b>2</b>
<b>3</b>	<b>Přehled literatury</b> .....	<b>3</b>
<b>3.1</b>	<b>Samičí pohlavní ústrojí</b> .....	<b>3</b>
3.1.1.	Anatomie a histologie vaječníku .....	3
<b>3.2</b>	<b>Hormonální řízení</b> .....	<b>4</b>
<b>3.3</b>	<b>Oogeneze a folikulogeneze</b> .....	<b>5</b>
<b>3.4</b>	<b>Produkce embryí</b> .....	<b>9</b>
<b>3.5</b>	<b>Odběr oocytů</b> .....	<b>11</b>
3.5.1	Odběr oocytů <i>post mortem</i> .....	12
3.5.2	Odběr oocytů <i>in vivo</i> .....	14
<b>3.6</b>	<b>Transport oocytů</b> .....	<b>15</b>
<b>3.7</b>	<b>Zrání oocytů <i>in vitro</i></b> .....	<b>17</b>
<b>3.8</b>	<b>Reaktivní formy kyslíku</b> .....	<b>19</b>
<b>4</b>	<b>Materiály a metody</b> .....	<b>21</b>
<b>4.1</b>	<b>Chemikálie</b> .....	<b>21</b>
<b>4.2</b>	<b>Získávání oocytů</b> .....	<b>21</b>
<b>4.3</b>	<b>Morfologická klasifikace oocytů</b> .....	<b>21</b>
<b>4.4</b>	<b><i>In vitro</i> zrání oocytů</b> .....	<b>22</b>
<b>4.5</b>	<b>Design experimentu</b> .....	<b>23</b>
4.5.1	Hodnocení jaderného zrání oocytů.....	23
4.5.2	Detekce ROS.....	24
<b>4.6</b>	<b>Statistická analýza výsledků</b> .....	<b>25</b>
4.6.1	Hodnocení výskytu ROS v savčích oocytech .....	25
4.6.2	Statistické zpracování.....	25
<b>5</b>	<b>Výsledky</b> .....	<b>25</b>
<b>5.1</b>	<b>Porovnání jaderného zrání u prasečích a bovinních oocytů</b> .....	<b>25</b>
<b>5.2</b>	<b>Hodnocení jaderného zrání bovinních oocytů</b> .....	<b>26</b>
<b>5.3</b>	<b>Hodnocení jaderného zrání prasečích oocytů</b> .....	<b>26</b>
<b>5.4</b>	<b>Detekce reaktivních forem kyslíku</b> .....	<b>27</b>
<b>6</b>	<b>Diskuze</b> .....	<b>29</b>
<b>7</b>	<b>Závěr</b> .....	<b>35</b>
<b>8</b>	<b>Přílohy</b> .....	<b>36</b>
<b>9</b>	<b>Seznam grafů, obrázků a tabulek</b> .....	<b>38</b>
<b>10</b>	<b>Seznam literatury</b> .....	<b>39</b>



# 1 Úvod

Šlechtitelské programy v chovu hospodářských zvířat stále častěji využívají biotechnologických metod pro dosažení chovatelských cílů. Díky těmto postupům je umožněno efektivnější využívání genetického potenciálu zvířat, která jsou chovatelsky cenná. Tyto metody mohou sloužit pro získání velkého počtu vajíček od výborné dárkyně s vynikajícím genotypem.

V současné době jsou embrya získávána pomocí MOET programu (most ovulation and embryo transfer) nebo *in vitro* produkcí (IVEP). Metoda MOET zahrnuje i hormonální stimulaci, která ale působí na každou plemenci trochu jinak. Výsledky jsou pak nevyrovnané a zvyšují se celkové náklady. Jako lepší alternativou se zdá být produkce embryí *in vitro*, díky které se výrazně omezí používání hormonálních preparátů. IVEP umožňuje získávat oocyty buď z živých (*in vivo*) nebo z mrtvých dárkyň (*post mortem*), které mohly být vyřazeny z důvodu poruchy reprodukce, nemoci či stáří. Díky IVEP mohou být embrya produkována levně a ve velkém množství. Takto vyprodukovaná embrya mohou sloužit například pro základní i biomedicínský výzkum. Konkrétně u skotu se IVEP používá pro produkci geneticky špičkových zvířat, která jsou dále chovateli využívána k dosažení jejich chovných cílů. U prasat se metod využívá ke zvýšení reprodukce a zlepšení celkové genetiky. Důležitým aspektem používání prasečích embryí je anatomická a fyziologická podobnost s člověkem a tím možná produkce prasat se změněnými geny vhodnými pro xenotransplantaci. Tyto postupy najdou své uplatnění i při transportu a uchování genetického materiálu unikátních plemenných rezerv.

S rozvojem *in vitro* metod se zvyšují nároky na počet a kvalitu embryí. Nejdůležitější je samotné získání oocyty. V posledních letech se mezi laboratorními metodami stále více používá metoda opakovaného sběru oocytů takzvaného Ovum Pick Up (OPU), která se provádí u živých zvířat pomocí ultrazvukem řízené transvaginální folikulární aspirace (TUGA). Při využití metody TUGA se oocyty většinou získávají v terénu a je tudíž nutný jejich převoz do kontrolovaných podmínek do specializované laboratoře. Oocyty po aspiraci znovuzahájí svůj maturační cyklus. Běžně se oocyty převážejí v inkubátorech, což je velmi drahé a oocyty do laboratoře dorazí v různých stádiích zrání. Jelikož je načasování mezi zráním oocyty a jeho následné fertilizaci velmi důležité, je nutné přistoupit k jiným postupům transportu. Možností je umístění aspirovaných oocytů do manipulačního média pro embrya a následné skladování při teplotě 17°C až do přivozu do laboratoře. Výsledkem by mělo být zachování meiotické kompetence oocytů a jejich následné dozrání do stádia metafáze druhého meiotického dělení. A o této možnosti transportu oocytů pojednává tato diplomová práce.

## **2 Cíl práce**

Cílem práce je ověřit hypotézu, že si savčí oocyty zachovají vývojovou kompetenci i po uchování v 17°C v manipulačním médiu pro embrya.

## 3 Přehled literatury

### 3.1 Samičí pohlavní ústrojí

U hospodářských zvířat jsou reprodukční orgány umístěny pod rektum. Toto umístění usnadňuje vyšetření reprodukčního traktu *per rectum* a má praktický význam pro určování funkčnosti vaječníků, březosti a manipulaci při inseminaci (Akers et Denbow, 2013).

Pohlavní ústrojí zahrnuje vaječníky a vývodné pohlavní cesty. Vývodné pohlavní orgány, které zahrnují vejcovody, dělohu, pochvu, poševní předsíň, vulvu, stydké pysky a klitoris, slouží k odvádění, oplození a uchování pohlavních buněk (Banks, 1993).

Pro potřeby této diplomové práce bude podrobně popsán pouze vaječník.

#### 3.1.1. Anatomie a histologie vaječníku

Vaječníky neboli ovaria jsou zakládány jako párové orgány z genitálních lišt a jsou umístěny v lumbální oblasti v blízkosti ledvin (König et Liebich, 2002). Konkrétně u krávy se nachází v dutině břišní, před vstupem do pánve, na mediální části širokého děložního vazů. Vaječníky u prasnic, které již byly březí, mohou zasahovat hluboko do dutiny břišní (Najbrt et al., 1982). Ovaria jsou uložena do vaječnickového vaku tvořeného závěsem vaječníku, závěsem vejcovodu a vlastním vaječnickovým vazem. Na místě jsou udržovány hlavně nejkranialnějším úsekem širokého děložního vazů tak zvaným mesovariem, který obsahuje hladkosvalová vlákna a dělí se na proximální a distální část. Okolí vstupu do vaječníku pokrývá pobřišnice – *tunica serosa*, která přechází v již zmíněné *mesovarium* (Najbrt et al., 1982).

Obecně má vaječník elipsovité až ledvinovité tvar (König et Liebich, 2002), ale v závislosti na druhu zvířete se liší tvarem, velikostí i hmotností. Dospělá kráva má vaječník tvarem připomínající švestku. U mladších krav je povrch hladký, naopak u starších a pravidelně říjících samic skotu je vaječník hrbolatý. Velikost je od 3 (Najbrt et al., 1982) do 6 cm (König et Liebich, 2002) a váha může být v rozmezí 10 (Louda, 2001) až 20 g. Ovarium prasnice měří 5 cm (Najbrt et al., 1982) a může mít 3 (Louda, 2001) až 15 g. U mladších prasnic má tvar maliny, u starších pak hroznu kvůli přítomnosti velkého množství folikulů a případných žlutých tělísek (Najbrt et al., 1982). Povrch ovaria je pokryt jednovrstevným dlaždicovým až kubickým epitelem, který je také označován jako germinativní epitel (Aughey et Frye, 2001). Pod epitelem je vrstva husté pojivové tkáně známá jako *tunica albuginea*. Tato vrstva má protektivní funkci (Akers et Denbow, 2013).

Vaječník je rozdělen na vnější parenchymatózní kůru a vnitřní vaskulární dřev (König et Liebich, 2002). Kůra obsahuje ovariální folikuly v různých stádiích vývoje, intersticiální buňky (Aughey et Frye, 2001) a lymfatické cévy, které se spojují, prochází přes dřev a vystupují z vaječníku skrz *hilus* (Banks, 1993). Místo, kudy do dřevě vstupují cévy a nervy, se tedy označuje jako *hilus* dále pokračující jako kanálky tvořící *rete ovarii*. Součástí dřevě je ještě fibroelastická pojivová tkáň, hladkosvalové buňky ale také krevní a mízní cévy a nervy, které vyživují a inervují vaječník (Aughey et Frye, 2001). Tkáň je krvena vstupující tepnou *arteria ovarica* a vystupující žilou *vena ovarica* (König et Liebich, 2002). Inervaci zajišťuje *plexus renalis* a *plexus aorticus abdominalis* (Najbrt et al., 1982).

### 3.2 Hormonální řízení

Reprodukce je řízena hormonálně, přičemž hormony jsou specifické látky produkované specializovanými endokrinními žlázami a do určitých částí těla jsou transportovány krví (Im et al., 1995). U samic se reprodukční potenciál rozvíjí začátkem puberty. Dochází k pravidelné cyklické aktivitě na vaječníku ovlivňující pohlavní trakt a chování samice. Všechny tyto změny jsou ovlivněny endokrinním a nervovým systémem (Hyttel et al., 2010). Tato kaskáda zahrnuje hypotalamus, hypofýzu a ovaria. Vlivem těchto signálů se mohou vyvíjet folikuly a oocyty obsažené v ovariích (Noakes et al., 2001). Hypotalamické neurony produkují hormon zvaný gonadotropin uvolňující hormon (gonadotropin-releasing hormon - GnRH), který se přes hypotalamo-hypofyzární portální krevní oběh dostává do přední části hypofýzy neboli adenohypofýzy (Klein, 2013). Zde GnRH kontroluje sekreci folikulostimulačního (FSH) a luteinizačního (LH) hormonu. Sekrece GnRH je ovlivňována nejen vnitřním systémem jedince ale i vizuálními, olfaktorickými, zvukovými a hmatovými stimuly z okolního prostředí (Hyttel et al., 2010). FSH ve vaječnicích stimuluje růst a vývoj folikulů a tvorbu estrogenů (Im et al., 1995). Estrogeny, které jsou syntetizovány buňkami granulózy a thékálními buňkami folikulu, mají pozitivní zpětnou vazbu na sekreci hypotalamického GnRH (Noakes et al., 2001). Díky rostoucím hladinám estrogenů se zvyšuje produkce GnRH, což má za následek uvolňování hormonu LH potřebného pro konečné dozrávání oocytů a jejich uvolnění procesem zvaným ovulace (Klein, 2013). Na ovulaci se podílí i ovariální progesteron syntetizovaný v nízké koncentraci během folikulární fáze.

Po ovulaci se buňky tvořící folikul přeměňují na žluté tělísko – *corpus luteum*. Po luteinizaci začínají folikulární buňky syntetizovat ve vysoké koncentraci progesteron, který působí na hypotalamus negativní zpětnou vazbou, kdy inhibuje uvolňování GnRH a navozuje změny v endometriu (Hyttel et al., 2010). V případě že samice zabřežne, progesteron je hlavním

hormonem zodpovědným za udržování březosti. Jestliže samice není březí, v endometriu dělohy se uvolňuje prostaglandin  $F_{2\alpha}$  ( $PG_{F_{2\alpha}}$ ), který navodí luteolýzu a dojde tak k zániku žlutého tělíska (Klein, 2013). Zastavuje se produkce progesteronu a znovu se zvyšuje sekrece GnRH a znovuobnovení estrálního cyklu (Noakes et al., 2001).

### 3.3 Oogeneze a folikulogeneze

Již od narození obsahují ovaria samic stovky tisíc oocytů (Paulini et al., 2014), které jsou součástí zatím inaktivních primordiálních folikulů (Eppig et al., 1996), z nichž ale většina později podlehne atrezii (Picton et al., 2008). V každém z folikulu je tedy malý nerostoucí oocyt a vrstva nedělících se pregranulózních buněk. K jejich aktivaci dochází až v pubertě (Rodgers et Irwing-Rodgers, 2010). Na vaječníku současně probíhá úzce související folikulogeneze a oogeneze (Eppig et al., 1996). Folikulogeneze neboli vznik folikulu je proces, kdy se aktivuje vývoj primordiálního folikulu, který pokračuje až do preovulační velikosti a to vlivem růstu a diferenciací oocytu a přilehlých granulózních buněk (Aughey et Frye, 2001). Během oogeneze dochází k formování a vývoji vaječné buňky (Banks, 1993). Tento proces zahrnuje zrání cytoplazmy i jádra (Paulini et al., 2014). Růst folikulu, zvětšování objemu a průměru oocytu je dán akumulací vody, iontů, sacharidů a lipidů (Picton et al., 2008). Obsah lipidů se liší podle druhu zvířat. Lipidové kapénky jsou zvláště hojné u prasat již od stadia primordiálního folikulu, u skotu jich je méně a myši oocyty neobsahují téměř žádné lipidy. Kapénky jsou považovány za zdroj energie. U většiny druhů dochází k vzájemnému funkčnímu propojení mezi endoplazmatickým retikulem, mitochondriemi a lipidovými kapénkami (Paulini et al., 2014).

Diferenciací oocytů ve vaječnicích plodu začíná již v těle matky. Zahrnuje dvě stádia a to stádium mitózy a meiózy (Picton et al., 2008). Během mitózy dochází k proliferaci oogonií z primordiálních buněk, které migrovaly do zárodečných hřebenů z endodermu žloutkového váčku (Singh, 1997). Rozdělují se a vytvářejí několik generací identických buněk (Banks, 1993). Meióza se rozlišuje na meiózu I a II. Oogonie vstupující do profáze prvního meiotického dělení se stává primárním oocytem. Oocyt je ve stádiu profáze I pozastaven až do té doby, než samice dosáhne pohlavní dospělosti (Singh, 1997). Zastavení buněčného cyklu po tak dlouhou dobu je způsobeno kontinuálním přenosem několika signálních molekul a inhibičních faktorů přes mezery mezi obklopujícími granulózními buňkami a oocytem. Toto pozastavení se ruší díky gonadotropinům z hypofýzy, které narušují transport molekul do oocytu (Khazaei et Aghaz, 2017). Další vývoj je synchronizován s vývojem a zráním folikulu (Banks, 1993).

Bylo zjištěno, že ovariální základ obsahuje tak zvané GREL (gonadal ridge epithelial-like) buňky. Tyto buňky se pravděpodobně vyvíjejí z povrchového epitelu mezonefrů a tvoří povrchový epitel budoucích vaječníků (Hopper, 2015). V rané fázi ontogeneze primordiální zárodečné buňky (primordial germ cells - PGC) migrují ze žlutkového váčku (Singh, 1997), přes mezoderm a entoderm, až do ovarií. Potencionálně první PGC byla identifikována již u osmnáctidenního embrya skotu. U embryí, která byla stará dvacet tři až dvacet pět dní, byly buňky umístěny převážně na úrovni v oblasti mezonefros. Okolo 27. dne se rozvíjí gonádový hřeben, který již obsahuje určitý počet primordiálních zárodečných buněk. U prasat vstupují PGC do genitálního hřebenu 26. den. Po vstupu PGC do gonád buňky ztrácí motilitu, nyní se nazývají oogonie a následně u nich dochází k mitotické aktivitě. Mezi 45. a 105. dnem fetálního vývoje telete byla pozorována nejvyšší mitotická aktivita. Nejvyšší počet zárodečných buněk (oogonie plus oocyty) u skotu byl zjištěn okolo 110. dne vývoje a obě ovaria obsahovala více než 2,7 miliónů zárodečných buněk. Zatímco u prasat byl vrchol kolem 50. dne s přibližným počtem buněk 1,1 miliónu. Bylo také zjištěno, že PGC mají určitou roli při indukci vývoje gonád (Kanitz et al., 2001).

Z těchto zárodečných buněk se následně vyvíjí nejen jednotlivá stádia oocytů ale i jejich podpůrné folikulární buňky (König et Liebich, 2002). Již tedy během embryogeneze dochází v kůře vaječníků k vývoji primordiálních folikulů s oocyty uvnitř (Gordon, 2003). Folikulární epitelální buňky, které jsou v kontaktu s oocytem, interagují prostřednictvím lokálních buněčných signálů regulujících zrání oocytu. Růst folikulu je tedy řízen signály probíhajícími mezi oocytem a okolními epitelálními buňkami a dalšími somatickými buňkami v ovariálním kortexu. Již během druhého trimestru březosti u skotu začínají některé primordiální folikuly růst, většina jich ale zůstává ve vývoji pozastavena (Britt, 2008). Vzniklé folikuly se opět aktivují až během fetálního života jedince během puberty (Singh, 1997). Jakmile jsou aktivovány a rostou, mohou buď plně dozrát a ovulovat nebo dochází k zániku čili atrézii (Richard, 2007) či eliminaci folikulárních buněk a oocytu vlivem apoptózy a dalších mechanismů (Paulini et al., 2014). K ovulaci dojde jen u postpubertálních samic, u nichž je funkční estrální cyklus. Většina folikulů tak podlehne atrézii (Britt, 2008).

Ovariální folikuly jsou klasifikovány v závislosti na morfologických charakteristikách, jako je počet vrstev granulózních buněk okolo oocytu, průměr oocytu a folikulu, absence nebo přítomnost dutiny naplněné tekutinou (Hopper, 2015). Obecně ale mohou být kategorizovány jako primordiální, primární, sekundární nebo terciární (antrální nebo vezikulární) folikul (Paulini et al., 2014). Počet primordiálních nebo primárních folikulů se u skotu pohybuje okolo 120 000 a 150 000, rostoucích folikulů pak 200 až 500 a antrálních folikulů něco mezi 20 a 50.

Preantrální folikuly, které zahrnují primordiální, primární a rostoucí folikuly, představují přes 99 % zárodečných buněk (Yang et al., 1997). U skotu se primordiální, primární, sekundární a terciální folikul prvně objeví v 90., 140., 210. a 250. dni gestace (březosti). Čas potřebný k růstu folikulu z preantrálního stádia (sekundární folikul) do velikosti zralého folikulu u skotu přibližně trvá 42 dní (Hopper, 2015).

Ovariální folikul je sférická agregace buněk obsahující vyvíjející se oocyt (Banks, 1993), kolem něhož se nachází specializované epiteliální buňky (Aughey et Frye, 2001). Během folikulárního vývoje se okolo epiteliálních buněk tvoří stroma a mezi buňkami dutina s tekutinou (Rodgers et Irwing-Rodgers, 2010). Primordiální (preantrální) folikuly okupují periferní část ovariální kůry (Gordon, 2003), obsahují primární oocyt, který je obklopen folikulárními buňkami (Eppig et al., 1996). Tyto folikuly vznikají již prenatálně mitotickou proliferací vnitřních epiteliálních buněk v ovariální kůře (Paulini et al., 2014). Předpokládá se, že masa epitelových buněk vzniká po interakci kortikálního stromatu, povrchového epitelu vaječníků nebo nepravidelných epiteloidních buněčných provazců (*rete ovarii*) se zárodečnými buňkami (PGC) ze žlutkového váčku (Gordon, 2003). Během proliferace se epiteliální buňky shlukují do skupinek. Centrální buňka v tomto shluku se stává oogonií (Eurell et Frappier, 2006). Tato buňka se zvětšuje, vstupuje do profáze prvního meiotického dělení a od této chvíle se nazývá primárním oocytem s průměrem 20  $\mu\text{m}$  u většiny druhů (Rodgers et Irwing-Rodgers, 2010). Jak se oocyt formuje, obklopující buňky vytváří jednu vrstvu plochých folikulárních buněk na bazální membráně (Singh, 1997). Společně tak tvoří primordiální folikul s průměrem 40  $\mu\text{m}$  a většinou se nachází ve vnější části kůry (Eurell et Frappier, 2006). Primární oocyt během prvního meiotického dělení vstoupí do profáze a postupně projde jejími stádii jako je leptotene, zygotene, pachytene a nakonec zůstane ve stadiu diplotene (Gordon, 2003). V této fázi setrvávají oocyty až do puberty (Singh, 1997). A právě tento pozastavený oocyt obsahuje zárodečný váček (GV – germinal vesicle), což je vlastně zvětšené jádro a velké jadérko (Richard, 2007). U bovinních oocytů, větších než 110  $\mu\text{m}$ , je GV lokalizován excentricky, zatímco u menších než 110  $\mu\text{m}$  je vezikul umístěn blíže k *zona pellucida* (Shah et Chauhan, 2017). U různých druhů může být na jednom ovariu přítomno několik stovek tisíc až milion potenciálních oocytů (Paulini et al., 2014). Většina z nich ale podléhá regresi ještě před nebo až po narození a během života jich ovuluje jen několik stovek (Banks, 1993). Postupným růstem vzniká primární folikul s primárním oocytem, který je obklopen jednovrstevným kubickým epitelem z folikulárních buněk (Gordon, 2003). Dalším stádiem je sekundární folikul (Eurell et Frappier, 2006). Uvnitř folikulu je primární oocyt, okolo kterého vzniká proliferací buněk primárního folikulu několik vrstev granulóznych buněk (Britt, 2008). U skotu má pozdější

sekundární folikul v průměru 120  $\mu\text{m}$  s oocytem v průměru 80  $\mu\text{m}$  (Eurell et Frappier, 2006). Granulózní buňky obklopí oocyt a začnou produkovat glykoproteinovou vrstvu zvanou *zona pellucida* (Kanitz et al., 2001). Tuto vrstvu produkuje i samotný oocyt (Eurell et Frappier, 2006), jehož krátké vzpřímené *mikrovilli* plazmatické membrány zasahují do zóny (Paulini et al., 2014). Jak pokračuje folikulární vývoj, mezi granulózními buňkami se formují malé štěrbiny naplněné tekutinou (Singh, 1997). V pozdních sekundárních folikulech se kolem vrstvy granulózy objevuje několik vrstev thékálních buněk (Britt, 2008).

Poslední terciální folikul, který je také nazývaný jako vezikulární, antrální nebo Graafův folikul (Singh, 1997), je složen z primárního oocytu (nebo před ovulací sekundárním folikulem) a epitelu z granulózních buněk (Rodgers et Irwing-Rodgers, 2010). Spojováním menších štěrbin naplněných tekutinou vzniká antrální dutina (Eppig et al., 1996). Okolo granulózy se vytváří několikvrstevnatá *theca* (Eurell et Frappier, 2006). Ta se později diferencuje do dvou vrstev a to vnitřní – *theca folliculi interna* a vnější – *theca folliculi externa* (Kanitz et al., 2001). Thékální buňky jsou od granulózní membrány separovány bazální membránou (Banks, 1993). Ve vnitřní vrstvě je přítomna rozsáhlá krevní a lymfatická kapilární síť zasahující i do vnější vrstvy, ale již nepenetruje do granulózní vrstvy (Eurell et Frappier, 2006). Dále tu jsou velké, epiteloidní buňky. Vnější vrstva se skládá z tenké vrstvy tenké pojivové tkáně s fibroblasty (Banks, 1993). Samotný oocyt pak excentricky přiléhá ke stěně folikulu v místě *cumulus oophorus* (König et Liebich, 2002) vytvořeném akumulací granulózních buněk. U velkého terciálního folikulu vytvoří granulózní buňky okolo oocytu vrstvu buněk zvaných *corona radiata*, které oocytu transportují živiny (Rodgers et Irwing-Rodgers, 2010). Tyto buňky většinou perzistují až do fertilizace, u přežvýkavců se některé odpojují již při ovulaci. V tomto stadiu granulózní buňky vytváří *stratum granulosum* (Eurell et Frappier, 2006).

Pozdní terciální folikul je nazýván zralým folikulem (Britt, 2008). V závislosti na druhu se průměr terciálního folikulu pohybuje od 150 do 300  $\mu\text{m}$  (Eurell et Frappier, 2006). Formování tohoto folikulu proběhne u prasnice později než u skotu. Rozdílnost v časování může být důležité pro celý průběh folikulogeneze (Paulini et al., 2014). Primární oocyt dokončí první meiotické dělení a stane se oocytem sekundárním (Rodgers et Irwing-Rodgers, 2010). Současně se vydělí první pólóvé tělísko (Banks, 1993). U většiny domácích zvířat je první meiotické dělení kompletní krátce před ovulací (Eurell et Frappier, 2006). Sekundární meiotické dělení začíná ihned po ukončení předchozího dělení (Gordon, 2003), ale zastaví se v metafázi II (MII) (Paulini et al., 2014). Toto dělení je dokončeno až při fertilizaci, kdy se sekundární oocyt stává vajíčkem a současně se vyděluje druhé pólóvé tělísko (Banks, 1993).



Po splynutí vajíčka a spermie vzniká zygota s diploidním počtem chromozomů (Eurell et Frappier, 2006).

### 3.4 Produkce embryí

Produkce embryí patří mezi biotechnologické metody, které se stále častěji využívají v rámci šlechtění hospodářských zvířat. Tyto postupy umožňují efektivněji využívat genetický potenciál zvířat, která jsou chovatelsky cenná (Machatková a kol., 2013). Samice během svého reprodukčního období přivede na svět jen omezený počet mláďat (McGeady et al., 2017). A právě díky těmto metodám se může od chovatelsky cenných jedinců získat více mláďat než by bylo fyziologicky možné (Yotsushima et al., 2007). Vyprodukovaná embrya se mohou přenést do živých příjemkyň anebo se dají zamrazit v tekutém dusíku. Zmrazená embrya je možné převážet do jiných zemí či je dlouhodobě uchovávat a mohou tak sloužit jako genetická rezerva plemene (Khazaei et Aghaz, 2017).

Mezi nejpoužívanější reprodukční biotechnologie, které se řadí mezi *in vivo* metody, patří umělá inseminace, přenos embryí a tak zvaný multiple ovulation embryo transfer (MOET) (McGeady et al., 2017). MOET zahrnuje synchronizaci, superovulaci, inseminaci a přenos embryí (Marshall et Minyard, 2002). Synchronizace a superovulace se musí u dárkyň navodit hormonálně a právě tato stimulace působí na každou plemenicí trochu jinak. Z toho důvody bývají výsledky nevyrovnané a značně variabilní (Hopper, 2015). Široká variabilita odpovědi na hormonální stimulaci je neekonomická, jelikož zvyšuje celkové náklady MOET (Marshall et Minyard, 2002).

Přirozenou reprodukci by kráva mohla za svůj reprodukční život přivést na svět jen kolem 10 telat. Metodou MOET se u skotu od jedné z nejlepších plemenic přenesou 50 i více embryí za rok. Dle statistik bylo v Severní Americe za rok 2016 provedeno 49 908 výplachů ze superovulovaných bovinních donorek. Do příjemkyň se přeneslo 332 252 embryí. Oproti tomu se v Evropě vypláchlo 20 783 dárkyň a přeneslo 128 877 embryí (IETS, 2016). Prasečích embryí se v Severní Americe za rok 2015 vyprodukovalo 395 (IETS, 2015) a v roce 2016 se získalo 413 transferuschopných embryí (IETS, 2016). Předpokládá se, že se MOET u prasat provádí mnohem více, ale největší chovy prasat vlastní velké společnosti, které si chrání svá data a nechtějí je moc zveřejňovat (IETS, 2013). Používání MOET má ve světě spíše klesající tendence (IETS, 2015). V České republice byl v minulých letech MOET hojně praktikován. Od roku 2000 do 2006 se průměrně každý rok vypláchlo 1125 dárkyň (AETE, 2013) a získalo se průměrně 6200 přenosuschopných embryí. V roce 2007 však Ministerstvo zemědělství ČR

zrušilo dotace a vzhledem k vysokým finančním nárokům se zájem o MOET snížil na minimum.

Jako alternativa k metodám *in vivo* se v posledních letech stále více využívají metody *in vitro* produkce embryí (IVEP) (Pascottini et al., 2018), které významně pomáhají omezit používání hormonálních preparátů (Machatková, 2009). IVEP umožňuje získávat oocyty buď z živých (*in vivo*) nebo z mrtvých dárkyň (*post mortem*), které byly vyřazeny z důvodu poruchy reprodukce, nemoci či stáří (Machatková a kol., 2013). Počet a kvalita takto získaných oocytů velmi ovlivňují konečný výsledek (Abeydeera, 2002). Výhodou IVEP je velká a levná produkce embryí například pro účely základního i biomedicínského výzkumu a uplatnění nových technologií jako je klonování a transgeneze (McGeady et al., 2017). Studium vývoje oocytů při IVEP můžeme získat podrobnější znalosti ohledně zrání oocyty a cytoplazmatické maturaci. Lepší pochopení těchto procesů by mohlo vést k vyšší kvalitě oocytů a většímu počtu embryí schopných přenosu (Yuan et Krisher, 2012). U skotu se IVEP využívá k produkci geneticky špičkových zvířat, která jsou dále chovateli využívána k dosažení jejich chovných cílů (Hruda et Sasáková, 2017). Také prasata se stávají čím dál více zajímavá a to například kvůli jejich využívání jako dárců orgánů. Ve srovnání s ostatními živočišnými druhy jsou orgány prasat s těmi lidskými nejvíce kompatibilní. Tento fakt je dán podobnostmi ve velikosti, anatomii i fyziologii (Abeydeera, 2002). Také z hlediska etiky jsou prasata jako dárci méně kontroverzní než primáti. Počet lidí čekajících na transplantaci orgánu roste čím dál více, z toho důvodu je produkce prasečích embryí základem pro vytváření prasat se změněnými geny a vhodnými tak pro xenotransplantaci. U prasat je také důležité zvýšení účinnosti reprodukce a míry genetického zlepšení (Okere et Nelson, 2002). Dále může mít aplikace těchto technologií pozitivní dopad na potravinové zemědělské komodity, zachování genetické diverzity a produkci transgenních zvířat, které mají potenciál pro zlepšení užitkovosti zvířat a jejich odolnosti proti nemocem (Terlouw et Dobrinsky, 2010). Tyto metody najdou své uplatnění i při transportu a uchovávání genetického materiálu unikátních genetických rezerv pro jejich případné použití v budoucích chovech (Okere et Nelson, 2002).

IVEP se skládá ze tří částí. První je *in vitro* zrání (IVM) oocytů získaných přímo z folikulů. Doba zrání je odlišná u různých druhů zvířat, u bovinních oocytů je to 24 hodin a u prasečích oocytů 48 hodin (McGeady et al., 2017). Druhá část zahrnuje *in vitro* fertilizaci (IVF) trvající 24 hodin. Poslední částí je *in vitro* kultivace (IVC) zygot až do fáze blastocysty (Pascottini et al., 2018). Po 7 dnech IVC se embrya přenáší do příjemkyň nebo se mrazí (McGeady et al., 2017). Nejdůležitější částí a tedy i klíčovým faktorem se zdá být IVM, kdy se určuje podíl oocytů, které se vyvinou do fáze blastocysty (Khazaei et Aghaz, 2017). Hlavním

problémem IVEP je snížená viabilita *in vitro* embryí oproti embryím, která vznikla *in vivo* (Smiljaković et Tomek, 2006).

Kvalitu embryí a jejich schopnost předimplantačního vývoje ovlivňují různé faktory jako je například kvalita oocytů, kultivační médium, zdroj proteinů a růstové faktory. Poměrně značný vliv na další vývoj má kvalita oocyty. Avšak na jejím hodnocení se promítá subjektivita posuzovatele a z toho důvodu se jednotlivá hodnocení mohou lišit (Yotsushima et al., 2007). Selekcce oocytů pro *in vitro* produkci embryí je založena na morfologických charakteristikách kumulárních buněk obklopujících oocyt a hodnocení ooplazmy (Yuan et Krisher, 2012). Ke kultivaci se používá kompaktní kumulo-oocytární komplex (COC) s neexpandovanou kumulární masou a mající 3 a více vrstev kumulárních buněk (Shah et Chauhan, 2017). Selektované oocyty musí mít homogenní ooplazmu a kompaktní kumulární buňky, které těsně adherují na *zona pellucida* (Yuan et Krisher, 2012). Ostatní kategorie, kdy je COC částečně nebo zcela obnažen či jsou s expandovanými nebo rozptýlenými kumulárními buňkami a heterogenní ooplazma, se řadí mezi oocyty, které se pro *in vitro* produkci nepoužívají (Shah et Chauhan, 2017).

Ve srovnání s embryotransferem se *in vitro* produkcí dá získat mnohem více embryí. Za rok se může od dárkyň v nukleovém stádě získat 10 000 embryí (Hruda et Sasáková, 2017). IVEP se nejčastěji využívá u prepubertálních samic, dále pak u plně dospělých i březích krav od druhého do čtvrtého měsíce gestace (Marshall et Minyard, 2002). IVEP metoda je tudíž ekonomičtější než MOET a není divu, že je o ni v posledních letech stále větší zájem. Americké státy metodě IVEP věnují velkou pozornost a čím dál více zlepšují své postupy, což vede k jejich velké úspěšnosti (IETS, 2015). V Severní Americe v roce 2016 se *in vitro* produkcí metodou TUGA z 45 918 donorek aspirovalo 805 072 oocytů a z tohoto počtu se vyprodukovalo 260 574 embryí. V rámci Evropy se z 10 651 donorek aspirovalo 94 407 oocytů a získalo 18 879 embryí (IETS, 2016). V Evropě je sice v posledních letech zaznamenána stoupající poptávka po IVEP, ale zatím tu nejsou tyto metody tolik rozšířené jako na západě. Příčinou mohou být nedostatečné zkušenosti a znalosti. Je potřeba se tomuto odvětví více věnovat, aby se mimo jiné zvýšila konkurenceschopnost v porovnání s ostatními zeměmi.

### 3.5 Odběr oocytů

Aby bylo možné produkovat *in vitro* embrya, musíme nejdříve získat oocyty. Ty mohou být odebrány z vaječníků živých (*in vivo*) anebo poražených zvířat na jatkách (*post mortem*) (Shah et Chauhan, 2017). Jejich kvalita je ovlivněna folikulární dynamikou (Shah et Chauhan, 2017). Na rozvoj a počet folikulů má vliv plemenná příslušnost, výživový stav, prostředí,

sezónnost, tepelný stres, fyziologický stav, aktivita estrálního cyklu a genetika. Kvalitu oocytů negativně ovlivňují vysoké teploty (Qi et al., 2013).

Problém při *in vitro* produkci spočívá v počtu získaných oocytů a jejich schopnosti zrání. Při transportu materiálu do laboratoře je také důležité dodržovat podmínky převozu co nejlépe podmínkám v těle živého zvířete, aby si převážené oocyty co nejdéle udržely životaschopnost. Ta totiž s časem klesá a tím se snižuje i produkce embryí (Yuan et Krisher, 2012).

### 3.5.1 Odběr oocytů *post mortem*

Při odběru oocytů *post mortem* se vaječníky získávají z poražených zvířat na jatkách. Takto získaná ovaria se musí k dalšímu zpracování převést do laboratoře. Většinou se převáží v 0,9% roztoku chloridu sodného (NaCl) nebo ve fosfátovém pufru (Phosphate Buffered Saline, PBS), což je fosfátový roztok s 0,15 M NaCl, doplněnými antibiotiky. K následnému získání oocytů z ovárií se nejvíce využívá metoda aspirace. Existují ale i další metody odběru (Hafez et Hafez, 2000). Množství oocytů získaných od jedné donorky bývá značně variabilní a ve většině případů bývá od 5 do 50 oocytů. Průměrně se ale počet odebraných oocytů pohybuje okolo 15 (Machatková a kol., 2009).

Při transportu ovárií je velmi důležitá teplota, ve které se udržují, doba od sběru ovárií do aspirace oocytů a také koncentrace oxidu uhličitého (CO<sub>2</sub>) (Gordon, 2003). Převoz je pro oocyty ve vaječnicích velmi náročný a tyto faktory mohou mít velký vliv na následnou kvalitu oocytů, proto je důležité dodržovat určité podmínky, aby se co nejvíce udržela viabilita oocytů (Abeydeera, 2002). Ideální teplota pro převoz ovárií do laboratoře je 37°C. Pro nejlepší výsledky by měla být ovaria zpracována nejdéle do 6 hodin od porážky a jejich teplota by neměla klesnout pod 28°C (Yuan et Krisher, 2012). Testovali se ale i jiné podmínky transportu a uchovávání. Ve studii Wang et al. (1997) byly vaječníky převáženy do laboratoře v 0,9% roztoku NaCl při teplotě 25°C. Sirard et Coenen (2006) použili vaječníky, které byly převezeny do laboratoře do 30 minut od porážky v transportním médiu o teplotě 30 až 35 °C. Médium obsahovalo 0,9% fyziologický roztok obsahující antibiotika a to penicilin, streptomycin, amphotericin. Experimentálně bylo zjištěno, že se při transportu ovárií může použít folikulární tekutina, která se získá z folikulů o průměru 2 až 8 mm, pro udržování nezralých bovinních oocytů při teplotách mezi 22 a 38°C po 5 hodin nebo při 30°C po 6 hodin. U oocytů, které byly po dobu 6 hodin ponechané ve folikulární tekutině před IVM, byla pozorována lepší morfologická kvalita embryí (Gordon, 2003). Ve studii Wang et al. (1995) se hodnotila vývojová kompetence oocytů aspirovaných z vaječnic, které byly skladovány po různě

dlouhou dobu a při odlišných teplotách. Zkoumaly se změny vyplývající ze skladování ovárií. Závěr byl takový, že při 4°C nebo pokojové teplotě docházelo ke značnému snížení vývojové schopnosti bovinních oocytů. Což odporuje studii Solano et al. (1994), který uvedl, že vaječníky mohou být krátkodobě bezpečně uchovány při 4°C. Jako příznivá se ukázala teplota v rozmezí 15 až 21°C. V takovémto rozmezí teplot bylo možné uchovávat vaječníky po dobu nejméně 12 hodin, aniž by byla u oocytů nepříznivě ovlivněna schopnost dalšího vývoje (Scherthaner et al., 1998). Walters et Graves (1998) také zkoumali vliv různých teplot (5, 16, 25, 30, 37°C) a doby skladování ovárií (2, 6, 10, 14, 26 h) na následné zrání prasečích oocytů. Zjistilo se, že při všech zkoušených teplotách docházelo k výraznému snížení zrání oocytů s tím, jak byla prodlužována doba skladování. Při teplotě 25 °C a době skladování do 5 h dokončilo zrání více jak 75 % oocytů. Zatímco uchovávání po dobu 5 hodin při teplotách vyšších nebo nižších než 25°C snížilo schopnost oocytů dokončit zrání a pravděpodobně by mohla být narušena následná vývojová kompetence (Walters et Graves, 1998). Bovinní oocyty, které byly získány z vaječníků uchovávaných 8 hodin při 37°C, se následně méně vyvíjeli v embrya, než tomu bylo u oocytů z vaječníků uložených při 25°C (Yang et al., 1990). Transport vaječníků do 5 h při teplotě 25°C se zdá být vhodný pro dokončení zrání oocytů a jejich případnou fertilizaci (Abeydeera, 2002).

#### 3.5.1.1 Folikulární aspirace

Nejvíce používanou metodou k odběru oocytů post mortem je aspirace antrálních folikulů. Její hlavní výhodou je rychlost, která je důležitá pro *in vitro* produkci embryí (Hafez et Hafez, 2000). Výtěžnost oocytů pohybuje okolo 30 až 60 % (Gordon, 2003).

Při této metodě se injekční stříkačkou napichují Graafovy folikuly a přitom je nasáván jejich obsah, který představuje folikulární tekutinu s oocytem s kumulárními buňkami. Aspirují se folikuly o velikosti 3 až 5 mm u vaječníků prasnic (Wang et al., 1997) a 2 až 8 mm velké folikuly u kravských ovárií (Gordon, 2003). K provedení úkonu je třeba jehla (16 – 18 G) se stříkačkou. Jehla se vybírá větší, aby při průchodu malým průměrem nedošlo k poškození buněk okolo oocytu. Stříkačky by měly být jednorázové a vyrobené z plastu. Mohou se používat i stříkačky skleněné ovšem ale za předpokladu, že jsou předem omyty a sterilizovány (Shah et Chauhan, 2017). Mimo stříkačky lze použít vakuovou pumpu. Bovinní folikuly bývají aspirovány až 20ml stříkačkou s 18 – 22 G jehlou nebo pomocí vakuové pumpy o tlaku 75 – 100 mmHg s 16 – 19 G jehlou (Gordon, 2003).

Ve studii Fry et al. (1997) se porovnávaly účinky používání různých průměrů jehel a tlaků vakuové pumpy na kvalitu získaných oocytů. Nejlepší výsledek testování byl s 17 G

jehlou a 55 mmHg tlakem vakuové pumpy. Se vzrůstajícím tlakem pravděpodobně dochází k odstraňování kumulárních buněk z COC a tím se snižuje viabilita oocytů (Boni, 2012). Toto tvrzení se potvrdilo při experimentu, kdy se aspirací vakuovou pumpou při tlaku 50 mmHg získalo 245 oocytů z 369 ovárií, zatímco při tlaku 150 mmHg jen 182 oocytů z 381 ovárií (Gordon, 2003). Doporučuje se proto používat tlak nižší okolo 50 mmHg (Boni, 2012).

### 3.5.2 Odběr oocytů *in vivo*

V posledních letech se ale mezi laboratorními metodami dostává do popředí metoda Ovum Pick Up (OPU), která se provádí u živých zvířat (Qi et al., 2013). OPU je charakterizována jako opakovaný sběr oocytů (Okere et Nelson, 2002), kterou lze provést pomocí ultrazvukem řízené transvaginální folikulární aspirace (TUGA) (Boni, 2012). Její účinnost závisí na několika faktorech a to na fázi reprodukce donorky, aspiračním schématu, použité technice a hlavně na samotné individualitě zvířete (Machatková a kol., 2009). Hlavní proces TUGA zahrnuje epidurální anestezii, polohování vaječnicků *per rectum*, vizualizaci folikulů pomocí transvaginální ultrasonografie a aspiraci oocytů jehlou (Shah et Chauhan, 2017). Provádí se buď s nebo bez hormonální stimulace folikulárního růstu (Qi et al., 2013).

Aspirace folikulů je prováděna pomocí jehly (18 G) o délce 55 cm připojené k vakuové pumpě (tlak 90 mmHg), která je ultrazvukem vedena k vaječnickovému folikulu přes vaginální stěnu (McGeady et al., 2017). Takto dojde k aspiraci obsahu folikulu do jehly a ke kolapsu folikulu, který se zobrazí na obrazovce monitoru. Oocyty jsou sbírány do kónické zkumavky (Carter et al., 2002). Procedura je opakována i u přilehlých folikulů na obou ovarii (Shah et Chauhan, 2017). Následně je za stálého odsávání jehla vytáhnutá a vypláchnuta proplachovacím médiem, což může být například fosfátový pufovaný fyziologický roztok (PBS) s 10% bovinním sérem, antibiotiky a heparinem (Carter et al., 2002). Získaný obsah, který je tvořen oocyty, folikulární tekutinou, granulózními buňkami a zbytky tkáně, se nechá usadit ve zkumavce. Pak je sediment prohledáván pod stereomikroskopem při dvacetinásobném zvětšení za účelem hledání kumulo-oocytárních komplexů (Shah et Chauhan, 2017).

Metodu TUGA lze provést za pomoci laparoskopie nebo transvaginální ultrasonografie (Hafez et Hafez, 2000). Obě varianty umožňují přesnější umístění aspirační jehly do folikulu, což je důležité hlavně u malých folikulů v průměru 2 až 3 mm (Gordon, 2003). Ultrasonografií se získá větší množství kvalitních oocytů než při laparoskopii. Navíc je ultrasonografie pro vaginu méně traumatická a lze ji tak využívat častěji (Hafez et Hafez, 2000). Pro úspěšnou laparoskopii jsou důležité praktické zkušenosti, správné vybavení, znalost anatomie abdominální dutiny a palpace reprodukčních orgánů *per rectum* (Gordon, 2003). Jejím použitím

může dojít k traumatickým změnám v reprodukčním traktu. Vyžaduje uklidnění zvířete nebo celkovou anestezii. Invazivnost této metody omezuje její častější využívání. Na druhou stranu je méně traumatická pro ovaria (Hafez et Hafez, 2000).

Tato metoda je nyní nejvíce využívána u předpubertálních samic. Je tomu tak například v holandském CERV, kde se jalovicím odebírají oocyty v 10 až 12 měsících věku v intervalu dvakrát za týden (Hruda et Sasáková, 2017). Dále se TUGA používá u dospělých samic bez ohledu na reprodukční stav (Hafez et Hafez, 2000). Samice mohou být acyklické, necitlivé na superovulaci, s infekcí reprodukčního traktu (Boni, 2012), s fyzickými zraněními (zlomená noha) nebo s abnormálním krčkem (Carter et al., 2002). Dokonce ji lze bezpečně provést i u březích samic, kdy se odběr může provádět každých 10 dní od 40. do 90. dne gestace (Gordon, 2003). Sběr oocytů lze pomocí TUGA provádět dvakrát týdně (McGeady et al., 2017). Při odběru se od jedné bovinní donorky získá okolo 6 až 8 oocytů (Machatková a kol., 2009). Ve studii Manik et al. (2002) se při punkci 157 bovinních folikulů získalo 92 oocytů a ve studii Boni (2012) bylo získáno 54 oocytů ze 197 punktovaných folikulů. U prasat se můžou odebrat 4 až 5 oocytů na jedince (Carter et al., 2002). Brüssow et al. (1997) z 695 folikulů získali 501 oocytů. Po maturaci a inseminaci je průměrně vyprodukováno 30% embryí schopných přenosu do příjemkyně (Machatková a kol., 2009).

### **3.6 Transport oocytů**

Za fyziologických podmínek je oocyt v malých folikulech udržován ve fázi profáze I díky inhibičním faktorům jako je cyklický adenosin monofosfát (cAMP), který se do oocytu dostává skrz vodivý spoj (gap junction) (Tanghe et al., 2002). Jakmile jsou oocyty z folikulů odebrány, přerušuje se přísun inhibičních faktorů, což způsobí znovuzahájení meiotického procesu (Bilodeau-Goeseels, 2011).

Získávání oocytů metodou TUGA se provádí většinou v terénu. Je tedy nutné aspirované oocyty převézt do specializované laboratoře, kde již jsou kontrolované podmínky (Alm et al., 2008). Avšak transport pro oocyty znamená stres. Obvykle jsou oocyty transportovány ve zracím médiu ve velkých přenosných inkubátorech, které udržují stálou teplotu a kontrolovanou atmosféru. Tento postup transportu je ovšem drahý a oocyty se většinou do laboratoře dostanou v rozdílných stádiích zrání, což zhoršuje další pokračování v IVEP procedurách (Pascottini et al., 2018).

Pro IVEP je ale nesmírně důležité přesné načasování mezi dobou zrání a fertilizací oocytu (Blondin, 2017). Často zrání oocytů končí rozdílně kvůli velkému časovému rozpětí mezi získáním prvního a posledního oocytu. Protože následná práce v laboratoři je striktně

načasována, tato asynchronnost ve zrání znamená zpracování večer nebo v noci. Navíc v některých případech není možné oocyty dopravit ihned do laboratoře k okamžitému zpracování. Může nastat situace, kdy se samice na jatky dostanou v různý čas a na různých místech. Pokud se oocyty vyaspirují na místě, pak je k jejich přepravě vhodný chladicí box, který se využívá pro přepravu spermatu (Pascottini et al., 2018). Box je přenosný, není drahý a lze udržovat stálou teplotu. Vlivem nižší teploty dochází ke snížení metabolismu oocytů. Uchovávání nezralých bovinních oocytů v transportních tubách s komerčně dostupným médiem schopné udržet oocyty v profázi I při zachování vývojových kompetencí, nejenže usnadní logistiku, ale také sníží náklady a umožní pohodlnější plánování další manipulace v laboratoři (Martino et al., 2014).

U skotu byla hodnocena média obsahující meiotické inhibitory (Lonergan et al., 2000). Ty se však nedoporučují kvůli jejich omezené dostupnosti a možné toxicitě. Alm et al., (2008) dokázali, že i přes nepřítomnost inhibičních faktorů a ponechání oocytů 16 až 18 hodin při pokojové teplotě, mohou nezralé bovinní oocyty dojít do stádia blastocysty.

Pascottini et al. (2018) hodnotili vliv různých teplot a doby při uchování v komerčním médiu na následné zrání bovinních oocytů. Jako komerční médium bylo použito médium pro uchování embryí (embryo holding medium, EHM), které bylo speciálně vyvinuto pro uchovávání bovinních a equinních embryí. Oocyty byly rozděleny do skupin a následně skladovány po 6, 10 a 14 hodin v EHM při 4°C, 22-25°C a 38,5°C. Teplota 4°C byla udržována pomocí Equitaineru pro transport hřebčího spermatu a teplota 38,5°C pomocí inkubátoru. Následně byly oocyty přemístěny do inkubátoru a zrály zde 22 hodin. Po uplynutí stanovené doby byly oocyty denudovány, fixovány a byl hodnocen stupeň zrání. Pokusem nebylo zjištěno, že by u oocytů, uchovávaných v EHM za snížených teplot, docházelo k maturaci. Dále z experimentu vyplynulo, že doba ani teplota skladování neměly vliv na procento zralých oocytů, které se pohybovalo v rozmezí 71,9 % až 83,2 %. Doba trvání skladování v tomto experimentu je však nesmyslná vzhledem k časovému plánu laboratoři.

Ve studii hodnotili Dini et al. (2016) účinky holding efektu na zrání oocytů u koní. Přes noc byly oocyty skladovány v EHM při 4°C, 17°C a 22-25°C. Procento dozrávání do MII při různých teplotách se pohybovalo mezi 60 % a 65 %, přičemž se hodnoty od sebe moc nelišily.

Cílem studie Yang et al. (2010) bylo zjistit, jak dlouho je možné uchovávat prasečí oocyty ve FCS nebo prasečí folikulární tekutině (pFF) při různých teplotách. Porovnávali počet oocytů, které dozrály do MII při 4°C, 20°C, 25°C, 27,5°C, 30°C a 38,5°C po 1, 2 nebo 3 dny. Jako holding média použili TCM-199, FCS a pFF. Nejdříve byl sledován vliv teploty na inhibici



meiotického obnovení u oocytů v různých médiích. Při skladování prasečích oocytů 1 den při 27,5°C byla meióza pozastavena u 74 % oocytů v pFF, 71 % oocytů ve FCS a jen u 9 % oocytů v médiu TCM-199. I po 3 dnech v pFF i FCS nedocházelo u většího množství oocytů ke zrání. K maturaci v pFF nedošlo u 18-44 % oocytů v rozmezí 20°C až 30°C. Ve FCS bylo 64 % při 27,5°C a 40 % při 30°C ve stádiu zárodečného váčku (germinal vesicle, GV), tudíž dále nezrály. Kultivační médium TCM-199 dokázalo ve stádiu GV pozdržet jen velmi málo oocytů a to 4- 9 % v rozmezí teplot 25°C až 30°C. A téměř žádné oocyty nezůstaly ve stádiu GV, jestliže byly skladovány ve 4°C a 38,5°C. Výsledky mezi médii a časem skladování byly výrazně odlišné. Oocyty ve stádiu GV byly umístěny do inkubátoru a po uplynutí stanovené doby byl u oocytů hodnocen stupeň zrání. Počet dozrálých oocytů skladovaných v pFF nebo FCS se moc nelišil. V pFF dozrálo 57 % a ve FCS 52 % oocytů. Avšak v médiu TCM-199 dozrálo jen 7 % oocytů. Pokusem bylo zjištěno, že prasečí oocyty mohou být i po 3 dnech skladování stále viabilní. Pro uchování v pFF a FCS byla nejideálnější teplota 27,5°C.

Dle výzkumů lze tedy bovinní i equinní oocyty skladovat v pokojové teplotě v rozmezí 22°C a 25°C a prasečí oocyty i po 3 dny nejlépe při 27,5°C. Používání komerčních médií jako je EHM či TCM-199 má tu výhodu, že je jejich složení garantováno. Ovšem například u folikulární tekutiny či FCS je složení rozdílné, a proto při používání těchto látek nelze přesně garantovat jejich složení. Zjištění, že bovinní oocyty mohou být skladovány v pokojové teplotě po několik hodin v komerčním uchovávacím médiu, znamená nové perspektivy pro komerční IVEP průmysl. Použití komerčně dostupného EHM nemá u bovinních gamet škodlivý vliv na zrání, následný vývoj embrya a standartních parametrů kvality embrya. Skladování nezralých oocytů v EHM po jejich sběru může zpomalit a tudíž synchronizovat zrání. Pro laboratoře to znamená možnost plánovat si lépe čas pro zpracování a práci s oocyty a embryi. V našich podmínkách je tato metoda perspektivnější hlavně pro skot. Potenciál u prasat by měla například v podobě nečekané porážky geneticky cenného jedince a tedy uchovávání genových rezerv.

### **3.7 Zrání oocytů *in vitro***

Z veškeré populace oocytů, které ve folikulech rostou na ováriích, je jen malá hrstka vhodná pro ovulaci. Většina oocytů tedy nikdy neovuluje (Gosden et Telfer, 1987). A právě systém *in vitro* zrání je užitečný pro ty oocyty, které by jinak v *in vivo* podmínkách podlehly atrézii (Hirao et al., 1994). Cílem IVM systému je produkce oocytů kvalitou srovnatelné s oocyty dozralými *in vivo* (Palma et al., 2012). Smiljaković et Tomek (2006) uvádí, že v *in vitro* podmínkách probíhají podobné procesy jako *in vivo*, jen je IVM rychlejší.

Pro IVM se vybírají oocyty s více než 3 vrstvami kumulárních buněk obklopujících oocyt. Tyto buňky jsou součástí kumulo-oocytárního komplexu (cumulus oocyte complex, COC). Po selekci se oocyty dávají zrát v kultivačním médiu obsahující gonadotropiny a/nebo růstové faktory (McGeady et al., 2017). Proces maturace oocytu se může rozdělit do dvou částí a to na část nukleární (jadernou) a cytoplazmatickou. Nukleární maturace spočívá v znovurozběhnutí meiózy. Jádro oocytu se nachází ve fázi profáze I, musí proto nejdříve dokončit první meiotické dělení, během něhož dochází k redukci počtu chromozómů na haploidní počet (Smiljaković et Tomek, 2006). Vydělené chromozomy se dostávají pod *zona pellucida* do perivitelinního prostoru a vytvoří zde první pólové tělísko (McGeady et al., 2017). Poté oocyt vstupuje do druhého meiotického dělení, kde se zastaví v metafázi II. Až po oplození spermií se meióza znovu spustí a kompletně se dokončí (Palma et al., 2012). Cytoplazmatická maturace s meiotickými procesy přímo nesouvisí, ale zato je spjata s procesy připravující oocyt na fertilizaci a následný předimplantační vývoj (Moor et al., 1990). Pro další vývoj je také nezbytná syntéza určitých druhů mRNA a proteinů (Sirard et Coenen, 2006). Procesy spolu úzce souvisí a jejich načasování je důležité k tomu, aby se jaderné a cytoplazmatické zrání dokončilo zároveň.

Na zrání oocytu mají vliv i okolní buňky, které jsou součástí COC. Studie Laurinčík et al. (1992) uvádí, že buňky *cumulus oophorus* a *corona radiata* jsou vzájemně propojeny. Buňky tvořící *corona radiata* jsou spojeny s oocylem skrze rozsáhlé sítě vodivých spojů (gap junction). Tyto spoje a propojení umožňují vzájemnou buněčnou komunikaci. Po přidání gonadotropinů se iniciuje proces expanze kumulu (Moor et al., 1990), což je pravděpodobně první morfologický znak maturace (McGeady et al., 2017). Během expanze dochází k přerušování mezibuněčných spojení mezi již výše zmíněnými buňkami. Odstraněním kumulárních buněk lze spatřit v perivitelinním prostoru první pólové tělísko, což indikuje metafázi II. V tomto stádiu jsou oocyty připraveny na fertilizaci (McGeady et al., 2017). U kravských oocytů se buněčná spojení rozvolňují během rozpadu zárodečného váčku (germinal vesice, GV), který se děje do 12 hodin kultivace *in vitro*. Vodivé spoje mizí do 18 h kultivace, když oocyt dosáhl metafáze I (Laurinčík et al., 1992).

Dříve byly při *in vitro* produkci prasečích embryí problémy s utvářením samčího prvojádra a polyspermií (Okere et Nelson, 2002). Polyspermie znamenala pro rané embryo zánik, což značně limitovalo studium předimplantačního vývoje v *in vitro* podmínkách (Wang et al., 1997). Později se přišlo na to, že kromě jaderného zrání musí proběhnout i normální cytoplazmatické zrání, aby mohla být produkována životaschopná embrya. Proto byly úspěšně

vyvinuty různé modifikace IVM systému pro zlepšení zrání a modifikovaná IVF média redukující nežádoucí polyspermii (Abeydeera, 2002).

K úspěšné maturaci prasečích oocytů *in vitro* se používají různé typy kultivačních médií obsahující fetální telecí sérum (FCS) nebo folikulární tekutinu (FF) a další doplňující látky jako jsou gonadotropiny (hlavně LH a/nebo FSH) a růstové faktory (Hunter, 2000). Doplnění média o FCS nebo FF ztěžuje identifikaci klíčových faktorů regulujících normální zrání oocyty. Z toho důvodu se vyvíjela média bez FCS, aby se mohly optimalizovat podmínky kultivace (Abeydeera, 2002). Základní kultivační média pro bovinní oocyty jako základ obsahují fyziologický roztok. Dále se přidává pyruvát, glukóza, laktát, sérum nebo albumin a antibiotika. Komplexní kultivační médium je složeno ze základního média s přidavkem aminokyselin, vitamínů, purinů a dalších látek. Jak je patrné, pro maturaci oocytů různých savčích druhů se vyrábí různá média, ale většinou se liší jen v koncentraci obsažených látek, např. iontů a zdrojů energie (Gordon, 2003).

I přes neustálou optimalizaci složení médií a systému IVM oocyty zrající v *in vitro* podmínkách mají nižší vývojový potenciál než oocyty zrající *in vivo* (Hunter, 2000). Při IVM u skotu přibližně 90 % oocytů dozraje do metafáze II. Asi 80 % je fertilizováno a dostane se do dvoubuněčného stádia. Jen asi 30 až 40 % oocytů se vyvine do stádia blastocysty. U prasat se do M II fáze dostane přibližně 75 až 85 % oocytů (McGeedy et al., 2017). Ve studii Wang et al. (1997) porovnávali 3 média při *in vitro* produkci prasečích oocytů. Použili následující média, NCSU23 médium, tkáňové kultivační médium (TCM 199) a modifikované Whitten médium. Všechna média byla doplněna o cystein a folikulární tekutinu. Nejvíce oocytů došlo v prvním médium a to 93 %. Za použití TCM 199 sice v tomto pokusu došlo nejmeně oocytů 87 %, ale zato nejvíce jich bylo z tohoto počtu fertilizováno (92 %).

### 3.8 Reaktivní formy kyslíku

V dnešní době se sice v rámci *in vitro* zrání a celkově při *in vitro* produkci embryí učinil velký pokrok, stále se však nedosahuje takové úspěšnosti maturace jako při *in vivo* produkci (Tiwari et Chaube, 2017). Získávání oocytů, jejich transport i zrání v laboratorních podmínkách nejsou pro oocyty fyziologickým dějem, proto na ně veškeré změny působí stresově. Při vývoji do stádia meiózy II působí na oocyty velké množství faktorů, které jsou v *in vitro* podmínkách násobeny. Jedním z důležitých faktorů je oxidační stres (OS) (Khazaei et Aghaz, 2017). OS je způsoben disbalancí mezi prooxidanty a antioxidanty (Goud et al., 2008).

Reaktivní formy kyslíku se řadí mezi volné radikály (VR). Volný radikál může být atom, molekula nebo iont, který je schopen samostatné existence a má ve svém elektronovém obalu

jeden či více nepárových elektronů (Bayir, 2005). Snaha radikálu je dostat se do stabilní konformace a to získáním dalšího elektronu do elektronového páru. Z tohoto důvodu jsou vysoce reaktivní a reagují s ostatními volnými radikály ale i s intaktními molekulami, což jsou například lipidy, nukleové kyseliny, sacharidy nebo proteiny. Tyto reakce mohou vést k poškození buněk, tkání až orgánů (Racek et Holeček, 1998). K nejdůležitějším volným radikálům pro živý organismus patří volné radikály kyslíku. Z nich mohou dalšími přeměnami vznikat jiné reaktivní látky, které se společně s VR označují jako reaktivní formy kyslíku (reactive oxygen species, ROS) (Bayir, 2005). Mezi tyto formy kyslíku se řadí například superoxid ( $O_2^{\cdot-}$ ), hydroxylový radikál ( $\cdot OH$ ), peroxid vodíku ( $H_2O_2$ ), peroxidy lipidů a hypohalinní kyseliny (HOX, kde X může být  $Cl^-$ ,  $Br^-$ ,  $I^-$  a další) (Goud et al., 2008).

ROS jsou v buňkách na jednu stranu generovány zcela fyziologicky řadou enzymatických a neenzymatických procesů a organismus je umí využít ve svůj prospěch (Goud et al., 2008). Oocyty produkují ROS kvůli využívání kyslíku při produkci energie prostřednictvím mitochondriální oxidační fosforylace (Bayir, 2005). Goud et al. (2008) uvádí, že se reaktivní formy kyslíku podílí na meiotickém zrání a ovulaci a Racek et Holeček (1998) doplňují signalizační funkci v buňce a podíl na oplození. Pro správný vývoj oocyty jsou důležité další signální molekuly, které syntetizují granulózní buňky nebo oocyt samotný. Přičemž různé hladiny těchto látek rozhodují o tom, zda oocyt zůstane ve stádiu diplotene I nebo bude pokračovat do další fáze vývoje. Látky nezbytné pro meiotický cyklus savčího oocyty jsou hydrogen peroxid ( $H_2O_2$ ), cyklický adenosin monofosfát (cAMP), cyklický guanosin monofosfát (cGMP). Dále je důležitý zrací promoting faktor (MPF) a cyklin-dependentní kináza 1 (Cdk1) pro konečnou regulaci meiózy (Tiwari et Chaube, 2017).

Na druhou stranu zmíněná vysoká reaktivita molekul vyvolává kaskádu řetězových reakcí, které vedou k narušení buněčných funkcí. ROS mohou difundovat a procházet buněčnými membránami a měnit tak většinu typů buněčných molekul (NK, proteiny a lipidy). Velice důležitá je proto hladina ROS. Pokud klesne pod určitou mez, je narušena ovulace (Tiwari et Chaube, 2017). Vyšší než fyziologické hladiny ROS vyvolávají apoptózu granulózních buněk, snižuje se přenos živin a důležitých faktorů pro přežití oocytů (Khazaei et Aghaz, 2017), dále se zhoršuje kvalita oocytů a celkově je negativně ovlivněn embryonální vývoj (Goud et al., 2008). Právě při *in vitro* kultivaci embryí je koncentrace kyslíku mnohem vyšší než v podmínkách *in vivo*, což vede ke zvýšení reaktivních forem kyslíku (ROS) (Luvoni et al., 1996). ROS také pravděpodobně přispívají ke stárnutí nefertilizovaného oocyty (Goud et al., 2008). A celkově se nadměrná produkce ROS bere jako jedna z hlavních příčin nízkého procenta při produkci embryí skotu *in vitro*. Proto se vyvinuly účinné mechanismy, které účinky

ROS neutralizují (Khazaei et Aghaz, 2017). Hlavním obranným faktorem je tak zvaná antioxidační ochrana (Racek et Holeček, 1998). Tento systém se skládá z enzymatických a neenzymatických antioxidantů. Enzymatické antioxidanty neutralizují přebytečné ROS a zabráňují tak poškození buněčných struktur (Khazaei et Aghaz, 2017). Jsou to například různé peroxidázy a peroxiredoxiny. Neenzymatické antioxidanty zahrnují glutation, vitamin C, taurin, vitamin E, zinek (Zn), selen (Se), betakaroten a karoten (Goud et al., 2008).

## **4 Materiály a metody**

### **4.1 Chemikálie**

Všechny použité chemikálie, pokud není uvedeno jinak, byly nakoupeny od firmy Sigma- Aldrich-Chemicals.

### **4.2 Získávání oocytů**

Vaječníky byly získány od pohlavně dospělých krav a prepubertálních prasniček poražených na lokálních jatkách. Ovaria byla do laboratoře převezena v termosce při 37°C do 2 hodin od porážky. Poté byla provedena aspirace oocytů jehlou se stříkačkou. Prasečí oocyty byly aspirovány z antrálních folikulů o průměru 2 až 6 mm spolu s folikulární tekutinou pomocí 18 G jehly a injekční stříkačky o objemu 10 ml. Obsah stříkačky po aspiraci tvořily aspirované kumulo-oocytární komplexy (COC), folikulární tekutina a granulózní buňky. Bovinní oocyty byly aspirovány z antrálních folikulů o průměru 2 až 8 mm pomocí 18 G jehly a 20ml injekční stříkačky, která se ještě před aspirací naplnila 5 ml na 37°C nahřátého média pro sběr oocytů (OCM) (viz příloha Tab. 4, 5). Poté se obsah stříkačky přenesl na Petriho misku a provedla se selekce.

### **4.3 Morfologická klasifikace oocytů**

Po získání oocytů se pod stereomikroskopem (Nikon, SMZ1000) při 20násobném zvětšení vybíraly oocyty nejvyšší kvality pro další použití. Hodnocení kvality oocytů vychází z morfologických kritérií kumulo-oocytárního komplexu (COC), podle nichž se předpokládá určitá souvislost s fyziologickým stavem folikulu a vývojovým potenciálem oocytu.

Podle základního vizuálního posouzení morfologických rysů pozorovatelných pod světelným mikroskopem se oocyty zařazují do 4 skupin (Shah et Chauhan, 2017):

- 1/ skupina – oocyty obklopené více jak 5 vrstvami kompaktních kumulárních buněk, homogenní ooplazmou, COC je úplně světlý a transparentní (Yuan et Krisher, 2012)
- 2/ skupina – oocyty se 3 až 5 vrstvami (Hafez et Hafez, 2000), homogenní ooplazma má drsný vzhled (Gordon, 2003) a na periferii oocytů je zóna tmavá, celkově je COC mírně tmavší a méně transparentní (Shah et Chauhan, 2017)
- 3/ skupina – 1 až 3 vrstvy buněk (Hafez et Hafez, 2000) a nebo zcela chybí (Shah et Chauhan, 2017), ooplazma je nepravidelná s tmavými shluky, COC je ještě tmavší než u předchozích skupin (Gordon, 2003)
- 4/ skupina – kumulární vrstvy expandované (Shah et Chauhan, 2017) a kumulární buňky jsou rozptýlené v tmavých shlucích v želatinózní matrix, ooplazma je nepravidelná s tmavými shluky, COC je tmavý a nepravidelný (Gordon, 2003)

Pro následné použití byly vybrány ty COC, které lze zařadit do skupiny 1 dle morfologického hodnocení oocytů.

#### **4.4 *In vitro* zrání oocytů**

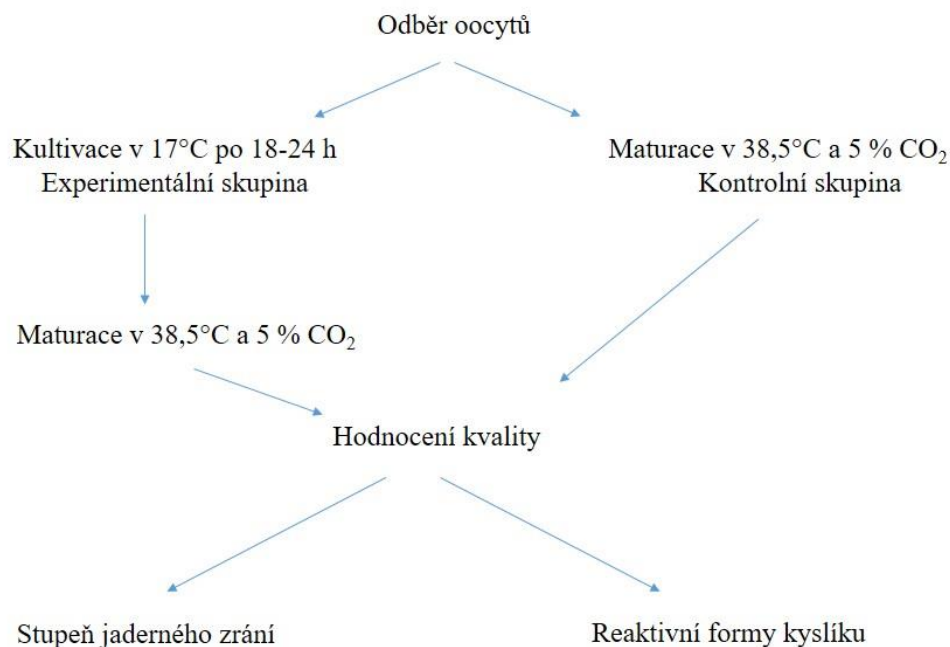
Selektované bovinní oocyty se propláchly ve třech důlcích po 0,5 ml média pro zrání oocytů (OMM) (viz příloha Tab. 6, 7) ve čtyřdůlkové kultivační misce. Po oplachu se oocyty přenesly do čtvrtého důlku s 0,5 ml OMM a 5  $\mu$ l Stimufolu (FSH 50 g/ml and LH 10 g/ml) (PARTNAR Animal Health). Čtyřdůlková kultivační miska se umístila do inkubátoru (NB-203; N-BIOTEK) o teplotě 38,2°C, 5% obsahu CO<sub>2</sub> a 95% vlhkosti. U bovinních oocytů inkubace trvala 24 h.

Selektované prasečí oocyty se propláchly ve třech důlcích po 0,5 ml kultivačního média (viz příloha Tab. 8, 9) ve čtyřdůlkové kultivační misce. Po oplachu se oocyty přenesly do čtvrtého důlku s 1 ml kultivačního média a 3 kapkami P.G. 600 (Intervet) v 1 ml rozpouštědla. Čtyřdůlková kultivační miska se umístila do inkubátoru (NB-203; N-BIOTEK) o teplotě 38,2°C, 5% obsahu CO<sub>2</sub> a 95% vlhkosti. Inkubace prasečích oocytů trvala 48 h.

## 4.5 Design experimentu

V této diplomové práci bylo porovnáváno jaderné zrání bovinních a prasečích oocytů. Oocyty od obou druhů savců se rozdělily do 2 skupin. První skupina byla kultivovaná ihned po aspiraci (kontrolní skupina). Druhá skupina byla nejdříve ponechána po dobu 18-24 hodin v termoboxu při 17°C v 1 ml BoviHold médiu (holding medium pro bovinní embrya) a pak byla kultivována (experimentální skupina). Experiment byl proveden zvláště s bovinními a prasečími oocyty.

Obr. 1 Schéma experimentu



### 4.5.1 Hodnocení jaderného zrání oocytů

Po době nutné k inkubaci pro daný živočišný druh se provedlo barvení dle protokolu s použitím Vectashield Antifade Mounting Medium s DAPI (H-1200, Vector Laboratories) a následně se vyhodnotil stupeň zrání pod fluorescenčním mikroskopem.

Po inkubaci oocytů byla kapilárou provedena jejich denudace neboli dekumulace. Poté se oocyty na 30 minut přenesly do prvního důlku čtyřdůlkové kultivační misky s 4% paraformaldehydem o objemu 500  $\mu$ l. Následně se v druhém důlku po 1 minutu prováděl oplach oocytů v 500  $\mu$ l PBS + NaN<sub>3</sub> (fosfátový pufovaný fyziologický roztok + azid sodný). Na podložní sklíčko se nanasly vedle sebe 2 kapky po 5  $\mu$ l Vectashield Antifade Mounting

Medium s DAPI (H-1200, Vector Laboratories). Do každé kapky se dalo po 5 oocytech a kapka se s oocyty promíchala. Kolem kapky s oocyty se lakem nakreslil čtvereček odpovídající velikosti krycího sklíčka. Přiložilo se krycí sklíčko a ještě se okolo zalakovalo, aby obsah nevyschl. Oocyty se pozorovaly pod fluorescenčním mikroskopem (Nikon Teclipse Ti) při zvětšení 200 a 400x.

#### **4.5.2 Detekce ROS**

Po době nutné k inkubaci pro daný živočišný druh se provedlo barvení dle protokolu s použitím DCFDA ( $H_2DCFDA$  (2',7' – dichlorofluorescein diacetate)) pro detekci buněčných forem reaktivního kyslíku (Reactive Oxygen Species – ROS).

Po inkubaci oocytů byla kapilárou provedena jejich denudace neboli dekumulace. Připravila se čtyřdůlková kultivační miska, kde do prvního a druhého důlku se po 500  $\mu$ l dal fosfátový pufovaný fyziologický roztok a polyvinylalkohol (PBS + PVA). Do třetího a čtvrtého důlku se na oplach kápily kapky po 10  $\mu$ l fosfátového pufovaného fyziologického roztoku a PBS + PVA. Čtyřdůlková kultivační miska se přemístila do inkubátoru (NB-203; N- BIOTEK) na 5 až 10 minut. Mezitím se z inkubátoru vyndala čtyřdůlková kultivační miska se zralými oocyty a ty se začaly kapilárou dekumulovat. Denudované oocyty se poté propláchly na Petriho misce ve 3 kapkách po 500  $\mu$ l PBS + PVA. Nyní se zhaslo a svítilo se jen malou žárovkou. Z mrazáku se vyndala barva DCFDA a nechala se rozmrazit zakrytá v alobalu. Pak se mohla vyjmout z inkubátoru čtyřdůlková kultivační miska. Do prvního důlku se daly vždy 2 oocyty, které sloužily jako negativní kontrola. Do druhého důlku se umístily všechny zbývající oocyty, které byly pozitivní kontrolou. Poté se do druhého důlku přidala barva DCFDA o objemu 0,5  $\mu$ l. Nyní se musela čtyřdůlková kultivační miska přemístit do inkubátoru na 20 minut. Mezitím bylo připraveno diagnostické mikroskopické sklíčko (ER- 201B-CE24; 8 well 6 mm numbered; Thermo Scientific). Do každého důlku na sklíčku se dalo 3,5  $\mu$ l PBS + PVA. Z inkubátoru se vyndala čtyřdůlková kultivační miska. Oocyty z druhého důlku na kultivační misce se opláchly v kapkách ve třetím a čtvrtém důlku. Následně se oocyty přenášely na podložní sklíčko. Do prvního důlku podložního sklíčka se přenesly oocyty z prvního důlku na kultivační misce, které představovaly negativní kontrolu. Do zbylých důlků na podložním sklíčku se po 2 až 3 umístily oocyty představující pozitivní kontrolu. Podložní sklíčko se zakrylo krycím sklíčkem a zalakovalo. Oocyty se pozorovaly pod fluorescenčním mikroskopem, za použití UV lampy při zvětšení 100x a 400x.



## 4.6 Statistická analýza výsledků

### 4.6.1 Hodnocení výskytu ROS v savčích oocytech

Produkce ROS byla hodnocena po 24 (bovinní oocyty) a 48 hodinách (prasečí oocyty) zrání. Oocyty byly nabarveny s 10  $\mu$  2', 7'-dichlorodihydrofluorescein diacetatem (Sigma-Aldrich) (20 min 39°C) a následně byly oocyty zamontovány na sklíčko (ER-201B-CE24 8 Well 6mm Numbered, Thermo Scientific). Vzorokly byly hodnoceny pomocí invertovaného fluorescenčního mikroskopu (Nikon Teclipse Ti). Získané obrázky oocytů byly pak vyhodnoceny ve specializovaném software pro analýzu digitálního obrazu NIS-Elements (ver. 4.0, Laboratory imaging, Česká Republika). Výsledky jsou vyjádřeny jako relativní intenzita fluorescence a jsou vztaženy ke kontrolní skupině.

### 4.6.2 Statistické zpracování

Všechny experimenty byly zopakovány minimálně dvakrát. Statistické zhodnocení získaných dat proběhlo v programu Statistika (ver. 12, Statsoft, ČR). Pro statistické zhodnocení jaderného zrání byl použit Chí-kvadrát test a pro zhodnocení výskytu ROS byl použit Studentův t-test. Data byla hodnocena na hladině významnosti  $P < 0,05$  a výsledky jsou prezentovány jako průměr  $\pm$  SEM.

## 5 Výsledky

### 5.1 Porovnání jaderného zrání u prasečích a bovinních oocytů

Celkově lze říci, že v kontrolní skupině se vyvíjely všechny oocyty do stádia MI a MII. Ve fázi GV zůstalo po maturaci  $0,0 \pm 0,0$  % oocytů, v MI fázi pak  $13,8 \pm 1,3$  % a do MII fáze došlo  $86,2 \pm 1,6$  % oocytů. V experimentální skupině bylo jen  $2,2 \pm 0,1$  % oocytů zastaveno v GV fázi. Metafáze I dosáhlo  $9,5 \pm 1,1$  % oocytů. Celkově nejvíce oocytů a to  $88,3 \pm 0,9$  % došlo do MII fáze. Mezi hodnocenými skupinami nebyl zjištěn žádný statisticky významný rozdíl v jaderném zrání oocytů ( $P > 0,05$ ).

Tímto srovnáním bylo zjištěno, že prasečí i bovinní oocyty dozrávaly do všech stádií velmi podobně a i přes sníženou teplotu při skladování dokázaly dozrát do stádia metafáze II (Tab. 1).

Tab. 1 Porovnání jaderného zrání prasečích a bovinních oocytů

Druh pokusu	Celkem	GV (n)	% GV	P	MI (n)	% MI	P	MII (n)	% MII	P
Kontrola	58	0	0,0 ± 0,0	P = 0,25	8	13,8 ± 1,3	P = 0,38	50	86,2 ± 1,6	P = 0,68
Experiment	137	3	2,2 ± 0,1		13	9,5 ± 1,1		121	88,3 ± 0,9	

GV – fáze zárodečného včku. MI – fáze první meiotické metafáze. MII – fáze druhé meiotické metafáze.

## 5.2 Hodnocení jaderného zrání bovinních oocytů

Po kultivaci kontrolní skupiny trvající 24 hodin nezůstal žádný oocyt ve fázi GV a do fáze MI došlo 14,3 ± 1,2 % oocytů. Největší procento oocytů z kontrolní skupiny došlo do MII stádia a to 85,7 ± 0,8 %. V druhé experimentální skupině bylo ve stádiu zárodečného včku 1,6 ± 0,3 % oocytů. Do MI stádia došlo 8,1 ± 0,4 % tedy asi o 6 % méně oocytů než v kontrolní skupině. 90,3 ± 1,9 % se dostalo do fáze metafáze II, což je ještě o 5 % více než ve skupině kontrolní. Mezi hodnocenými skupinami opět nebyl zjištěn žádný statisticky významný rozdíl v jaderném zrání oocytů ( $P > 0,05$ ).

Stejně jako u prasečích tak i u bovinních oocytů bylo dokázáno, že zůstanou životaschopné a dozrají do MII i za snížených teplot po několikahodinovém skladování (Tab. 2).

Tab. 2 Hodnocení jaderného zrání bovinních oocytů po 24 hodinách kultivace

Druh pokusu	Celkem	GV (n)	% GV	P	MI (n)	% MI	P	MII (n)	% MII	P
Kontrola	28	0	0,0 ± 0,0	P = 0,49	4	14,3 ± 1,2	P = 0,37	24	85,7 ± 0,8	P = 0,52
Experiment	62	1	1,6 ± 0,3		5	8,1 ± 0,4		56	90,3 ± 1,9	

GV – fáze zárodečného včku. MI – fáze první meiotické metafáze. MII – fáze druhé meiotické metafáze.

## 5.3 Hodnocení jaderného zrání prasečích oocytů

V kontrolní skupině zůstalo po 48hodinové kultivaci ve stádiu zárodečného včku (GV) 0,0 ± 0,0 % oocytů, ve stádiu metafáze prvního meiotického zrání (MI) 13,3 ± 0,7 % oocytů a do metafáze druhého meiotického zrání (MII) došlo 86,7 ± 0,8 % oocytů. V experimentální skupině 2,7 ± 0,2 % oocytů zůstalo v GV fázi, tudíž došlo k navýšení oproti skupině kontrolní. Do fáze MII došlo 10,7 ± 1,5 % oocytů, což je zhruba o 3 % méně než v kontrolní skupině. Avšak u experimentální skupiny do druhé metafáze došel stejný podíl oocytů a to 86,7 ± 0,5 %

jako u kontrolní skupiny. Mezi hodnocenými skupinami nebyl zjištěn žádný statisticky významný rozdíl v jaderném zrání oocytů ( $P > 0,05$ ).

Prokázalo se, že i po několikahodinovém skladování za snížených teplot prasečí oocyty zůstanou životaschopné a dozrají do metafáze II (Tab. 3).

Tab. 3 Hodnocení jaderného zrání prasečích oocytů po 48 hodinách kultivace

Druh pokusu	Celkem	GV (n)	% GV	P	MI (n)	% MI	P	MII (n)	% MII	P
Kontrola	30	0	0,0 ± 0,0	P = 0,36	4	13,3 ± 0,7	P = 0,71	26	86,7 ± 0,8	P = 1
Experiment	75	2	2,7 ± 0,2		8	10,7 ± 1,5		65	86,7 ± 0,5	

GV – fáze zárodečného vajíčku. MI – fáze první meiotické metafáze. MII – fáze druhé meiotické metafáze.

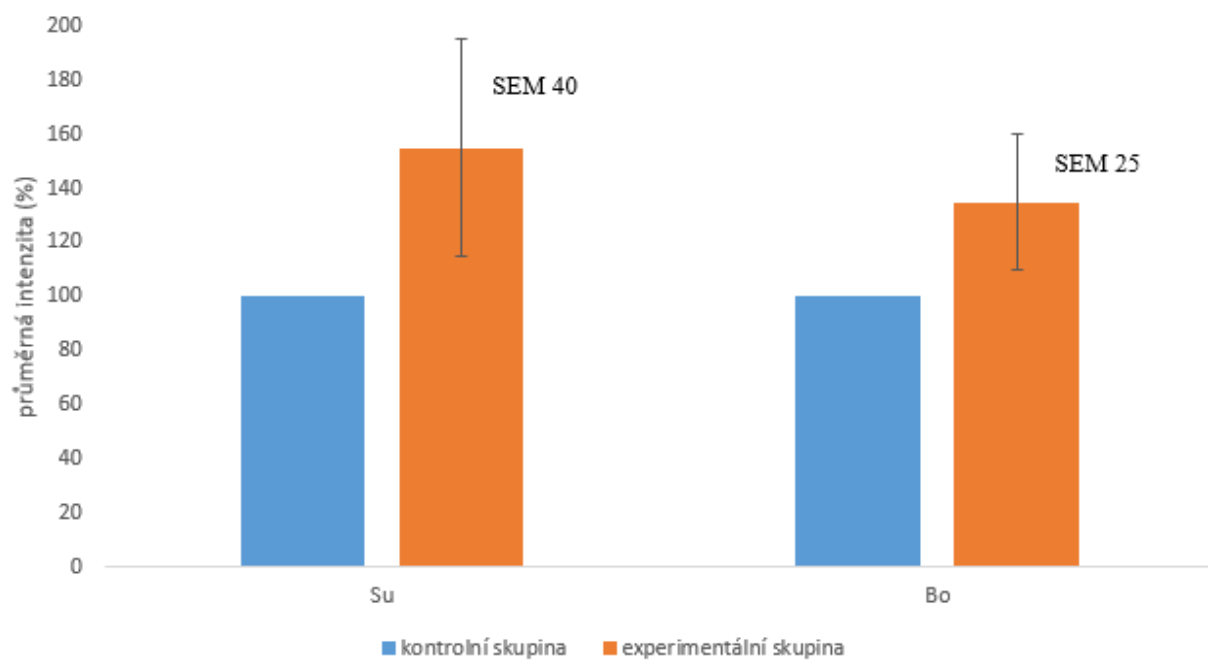
#### 5.4 Detekce reaktivních forem kyslíku

Detekce ROS byla stanovena u bovinních i prasečích oocytů, přičemž oba druhy byly hodnoceny zvlášť. Relativní výskyt reaktivních forem kyslíku se určoval pomocí metody měření fluorescenčního fluorescence. Při této metodě se vyšší výskyt ROS projevuje větší pozorovanou intenzitou fluorescence.

U každého druhu byla srovnávána průměrná intenzita fluorescence experimentální skupiny se skupinou kontrolní, jejíž hodnoty byly vzaty za referenční základ (100 %). U prasečích oocytů byla u experimentální skupiny naměřena průměrná intenzita fluorescence o 55 % vyšší oproti kontrolní skupině. Směrodatná chyba průměru byla 40 procentních bodů. V experimentální skupině u bovinních oocytů byl oproti kontrolní skupině zjištěn nárůst intenzity fluorescence o 35 %, se směrodatnou chybou průměru 25 procentních bodů. Při zkoumání průměrné intenzity fluorescence u prasečích a bovinních oocytů byl mezi kontrolními a experimentálními skupinami u obou druhů zaznamenán statisticky významný rozdíl v průměrné intenzitě fluorescence ( $P < 0,05$ ). Avšak při vzájemném porovnávání experimentálních skupin u prasečích a bovinních oocytů nebyl zjištěn žádný statisticky významný rozdíl v relativní intenzitě fluorescence ( $P > 0,05$ ) (Graf 1).

U obou druhů byla v experimentálních skupinách naměřena vyšší relativní průměrná intenzita fluorescence. Tím se potvrdil předpoklad, že čím déle bude s oocyty manipulováno v *in vitro* podmínkách, tím budou hladiny ROS narůstat.

Graf 1 Porovnání průměrné intenzity u prasečích a bovinních oocytů



Su – prasečí oocyty. Bo – bovinní oocyty. SEM – směrodatná chyba průměru.

## 6 Diskuze

V dnešní době se v rámci šlechtění hospodářských zvířat stále častěji používají biotechnologické metody (Machatková a kol., 2013). Díky těmto metodám lze využívat geneticky cenná zvířata daleko efektivněji než by tomu bylo možné u přirozené reprodukce (Yotsushima et al., 2007). Metody se týkají produkce embryí *in vivo* nebo *in vitro*. *In vitro* produkce embryí se stále rozvíjí a počet takto vyprodukovaných embryí roste (Pascottini et al., 2018). Je to kvůli stále se vyvíjejícím se metodám a technik, zlepšování podmínek kultivace a samotných kultivačních médií. Při *in vitro* produkci embryí je kromě jiného důležitý transport získaných oocytů. Jestliže byly oocyty aspirovány v terénu pomocí TUGA, je nutné převést je do kontrolovaných podmínek v laboratoři (Alm et al., 2008). Celou dobu od aspirace až do umístění do inkubátoru ale oocyty dozrávají a do laboratoře dorazí v různých stádiích zrání podle toho, zda byly aspirovány na začátku či na konci procedury (Pascottini et al., 2018). Kvůli tomuto aspektu se zdá vhodné oocyty transportovat za nižších teplot, aby byl snížen jejich metabolismus. Nedochozelo by tak k asynchronnosti ve zrání. K tomu by mohl být vhodný převoz oocytů v komerčním médiu v termoboxu.

Cílem této diplomové práce bylo ověřit hypotézu, že si savčí oocyty zachovávají vývojovou kompetenci i po uchování v 17°C v manipulačním médiu pro embrya. Tento fakt byl potvrzen experimenty s prasečími a bovinními oocyty. V rámci pokusu byly mezi sebou porovnávány fáze zrání u bovinních a prasečích oocytů. Pokud byly oocyty kultivovány v BoviHold médiu (holding medium pro bovinní embrya) poté, co byly skladovány 18-24 hodin při teplotě 17°C, do stádia MII došlo 88,3 ± 0,9 %, naproti tomu v kontrolní skupině, kde se oocyty kultivovali ihned po aspiraci, to bylo o 3 % méně ( $P > 0,05$ ). Z těchto údajů vyplývá, že se mezi těmito skupinami neprokázal žádný rozdíl ve zrání oocytů. Bylo tak prokázáno, že ani po několikahodinovém skladování při snížené teplotě oocyty neztrácí meiotickou kompetenci a jsou schopny dozrát do metafáze II. Tento výsledek je standardní a je publikován i v dalších studiích zabývajících se holdingem oocytů jako je například studie provedená autory Pascottini et al. (2018). Aby oocyty dozrály do metafáze II, je naprosto zásadní vybrat kvalitní oocyty. Na tomto výběru jsou reprodukční biotechnologie zcela závislé. Selektce oocytů je založena na hodnocení morfologických charakteristik kumulárních buněk obklopujících oocyt a hodnocení ooplazmy (Yuan et Krisher, 2012). Jako nejvhodnější pro kultivaci se používá kompaktní kumulo-oocytární komplex, který má 3 a více vrstev kumulárních buněk a zároveň nemá expandovanou kumulární masu (Shah et Chauhan, 2017). Selektované oocyty musí mít homogenní ooplazmu a kompaktní kumulární buňky, které těsně adherují na *zona pellucida*

(Yuan et Krisher, 2012). Dle našich výsledků je patrné, že oocyty byly vybírány správně, což se odrazilo na procentu dozrálých oocytů do MII a také se tím potvrzuje správnost laboratorní praxe.

Při hodnocení jaderného zrání u bovinních oocytů kontrolní i experimentální skupina dozrávala velmi podobně. Opět mezi hodnocenými skupinami nebyl zjištěn žádný statisticky významný rozdíl v jaderném zrání oocytů ( $P > 0,05$ ). Zatímco metafáze II z kontrolní skupiny dosáhlo  $85,7 \pm 0,8$  % oocytů, v experimentální skupině tomu bylo zhruba o 5 % více a to  $90,3 \pm 1,9$  %. Ve stádiu zárodečného vřetka v kontrolní skupině nezůstal žádný oocyt, zato ve skupině experimentální tomu bylo  $1,6 \pm 0,3$  %. Do fáze MI dozrálo u kontrolní skupiny  $14,3 \pm 1,2$  % oocytů, v experimentální skupině tomu bylo až o polovinu méně ( $8,1 \pm 0,4$  %). Procenta oocytů, která zůstala ve stádiu zárodečného vřetka nebo dozrála jen do MI, jsou celkem nízká, což také vypovídá o správnosti výběru kvalitních oocytů. Z těchto výsledků je tedy patrné, že zrání u oocytů skotu nebylo ovlivněno skladováním za nižších teplot. Tento experiment a z něho vyplývající výsledky se shodují s výsledky studie Pascottini et al. (2018), kteří kultivovali bovinní oocyty v médiu pro uchování embryí. Oocyty byly skladovány po různé dlouhou dobu při různých teplotách. Z jejich experimentu je zřejmé, že doba ani teplota skladování neměly vliv na procento dozrálých oocytů do MII, které se pohybovalo v rozmezí 71,9 % až 83,2 %. V této studii však byly oocyty drženy v médiu jen po 10 hodin, zatímco tato diplomová práce dokázala, že lze oocyty skladovat i po 18-24 hodin s velmi podobnými výsledky zrání. Další studie, která se zabývala skladováním bovinních oocytů, byla provedena kolektivem autorů Nazem et al. (2016). Tito autoři kultivovali oocyty v médiu pro uchování embryí při teplotě  $38,5^{\circ}\text{C}$  a  $22^{\circ}\text{C}$  po 12 hodin, kdy jich do MII dozrálo průměrně 80 % oocytů. Při  $4^{\circ}\text{C}$  dozrálo oocytů méně a to 71,6 %. Tento experiment opět dokazuje, že i přes různé teploty skladování, je velké množství oocytů schopné maturace. Toto tvrzení však částečně vyvrací studie uskutečněná Wu et al. (2000), kde mimo hodnocení zrání také posuzovali účinky nízkých teplot na tvorbu meiotického vřetena u bovinních oocytů během *in vitro* zrání. Výsledky uváděného experimentu ukazují, že pokud byly oocyty vystaveny teplotám, které nebyly nižší než  $24^{\circ}\text{C}$ , nedošlo ke zhoršení tvorby normálních meiotických vřeten a procento dozrálých oocytů s normálním vřetenem se pohybovalo okolo 70 %. Naproti tomu ochlazení oocytů na  $4^{\circ}\text{C}$  nebo na teplotu nižší, které byly oocyty vystaveny třeba jen po dobu 10 minut, drasticky snižuje tvorbu normálních meiotických vřeten a snižuje oplodnění. Při těchto teplotách dozrálo méně než 44 % oocytů s normálními meiotickými vřeteny. Naše práce sice nehodnotila meiotická vřetena, avšak v příštích studiích by bylo vhodné se na jejich hodnocení

zaměřit, jelikož naše teplota skladování 17°C byla mezi teplotami zkoumanými autory Wu et al. (2000) a bylo by dobré je ještě zhodnotit.

Dále bylo v této diplomové práci hodnoceno jaderné zrání u prasečích oocytů. Dozrávání do stádia MII, MI i GV bylo jak u kontrolní tak i u experimentální skupiny velmi podobné, tudíž se došlo k závěru, že mezi těmito skupinami nebyl zjištěn žádný statisticky významný rozdíl v jaderném zrání oocytů ( $P > 0,05$ ). Z kontrolní skupiny ve stádiu GV nezůstal žádný oocyt, v experimentální skupině se procento zvýšilo jen na  $2,7 \pm 0,2$  %. Do fáze MI dozrálo v kontrolní skupině  $13,3 \pm 0,7$  % a v experimentální skupině  $10,7 \pm 1,5$  % oocytů. Do metafáze druhého meiotického zrání dozrálo stejné procento oocytů u obou skupin a to zhruba 87 %, čímž se znovu prokázalo, že i po několikahodinovém skladování za snížených teplot prasečí oocyty zůstanou životaschopné a dozrají do metafáze II. Uvedené závěry jsou podobné výsledkům studie provedené Quadalti et al. (2016). Z uvedené studie vyplývá, že prasečí oocyty uchovávané ve 2 ml HEPES-SOF při 24°C po dobu 24 hodin se počtem dozrálých oocytů do metafáze II signifikantně nelišily od skupiny kontrolní. Také výsledky další studie autorů Liu et al. (2003) ukázaly, že pokud byly prasečí oocyty po dobu 5 až 120 minut ponechány v médiu při teplotě 24°C, bylo sice pozorováno snížené dozrávání jader i cytoplazmatického zrání, ale ve srovnání s kontrolní skupinou nedošlo k žádnému statistickému rozdílu ohledně zrání. Rovněž byla u prasečích oocytů zjištěna větší citlivost na nižší teploty při jejich uchovávání, než je tomu u bovinních oocytů. Jestliže totiž byly oocyty skladovány po stejnou dobu ale při teplotě 4°C, u většiny oocytů docházelo k inhibici jak jaderného tak i cytoplazmatického zrání a to přímo úměrně na čase. Z této studie vyplývá, že je vhodnější prasečí oocyty skladovat při vyšších teplotách než se skladují oocyty bovinní. Skladováním prasečích oocytů při vyšších teplotách se zabývali Yang et al. (2010). Jejich výsledky prokázali, že prasečí oocyty mohou být životaschopné i po 3 dnech skladování v prasečí folikulární tekutině nebo ve fetálním telecím séru při teplotě 27,5°C. Ovšem tato média nejsou zrovna ideální, jelikož je jejich složení téměř pokaždé odlišné a nedá se proto při jejich používání garantovat jejich složení. Oproti tomu používání komerčních médií má výhodu garantovaného složení a tím i shodných výsledků.

Několikahodinové skladování oocytů může být využito a dobře fungovat i u jiných savčích druhů. Důkazem je například studie provedená Dini et al. (2016) u oocytů koní, které byly skladovány přes noc v holding médiu pro embrya (EHM) ve 4°C, 17°C a 22-25°C. Procento dozrávání oocytů do metafáze druhého meiotického dělení se při různých teplotách pohybovalo mezi 60 % a 65 %, přičemž se procento dozrálých oocytů nelišilo ani mezi experimentálními skupinami ani ve srovnání se skupinou kontrolní. Wakayama et al. (2004)

se zabývali pokusem, kdy zjišťovali, jaký vliv bude mít uchovávání myších oocytů na jejich morfológickou strukturu. Experimentem bylo zjišřeno, že při skladování v médiu Chatot-Ziomek-Bavister (CZB) při 27°C nebo 37°C po 24 hodin k výskytu abnormalit nedochází a oocyty jsou v průměru z 90 % morfológicky normální. Zato ale při 4°C dochází u všech oocytů k morfológickým abnormalitám a dále se nejsou schopni normálně vyvíjet. Potvrdilo se tedy, že uchovávání oocytů může být použito i u myši a navíc s velmi dobrými výsledky. Také byl hodnocen vliv skladovacích podmínek na kvalitu preantrálních folikulů koz uzavřených v ovariální tkáni (Costa et al., 2002). V této práci byly folikuly skladovány buď ve fyziologickém roztoku či v kokosové vodě po různou dobu a při odlišných teplotách. Histologická analýza ukázala, že pro skladování po dobu až 24 hodin při 4°C mohou být použity oba roztoky, aniž by došlo k poškození preantrálních folikulů. Avšak při skladování 24 hodin při teplotě 20°C a 39°C již docházelo ke snížení počtu normálních preantrálních folikulů.

Ideta et al. (2013) upozorňují ve své studii na negativa kryokonzervace gamet a embryí s použitím tekutého dusíku. Tato metoda sice převládá při umělé reprodukci savců, ale za poslední roky se úspěšnost březosti nijak nezlepšila, jelikož zmrazení a následné rozmrazení značně poškozuje buněčné struktury. Navíc přísná regulace při přepravě kontejnerů obsahující tekutý dusík ve velké míře stěžuje výměnu gamet či embryí mezi chovateli. Předchozí studiemi bylo dokázáno, že i po dlouhodobějším skladování bez použití kryokonzervace jsou oocyty schopné dozrát do metafáze II. To samé bylo zkoušeno i s embryí a úspěšně. Při produkci embryí *in vitro*, musí ještě dozrálé oocyty v metafázi II projít přes fertilizaci do embryonálního stádia. Podobnou práci se zabývala například skupina autorů Pascottini et al. (2018), kdy byly při pokojové teplotě po 10 hodin skladovány oocyty, které se pak nechávaly dozrát do metafáze II a pak byly dále fertilizovány. Výsledkem experimentu bylo, že i z takto uchovávaných oocytů  $40,2 \pm 4,5$  % došlo do stádia 8denních blastocyst. Již v roce 1985 zkoušeli Lindner et Ellis prodloužit dobu uchování embryí bez použití tekutého dusíku. Jako médium byl použit fosfátem puřrovaný fyziologický roztok (PBS) s 10% fetálním bovinním sérem (FBS). Ačkoliv bylo toto médium schopné prodloužit dobu uchování embryí při 4°C na 1 až 3 dny, stále tato doba byla příliš krátká pro přepravu mezi vzdálenějšími chovateli. Navíc míra úspěšnosti při zabřezávání byla jen 50 %. Pokud by mohla být embrya skladována bez použití tekutého dusíku po dobu jednoho týdne a v lednici či na ledě, mohl by být transport takto uchovávaných embryí mnohem jednodušší a celkově by se zvýšila produkce skotu hlavně mléčného. Tento cíl si stanovili Ideta et al. (2013), kteří chtěli vyvinout médium, které by prodloužilo životnost embryí za hypotermických podmínek. A během experimentu, ve kterém byla bovinní embrya skladována v různých médiích po dobu až 7 dní při teplotě 4°C,



jako nejlepší médium pro uchování embryí vyšlo médium 199 s 50 % FBS. Po uchování v uvedených podmínkách byla pak embrya životaschopná z 90 %, na rozdíl od použitého média PBS s 50 % FBS, kdy byla životnost embryí jen 50 %. Avšak při studii provedené Quadalti et al. (2016) byla zjištěna změna ve vývojové kapacitě prasečích embryí při předchozím uchovávání nezralých oocytů po 24 hodin ve 2 ml HEPES-SOF při 24°C. Také ale bylo zmíněno, že je potřeba udělat více testů ohledně kinetiky oocytů, aby mohly být tyto výsledky potvrzeny. V další studii se Wakayama et al. (2004) zabývali vývojem myších blastocyst z oocytů, které byly po dobu jednoho dne uchovávány v několika médiích při různých teplotách. Z výsledků vyplynulo, že se do stádia blastocysty vyvinuly jen ty oocyty, jež byly skladované při pokojové teplotě a to z 57 %. Na rozdíl od oocytů uložených při 5°C či 0°C, kteří téměř úplně ztratili zrající potenciál.

Nejen samičí ale i samčí gamety a další testikulární buňky lze skladovat v hypotermických podmínkách, aniž by ztratily možnost fertilizace. Tímto se ve studii zabývali například Yang et Honaramooz (2010), kteří k izolaci buněk použili varlata od selat starých 1 týden. Buňky byly skladovány po 6 dní v různých médiích a po uplynulé době vykazovaly podobný potenciál jako buňky čerstvé. Tímto experimentem bylo tedy dokázáno, že buňky varlat mohou být uchovávány v hypotermických podmínkách po dobu 6 dnů se životaschopností 88 %. Také v další studii se Strand et al. (2016) zabývali uchováváním boviních testikulárních buněk. Varlata z již poražených býků byla skladována 24 hodin při teplotě 5°C. Po uplynulé době byly z varlat izolovány spermie, jež byly následně posouzeny a kryokonzervovány. Po oplození oocytů těmito spermii byla produkce blastocyst v rozmezí 21 % a 31 %. Výsledky tedy ukázaly, že i po smrti býků či jejich poražení na jatkách můžou být z nadvarlat odebrány životaschopné a oplození schopné spermie. Takto získané a uchovávané spermie mohou být použity ke skladování genetického materiálu jak hospodářských a domácích zvířat tak i ohrožených druhů.

Dále tato práce prokázala, že se v *in vitro* podmínkách zvyšuje hladina reaktivních forem kyslíku. Zatímco v experimentální skupině prasečích oocytů byla oproti kontrolní skupině naměřena průměrná intenzita fluorescence o 55 % vyšší, u boviních oocytů v experimentální skupině byl oproti kontrolní skupině zjištěn nárůst intenzity fluorescence o 35 %. Vyšší relativní průměrná intenzita fluorescence byla naměřena u obou druhů v experimentálních skupinách, čímž se potvrdil předpoklad, že delší manipulací vzniká u oocytů oxidační stres a tím se zvyšují hladiny ROS. Reaktivní formy kyslíku narušují strukturu buňky a snižují tak její životaschopnost (Goud et al., 2008). Zabránit se tomu dá přidáním antioxidantů do kultivačních médií, které zneutralizují nadbytečné ROS a zároveň snižují apoptotické faktory (Khazaei

et Aghaz, 2017). Snižováním hladiny ROS se u bovinních embryí například zabývali autoři Lojkic et al. (2012). Cílem jejich studie bylo vyhodnotit, zda přidání cysteaminu do kultivačního média zlepší kvalitu embryí. Výsledky prokázaly, že po přidání 100  $\mu$ M cysteaminu se sníží množství ROS, což vede ke zvýšení kvality embryí. U prasečích oocytů je výskyt reaktivních forem kyslíku řešen a zkoumán mnohem více než je tomu u bovinních oocytů, což je pravděpodobně kvůli velkým podobnostem prasečích oocytů s těmi lidskými a tím pádem jejich vhodnost jako modelových buněk. Jako vhodný antioxidant ke snížení ROS testovali Hyun et Kwak (2012) resveratrol. Přídavek resveratrolu do kultivačního média dokázal u prasečích oocytů snížit intracelulární hladinu ROS, čímž se zvýšila koncentrace intracelulárního glutathionu (GSH) a došlo k regulaci genů souvisejících s apoptózou. V rámci dalšího pokusu o snížení hladin ROS se Dvořáková et al. (2016) zabývali přidavkem látky S-allylcystein (SAC) do kultivačního média při *in vitro* maturaci prasečích oocytů. SAC je látka, která má vysoké antioxidační vlastnosti a přirozeně se vyskytuje v česneku (*Allium sativum*). Experimentem byla prokázána schopnost SAC o různé koncentraci významně snížit hladinu ROS v prasečích oocyttech a to v průměru o 88 % po 24 hodinách a 93 % po 48 hodinách, aniž by došlo k narušení standardního průběhu meiotického zrání. Jako další látka, která by mohla snižovat hladinu ROS, byla Lee et al. (2017) testována kyselina alfa-linolenová (ALA), což je jedna z n-3 polynenasycených mastných kyselin a nachází se v chloroplastech. Výsledkem bylo zjištění, že při oxidativním stresu přidáním ALA dochází ke zlepšení zrání prasečích oocytů zvýšením GSH a snížením hladin ROS u oocytů. Tyto výsledky tedy naznačují, že ALA má antioxidační schopnost a tato látka by mohla být použita jako antioxidant ve výrobním systému embryí prasat v *in vitro* podmínkách. Ve výše zmíněných studiích snížení hladin ROS pomocí přidávaných látek funguje. Pokud by se tedy do médií tyto látky přidávaly, množství reaktivních forem kyslíku by nebylo tak vysoké a zároveň by se zvýšil počet dozrálých oocytů i vyprodukovaných embryí, což by v konečném důsledku mohlo znamenat produkci vyššího počtu zvířat.

## 7 Závěr

Cílem práce bylo ověřit hypotézu, že si savčí oocyty zachovají vývojovou kompetenci i po uchování v 17°C v manipulačním médiu pro embrya. Vzhledem k výsledkům experimentu se podařila ověřit hypotéza, že skladování prasečích a bovinních oocytů v 17°C v manipulačním médiu pro embrya nemá vliv na jejich vývojovou kompetenci. Procenta dozrání do metafáze II se nelišila, u bovinních oocytů ve skupině kontrolní dozrálo do II  $85,7 \pm 0,8$  % oocytů, ve skupině experimentální  $90,3 \pm 1,9$  % a u prasečích oocytů bylo procento dozrálých oocytů v experimentální i kontrolní skupině stejné a to zhruba 87 %. Mezi oběma skupinami nebyl zjištěn žádný statisticky významný rozdíl ( $P > 0,05$ ). Bylo tak prokázáno, že prasečí i bovinní oocyty byly i po několikahodinovém skladování za snížených teplot stále životaschopné a dozrály do metafáze II.

Hodnotilo se také množství vzniklých reaktivních forem kyslíku (ROS). Při zkoumání průměrné intenzity fluorescence byl mezi kontrolními a experimentálními skupinami u obou druhů zaznamenán statisticky významný rozdíl v průměrné intenzitě záření ( $P < 0,05$ ). Avšak žádný statisticky významný rozdíl v relativní intenzitě záření ( $P > 0,05$ ) nebyl zjištěn při vzájemném porovnávání experimentálních skupin u prasečích a bovinních oocytů. U obou druhů byla v experimentálních skupinách naměřena vyšší relativní průměrná intenzita záření.

V této diplomové práci byly testovány podmínky pro transport oocytů, které jsou vhodné pro zpomalení a synchronizování zrání oocytů. Tyto podmínky převozu napomohou zvýšit životaschopnost oocytů a pro laboratoře lepší možnost plánování práce s oocyty a embryi. Poznatky by mohly být využity pro produkci embryí nutných pro efektivní šlechtění hospodářských zvířat či medicínský výzkum.

## 8 Přílohy

Tab. 4 Příprava zásobního roztoku OCM

Látka	Množství
Redestilovaná voda (ml)	1000
TCM-199 (M-0393) (g)	10,6
PVA (P-8136)	1
NaHCO <sub>3</sub> (S-5761) (g)	0,35 g
HEPES (H-4034) (ml)	10

Pro přípravu OCM média se nejdříve připravil zásobní roztok OCM (viz Tab. 4).

Tab. 5 Příprava OCM

Látka	Množství
Zásobní roztok OCM (ml)	100
Glutamin (G-8540) (ml)	1
Pen/Strep (P-3032/S-9137) (ml)	0,5

Následně se provedla filtrace roztoku (0,22  $\mu$ m) a uchovával se v lednici při 4°C po dobu 3 měsíců. Před chystanou aspirací se vždy musel udělat čerstvý OCM, který obsahoval již připravený zásobní OCM (viz Tab. 5).

Tab. 6 Příprava zásobního roztoku OMM

Látka	Množství
Redestilovaná voda (ml)	1000
TCM-199 (M-5017) (g)	9,5
NaHCO <sub>3</sub> (S-5761) (g)	2,2

Pro přípravu OMM se nejdříve připravilo zásobní médium pro zrání oocytů (OMM), který obsahoval destilovanou vodu, tkáňové kultivační médium 199 (TCM-199) a hydrogenuhličitan sodný (NaHCO<sub>3</sub>) (viz Tab. 6).

Tab. 7 Příprava OMM

Látka	Množství
Zásobní roztok OMM (ml)	5
FBS – FCS (ml)	0,57
Na-pyruvát (P-2256) ( $\mu$ l)	56,82
Glutamin (G-8540) ( $\mu$ l)	56,82
Gentamycin (G-1272) ( $\mu$ l)	28,41

Pro upravení pH na hodnotu 7,35 – 7,38 se přidal 1N hydroxid sodný (NaOH). Provedla se filtrace roztoku (filtr M-5017; 9,5 gr/l; 0,22  $\mu$ m) a uchovával se v lednici při 4°C po dobu 3 měsíců. Před chystanou kultivací se musel udělat čerstvý OMM, který obsahoval již připravený OMM stock, fetální bovinní sérum – fetální telecí sérum (FBS – FCS), Na-pyruvát, glutamin a gentamycin (viz Tab. 7).

Tab. 8 Příprava modifikovaného M 199

Látka	Množství
M199 (M4530) (ml)	100
Ca-laktát (g)	0,060
Na-pyruvát (g)	0,025
HEPES (g)	0,150
Gentamycin (g)	0,0025

Pro přípravu média se nejdříve připravil zásobní M199, který obsahoval M199, Ca-laktát, Na-pyruvát, HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid) a Gentamycin (viz Tab. 8).

Tab. 9 Příprava kultivačního média

Látka	Množství
Modifikované M199 (ml)	1
BSA (A2163) (g)	0,005
FCS (F2442) (μl)	50

Roztok se skladoval ve 20ml stříkačkách při 4°C. Před chystanou kultivací se muselo udělat čerstvé kultivační médium, které obsahovalo již připravené modifikované M199, bovinní sérový albumin (BSA) a fetální telecí sérum (FCS) (viz Tab. 9).

## 9 Seznam grafů, obrázků a tabulek

Graf 1 Porovnání průměrné intenzity u prasečích a bovinních oocytů.....	28
Obr. 1 Schéma experimentu.....	23
Tab. 1 Porovnání jaderného zrání prasečích a bovinních oocytů.....	26
Tab. 2 Hodnocení jaderného zrání bovinních oocytů po 24 hodinách kultivace.....	26
Tab. 3 Hodnocení jaderného zrání prasečích oocytů po 48 hodinách kultivace.....	27
Tab. 4 Příprava zásobního roztoku OCM.....	36
Tab. 5 Příprava OCM.....	36
Tab. 6 Příprava zásobního roztoku OMM.....	36
Tab. 7 Příprava OMM.....	36
Tab. 8 Příprava modifikovaného M 199.....	37
Tab. 9 Příprava kultivačního média.....	37

## 10 Seznam literatury

29th Annual Meeting A.E.T.E. 2013. Istanbul. p. 239.

Abeydeera, L. R. 2002. In vitro production of embryo in swine. *Theriogenology*. 57. 257-273.

Akers, R. M., Denbow, D. M. 2013. *Anatomy and Physiology of Domestic Animals*. 2nd ed. Wiley-Blackwell. p. 680. ISBN: 9781118356388.

Alm, H., Choi, Y., Love, L., Heleil ,B., Torner, H., Hinrichs, K. 2008. Holding bovine oocytes in the absence of maturation inhibitors: kinetics of in vitro maturation and effect on blastocyst development after in vitro fertilization. *Theriogenology*. 70. 1024-1029.

Aughey, E., Frye, F. L. 2001. *Comparative veterinary histology with clinical correlates*. Manson Publishing. London. p. 269. ISBN: 1874545669.

Banks, W. J. 1993. *Applied veterinary histology*. 3rd ed. Mosby. p. 527. ISBN: 0801666104.

Bayir, H. 2005. Reactive oxygen species. *Critical Care Medicine*. 33 (12). 498-501.

Bilodeau-Goeseels, S. 2011. Cows are not mice: the role of cyclic AMP, phosphodiesterases, and adenosine monophosphate-activated protein kinase in the maintenance of meiotic arrest in bovine oocytes. *Molecular Reproduction and Development*. 78. 734-743.

Blondin, P. 2017. Logistics of large scale commercial IVF embryo production. *Reproduction, Fertility and Development*. 29. 32-36.

Brinsko, S. P., Blanchard, T. L., Varner, D. D., Schumacher, J., Love, Ch. C., Hinrichs, K., Hartman, D. 2011. *Manual of Equine Reproduction*. 3rd ed. Mosby. St Louis. p. 336. ISBN: 9780323064828.

Britt, J. H., 2008. Oocyte development in cattle: physiological and genetic aspects. *Sociedade Brasileira de Zootecnia*. 37. 110-115.

Brüssow, K. P., Torner, H., Rátky, J., Hunter, M. G., Nürnberg, G. 1997. Ovum pick up in swine: the influence of aspiration vacuum pressure on oocyte recovery from preovulatory follicles. *Acta Veterinaria Hungarica*. 45 (2). 189-196.

Boni, R. 2012. Ovum pick-up in cattle: a 25 yr retrospective analysis. *Animal Reproduction*. 9 (3). 362-369.

Carter, J. A., Bellow, S., Meintjes, M., Perez, O., Ferguson, E., Godke, R. A. 2002. Transvaginal ultrasound-guided oocyte aspiration for production of embryos *in vitro*. *Archiv fur Tierzucht*. 45(1). 99-108.

Costa, S. H. F., dos Santos, R. R., Ferreira, M. A. L., Machado, V. P., Rodrigues, A. P. R., Ohashi, O. M., Figueiredo, J. R. 2002. Preservation of goat preantral follicles in saline or coconut water solution. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*. 39 (6). 324-330.

Dini, P., Pascottini, O. B., Ducheyne, K., Hostens, M., Daels, P. 2016. Holding equine oocytes in a commercial embryo-holding medium: New perspective on holding temperature and maturation time. *Theriogenology*, 86 (5). 1361-1368.

Dvořáková, M., Heroutová, I., Němeček, D., Adámková, K., Krejčová, T., Nevoral, J., Kučerová Chrpová, V., Petr, J., Sedmíková, M. 2016. The antioxidative properties of S-allyl cysteine not only influence somatic cells but also improve early embryo cleavage in pigs. *PeerJ*.

Eppig, J. J., O'Brien M., Wigglesworth, K. 1996. Mammalian oocyte growth and development in vitro. *Molecular Reproduction and Development*. 44 (2). 260-273.

Eurell, J. A., Frappier, B. L. 2006. *Dellmann's Textbook of veterinary histology*. 6th ed. Blackwell Publishing. p. 420. ISBN: 0781741483.



Fry, R. C., Niall, E. M., Simpson, T. L., Squires, T. J., Reynolds, J. 1997. The collection of oocytes from bovine ovaries. *Theriogenology*. 47. 977–987.

Gordon, I. 2003. Laboratory production of cattle embryos. CABI Publishing. Cambridge. p. 592. ISBN: 0851996663.

Gosden, R. G., Telfer, E. 1987. Numbers of follicles and oocytes in mammalian ovaries and their allometric relationships. *Journal of Zoology*. 211. 169-175.

Goud, A. P., Goud, P. T., Diamond, M. P., Gonik, B. Abu-Soud, H. M. 2008. Reactive oxygen species and oocyte aging: Role of superoxide, hydrogen peroxide and hypochlorous acid. *Free Radical Biology and Medicine*. 44 (7). 1295-1304.

Hafez, B., Hafez, E.S.E. 2000. Reproduction in farm animals. 7th edition. Lippincott Williams & Wilkins. USA. p. 509. ISBN: 0683305778.

Hirao, Y., Nagai, T., Kubo, M., Miyake M., Kato, S. 1994. *In vitro* growth and maturation of pig oocytes. *Journal of Reproduction and Fertility*. 100. 333-339.

Hopper, R. M. 2015. Bovine reproduction. Wiley Blackwell. p. 816. ISBN: 9781118470831.

Hruda, R., Sasáková, M. 2017. Úspěchy embryoprogramu Delta Satellite i u nás. *Chov Skotu*. 14. 5. 22-23.

Hyttel, P., Sinowatz, F., Vejlsted, M. 2010. Essentials of domestic animal embryology. Saunders Elsevier. ISBN: 9780702028991.

Hyun, S. H., Kwak, S. S. 2012. The effects of resveratrol on oocyte maturation and preimplantation embryo development. *Journal of Embryo Transfer*. 27 (2). 71-80.

Hunter, M. G. 2000. Oocyte maturation and ovum quality in pigs. *Reviews of Reproduction*. 5. 122-130.

Ideta, A., Aoyagi, Y., Tsuchiya, K., Kamijima, T., Nishimiya, Y., Tsuda, S. 2013. A simple medium enables bovine embryos to be held held for seven days at 4°C. Scientific Reports. 3. 1173.

Im, K. S., Kim, H. J., Chung, K. M., Kim, H. S., Park, K. W. 1995. Effects of ovary type, oocyte grade, hormone, sperm concentration and fertilization medium on in vitro maturation, fertilization and development of bovine follicular oocytes. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences. 8 (2). 123-127.

Kanitz, W., Brüssow, K.-P., Becker, F., Torner, H., Schneider, F., Kubelka, M., Tomek, W. 2001. Comparative aspects of follicular development, follicular and oocyte maturation and ovulation in cattle and pigs. Archiv Tierzucht. 44. 9-23.

Khazaei, M., Aghaz, F. 2016. Reactive oxygen species generation and use of antioxidants during *in vitro* maturation of oocytes. International Journal of Fertility and Sterility. 11 (2). 63-70.

Klein, B. G. 2013. Cunningham's textbook of veterinary physiology. 5th edition. Elsevier.Missouri. ISBN: 9781437723618.

König, H. E., Liebich, H. G. 2002. Anatomie domácích savců 2. Hajko a Hajková. Bratislava. 416 s. ISBN: 8088700574.

Laurinčík, J., Krošlák, P., Hyttel, P., Pivko, J., Sirotkin, A. 2012. Bovine cumulus expansion and corona- oocyte disconnection during culture in vitro. Reproduction Nutrition Development, EDP Sciences. 32 (2). 151-161.

Lee, J. E., Hwangbo, Y., Kim, H. Y., Cheong, H. T., Yang, B. K., Park, Ch. K. 2017. Antioxidant effect of alpha-linolenic acid during in vitro maturation in porcine oocytes. Reproductive and Developmental Biology. 41 (4). 65-70.

Lindner, G. M., Ellis, D. E. 1985. Refrigeration of bovine embryos. Theriogenology 23, 202.

Liu, R. H., Sun, Q. Y., Li, Y. H., Jiao, L. H., Wang, W. H. 2003. Maturation of porcine oocytes after cooling at the germinal vesicle stage. Cambridge University Press. 11 (4). 299-305.

Lonergan, P., Dinnyes, A., Fair, T., Yang, X., Boland, M. 2000. Bovine oocyte and embryo development following meiotic inhibition with butyrolactone I. Molecular Reproduction and Development. 57. 204-209.

Lonergan, P., Managhan, P., Rizos, D., Boland, M. P., Gordon, I. 1994. Effect of follicle size on bovine oocyte quality and developmental competence following maturation, fertilization, and culture in vitro. Molecular Reproduction and Development. 37. 48-53.

Louda, F. 2001. Inseminace hospodářských zvířat se základy biotechnických metod. Česká zemědělská univerzita. Praha. 225 s. ISBN: 8021307021.

Luvoni, G. C., Keskinetepe, L., Brackett, B. G. 1996. Improvement in bovine embryo production in vitro by glutathione-containing culture media. Molecular Reproduction and Development. 43. 437-443.

Machatková, M., Jeřeta, M., Čtvrtlíková Knitlová, D., Hanzalová, K. 2013. Diferencované zrání bovinních oocytů využitelných pro reprodukční biotechnologie. Výzkumný ústav veterinární lékařství, v.v.i. Brno. ISBN: 9788086895321.

Machatková, M., Jeřeta, M., Hulínská, P. 2009. Faktory ovlivňující efektivnost produkce embryí skotu in vitro. Náš Chov. 11. 24-26.

Machatková, M., Jeřeta, M., Knitlová, D., Hanzalová, K. 2013. Deferencované zrání bovinních oocytů využitelných pro reprodukční biotechnologie. Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i. Brno. ISBN: 9788086895321.

Manik, R. S., Singla, S.K., Palta, P. 2002. Recovery and cleavage rate of oocytes retrieved through transvaginal ultrasound-guided aspiration of follicles in Indian cattle. Theriogenology. 57. 791.

Marshall, D. M., Minyard, J. A. 2002. Embryo transfer in beef cattle. Extension Extra. 5.

Martino, N. A., Dell'Aquila, M. E., Uranio, M. F., Rutigliano, L., Nicassio, M., Lacalandra, G. M. 2014. Effect of holding equine oocytes in meiosis inhibitor-free medium before in vitro maturation and of holding temperature on meiotic suppression and mitochondrial energy/redox potential. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 12. 99.

McGeedy, T. A., Quinn, P. J., Fitzpatrick, E. S., Ryan, M. T., Kilroy, D., Lonergan, P. 2017. *Veterinary embryology*. 2nd edition. Wiley Blackwell. ISBN: 9781118940617.

Moor, R. M., Mattioli, M., Ding, J., Nagai, T. 1990. Maturation of pig oocytes in vivo and in vitro. *Journal of Reproduction and Fertility*. 40. 197-210.

Najbrt, R., Bednář, K., Červený, Č., Kaman, J., Mikyska, E., Štarha, O. 1982. *Veterinární anatomie 2*. Státní zemědělské nakladatelství. Praha. 596 s. ISBN: 0700682.

Nazem, M., Moghadam, M. F., Akbari, G., Eslampour, M. A. 2016. Effect of embryo holding on bovine oocyte maturation outside the inkubátor. *Biosciences Biotechnology Research Asia*. 13 (3). 1639-1643.

Noakes, D. E., Parkinson, T. J., England, G. C. W. 2001. *Arthur's veterinary reproduction and obstetrics*. Saunders Elsevier. p. 868. ISBN: 9780702025563.

Okere, C., Nelson, L. 2002. Novel reproductive techniques in swine reproduction. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*. 15 (3). 445-452.

Palma, G. A., Arganaraz, M. E., Barrera, A. D., Rodler, D., Mutto, A. Á., Sinowatz, F. 2012. *The Scientific World Journal*. p. 12.

Pascottini, O. B., Catteuw, M., Soom, A. V., Opsomer, G. 2018. Holding immature bovine oocytes in a commercial embryo holding medium: High developmental competence for up to 10 h at room temperature. *Theriogenology*. 107. 63-69.

Paulini, F., Silva, R. C., de Paula Rôlo, J. L. J., Lucci, C. M. 2014. Ultrastructural changes in oocytes during folliculogenesis in domestic mammals. *Journal of Ovarian Research*. 7. 102.

Picton, H. M., Harris, S. E., Muruvi, W., Chambers, E. L. 2008. The in vitro growth and maturation of follicles. *Reproduction*. 136. 703-715.

Qi, M., Yao, Y., Ma, H., Wang, J., Zhao, X., Liu, L., Tang, X., Zhang, L., Zhang, S., Sun, F. 2013. Transvaginal ultrasound-guided ovum pick-up (OPU) in cattle. *Biomimetics Biomaterials and Tissue Engineering*. 18. 118.

Quadalti, C., Lagutina, I., Lazzari, G., Galli, C. 2016. Holding pig oocytes at 24°C prior to in vitro maturation alters the developmental capacity after in vitro fertilisation but not parthenogenetic activation. *Reproduction Fertility and Development*. 28 (2). 233.

Racek, J., Holeček, V. 1999. Enzymy a volné radikály. *Chemické Listy*. 93. 774-780.

Richard, F. J. 2007. Regulation of meiotic maturation. *Journal of Animal Science*. 85 (13). E4-E6.

Rodgers, R. J., Irving-Rodgers, H. F. 2010. Morphological classification of bovine ovarian follicles. *Reproduction*. 139. 309-318.

Shah, S. M., Chauhan, M. S. 2017. *Reproduction in buffalo. Natural and Assisted Reproductive Techniques*. Notion Press. Chennai. ISBN: 9781946556448.

Schernthaner, W., Wenigerkind, H., Boxhammer, K., Jung, P., Stojkovic, M., Wolf, E. 1998. Storage of bovine oocytes after ultrasound-guided follicle aspiration: effects on developmental competence. In: *Proceedings 14th Meeting Euro-pean Embryo Transfer Association, Venice*, p. 242.

Singh, J. 1997. *Bovine ovary: Morphologic and biochemical kinetics*. University of Saskatchewan. 252.

Sirard, M. A., Coenen, K. 2006. In vitro maturation and embryo production in cattle. *Methods in Molecular Biology*. 348. 35-42.

Smiljaković, T., Tomek, W. 2006. Meiotic maturation and in vitro maturation in cattle. *Biotechnology in Animal Husbandry*. 22 (1-2). 29-34.

Solano, R., de Armas, R., Pupo, C. A., Castro, F. O. 1994. Short term preservation of intrafollicular oocytes at 4°C. *Theriogenology*. 41. 299.

Sovernigo, T. C., Adona, P. R., Monzani, P. S., Guemra, S., Barros, F., Lopes, F. G., Leal, C. 2017. Effects of supplementation of medium with different antioxidants during in vitro maturation of bovine oocytes on subsequent embryo production, *Reproduction in Domestic Animals*. 52 (4). 561-569.

Statistics of Embryo Collection and Transfer in Domestic Farm Animals. 2013. IETS Data Retrieval Committee. p. 13.

Statistics of Embryo Collection and Transfer in Domestic Farm Animals. 2015. IETS Data Retrieval Committee. p. 16.

Statistics of Embryo Collection and Transfer in Domestic Farm Animals. 2016. IETS Data Retrieval Committee. p. 16.

Strand, J., Ragborg, M. M, Pedersen, H. S., Kristensen, T. T., Pertoldi, C., Callesen, H. 2016. Effects of post-mortem storage conditions of bovine epididymides on sperm characteristics: investigating a tool for preservation of sperm from endangered species. *Conservation Physiology*. 4 (1).

Tanghe, S., Van Soom, A., Nauwynck, H., Coryn, M., de Kruif, A. 2002. Minireview: functions of the cumulus oophorus during oocyte maturation, ovulation, and fertilization. *Molecular Reproduction and Development*. 61. 414-424.

Terlouw, S. L., Dobrinsky, J. R. 2010. Pig embryo transfer: A glimpse into the future. *Pig Progress*. 26 (3). 14-16.

Tiwari, M., Chaube, S. K. 2017. Increase of Reactive Oxygen Species Associates with the Achievement of Meiotic Competency in Rat Oocytes Cultured In Vitro. *Cell Med Press*. 4. 320-335.

Tiwari, M., Prasad, S., Tripathi, A., Pandey, A. N., Singh, A. K., Shrivastav, T. G., Chaube, S. K. 2015. Involvement of Reactive oxygen species in meiotic cell cycle regulation and apoptosis in mammalian oocytes. *Reactive Oxygen Species. Cell Med Press*.1 (2). 110-116.

Yang, C. R., Miao, D. Q., Zhang, Q. H., Guo, L., Tong, J. S., Wei, Y., Huang, X. Hou, Y., Schatten, H., Liu, Z. H., Sun, Q. Y. 2010. Short-term preservation of porcine oocytes in ambient temperature: Novel approaches. *PLoS ONE*. 5 (12).

Yang, H. W., Hwang, K.J., Kwon, H. C., Kim, H. S., Choi, K. W., Oh, K. S. 1998. Detection of reactive oxygen species (ROS) and apoptosis in human fragmented embryos. *Human Reproduction*. 13. 998-1002.

Yang, N., Lu, K., Gordon, I. 1990. In vitro fertilization and culture of bovine oocytes from stored ovaries. *Theriogenology*. 33. 352.

Yang, X., Kubota, C., Suzuki, H., Taneja, M., Bols, P. E. J., Presicce, G. A. 1997. Control of oocyte maturation in cows- Biological factors. *Theriogenology*. 49. 471-482.

Yang, Y., Honaramooz, A. 2010. Effects of medium and hypothermic temperatures on preservation of isolated porcine testis cells. *Reproduction, fertility, and development*. 22. 523–532.

Yotsushima, K., Shimizu, M., Kon, H., Izaike, Y. 2007. A simple method for selection of cumulus-oocyte complexes from bovine ovaries by sedimentation with Percoll. *Journal of Reproduction and Development*. 53 (4).

Yuan, Y., Krisher, R. L. 2012. In vitro maturation (IVM) of porcine oocytes. *Methods in Molecular Biology*. 825. 183-198.

Wakayama, S., Thuan, N. V., Kishigami, S., Ohta, H., Mizutani, E., Hikichi, T., Miyake, M., Wakayama, T. 2004. Production of offspring from one-day-old oocytes stored at room temperature. *Journal of Reproduction and Development*. 50 (6). 627-637.

Walters, E. M., Graves, C. N. 1998. Transportation and storage effects on porcine ovaries. *Journal of Animal Science*. 76 (2). 69.

Wang, S., Holyoak, G. R., Liu, Y., Bunch, T. D. 1995. Interaction of oviduct epithelial cells and fetal bovine serum in the co-culture of in vitro produced bovine embryos. *Journal of Animal Science*. 73 (1) 304.

Wang, W. H., Abeydeera, L. R., Cantley, T. C., Day, B. N. 1997. *Journal of Reproduction and Fertility*. 111. 101-108.

Wu, B., Tong, J, Leibo, S. P. 2000. Effects of cooling germinal vesicle-stage bovine oocytes on meiotic spindle formation following in vitro maturation. *Gamete Biology*. 54 (4). 388-395.