Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra chovu hospodářských zvířat

Fakulta agrobiologie,
potravinových a přírodních zdrojů

Vliv stresu na kvalitu a výtěžnost aspirovaných oocytů u dojnic

Diplomová práce

Autor práce: Nikola Marešová

Obor studia: Reprodukční biotechnologie

Vedoucí práce: doc. Ing. Luděk Stádník, Ph.D.

© 2024 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Vliv stresu na kvalitu a výtěžnost aspirovaných oocytů u dojnic" 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 21.4.2024 _____

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala doc. Ing. Luďkovi Stádníkovi, Ph.D. za odborné vedení, za pomoc a rady při zpracování této práce. Dále bych ráda poděkovala Ing. Jaromírovi Ducháčkovi Ph.D. za pomoc při statistickém zpracování dat.

Vliv stresu na kvalitu a výtěžnost aspirovaných oocytů u dojnic

Souhrn

Cílem této diplomové práce bylo detekovat vztah mezi vybranými indikátory stresu a množstvím a kvalitou oocytů získaných metodou ovum pick-up u dojnic. Hypotézou práce byl předpoklad, že vyšší hladiny indikátorů stresu v krvi, respektive v mléce dojnic působí negativně na výtěžnost a kvalitu jejich aspirovaných oocytů. Efekt stresu ve výzkumné části byl reprezentován metabolickým stresem a efekty jednotlivých indikátorů stresu byly hodnoceny jednotlivě ke vztahu k počtu oocytů získaných metodou ovum pick-up a k parametrům hodnotícím jejich kvalitu. Vybrané parametry byly sledovány u 143 prvotelek holštýnského skotu v první třetině laktace. Metabolický stres byl sledován na základě poměru bílkovin a tuku v mléce a na základě hodnot vybraných parametrů (cholesterol, triacylglycerol, betahydroxybutyrát, neesterifikované mastné kyseliny) dostupných z výsledků biochemického vyšetření krve. Aspirace oocytů proběhla zpravidla dvakrát s týdenní pauzou mezi odběry. Celkem proběhlo 7 odběrových dní v různých částech roku (listopad 2021, duben 2022, květen 2022, říjen 2022, duben 2023) s celkovým počtem 260 odběrů. Získané oocyty byly po odběru přeneseny do laboratoře Ústavu živočišné fyziologie a genetiky akademie věd České republiky v Liběchově pro posouzení jejich kvality. Pro následné statistické vyhodnocení výsledků byl použit program SAS 9.4. Negativní vztah mezi počtem získaných oocytů byl prokázán korelační analýzou u metabolitu betahydroxybutyrátu ($r = -0,15$; $P < 0,05$) a detailní vyhodnocení u efektu průměrného poměru tuku a bílkovin do první aspirace oocytů značilo, že při vyšším poměru tuku a bílkovin v mléce pod vlivem metabolického stresu může být od dojnic odebráno nižší množství oocytů. U parametrů kvality byl negativní vztah prokázán korelační analýzou u hladiny triacylglycerolu mezi kvalitou kumulo-oocytárního komplexu ($r = -0,19$; $P < 0,05$) a mírou zrání ($r = -0,25$; $P < 0,01$), což značí, že při zvýšené hladině triacylglycerolu dosahují oocyty nižší kvality se sníženým procentem dosažení MII fáze. U některých metabolitů stresu byly ale zjištěny i pozitivní vztahy mezi jejich hladinou a počtem získaných oocytů. Korelační analýzou byl tento vztah prokázán u cholesterolu ($r = 0,17$; $P < 0,01$) a triacylglycerolu ($r = 0,15$; $P < 0,05$). Detailním vyhodnocením efektu cholesterolu bylo zjištěno, že u třetí skupiny dojnic (> 5,14) bylo odebráno nejvíce oocytů ($5,30 \pm 0,411$) s prokazatelným rozdílem mezi touto a první skupinou (< 4,07). Na základě různých výsledků pro jednotlivé indikátory stresu nelze celkově hypotézu diplomové práce potvrdit. Tato diplomová práce přináší srovnání vztahu jednotlivých indikátorů metabolického stresu a počtem a kvalitou odebraných oocytů. Poznatky mohou být využity v dalších studiích pro vyhodnocení nejvíce vypovídajícího indikátoru, který by mohl negativně či pozitivně ovlivnit vývojovou kompetenci oocytů a reprodukční výkonnost dojnic.

Klíčová slova: metabolický stres, reprodukce, cholesterol, triacylglycerol, betahydroxybutyrát, neesterifikované mastné kyseliny

Effect of stress on the the quality and yield of aspirated oocytes in dairy cows

Summary

The aim of this thesis was to detect the relationship between selected stress indicators and the quantity and quality of oocytes obtained by the ovum pick-up method in dairy cows. The hypothesis of the thesis was that higher levels of stress indicators in the blood or milk have a negative effect on the yield and quality of their aspirated oocytes. The effect of stress in the research part was represented by metabolic stress and the effects of individual stress indicators were evaluated individually in relation to the number of oocytes obtained by the ovum pick-up method and to parameters assessing their quality. The selected parameters were monitored in 143 Holstein cows on first lactation. Metabolic stress was monitored on the basis of the protein/fat ratio in milk and on the basis of the values of selected parameters (cholesterol, triacylglycerol, betahydroxybutyrate, non-esterified fatty acids) available from the results of biochemical blood tests. Oocyte aspiration was usually performed twice with a one week gap between collections. A total of 7 sampling days were performed in different parts of the year (November 2021, April 2022, May 2022, October 2022, April 2023) with a total of 260 aspirations. After collection, the obtained oocytes were transferred to the laboratory of the Institute of Animal Physiology and Genetics of the Academy of Sciences of the Czech Republic in Liběchov for quality assessment. A negative correlation between the number of oocytes obtained was demonstrated by correlation analysis for the metabolite betahydroxybutyrate ($r = -0.15$; $P < 0.05$) and a detailed evaluation of the effect of the average fat/protein ratio until the first oocyte aspiration indicated that with a higher fat/protein ratio in milk under metabolic stress, fewer oocytes may be collected from dairy cows. For quality parameters, a negative relationship was demonstrated by correlation analysis for triacylglycerol levels between the quality of the cumulo-oocyte complex ($r = -0.19$; $P < 0.05$) and the maturation rate ($r = -0.25$; $P < 0.01$), indicating that at elevated triacylglycerol levels, oocytes reach lower quality with a reduced percentage reaching the MII phase. However, some metabolites were also found to have positive relationships between their levels and the number of oocytes retrieved. By correlation analysis, this relationship was demonstrated for cholesterol ($r = 0.17$; $P < 0.01$) and triacylglycerol ($r = 0.15$; $P < 0.05$). Detailed evaluation of the effect of cholesterol revealed that the third group of dairy cows (> 5.14) had the highest number of oocytes retrieved (5.30 ± 0.411) with a demonstrable difference between this group and the first group (< 4.07). Based on the different results for the different stress indicators, the overall hypothesis of the thesis cannot be confirmed. This thesis presents a comparison of the relationship between each metabolic stress indicator and the number and quality of oocytes retrieved. The findings can be used in further studies to evaluate the most meaningful indicator that could negatively or positively influence oocyte developmental competence and reproductive performance of dairy cows.

Keywords: metabolic stress, reproduction, cholesterol, triacylglycerol, betahydroxybutyrate, non-esterified fatty acids

Obsah

1 Úvod 8

2 Vědecká hypotéza a cíle práce 9

3 Literární rešerše 10

3.1 Faktory ovlivňující užitkovost skotu 10

3.2 Stres 10

3.2.1 Stresor 11

3.2.2 Fyziologie stresové reakce 11

3.2.3 Indikátory stresu 13

3.2.4 Stresové faktory v chovu skotu 14

3.2.4.1 Tepelný stres 15

3.2.4.2 Metabolický stres a výživa 16

3.2.4.3 Ostatní stresové faktory 16

3.3 Reprodukce v chovu dojnic 18

3.4 Oocyty 20

3.4.1 Odběr oocytů 20

3.4.1.1 Odběr oocytů in vitro – post mortem 20

3.4.1.2 Odběr oocytů in vivo – metoda ovum pick-up 21

3.4.2 Hodnocení oocytů 25

3.4.3 Využití – in vitro produkce embryí (IVP) 26

3.5 Vliv stresu na reprodukci dojnic 29

3.5.1 Mechanismy vlivu stresu na reprodukci 29

3.5.2 Vliv stresu na kvalitu oocytů 31

4 Metodika 35

4.1 Charakteristika podniku 35

4.2 Soubor hodnocených zvířat 35

4.3 Odběr oocytů - ovum pick-up 36

4.4 Hodnocení kvality oocytů 37

4.5 Odběr a vyšetření krve 38

4.6 Sledování metabolického stresu 38

4.7 Statistické vyhodnocení 39

5 Výsledky 40

5.1 Základní statistiky odběru a hodnocení kvality oocytů 40

5.2 Základní statistiky parametrů metabolického stresu 41

5.3 Korelační analýza 42

5.4 Vyhodnocení modelové rovnice 44
5.4.1 Cholesterol 44
5.4.2 Triacylglycerol 45
5.4.3 Betahydroxybutyrát 46
5.4.4 Neesterifikované mastné kyseliny 48
5.4.5 Průměrný poměr tuku a bílkovin do 1. aspirace 49
5.4.6 Poměr tuku a bílkovin v den aspirace 50
6 Diskuze 52
7 Závěr 55
8 Literatura 56

1 Úvod

Na zvířata, jejich užitkovost i plodnost působí vzájemně několik vnitřních i vnějších faktorů. Některé tyto faktory, jako například klimatické podmínky, výživa a ustájení (Louda et al. 2007) působí jako stresory, a ty narušují produkční a reprodukční vlastnosti zvířat (Chmelíková et al. 2023). Pokud je organismus vystaven stresoru, tak centrální nervový systém na něj reaguje fyziologickou a behaviorální odezvou (Squires 2003). Behaviorální odpověď může zahrnovat snížený příjem krmiva, či sníženou dobu lehání a odpočinku (Keyserlingk et al. 2008), zatímco fyziologická odpověď zahrnuje aktivaci osy sympato-adreno-medulární (SAM) a osy hypothalamo-hypofyzární (HPA) (Squires 2003). Fyziologická odpověď může zahrnovat také změnu v hladině metabolitů (Song et al. 2021) či změnu ve složení mléka (Gross et al. 2011).

Mechanismy aktivované stresovou reakcí pak negativně ovlivňují reprodukci zvířat několika principy. Například pod vlivem tepelného stresu dochází k narušení mnoha reprodukčních procesů, včetně kompetence oocytů, embryonálního růstu, sekrece gonadotropinů, steroidogeneze ovariálních folikulů, vývoje žlutého tělíska a reakcí děložního endometria (Wolfenson & Roth 2019). Podle Roth (2008) se zdá být hlavním faktorem, kterým tepelný stres ovlivňuje plodnost, poškození folikulů a v nich obsažených oocytů.

I metabolický stres ovlivňuje plodnost. S výskytem negativní energetické bilance (NEB) souvisí endokrinní a metabolické důsledky na organismus (Leroy et al. 2008). Dochází k aktivaci osy hypofýza-hypotalamus-vaječníky a ke změně biochemického profilu ovariálních folikulů, oocytů, vyvíjejícího se embrya, žlutého tělíska a dělohy, což v konečném důsledku může vést k nízké míře zabřeznutí (Sammad et al. 2022).

Celkově stres ovlivňuje plodnost i produkci skotu (Lucy 2019). Zvířata, která trpí chronickým stresem, nemají stejnou reprodukční úspěšnost jako zvířata, která stresem netrpí a akutní stresory mohou narušit reprodukční funkce v kritických obdobích reprodukčního cyklu (Squires 2003).

2 Vědecká hypotéza a cíle práce

Cílem této diplomové práce bylo detekovat vztah mezi vybranými indikátory stresu a množstvím a kvalitou oocytů získaných metodou ovum pick-up u dojnic. Hypotézou práce byl předpoklad, že vyšší hladiny indikátorů stresu v krvi, respektive v mléce dojnic působí negativně na výtěžnost a kvalitu jejich aspirovaných oocytů.

3 Literární rešerše

3.1 Faktory ovlivňující užitkovost skotu

Užitkové vlastnosti jsou limitovány dědičným založením a jejich realizace je ovlivněna prostředím. Jednotlivé faktory působí na užitkovost ve vzájemné interakci genotypu a prostředí (Skládanka et al. 2014). Mezi vnější podmínky prostředí, které užitkovost ovlivňují, můžeme zahrnout například klimatické podmínky, roční dobu, výživu, ustájení, ošetřování, sociální hierarchii ve stádě a organizaci chovu. Jednotlivé faktory vnějšího prostředí působí na organizmus zvířete většinou souběžně jako celek a reakce jedince je individuální (Louda et al. 2007).

Koeficient dědivosti pro produkci mléka je h^2=0,25–0,30 a za nejvýznamnější složku vnějšího prostředí podílející se na mléčné užitkovosti můžeme považovat úroveň výživy a krmení. To se spolu s managementem podílí na výši mléčné užitkovosti z 60-70 %. Déle působí i kvalita odchovu zvířat, systém ustájení a lidský faktor (Stupka et al. 2013).

Dědivost ukazatelů plodnosti je velmi nízká (Louda et al. 2008), kdy hodnoty heritability dosahují hodnot h^2=0,01– 0,2 (Stupka et al. 2013). O plodnosti plemenic rozhodují podmínky vnějšího prostředí a především chovatel, zajištěním optimálních podmínek chovu a adekvátní úrovně výživy (Louda et al. 2008). Podle Stupky et al. (2013) je podmínkou vyhovující plodnosti dobrý zdravotní stav a odpovídající tělesná kondice krávy. Dále na plodnost působí výživa, technologie chovu, klimatické vlivy a kvalita ošetřovatelské péče.

V chovu skotu jsou používány různé technologické systémy poskytující odlišnou úroveň chovného prostředí a tím i welfare zvířat (Stupka et al. 2013). Welfare zvířat požaduje pro chovaná zvířata dosažení určité spokojenosti, pohody, komfortu. To je důležité nejen z hlediska etiky, ale i ekonomiky. Jen zvíře, které má na dostatečné úrovni zajištěny své fyziologické i psychické potřeby může poskytovat maximální užitkovost odpovídající jeho genetickému potenciálu. Takové zvíře může optimálně zhodnocovat krmnou dávku, uchovat si zdraví, produkční schopnost i přirozené projevy chování a jeho chov může být proto ekonomicky úspěšný (Doležal et al. 2004). Pokud se zvíře potýká se stresory z vnějšího prostředí, narušuje to jeho produkční a reprodukční vlastnosti (Chmelíková et al. 2023).

3.2 Stres

Hans Selye v roce 1936 jako první popsal vztah mezi stresem a nemocí. Selye ve svých experimentech zjistil, že různé stresové situace způsobovaly u potkanů zvětšení nadledvin, gulceraci gastrointestinální sliznice a involuci brzlíku, což považoval za všeobecnou reakci na každý stresový podnět (Rokyta et al. 2015). Na základě těchto poznatků Selye definoval stres jako nespecifickou odpověď organismu na jakýkoliv podnět (Fink 2009; Rokyta et al. 2015).

Biolog Walter Cannon ovšem ještě před stresovou teorií ukázal, že homeostatická reakce organismu na nedostatek kyslíku je jiná nežli ta, kterou organismus reaguje na chlad. Navíc se Cannon domníval, že stereotypní odpověď neposkytuje možnost adaptace, a proto se během evoluce nemohla vyvinout. Cannon zavedl do fyziologie pojem homeostáza (Rokyta et al. 2015), což je označení pro relativní dynamickou stálost prostředí (Jelínek & Koudela 2003), ale přímo pojem stres nikdy nepoužil.

V současné době existuje několik definicí stresu, nelze však s jistotou prohlásit, že by některá z nich zcela vystihovala, co stres je - vzhledem k jeho komplexnímu charakteru a neustálému rozvoji poznatků. Na základě současných poznatků definovali vědci zabývající se stresem stres takto: *„Stres je stav ohrožení homeostázy. Během stresu se aktivuje adaptivní kompenzační specifická odpověď organismu pro udržení homeostázy. Adaptivní odpověď představuje aktivaci specifických centrálních drah, je geneticky programovaná a soustavně modulovaná environmentálními faktory.“* (Rokyta et al. 2015).

3.2.1 Stresor

Homeostáza organismu je neustále ohrožována vnitřními nebo vnějšími nepříznivými vlivy, které označujeme jako stresory. Jako stresor může působit velké množství nepříznivých faktorů, které mohou být emocionálního nebo fyzického původu (Chrousos 2009). Jelínek & Koudela (2003) rozděluje stresory do více kategorií. Dělí je na stresory fyzikální, chemické, biologické, komplexní a emoční neboli psychické.

K fyzikálním stresorům můžeme řadit například hluk, vibrace, chlad, horko a atmosférický tlak. Z chemických stresorů se jedná například o otravy, hlad, žízeň a zánět. K biologickým stresorům řadíme například chirurgické zákroky, zlomeniny a popáleniny. Komplexní stresor může být námaha, změna prostředí či fixace. Jako emoční neboli psychický stresor působí například strach a úzkost (Jelínek & Koudela 2003).

Důležitý je jak význam, tak i chronicita stresorů. Když jakýkoli stresor překročí určitou závažnost nebo časový limit, adaptační homeostatické systémy organismu aktivují kompenzační reakce (Chrousos 2009). Dle délky trvání stresoru rozlišujeme stres na chronický a akutní. Za akutní stres se obvykle považuje relativně krátké vystavení jednomu stresoru. I když je stresor krátký, jeho biologické důsledky mohou být dostatečné k tomu, aby změnily biologické funkce organismu. Chronický stres je u většiny zvířat důsledkem prožívání řady akutních stresorů, jejichž kumulativní biologická nákladnost vede zvíře k prepatologickému až patologickému stavu. Případným chronickým stresorem u neexperimentálních zvířat může být neutuchající bolest nebo dlouhodobé vystavení extrémním podmínkám prostředí, jako je silný mráz (Moberg 2000).

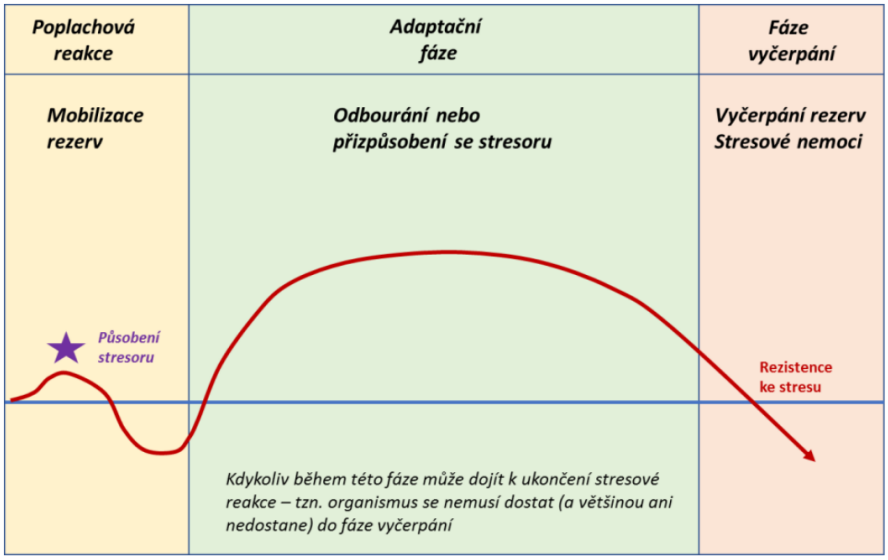
U zvířat mohou konkrétně jako stresory působit například dráždivé pachy, nepříjemné teploty, nucená blízkost člověka, omezená možnost krmení, udržování zvířete v abnormálních sociálních skupinách a další. V každém případě stresory způsobují kaskádu fyziologických událostí, jejichž cílem je připravit tělo na stres (Morgan & Tromborg 2007).

3.2.2 Fyziologie stresové reakce

Pokud je organismus vystaven stresoru, tak centrální nervový systém na něj reaguje fyziologickou a behaviorální odezvou. Behaviorální reakce mohou být buď aktivní - reakce „fight-or-fligh“ či „bojuj, nebo uteč" nebo pasivní. Pasivní reakce může být například schovávání se nebo projevy abnormálního chování či stereotypie (Squires 2003).

Selye poprvé popsal obecný adaptační syndrom (GAS - general adaptive syndrome) pro časopis Nature v roce 1936. GAS má tři fáze: poplachovou, adaptační a vyčerpání (viz Obrázek 1). V poplachové fázi tělo vykazuje změny charakteristické pro první vystavení stresoru - tyto změny se zpravidla překrývají s výbojem sympatiku, který umožňuje „fight-or-fligh“ reakci,

fenomén, který charakterizoval Cannon. Pokud stresor pokračuje a je slučitelný s adaptací, znaky poplachové reakce mizí a rozvíjí se adaptace. Dlouhodobé působení stresoru může vést k vyčerpání, a nakonec ke smrti (Fink 2009).



Obrázek 1: Základní fáze stresu
Zdroj: Tomenendalova et al. (2018)

Rezistence ke stresoru se v průběhu GAS vyvíjí. Nejprve dochází k mobilizaci rezerv a odolnost ke stresoru postupně roste (adaptace). Organismus si může na stresor přivyknout, stresor může vymizet anebo může dojít k vyčerpání adaptačních mechanismů a přechodu do fáze vyčerpání. Ve třech fázích obecné stresové reakce (GAS) se uplatňují různé neurohumorální mechanismy (Tomenendalova et al. 2018)

Poplachová reakce

Poplachová reakce mobilizuje všechny rezervy v těle k „útoku nebo útěku“ (Jelínek & Koudela 2003). Je charakterizovaná okamžitou aktivací osy sympato-adreno-medulární (SAM) a vyplavením katecholaminů (Trojan 2003). Současně se prostřednictvím osy hypotalamo-hypofyzární (HPA) (Squires 2003) aktivuje systém CRH-ACTH-kortizol a zvyšuje se sekrece kortizolu. Aktivují se i složky POMC systému (Trojan 2003).

Osa sympato-adreno-medulární (SAM)

Když je zvíře ohroženo, dráha sympatiku stimuluje uvolňování adrenalinu z dřeně nadledvin. Oblast *locus coeruleus* v mozkovém kmeni, která je taktéž stimulovaná stresem, obsahuje nervová vlákna vylučující noradrenalin. Adrenalin a noradrenalin inhibují ukládání glukózy a mastných kyselin, inhibují syntézu bílkovin a stimulují uvolňování glukózy, aminokyselin a volných mastných kyselin ze svalů, tukové tkáně a jater (Squires 2003), což zajišťuje metabolické substráty pro svalovou práci (Trojan 2003). Zvyšuje se srdeční frekvence, průtok krve se přerozděluje do kosterních a srdečních svalů a potlačují se anabolické procesy, jako je trávení, růst, reprodukce a imunitní funkce. Jedná se o rychlou hormonální reakci, která nastává během několika sekund a podporuje zvíře v reakci "bojuj, nebo uteč" (Squires 2003).

Osa hypotalamo-hypofyzární (HPA)

Neuroendokrinní reakce osy hypotalamus-hypofýza-nadledviny (HPA) zahrnuje uvolňování kortikoliberinu (CRH) hypotalamem. CRH stimuluje adenohypofýzu k uvolňování adrenokortikotropního hormonu (ACTH) a následně způsobuje uvolňování glukokortikoidů kůrou nadledvin. Hlavním glukokortikoidem produkovaným u skotu je kortizol (Squires 2003).

Glukokortikoidy regulují glukoneogenezi, při níž se registruje hypoplazie mízní tkáně a brzlíku, leukocytóza a zvýšení fagocytózy, zvyšuje se rovněž tělesná teplota a dochází také k distribuci iontů a elektrolytů (Jelínek & Koudela 2003). Uvolňování glukokortikoidů také zvyšuje vazopresin, který zesiluje účinky CRH na hypofýzu, tím se zvyšuje uvolňování ACTH a také se uvolňují peptidy odvozené od proopiomelanokortinu (POMC), jako je β-endorfin. Tyto opioidní peptidy mají analgetický účinek a inhibicí uvolňování CRH snižují stresovou reakci. Kortizol působí negativní zpětnou vazbou na hypotalamus a hypofýzu a snižuje produkci CRH a ACTH (Squires 2003).

Reakce HPA osy probíhá pomaleji (minuty až hodiny) a má na zvíře celkový účinek (Squires 2003). Podaří-li se optimalizovat odpověď na působení stresorů, přechází poplachová reakce do stádia odolnosti – adaptace (Jelínek & Koudela 2003).

Adaptační fáze

Adaptační fáze je charakterizovaná další aktivací systému CRH-ACTH-kortizol a POMC. Kortizol dále zajišťuje substrát pro energetické reakce. Další účinky kortizolu, tedy proteokatabolický, imunosupresivní ademineralizace kostí nastávají při jeho velkém nadbytku (Trojan 2003). Jak kortikoliberin, tak i adrenokortikopní hormon potlačují reprodukci (Squires 2003). V této fázi stresory sice dále působí, ale organismus se stresu přizpůsobil a zátěž zvládl. Pokud se zvíře nedokáže se stresem vypořádat, vyvíjí se stádium vyčerpání (Jelínek & Koudela 2003).

Fáze vyčerpání

Fáze vyčerpání nastává, pokud je stres příliš silný, trvá příliš dlouho, nebo je sekrece kortizolu nějak narušena například poškozením kůry nadledvin (Trojan 2003). Dochází k vyčerpání zásob cholesterolu a askorbové kyseliny, pro kůru nadledvin je charakteristické její vyčerpání, což vede k metabolickému zhroucení, a nakonec ke smrti (Jelínek & Koudela 2003). Dochází k hypotenzi, šoku a srdečnímu selhání (Trojan 2003).

3.2.3 Indikátory stresu

Kvantifikace reakcí na stresory je důležitým prvním krokem při určování možných účinků akutních nebo chronických stresorů. Vzhledem k tomu, že na organismus může působit více druhů stresu, může být i přístup k jeho měření rozdílný (Chen et al. 2015).

Měření aktivity HPA osy je standardním postupem při studiu stresu a welfare hospodářských zvířat. Referenční technikou je použití krevní plazmy k měření glukokortikoidních hormonů, ale bylo vyvinuto i několik alternativních metod, aby se překonal stres vyvolaný samotným odběrem krve (Mormède 2007). Neinvazivní metody zahrnují měření kortizolu ve slinách, mléku, moči, stolici (Squires 2003) a ze srsti (Grelet et al. 2022). Případně lze použít i jiné ukazatele aktivace HPA osy, které se odvíjejí od biologických účinků

glukokortikoidů, např. zvýšení hladiny glukózy v plazmě nebo změny v počtu a složení cirkulujících leukocytů. Metody stanovení glukokortikoidů v biologických vzorcích jsou například radioimunoanalýza (RIA), enzymová imunoabsorpční analýza (ELISA) a vysokotlaká kapalinová chromatografie s UV detekcí (Mormède 2007).

Vzhledem k mechanismu HPA osy je uvolňování kortikosteroidů pomalý proces a při akutním stresu dochází ke zvýšení hladiny kortikosteroidů v krvi až po několika minutách od začátku stresové události (Mormède & Morécit 1980; Veissier & Le Neindre 1998 cit. dle Mormède 2007). Proto se reakce HPA na averzivní situaci obvykle hodnotí měřením hladin kortikosteroidů v krvi nejméně 10 minut po prvním vystavení zvířete této situaci. Amplituda reakce závisí na druhu, pravděpodobně ve vztahu k bazálním hladinám. Skot má velmi nízké bazální hladiny kortizolu v množstvím často menším než 15 nmol/l. Hladiny kortizolu v reakci na stresor se mohou zvýšit až na 60-200 nmol/l (Boissy & Le Neindre 1997; Lay et al. 1992 cit. dle Mormède 2007).

U chronického stresu nemá hladina plazmatického kortizolu příliš vypovídající hodnotu, protože v případě dlouhotrvajícího stresoru se cirkulující hladiny kortizolu mohou vrátit zpět na výchozí hodnotu (Fisher et al. 1997). Podle Grelet et. al (2022) je slibným ukazatelem pro hodnocení chronického stresu v chovech vyšší koncentrace kortizolu v srsti a vyšší hladiny fruktosaminu v krvi. Zmiňuje také, že sledování poklesu produkce mléka je účinným a snadným způsobem, jak odhalit obecné problémy v chovu včetně stresu.

V případě metabolického stresu může být ke kvantifikaci využito měření metabolických změn v organismu. Song et al. (2021) ve své práci prokázal, že při negativní energetické bilanci dochází k zvýšení plasmatických koncentrací triacylglycerolu, betahydroxybutyrátu a neesterifikovaných mastných kyselin, zároveň došlo ke snížení koncentrací došlo u hladiny cholesterolu a glukózy. Jiné studie ale zaznamenaly po otelení naopak zvyšující se hladinu cholesterolu (Leroy et al. 2004; Takahashi et al. 2021). Dochází také ke změnám ve složení mléka, jako je zvýšený obsah tuku, bílkovin a jejich poměru. K tomuto jevu dochází v důsledku zvýšené mobilizace tělesných tukových zásob a větší akumulace triacylglycerolů v játrech po otelení (Gross et al. 2011).

3.2.4 Stresové faktory v chovu skotu

U skotu byla v posledních 50 letech zkoumána řada stresorů. Jako stresor může působit například tepelný stres (chlad, teplo), transport, nedostatek krmiva, hluk, sociální stres (izolace/sloučení), restrikce pohybu a u telat odstav (Chen et. al 2015). Podle Islam et al. (2020) představují tepelné podmínky prostředí největší stresový faktor v živočišné výrobě. Mezi další typy stresorů řadí podmínky ustájení, přeplněnost stáje, sociální postavení, nemoci a toxické látky. Jako další faktory narušující welfare zvířat mohou být různé zdroje bolesti a strachu, nevhodná/nešetrná manipulace nebo management ze strany člověka, hluk a diskomfort v prostředí, konkurence mezi zvířaty, nevhodná konstrukce stáje a obtížný přístup ke krmivu (Grelet et al. 2022). Naqvi et al. (2012) zmiňuje, že enviromentální stres zahrnuje v podstatě všechny podněty, které vyžadují reakci zvířete, aby se přizpůsobilo novým podmínkám. Při běžných chovatelských postupech se skot setkává s mnoha stresory současně (Chen et. al 2015).

3.2.4.1 Tepelný stres

Skot má velmi dobré termoregulační schopnosti, avšak lépe mu vyhovuje pobyt v prostředí s nízkými teplotami. Skot produkuje totiž vysoké množství tepla především mikrobiální činností předžaludků, ale kvůli relativně malému povrchu těla se nadbytečného tepla zbavuje s obtížemi. Při vyšších teplotách je organismus nucen zapojit tzv. aktivní termoregulační mechanismy, které spotřebovávají na svou činnost energii, která by byla za optimálních teplotních podmínek využita například k tvorbě mléka, či přírůstků živé hmotnosti.

Hranicí tepelného stresu je u skotu s průměrnou užitkovostí teplota prostředí 25 °C. U vysokoužitkových zvířat s vyšší intenzitou metabolismu lze projevy tepelného stresu zaznamenat již od 21 °C (Knížková & Kunc 2010). Vysokoužitkové dojnice na vrcholu laktace jsou na tepelný stres zvláště citlivé vzhledem ke své úzce zaměřené produkční funkci, vysoké účinnosti využití krmiva, a tím i vysoké produkci metabolického tepla (Doležal 2010). Po překročení této teplotní hranice organismus zapojuje aktivní termoregulační mechanismy zabezpečující výdej nadbytečného tepla z organismu (Knížková & Kunc 2010). Hormony podílející se na tepelné adaptaci zahrnují prolaktin, růstový hormon, tyroxin, glukokortikoidy, mineralokortikoidy, katecholaminy a antidiuretický hormon (Faraooq et al. 2010).

Pokynem pro zapojení aktivních termoregulačních mechanismů je zvýšená rektální teplota. Prvním a nejpohotovějším mechanismem je cévní reakce, při které dochází k vasodilataci cév a tím se zvyšuje průtok krve k povrchu těla. Pokud tento mechanismus nestačí dostatečně odvést nadbytečné množství tepla z organismu, nastupuje výdej tepla dýcháním. Minimální hodnoty frekvence dechu jsou uváděny v rozmezí 10-15 dechů za minutu, vyšší hodnoty svědčí o zapojování dýchání do termoregulace. Při vysokých teplotách může frekvence dechu dosáhnout i více než 90 dechů za minutu. Toto nápadně zrychlené a povrchní dýchání se nazývá termická polypnoe a je doprovázena i zvýšenou salivací. Nejúčinnějším ochlazovacím mechanismem skotu během působení vysokých teplot je odpařování vody během pocení, čímž se snižuje teplota povrchu těla. Pokud tyto mechanismy nestačí k odvodu nadbytečného tepla z organismu, nastupuje tzv. druhá chemická termoregulace, což je omezení produkce tepla vznikající při trávení přijaté potravy, resorpci živin a jejich metabolismu (Knížková & Kunc 2010).

Při vysokých teplotách nastávají u zvířat i změny v chování. Je to tzv. etologická adaptace, která svědčí o obraně zvířat proti těmto vysokým teplotám (Doležal 2010). Sníží se množství i frekvence příjmu krmiv, naopak se zvýší četnost příjmu a spotřeba vody. Zvířata snižují svoji pohybovou aktivitu a leží zpravidla zcela natažena na boku, včetně natažených končetin, aby co nejvíce zvětšila povrch svého těla pro větší výdej tepla (Knížková & Kunc 2010). Jasnou formou behaviorální adaptace je zřetelné vyhledávání stínu a chladnějších míst ve stáji (Doležal 2010).

Vysoké teploty prostředí dokáží velmi nepříznivě ovlivnit organismus chovaných zvířat, což se v konečném důsledku promítá do ekonomických ztrát chovu. Tepelný stres například negativně ovlivňuje příjem krmiva a zvyšuje požadavky na záchovnou krmnou dávku, protože aktivní termoregulační mechanismy spotřebovávají energii. Také dochází k významnému poklesu účinnosti využití krmiva (Knížková & Kunc 2010). Naopak metabolismus vody a elektrolytů se zvyšuje (Faraooq et al. 2010). Tepelný stres způsobuje depresi mléčné užitkovosti, která může poklesnout až o 25 % a dochází také ke změnám ve složení mléka a

mleziva. Tepelný stres také negativně ovlivňuje reprodukci a plodnost dojnic (Knížková & Kunc 2010). Podle Miętkiewska et al. (2022) je stres z horka dnes hlavní hrozbou pro reprodukci skotu. Prevence negativních účinků tepelného stresu na skot je nezbytná pro zajištění dobrých životních podmínek zvířat, jejich zdraví a produktivity (Herbut et al. 2019).

3.2.4.2 Metabolický stres a výživa

Metabolismus vysokoužitkových dojnic je velmi zatěžován a při nadměrné zátěži může docházet k metabolickému stresu zvířete. Příznaky tohoto stavu mohou zahrnovat narušení normálních fyziologických funkcí organismu. Předpokládá se, že některé aspekty zdravotních problémů a problémů s plodností u zvířat s vysokou genetickou hodnotou jsou částečně důsledkem metabolického stresu (Pryce & LØvendahl 1999).

S metabolickým stresem je spojeno peripartální období a stav negativní energetické bilance (NEB). Metabolický stres a NEB jsou charakterizovány zvýšenou lipolýzou, ketogenezí, jaterní steatózou, oxidačním stresem a inzulinovou rezistencí. Tyto metabolické změny mohou mít nepříznivý vliv na zdraví a mléčnou užitkovost laktujících krav (Cincović et al. 2018). Nedostatečný příjem energie z krmiva má také škodlivý dopad na reprodukční činnost dojnic (Van Hoeck et al. 2014; Nigussie 2018). Illek & Kudrna (2014) zmiňují, že chyby v krmení v období před porodem způsobují dystokie, patologický průběh puerperia, retenci placenty, metritidy, zpomalení involuce dělohy a opožděný nástup ovariálních funkcí. Negativní energetická bilance způsobuje zpoždění ovulace a obnovu reprodukčních funkcí po porodu a představuje hlavní výživovou souvislost s nízkou plodností dojnic v laktaci. Podle Britt (2008) jsou folikuly a oocyty procházející časným vývojem během negativní energetické bilance ohroženy. Také Nigussie (2018) zmiňuje, že NEB může mít škodlivý vliv na oocyty a může snižovat míru zabřeznutí po inseminaci.

K nedostatku výživy může docházet na více úrovních, ať už jde o nedostatečný příjem energie, specifických mikroživin nebo nedostatečný příjem bílkovin (Chen et al. 2015). Naqvi et al. (2012) zmiňuje, že jak nízká energetická hodnota a nízký obsah bílkovin v krmné dávce, tak i nadměrný obsah bílkovin v krmivu škodí reprodukci. Celkově z důvodu nedostatečné výživy není patřičně využíván genofond zvířat, produkce mléka je snížena, zhoršená je i jeho kvalita a vyskytují se i poruchy plodnosti a metabolismu. Dochází tak ke značným přímým i nepřímým ztrátám (Illek & Kudrna 2014).

V případě deprivace krmiva se dostavují u skotu fyziologické i behaviorální reakce. U holštýnského skotu, který byl podroben řízené deprivaci krmiva po dobu 31 hodin byla pozorována zvýšená reaktivita na sociální problémy, jak naznačuje zvýšený počet agonistických interakcí mezi zvířaty. Zpozorována byla také zvýšená reaktivita na náhlé podněty a na manipulaci, ale pouze tehdy, pokud byla zvířata vystavena dalšímu fyzickému a psychickému stresu. Deprivace krmiva zvýšila plazmatické koncentrace kortizolu u jalovic a krav a snížila plazmatické koncentrace β-HBA u krav (Bourguet et al. 2011).

3.2.4.3 Ostatní stresové faktory

Sociální stres

Některé běžné chovatelské postupy mohou být pro skot zdrojem sociálního stresu a snižovat tak úroveň welfare. Jedná se principiálně buď o sociální izolaci, nebo naopak stres

vyvolaný nevhodným či danému jedinci nevyhovujícím sociálním prostředím, které je způsobeno častým přeskupováním skupin, vysokou hustotou chovaných zvířat nebo sdružováním jedinců, kteří si vzájemně nesedí (Šárová et al. 2020).

V chovech skotu nastávají situace, kdy je nutné zvíře na různě dlouhou dobu ze stáda oddělit. Vyjmutí zvířete a jeho izolace, ať již krátkodobá nebo dlouhodobá, u něj vyvolává silnou reakci a velmi intenzivní stres. Již krátká 15minutová izolace krávy od stáda u ní vyvolává stresové fyziologické a behaviorální reakce. Tyto reakce jsou charakteristické zvýšenou vokalizací, intenzivním močením a kálením, zvýšenou tepovou frekvencí nebo například zvýšenou hladinou kortizolu v plasmě (Rushen et al. 1999). V některých situacích je částečná sociální izolace pro skot přirozená. Jedná se o izolaci nemocných zvířat a zvířat před porodem (Šárová et al. 2020). Volné individuální porodní kotce jsou ideálním řešením pro rodící krávy, je však potřeba zajistit dostatečně velkou plochu, dodržovat hygienická opatření a důležité je zachovat rodícím krávám vizuální kontakt se stádem (Doležal & Staněk 2015).

Současné chovatelské postupy často vedou k sociálnímu míšení nebo přeskupování zvířat (Chen et al. 2015). Přeskupení dojnic může narušit jejich chování a produkci v následujících hodinách až dnech po přeskupení. Konkrétně se může jednat o snížení času stráveným přijímáním potravy, zvýšené soupeření o krmný prostor, snížený počet ulehnutí nebo sníženou produkci mléka (Keyserlingk et al. 2008). Studie naznačují, že jak přeskupení, tak i zvýšená hustota zvířat mají negativní účinky na krávy. Ukazuje se, že účinky přeskupení jsou zesíleny současným zvýšením hustoty zvířat a vedou k zvýšenému výskytu konkurenčního chování mezi dojnicemi související se soupeřením o přístup ke krmivu a zkrácením doby ležení (Talebi et al. 2014). Pokud dochází k společnému míšení větších skupin skotu, může to mít dlouhodobější účinky na chování i fyziologii zvířete, což odpovídá chronické stresové reakci (Chen et al. 2015).

Vliv ustájení

Neadekvátní prostředí a technika chovu způsobují, že značná část hospodářských zvířat je ve stavu chronické zátěže, která velmi výrazně snižuje odolnost, životaschopnost, dlouhověkost, produkci a reprodukci geneticky vysokohodnotných zvířat. Musíme proto respektovat nároky zvířat, abychom mohli vytvořit podmínky pro jejich život a produkci (Brouček et al. 2013)

Volné boxové ustájení je nejčastěji používaným skupinovým ustájením dojnic ve vnitřních prostorách. Přestože tyto systémy ustájení poskytují kravám určitou volnost pohybu, bývají spojeny s vysokým výskytem kulhání. To je pravděpodobně důsledkem používání špatně navržených boxů a tvrdých, mokrých podlah. Nekomfortní povrch stání před krmnými boxy může zkrátit dobu krmení, zejména u kulhajících krav (Rushen 2017). Stupka et al. (2013) zmiňuje, že nevhodné, mokré a kluzké podlahy také výrazně omezují projevy říje ve změnách v chování a tím znesnadňují její detekci.

Welfare může být také narušeno, pokud je dojnicím znemožněné si lehnout. Možnost lehnout si je pro dojnice velmi důležitá a ležení by mělo být v zemědělských podnicích usnadněno zajištěním měkkých, suchých, čistých, přístupných, dobře navržených a přiměřeně velkých prostor pro ležení (Tucker at al. 2021). Odpočinek v leže je důležitý pro regeneraci organismu a přežvykování, a jako takový má přímý vliv na produkci (Šárová et. al 2020).

Skot má citlivý sluch a nadměrný hluk mu způsobuje stres (Brouček et al. 2013). Jako stres hluk působí při překročení určité maximální meze. Úroveň hlučnosti prostředí by neměla překročit 80 dB. Zdravotní poruchy a snížení užitkovosti jsou závislé nejenom na hladině hluku, ale i na jeho frekvenci, časovém průběhu a četnosti vzniku (Doležal et al. 2004).

Ustájení může vést prostřednictvím nevhodného stájového mikroklimatu k tepelnému stresu zvířete. K tepelnému stresu dochází v důsledku kombinace vysokých okolních teplot, působení slunečního záření, nedostatečného pohybu vzduchu a vysoké vlhkosti vzduchu. Ustájení, ve kterém je skot chován, může vést k tepelnému stresu tím, že zvyšuje přenos tepla z prostředí na zvíře a narušuje termoregulační reakci zvířat (Rushen 2017). Problematika tepelného stresu byla podrobněji rozebrána v kapitole 3.2.4.1.

Xenobiotika

Různé chemické látky přítomné v životním prostředí mohou působit jako stresory a vést k neplodnosti zvířat. Znečištěná půda, voda a vzduch jsou hlavními zdroji prostřednictvím kterých jsou zvířata vystavena působení xenobiotik. Látky jako pesticidy, dioxiny a organická rozpouštědla působí jako endokrinní disruptory a mění hormonální rovnováhu v organismu. Endokrinní disruptory způsobují velké škody na reprodukci hospodářských zvířat (Naqvi et al. 2012). Roth (2018) dodává, že oocyty, které byly vystaveny vlivu endokrinních disruptorům jsou méně kvalitní, což se projevuje sníženou zralostí a vývojovou schopností oocytů.

3.3 Reprodukce v chovu dojnic

Reprodukce výrazně ovlivňuje ekonomiku chovu skotu (Urban et al. 1997). Její ekonomický význam spočívá v produkci telat a v hormonální stimulaci navazující laktace (Burdych et al. 2004). Vynikající reprodukční výkonnost je rozhodující pro rentabilitu chovu dojného skotu (Berry et al. 2014), a proto musí být úroveň reprodukce v popředí zájmů každého chovatele (Urban et al. 1997). Za ideální se považuje získání jednoho zdravého telete od krávy za rok. Dobré plodnosti krav odpovídají délka inseminačního intervalu do 75 dnů, březost po první inseminaci nad 50 %, inseminační index do 1,5, délka servis periody do 100 dnů a délka mezidobí do 385 dnů. Při vysoké užitkovosti lze tolerovat prodloužení mezidobí na 400 dnů spolu s adekvátním prodloužením inseminačního intervalu a servis periody (Kvapilík et al. 2019). Aktuální hodnoty reprodukčních ukazatelů jsou k dispozici v Tabulce 1. Podle Burdycha et al. (2004) je základním ukazatelem dobré reprodukce stáda stav, kdy od jedné krávy dostaneme do roka jedno tele, kdy užitkové plemenice dají za život 4-6 telat při plnohodnotných laktacích a kdy vyřazování plemenic pro poruchy plodnosti nepřesáhne 15 % z celkového počtu brakovaných plemenic.

Tabulka 1: Reprodukční ukazatele dojnic v ČR dle plemen za rok 2020

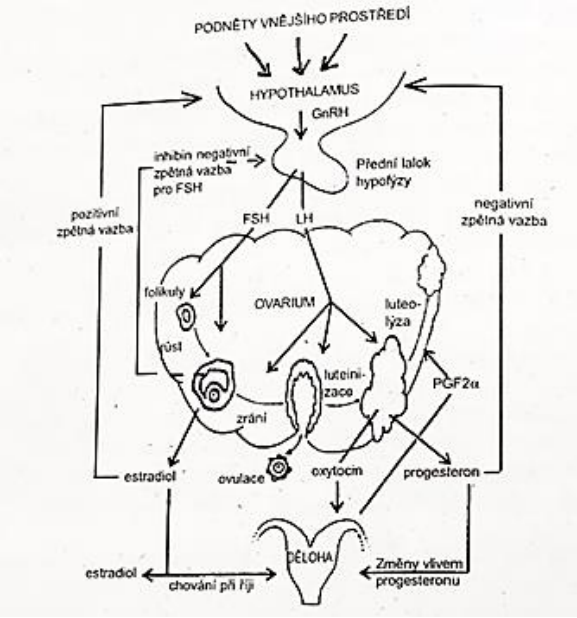
Plemeno	Mezidobí	Věk při 1. otelení (měsíc/dny)	% zabřeznutí po 1. inseminaci jalovice	% zabřeznutí po 1. inseminaci krávy	Servis perioda
Holštýnský skot	400	24/16	59,0	37,7	115
Český strakatý skot	392	27/19	59,4	45,5	105

Upraveno podle: Burdych & Kocmánek (2021)

Reprodukce a pohlavní funkce jsou řízeny jak nervově, tak hormonálně. Základem celého systému je hormonální kaskáda na ose hypothalamus – hypofýza – gonády (Bouška et al. 2006). Tato kaskáda představuje uzavřený okruh, u kterého funkčně nadřazené struktury ovlivňují funkci nižších struktur a naopak. Jedná se o takzvaný zpětnovazebný mechanismus (Jelínek & Koudela 2003).

Prostřednictvím smyslových orgánů a nervové soustavy je hypothalamus ovlivňován i podněty z vnějšího prostředí (Jelínek & Koudela 2003). Právě přes hypotalamus dochází k útlumu pohlavních funkcí při hladovění, bolesti, strachu, či jiných formách stresu a uplatňují se přes něj i pozitivní stimulace světelným režimem, flushingem nebo zařazením plemeníka do skupiny plemenic (Bouška et al. 2006).

V hypothalamu dochází k sekreci hormonů se stimulujícím, nebo inhibujícím účinkem na adenohypofýzu. Podle těchto účinků jsou označovány jako uvolňující hormony – liberiny (RH) a jako inhibující – statiny (IH). Tyto hormony se prostřednictvím cévního systému dostávají do hypofýzy a řídí zde produkci hypofyzárních gonadotropních hormonů. Hypofyzární hormony - folikuly stimulační hormon (FSH) a luteinizační hormon (LH) působí na růst a zrání folikulů na vaječnících. Při růstu folikulů vzniká hormon estradiol, jehož zvýšená hladina na principu zpětné vazby sníží produkci FSH a naopak zvýší produkci LH a nastává ovulace. Po ovulaci dochází pod vlivem LH k vzniku žlutého tělíska (CL) na místě prasklého Graafova folikulu. Žluté tělísko tvoří progesteron, který v děloze zajišťuje podmínky pro přijetí oplozeného vajíčka a následně jeho dalšího vývoje. Pokud nedojde k oplození, vytváří se v děložní sliznici $PGF_{2\alpha}$, který přeruší činnost CL a následně dochází k jeho regresi a cyklus se opakuje (Jelínek & Koudela 2003). Hormonální kaskáda je znázorněna na Obrázku 1.



Obrázek 1: Schéma řízení pohlavních funkcí
Zdroj: Říha et al. (1999)

3.4 Oocyty

Vajíčko je u skotu velké 135-140 μm, tvar vajíčka je pravidelně kulovitý a obsah tvoří zrnitá cytoplazma s obsahem žloutkových inkluzí (Marvan 1992) a s excentricky uloženým jádrem. Vlastní primární obal tvoří zesílená cytoplazmatická membrána (ovolemma). Sekundárním obalem je průsvitná blána zona pellucida (Jelínek & Koudela 2003), která je produktem folikulárních buněk ve vaječníkovém folikulu. Na zonu pellucidu navazuje vrstva folikulárních buněk, které se označují jako corona radiata (Marvan 1992). Komplex folikulárních buněk s oocytem se nazývá také kumulo-oocytární komplex. Několik hodin před prasknutím folikulu a ovulací plně vyvinutý oocyt v preovulačním folikulu obnovuje meiózu na základě signálů spojených se zvýšenou koncentrací luteinizačního hormonu, a postupuje z profáze prvního meiotického dělení do metafáze II. Tento proces zrání transformuje primární oocyt ve zralý sekundární oocyt (Gordon 2003). Ten již obsahuje kompletní buněčnou výbavu potřebnou pro oplození a následný raný embryonální vývoj. Zrání oocytů je charakterizováno změnami na jádře, v cytoplazmě a na kumulárních buňkách (Hofírek et al. 2009). Při ovulaci, k níž dochází u skotu průměrně za 8 hodin po odeznění zevních příznaků říje dochází k prasknutí stěny folikulu a vyplavení oocytu (Jelínek & Koudela 2003). Díky použití reprodukčních biotechnologií je možné izolovat oocyty přímo z folikulů na vaječníku.

3.4.1 Odběr oocytů

Oocyty lze získat jak za podmínek in vitro, tak za podmínek in vivo. Odběr oocytů in vitro je prováděn po porážce zvířete, zatímco u in vivo metody se jedná o odběr z živých dárkyň (Hofírek et al. 2009).

3.4.1.1 Odběr oocytů in vitro – post mortem

Při získávání oocytů v podmínkách *in vitro* jsou vaječníky odebírány po porážce zvířete (Hofírek et al. 2009). V této situaci je IVP jedinou možností, jak získat embrya od cenných dárkyň, které jsou určeny k porážce, vyřazené z důvodu sterility nebo jiných faktorů (Lazzari & Galli 1993). Vaječníky odebírány po porážce zvířete musí být transportovány do laboratoře. K tomu může sloužit několik postupů. Hofírek et al. (2009) uvádí možnost vaječníky uložit do média Dulbecco obohaceného antibiotiky při teplotě 37 °C. Sanbuissho & Threlfall (1989) vaječníky do 10 minut po porážce vložil do fyziologického roztoku o teplotě 37 °C, kde byly nejvýše 3 hodiny před samotným odběrem oocytů. Obecně jsou oocyty velmi citlivé na teplotu, proto je důležité pečlivě monitorovat teplotu během odběru a transportu (Galli et al. 2003).

Existují základní techniky pro odběr oocytů z ovarií vyřazených krav, které zahrnují aspiraci pomocí vakua, disekci folikulů nebo totální disekci ovariálního cortexu (Machatková et al. 2009). Aspirace oocytů s folikulární tekutinou z folikulů je nejjednodušší postup. Oocyty se odebírají z folikulů o velikosti 2-8 mm pomocí tenké jehly a injekční stříkačky, nebo za použití aspirační pumpy (Hofírek et al. 2009). Tato metoda umožňuje selekci oocytů podle velikosti a stupně atresie, avšak obvykle poskytuje nižší počet oocytů na dárkyni a je časově náročná (Machatková et al. 2009).

Disekce folikulů je pracnější metoda, která spočívá v preparaci jednotlivých folikulů a jejich následného naříznutí speciálním skalpelem. Tento způsob poskytuje oocyty excelentní kvality (Hofírek et al. 2009).

Totální disekce ovariálního cortexu, neboli tzv. slicing, je metoda při niž je povrch vaječníku nařezáván rovnoběžně pomocí žiletek a vytékající folikulární tekutina s oocyty je oplachována médiem do Petriho misky (Hofírek et al. 2009). Tato technika umožňuje získat vyšší počet oocytů na dárkyni v relativně kratším čase, ale neumožňuje selekci jednotlivých folikulů (Machatková et al. 2009).

Počet oocytů získaných na donorku post mortem je vysoce variabilní, většinou kolísá mezi 5 až 50, stejně jako kvalita a relativní vývoj embryí je velmi rozdílný (0-66,6 %). Průměrně lze izolovat 25 oocytů z jedné dárkyně, což při vhodné kombinaci rodičů umožňuje získat průměrně 5 přenosuschopných embryí post mortem (Machatková et al. 2016). Galli et al. (2003) zmiňuje, že podle Lazzari & Galli (1993) je výsledek v produkci embryí často spojen s důvody porážky dárkyně. U zvířat již uhynulých nebo ve stavu kritického zdravotního stavu je výsledek obvykle slabý (jedno až dvě embrya na dárkyni), zatímco u zdravých dárců je průměrná produkce šesti nebo více přenositelných embryí na dárkyni. V případě porážky zdravých dárkyň je výsledek mnohem lepší s průměrnou produkcí šesti nebo více přenositelných embryí na dárkyni.

3.4.1.2 Odběr oocytů in vivo – metoda ovum pick-up

Odběr oocytů in vivo, tedy od živných zvířat, je výhodný díky možnosti opakovaného odběru a možnosti dalšího využití dárců v reprodukci. Dříve používané chirurgické postupy byly nahrazeny technikou punkce folikulů, která se provádí laparoskopicky nebo pomocí ultrazvuku (Hofírek et al. 2009). Obecným závěrem ale je, že laparoskopický přístup k odběru oocytů je poměrně komplikovaný a vyžaduje speciální prostředky a sterilní operační postupy, stejně jako zklidnění nebo celkovou anestezii. Invazivní povaha laparoskopie omezuje frekvenci opakování zákroku a může způsobovat jizvy a srůsty (Gordon 2003).

Ultrazvukem naváděný odběr oocytů je méně invazivní, snižuje stres zvířete a je snadněji přizpůsobitelný pro použití na farmě než jiné metody (Gordon 2003). V současnosti je nejčastěji používanou metodou odběru oocytů transvaginální ultrazvuková punkce, neboli OPU (ovum pick-up) (Hofírek et al. 2009). Opakovaná transvaginální aspirace oocytů (OPU) a následná fertilizace in vitro (OPU/IVF) je považována za jednu z nejefektivnějších metod pro využití geneticky cenných jedinců k systematickému šlechtění skotu (Machatková et al. 2018). Galli et al. (2003) zdůrazňuje, že metoda OPU je nejpružnější a nejopakovatelnější technikou produkce embryí od živých dárců.

V roce 1988 nizozemský tým vedený M. C. Pietersenem provedl poprvé odběr oocytů in vivo pomocí transvaginální aspirace folikulů pod ultrazvukovou kontrolou u skotu (Boni 2012, Gordon 2003). Tato metoda byla původně vyvinuta pro použití v lidské asistované reprodukci a léčbě neplodnosti (Meiyu et al. 2013). Možnost punkce a odběru nezralých folikulů z vaječníků živých dárkyň otevřela nové perspektivy v programech reprodukční biotechnologie. Samičí gamety mohou být totiž k dispozici pro produkci embryí in vitro (IVP) během delšího časového období, což je v případě zisku oocytů post mortem nemožné (Bols & Stout 2018).

Odběr oocytů

Ovum pick up je neinvazivní a opakovatelná technika (Říha et al. 1999; Machatková et al. 2016, Bols & Stout 2018), kterou lze použít k odběru oocytů s hormonální stimulací nebo bez ní (Bols & Stout 2018). Původní postup OPU nezahrnuje žádnou hormonální stimulaci. Rutinně se provádí dvakrát týdně (Meiyu et al. 2013; Bols & Stout 2018), což umožňuje získat maximum oocytů vhodné kvality pro produkci embryí v daném časovém intervalu. Odběr dvakrát týdně je nejziskovější, protože při odsátí všech viditelných folikulů v procesu OPU se nevyvíjí žádný dominantní folikul, který jinak způsobuje regresi a degeneraci ostatních folikulů, jako při odběru jednou týdně (Meiyu et al. 2013). Goodhand et al. (1999) zjistil, že aspirace dvakrát týdně oproti aspiraci jednou týdně zdvojnásobila počet přenositelných embryí vyprodukovaných za týden. Nejlepších výsledků se dosahuje, když se mezi jednotlivými sezeními OPU dodržuje interval 3 a 4 dnů nebo 2 a 5 dnů (Merton et al. 2003). Vzhledem k tomu, že dominantní folikul vzniká přibližně 3 dny po odběru oocytů, zabrání zejména 2 a 3 denní intervaly tomu, aby dominantní folikul negativně ovlivnil vývojovou kompetenci oocytů z menších folikulů (Wagtendonk-de Leeuw 2006). Oocyty lze od požadovaných donorek odebírat opakovaně po období několika týdnů nebo měsíců (Říha et al. 1999; Hofírek et al. 2009; Machatková et al. 2016). Machatková (2006) upřesňuje, že opakovanou aspiraci lze provádět po dobu tří až šesti měsíců.

Některá schémata aspirace zahrnují i hormonální stimulaci dárkyň (Hofírek ate al. 2009). Podle Mertona et al. (2003) použití hormonální stimulace může zvýšit počet folikulů. Podle Vieira et al. (2014) superstimulace před OPU vedla k významnému zvýšení produkce blastocyst u holštýnských dárkyň. Cavalieri et al. (2018) zjistil, že synchronizací ovariální folikulární vlny u dárkyň se umožnilo aspirovat homogennější folikuly ve vztahu k velikosti a fázi vývoje, což podpořilo získání kompetentnějších oocytů. Také průměrný počet zabřeznutí byl vyšší u příjemkyň, které obdržely embrya ze synchronizované skupiny, ve srovnání s kontrolní skupinou. Aby došlo k synchronizaci, dárkyním byl aplikován progesteronový implantát, estradiol benzoát a prostaglandin v náhodný den říjového cyklu a po pěti dnech proběhla OPU. Synchronizované dárkyně pak vykazovaly vyšší počet embryí (5.9 ± 0.5 vs. 4.5 ± 0.4) a vyšší míru produkce embryí (45,8 % vs. 38,5 %) než nesynchronizované dárkyně (Cavaliery et al. 2018). Nicméně i přes to, že hormonální prestimulační schémata mohou vést k vyšší výtěžnosti embryí na krávu na jeden odběr OPU, výtěžek embryí na jednotku času na krávu nemusí být vyšší, protože hormonální prestimulaci lze provádět pouze jednou týdně (Wagtendonk-de Leeuw 2006).

Dárkyně oocytů

Jako dárkyně nejčastěji slouží cyklující krávy či jalovice a aspirovat lze i prepubertální jalovičky nebo březí zvířata (Hofírek et al. 2009). Dárkyní může být zvíře prakticky v jakémkoliv fyziologickém stavu a všech věkových kategorií, od dvouměsíčních telat po velmi staré jedince. Nevhodná jsou pouze zvířata, která překročila první trimestr březosti, dále jedinci v poporodním období, u kterých ještě nedošlo k obnovení ovariální aktivity a zvířata s těžkou ovariální hypoplasií (Galli et al. 2001).

Vedle možnosti využít tuto metodu v době plného reprodukčního zdraví donorky je uvedený způsob získávání oocytů vhodný pro cyklující, reprodukčně problémové krávy, které nezabřezávají po inseminaci, neodpovídají na hormonální ošetření nebo neprodukují

přenosuschopná embrya. Při správné aplikaci metody a opakované punkci folikulů dochází k aktivaci folikulárního vývoje, protože každá z provedených aspirací oocytů vyvolává na ovariích přirozené folikulární vlny bez toho, že by negativně ovlivnila další reprodukční schopnost donorky (Machatková 2006). OPU může mít vlastní terapeutický účinek na neplodné dárkyně, zejména ty, které jsou postiženy ovariálními cystami (Galli et al. 2001).

Dárkyněmi oocytů mohou být i telata ve věku přibližně 2 až 3 měsíců. Pro efektivní odběr bez vedlejších účinků je však nutné provést laparotomii v celkové anestezii. Řezem se obnaží vaječníky a oocyty se získají aspirací folikulů. Mladá telata jsou z pohledu chovatelských společností ideálními dárkyněmi, protože použití předpubertálních zvířat jim umožňuje zkrátit interval mezi generacemi, a tím urychlit proces genetického zlepšování (Galli et al. 2001). Tímto přístupem je možné dosáhnout generačního intervalu 11 měsíců. Pro dosažení konzistentních výsledků v tomto věku je nutné stimulovat vaječníky gonadotropiny (Galli et al. 2003).

Podle Fry et al. (1998) lze oocyty získat už z pětiměsíčních telat za použití transvaginálního přístupu řízeného ultrazvukem. Odběr trval přibližně 10-15 min a neměl žádné zjevné účinky na následnou reprodukční výkonnost zvířat. Je důležité udržovat takovou úroveň výživy, aby bylo dosaženo přibližně 100 kg živé hmotnosti před odběrem, tato velikost zvířete totiž umožňuje obsluze manipulovat s vaječníky per rectum. Vzhledem k tomu, že vaječníky jsou ve věku 5 měsíců velmi malé, je nutné je hormonálně stimulovat, aby došlo k růstu folikulů do velikosti vhodné pro aspiraci.

Pozitiva a negativa metody

Metoda OPU má několik výhod, například je méně traumatizující pro zvířata a méně invazivní než jiné systémy a má vysoký stupeň opakovatelnosti (Bols & Stout 2018). Galli et al. (2001) podotýká, že odběr se provádí s minimálním stresem pro dárce. Díky metodě OPU je možná také produkce embryí od neplodných krav nebo donorek s neúspěšnou superovulací a rozšíření kombinací rodičovských párů oplozením oocytů spermiemi více býků (Machatková 2006). Každou dávku oocytů lze použít k inseminaci s jiným býkem, což zvyšuje počet možných genetických kombinací (Merton et al. 2003). Fertilizace odebraných oocytů několika býky je výhoda, který maximalizuje genetický zisk a minimalizuje inbreeding (Wagtendonk-de Leeuw 2006).

Výhodou metody OPU/IVF je také to, že bez jakékoliv aplikace hormonů donorce lze oocyty získat dvakrát týdně po dobu několika měsíců, a to dokonce i v 1. trimestru březosti dárkyně (Machatková et al. 2016). To, že použití hormonů není u této metody nutné je velmi důležitá výhoda zejména pro mladé jalovice, u nichž může stimulace gonadotropiny způsobit edém mléčné žlázy a syndrom ovariálních cyst. Případně pro výstavní krávy, u nichž může opakovaná superovulace způsobit uvolnění vazů vemene (Galli et al. 2003).

Machatková et al. (2016) při porovnání nákladů na superovulaci a OPU/IVF zjistila, že se ušetří na hormonální stimulaci, na inseminační dávce (jedna místa dvou) i na počtu získaných embryí. Po superovulaci se získá průměrně deset embryí za rok, zatímco při OPU/IVF se získá až 30 embryí. Použití OPU bude neocenitelné při rychlém rozšiřování vzácných genů a poskytne základ pro pokročilejší technologie, jako je klonování a transgenetika (Meiyu et al. 2013).

Na druhou stranu OPU/IVP ve srovnání s MOET vyžaduje sofistikovanější a nákladnější laboratorní prostředí. Náklady na jedno embryo OPU/IVP jsou přibližně dvakrát vyšší než náklady na embrya MOET (Wagtendonk-de Leeuw 2006).

Existují důkazy, že výtěžnost blastocyst po IVM, IVF a in vitro kultivaci (IVC) oocytů získaných OPU může být nižší než u oocytů získaných z jatečních vaječníků (Donnay et al. 1996). Oocyty odebrané pomocí OPU mohou být obklopené omezeným počtem vrstev kumulárních buněk a mohou mít nižší vývojovou kompetenci. Část tohoto problému může být způsobeno ztrátou kumulárních buněk v průběhu aspirace (Palma & Brem 1995).

Gordon (2003) ve své práci zmiňuje, že několik autorů uvádí, že OPU lze provádět dvakrát týdně po dobu několika týdnů, aniž by to mělo nežádoucí vedlejší účinky na plodnost dárcovského zvířete (Gibbons et al. 1994a,b,c, 1995; Bucher et al. 1996; Dolman et al. 1995; Goto et al. 1995; Lansbergen et al. 1995; Menard et al. 1995; Hepburn and MacMillan 1996; Boni et al. 1997; Broadbent et al. 1997a,b; Hanenberg and Van Wagtendonk-De Leeuw 1997; Kurokin 1998; Hashimoto et al. 2000a; Park, S.J. et al. 2000). Figueiredo et al. (2020) ale podotýká, že (Kruip et al. 2014; Stangl et al. 1999; Petyim et al. 2000; Shalev et al. 2001; Viana et al. 2003; Kelada & Ghani 2007; Fouks at al. 2019) zase upozorňují, že metoda OPU byla spojena s lézemi reprodukčního traktu, jako jsou ovariální adheze a abscesy u lidí, krav a ovcí. Kromě toho byl rozsah ovariálních lézí u krav pozitivně korelován s počtem OPU procedur. Léze spojené s OPU mění nejen morfologii, ale i funkčnost reprodukčních orgánů s měřitelnými dopady na následné fyziologické děje a výsledky plodnosti. Například u holštýnských plemenic byly popsány nepravidelné intervaly mezi říjemi, pokud byly dárkyně podrobeny procedurám OPU, ve srovnání se stejnými zvířaty, u kterých nebyl odběr oocytů prováděn (Stubbings & Walton 1995). Potenciál vzniku abscesů na vaječnících může být spojen se zavlečením patogenů během odběru. Ztráty plodnosti pozorované u dárců nebyly spojeny se zvýšeným vyřazováním (Figueiredo et al. 2020)

Výsledky metody

Účinnost metody je závislá na individualitě donorky, technickém vybavení týmu, použité metodě punkce a aspiračním schématu (Machatková 2006). Počet oocytů odebraných zvířeti během jednoho sezení OPU závisí na řadě technických a biologických faktorů (Merton et al. 2003). Podle Meiyu et al. (2013) patří mezi důležité faktory, které ovlivňují úspěšnost OPU a kvalitu oocytů také zkušenosti operatéra a individuální rozdíly dárkyň jako je věk, reprodukční fáze a individuální reakce. Podle Mertona et al. (2003) je možné při dvou OPU týdně vyprodukovat přibližně 150 embryí za rok, z nichž by se mělo narodit přibližně 70 telat, výsledky se však pohybují od 10 do 30 % přenositelných embryí ze zpracovaných oocytů. Výtěžnost oocytů na odběr se při schématu dvakrát týdně bez hormonální prestimulace u jednotlivých dárkyň výrazně a opakovaně liší. Pohybuje se od 0 do 26 oocytů na odběr a od 0,5 do 15 oocytů na krávu, přičemž obvykle 20 % oocytů je nekvalitních (Wagtendonk-de Leeuw 2006). Podle Machatkové (2006) lze při transvaginálním odběru oocytů z ovarií živých donorek dosáhnout asi 60% úspěšnosti, to znamená při punkci 10-12 folikulů aspirovat asi šest až sedm oocytů na jednu donorku. Po fertilizaci těchto oocytů je průměrně získáno 1,5 embrya. Galli et al. (2001) zmiňuje, že lze na jeden odběr získat v průměru 8 až 10 oocytů s průměrnou produkcí 2 přenositelných embryí. Kruip et al. (1994) získal průměrně 13 vhodných oocytů týdně na

krávu, což znamenalo 16 % životaschopných blastocyst a celkem 2,1 embrya na krávu týdně. Během 6 měsíců by tedy mohla metoda přinést více než 50 embryí.

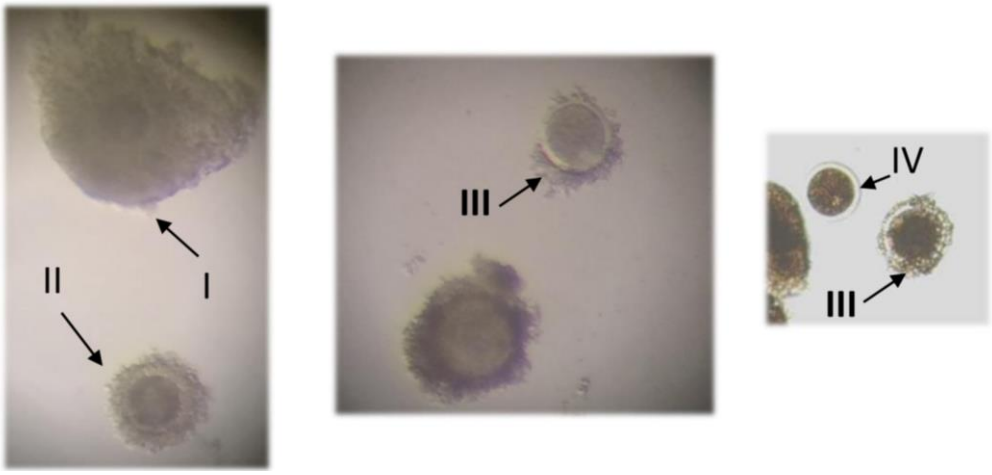
3.4.2 Hodnocení oocytů

Oocyty se po odběru hodnotí a selektují na základě kumulo-oocytárního komplexu. Buňky kumulu se podílí na zrání oocytu, zajišťují jeho nutriční požadavky a zprostředkovávají i řadu důležitých signálů přicházejících z oocytu (Říha et al. 1999). Pro hodnocení oocytů se používá několik systémů, většina závisí na vizuálním subjektivním hodnocení laboratorního pracovníka. Ten klasifikuje oocyty na základě kompaktnosti a množství okolních folikulárních buněk a dalších morfologických znaků, které jsou viditelné světelným mikroskopem (Gordon 2003). Například Andrlíková et al. (2018) použila ve své práci klasifikaci kumulo-oocytárního komplexu modifikovanou podle Leibfrieda a Firsta (1979), viz Tabulka 2 a Obrázek 2.

Tabulka 2: Klasifikace kumulo-oocytárního komplexu

Třída	Vlastnosti oocytu	Vlastnosti kumulárních buněk
I	Tmavá, rovnoměrně jemně granulovaná, kompaktní ooplasma	Kompaktní, celý oocyt obklopující minimálně pětivrstevný kumulus
II	Tmavá, rovnoměrně jemně granulovaná, kompaktní ooplasma	Kompaktní, celý oocyt obklopující méně než pětivrstevný kumulus
III	Rovnoměrně, kompaktně jemně granulovaná ooplasma, ale obsahující i větší granula	Kumulární buňky obklopují minimálně polovinu zony pellucidy
IV	Abnormálně velké či malé oocyty; silně deformované oocyty; ooplasma s velkými granuly; výrazné rozdíly v kompaktnosti ooplasmy	Kumulus bez kumulárních buněk či s částečně nebo úplně expandovaným kumulem

Zdroj: Andrlíková (2018) podle Leibfrieda a Firsta (1979)



Obrázek 2: Třídy kumulo-oocytárního komplexu
Zdroj: Andrlíková (2018)

3.4.3 Využití – in vitro produkce embryí (IVP)

Historicky je název embryí produkovaných v laboratoři spojen s prvními pokusy o oplození vajíčka spermiemi laboratorních zvířat, které byly prováděny "ve skle" což v latinském překladu znamená *in vitro* (Říha et al. 1999). Produkce embryí in vitro je u skotu alternativní biotechnologickou metodou, kdy můžeme získat geneticky cenná embrya především od vysokoužitkových krav, které nejsou schopné reprodukce pomocí konvenčních biotechnik (Hofírek et al. 2009). Pojem produkce embryí in vitro (IVP) obecně označuje proces získávání embryí mimo tělo matky. Zahrnuje in vitro maturaci (IVM) a in vitro fertilizaci (IVF) oocytů a in vitro kultivaci (IVC) embryí. Oocyty je možné odebírat od živých dárkyň, kdy již prodělaly maturaci in vivo, nebo se oocyty získávají také z jatečných vaječníků, které vyžadují maturaci in vitro (Andrlíková et al. 2018).

První tele vyprodukované ze systému IVM-IVF-IVC se narodilo 1987. V zahraničí je IVP v poslední době nedílnou součástí šlechtitelských programů v chovu skotu a je běžně využívána v komerční sféře společně s transferem embryí, kde jsou přednostně využívány oocyty odebírané od živých dárců (Andrlíková et al. 2018). Získávání oocytů za podmínek in vivo aspirací oocytů z folikulů u živých zvířat a následná in vitro produkce embryí výrazně zvyšuje využití genetického potenciálu vybraných zvířat (Hofírek et al. 2009). Metody přípravy embryí skotu v systému in vitro patří mezi reprodukční biotechnologie, které přispívají k efektivnějšímu využívání gamet geneticky cenných jedinců a zvyšují produkci potomstva od rodičů zařazených do šlechtitelských programů (Machatková et al. 2021). Fertilizace oocytů a příprava embryí in vitro (IVF) také umožňuje významně omezit používání hormonálních preparátů (Machatková 2006). IVP poskytuje chovatelům skotu, zejména v mlékárenském průmyslu, nové možnosti, jak překonat neplodnost a zvýšit rozšíření zvířat s vysokou genetickou hodnotou (Wrenzycki 2018). V našich podmínkách se IVP běžně v praxi neprovádí. (Andrlíková et al. 2018)

Účinnost metody produkce embryí in vitro ovlivňuje řada faktorů. Je to především celkový a reprodukční stav dárkyně, kvalita oocytů, média, postupy pro zrání a fertilizaci oocytů, i techniky kultivace embryí (Hofírek et al. 2009).

Maturace (IVM)

Zrání neboli maturace oocytů je biologický proces, při kterém se primární oocyt v profázi I. meiotického dělení mění na haploidní sekundární oocyt. Odebrané oocyty jsou přenášeny do propíracího média, které obsahuje 10 % kravského říjového séra a odtud do tzv. zracího média (Hofírek et al. 2009). Existuje několik komerčních medií využívaných pro zrání oocytů. Obvykle se jedná o média s pufrovanými bikarbonáty obsahující základní fyziologický roztok s přídavkem pyruvátu, laktátu a glukózy. Obvykle je médium doplněno sérem nebo albuminem se stopovým množstvím antibiotik, případně také o aminokyseliny, vitamíny, puriny a další látky, v podobných koncentracích jako se nacházejí v séru (Gordon 2003).

Machatková et al. (2018) pro zrání použila médium TCM-199 doplněné 0,2 mM pyruvátu sodného, 5 % ECS, gonadotropiny a antibiotiky. Médium je nejdříve ekvilibrováno po dobu 1 hodiny, kdy je přidáno mitochondriální stimulans L-carnitin v koncentraci 2,5 mM a následně je opět ekvilibrováno po dobu 2 hodin. Oocyty zrají při teplotě 38,5 °C, v atmosféře s vysokou vzdušnou vlhkostí a 5 % CO_2, po dobu 24 hodin.

Za optimálních podmínek zrání více než 90 % oocytů dosáhne metafáze II. Před oplozovací fází můžou být kumulární buňky částečně odstraněny (Galli et al. 2003).

Fertilizace (IVF)

Oplození je složitý proces, jehož výsledkem je spojení spermie a oocytu, což představuje začátek přeměny oocytu v embryo. Úspěšné oplodnění skotu in vitro (IVF) vyžaduje vhodnou přípravu obou gamet, jakož i příznivé kultivační podmínky (Gordon 2003). Při fertilizaci tedy dochází ke spojení haploidních rodičovských pohlavních buněk a následnému vzniku kvalitativně nového jedince s diploidním počtem chromozomů (Hofírek et al. 2009).

Rozhodujícím kritériem při výběru býků pro produkci embryí je jejich plodnost v inseminaci. Nezbytným předpokladem pro oplození in vitro je získání motilních spermií s neporušenou cytoplazmatickou membránou a intaktním akrozomem, které je nutno izolovat z čerstvého nebo zmraženého spermatu (Machatková et al. 2009). Nejčastěji se pro oplození používá sperma komerčně zmrazené. Více než 90 % plemeníků lze použít pro oplození po úpravě koncentrace spermatu na individuální hodnotu vhodnou pro každého býka, ne všichni plemeníci však poskytují dobrou výtěžnost embryí (Galli & Lazzari 1993).

Oocyty jsou po maturaci přeneseny ze zracího média do speciálního oplozovacího média nejméně 30-45 minut před přikápnutím spermatu. Toto médium obsahuje faktory k podpoře kapacitace a motility spermií (Hofírek at al. 2009). Například Gordon (2003) zmiňuje oplozovací média TALP, SOF či Fert-CDM médium. K vyvolání kapacitace spermií jsou fertilizační média doplňována kofeinem, Ca ionophorem a především heparinem. Spermie býků s vyšší afinitou k heparinu mají lepší schopnost prodělat akrozomální reakci a vázat se na zonu pellucidu, což koreluje s jejich plodností (Machatková et al. 2009).

V případě mraženého spermatu jsou pejety v 39 °C po dobu 10 sekund rozmraženy a je odebráno 100 µl spermatu, které se v kónických zkumavkách tzv. podvrství pod 1 ml média stimulující kapacitační proces (Hofírek at al. 2009). Předpokladem pro úspěšnou fertilizaci oocytů v systému in vitro je dostatek motilních spermií schopných prodělat akrozomální reakci, které je nutno separovat z komerčních inseminačních dávek (Machatková et al. 2021). Pohyblivé spermie mohou být separovány od ředidla několika způsoby. Běžnou metodou je „swim up“ technika a také metoda centrifugace na diskontinuálních Percollových gradientech. (Galli & Lazzari 1993). Pomocí obou technik lze získat populaci se 70 až 90% podílem motilních spermií a s intaktním chromozomem (Machatková et al. 2009).

Po separaci spermií od ředila a zjištění koncentrace spermatu jsou oocyty inseminovány tak, aby výsledná koncentrace byla 1 000 000 aktivních spermií v 1 ml oplozovacího média. Oplozovací proces in vitro, tedy inkubace pohyblivých spermií spolu se zralými oocyty, probíhá po dobu 20 hodin v řízené atmosféře (Hofírek et al. 2009). Galli & Lazzari (1993) zmiňuje společnou inkubaci oocytů a spermatu v oplozovacím médiu po dobu 18-24 hodin při teplotě 38,5 °C a atmosféře s 5 % CO_2.

Pokud jsou morfologicky kvalitní oocyty oplozeny spermiemi prověřených býků s odpovídající schopností a je použita vhodná rodičovská kombinace, je podíl embryí vyvíjejících se z fertilizovaných oocytů relativně vysoký (25-35 %) (Machatková 2006).

Kultivace (IVC)

Po dozrání bovinního oocytu a oplození in vitro, je posledním krokem kultivace embrya do stádia blastocysty, kdy může být embryo buď přeneseno do čekající příjemkyně, nebo kryokonzervováno (Gordon 2003). Kultivace embryí je proces, kdy v umělých podmínkách

probíhá raný vývoj zárodku od oplozeného vajíčka-zygoty až po morulu či blastocystu (Hofírek et al. 2009).

Pro růst zygot může být použit jeden ze tří systémů. V prvním systému mohou být oplozené oocyty transportovány do vejcovodů dočasného příjemce, například ovce nebo králíka (Eyestone et al. 1987). Raná embrya jsou přenesena chirurgickou cestou do podvázaných oviduktů dočasných příjemkyň (Machatková et al. 2009). Po 4-5 dnech, resp. 6 dnech po inseminaci, jsou embrya odebrána, roztříděna a následně mražena nebo transportována (Eyestone et al. 1987). Tento způsob kultivace používají především společnosti s komerčním zaměřením, protože získávají vyšší podíl zmrazitelných embryí. Nevýhodou tohoto kultivačního postupu jsou vyšší pracnost i finanční náklady (Machatková et al. 2009).

Druhý a třetí systém využívá kultivace v syntetických kultivačních médiích (Machatková et al. 2009). Embrya musí z média získávat všechny živiny, jakmile jsou zásoby z oocytu vyčerpány a také musí být chráněna před možnými toxickými vlivy (Gordon 2003).

Médium představuje definovaný roztok minerálních solí upravujících pH a osmotický tlak, stopových prvků, aminokyselin, glukózy, pyruvátu a krevního séra. Dlouhý pobyt raného embrya v podmínkách in vitro vyžaduje takové kultivační podmínky, aby se co nejvíce přibližovaly prostředí vejcovodu a dělohy. Chemicky definovaná kultivační média jsou proto obohacována embryotrofními látkami, jako je např. dezaktivované fetální telecí sérum nebo sérový albumin. Vývojová schopnost raných embryí se zvyšuje používáním tzv. kokultivace se somatickými buňkami, jako jsou kumulární buňky, epiteliální buňky vejcovodu aj. Využívá se rovněž médií, která neobsahují somatické buňky, ale pouze látky jimi secernované (peptidy, růstové faktory apod.) (Hofírek et al. 2009).

Ve druhém systému jsou zygoty kultivovány spolu se somatickými buňkami (epiteliální buňky vejcovodu, granulózové buňky, jaterní buňky buvolů či potkanů) v roztoku TCM 199 nebo v roztoku B2 Menezo s 10 % séra nebo 1 % albuminového bovinního séra (BSA) při 38,5 °C v 5 % CO2.

Ve třetím systému jsou zygoty kultivovány v prostém médiu bez podpory somatických buněk. Prostým médiem se v tomto případě rozumí syntetická vejcovodová tekutina neboli SOF (Synthetic Oviductal Fluid) doplněná sérem nebo BSA a aminokyselinami (Gardner et al. 1994). Podle Machatkové et al. (2009) je médium doplněno pouze bovinním sérovým albuminem nebo polyvinylalkoholem, inkubace pak probíhá v atmosféře s 90 % N2, 5 % O2 a 5 % CO2. Rosenkrans & First (1994) zmiňuje inkubaci při 38,5 °C v 5 % CO2 a 5 % O2. Tato kultivace dosud nepřináší očekávané výsledky, na druhou stranu, plně definovaná média jsou nezbytná pro studium faktorů regulujících vývoj embryí (Machatková et al. 2009).

V in vitro kultivačním systému probíhá produkce blastocyst hlavně 7. den po oplození, pokud 0. den je den oplození. U in vivo kultivačních systémů (např. vejcovod ovcí) dochází k formování blastocyst již 6. den (Galli & Lazzari 1993). Podle Machatkové et al. (2021) se embrya vyvíjejí po dobu 7–8 dnů do stádií časné až expandující blastocysty, kdy mohou být použita pro embryotransfer nebo kryokonzervaci.

Výsledky a využívání

Pokud jde o účinnost IVP, přibližně 80-90 % nezralých hovězích oocytů projde jaderným zráním in vitro, přibližně 80 % projde oplozením, 30-40 % se vyvine do stadia blastocysty a přibližně 50 % přenesených embryí naváže a udrží březost (Galli et al. 2014; Lonergan et al.

2016). Vývoj IVP embryí po embryotransferu je srovnatelný s vývojem embryí po superovulaci. Po přenosu kvalitních embryí lze dosáhnout u příjemkyní 50 % březosti s 10% embryonální mortalitou (Machatková et al. 2016). Produkce embryí skotu v podmínkách in vitro (IVP) našla již své nezastupitelné místo v chovatelsky vyspělých zemích (Machátková et al. 2019). Četnost využívání metody znázorňuje Tabulka 3.

Tabulka 3: Produkce embryí v podmínkách in vitro v letech 2014 a 2020 celosvětově dle oblasti

Oblast	Prudukce embryí in vitro					
	Získané oocyty	Přenositelná embrya	Přenosů celkem	Získané oocyty	Přenositelná embrya	Přenosů celkem
	2014			2020		
Afrika	20 976	5081	1372	16 793	4977	4159
Asie	0	0	0	0	0	0
Evropa	121 199	17 062	13 972	195 859	47 470	35 352
Severní Amerika	812 726	206 326	93 123	2 394 280	578 995	339 716
Oceánie	30 695	6502	3431	57 053	14 345	14 571
Jižní Amerika	853 125	357 479	251 683	1 500 571	500 397	474 145
Celkově	1848 721	592 450	365 625	4 193 804	1 156 422	878 181

Zdroj dat: IETS (2015) a IETS (2020)

3.5 Vliv stresu na reprodukci dojnic

Stres ovlivňuje plodnost i produkci skotu (Lucy 2019). Zvířata, která trpí chronickým stresem, nemají stejnou reprodukční úspěšnost jako zvířata, která stresem netrpí. Akutní stresory mohou také narušit reprodukční funkce v kritických obdobích reprodukčního cyklu, jako je ovulace, raná březost a laktace (Squires 2003). Stres působí jako zátěž a na jednotlivá zvířata působí tato zátěž v různé míře v reakci na stejnou míru stresu. Síla zátěže pak určuje dopad stresu na plodnost (Lucy 2019).

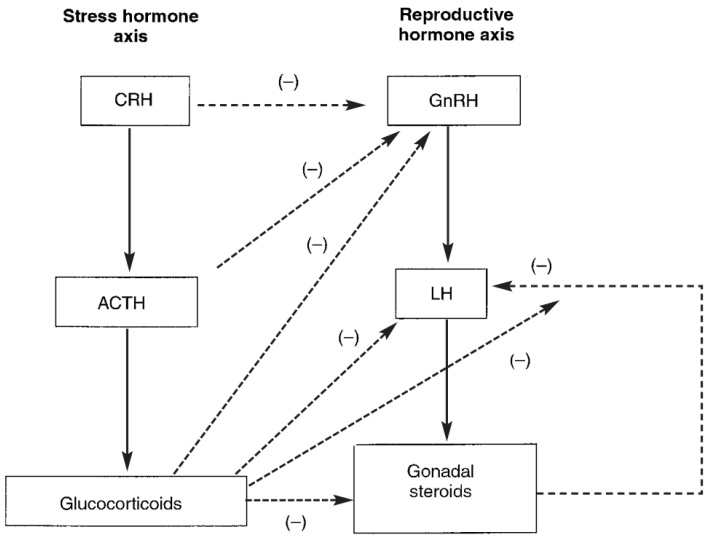
3.5.1 Mechanismy vlivu stresu na reprodukci

Jednou z možností, jak je vliv stresu na reprodukční systém zprostředkován je skrz stresory působícími na organismus prostřednictvím osy hypotalamus-hypofýza-gonády (HPG) a osy hypotalamus-hypofýza-nadledviny (HPA). Zátěž, ke které dochází v reakci na stres, ovlivňuje zdraví dělohy, kvalitu oocytů, funkci vaječníků a vývojovou schopnost embrya (Lucy 2019). Také Naqvi et al. (2012) zmiňuje, že tělesné systémy aktivované stresem ovlivňují reprodukci změnou činnosti hypotalamu, hypofýzy nebo gonád.

Stres snižuje sekreci GnRH hypotalamem a tím i následnou produkci LH a FSH hypofýzou a pohlavních steroidů gonádami (viz Obrázek 3) (Squires 2003). Podle Naqvi et al. (2012) aktivace stresových drah může přímo ovlivnit aktivitu neuronů gonadotropin uvolňujícího hormonu (GnRH) v hypotalamu nebo vyšších nervových centrech, což následně ovlivňuje syntézu nebo sekreci GnRH do krve. Squires (2003) zmiňuje, že k snížení GnRH

dochází pod vlivem glukokortikoidů, ACTH a CRH, vazopresinu a opioidů jako je βendorfin. Potlačení frekvence pulzů GnRH a tím následně i LH během vystavení stresoru zapříčiní potlačení růstu folikulů. Dochází také k zpoždění ovulace kvůli opoždění procesů související s říjí, konkrétně například předovulační nárůst LH (Dobson & Esslemont 2002). Snížená sekrece GnRH způsobuje také snížení libida, nedostatečnou implantaci oplodněného vajíčka a zpomalení růstu embrya (Squires 2003).

Dalším možným působením stresu je změna zpětnovazebného působení pohlavních steroidů (Naqvi et al. 2012; Squires 2003). Glukokortikoidy jsou schopny zesílit negativní zpětnovazební účinky estradiolu a snížit stimulaci exprese receptorů GnRH estrogenem. Glukokortikoidy mohou mít také přímé inhibiční účinky na sekreci gonadálních steroidů a citlivost cílových tkání na pohlavní steroidy (Naqvi et al. 2012).



Obrázek 3: Efekt stresových hormonů na funkci gonád
Zdroj: Squires (2003)

Tepelný stres způsobující depresi plodnosti je multifaktoriální problém, který ovlivňuje fyziologické a buněčné funkce v řadě tkání (Paula-Lopes et al. 2012). Dochází k narušení mnoha reprodukčních procesů, včetně kompetence oocytů, embryonálního růstu, sekrece gonadotropinů, steroidogeneze ovariálních folikulů, vývoje žlutého tělíska a reakcí děložního endometria (Wolfenson & Roth 2019).

Pod vlivem tepelného stresu dochází ke snížení sekrece luteinizačního hormonu a tím následně i estradiolu, což vede ke snížení délky a intenzity říje, zvýšenému výskytu anestru a tiché říje (Krishnan et al. 2017). Sníženou steroidogenezi ve folikulárních buňkách pod vlivem tepelného stresu dokumentuje Wolfenson et al. (1997) ve své práci. Také účinky steroidních hormonů na tkáň reprodukčního ústrojí by mohly být během expozice tepelného stresu sníženy v důsledku zvýšené syntézy proteinů tepelného šoku (HSP) - HSP 70 a HSP 90. Zvýšená syntéza HSP by mohla změnit sestavení, transport nebo vazebné aktivity steroidních receptorů (Naqvi et al. 2012). Objevuje se zvýšený počet středně velkých folikulů (6-9 mm v průměru), pravděpodobně v důsledku narušené folikulární dominance, což je spojeno se sníženou koncentrací inhibinu a zvýšenou koncentrací FSH. Dochází k nízké sekreci progesteronu, což souvisí se zhoršenou funkcí CL (Wolfenson & Roth 2019). Podle Naqvi et al. (2012) pod

vlivem tepelného stresu může docházet k inhibici 3-beta-hydroxysteroid dehydrogenázi (3b HSD), čímž dochází k minimalizaci sekrece progesteronu z luteálních buněk. To omezuje funkci endometria a zvýšená sekrece endometriálního prostaglandinu F2 alfa během tepelného stresu ohrožuje udržení březosti (Krishnan et al. 2017). Pod vlivem tepelného stresu může docházet také k inhibici enzymu aromatázy, což může vyvolat folikulární atrézii a následně anestrii (Naqvi et al. 2012). Podle Wolfenson et al. (1997) je snížení steroidogenní kapacity folikulů při tepelném stresu charakterizováno nižší aromatázovou aktivitou granulózových buněk a sníženou koncentrací estradiolu v dominantním folikulu. Tepelný stres způsobuje také nadprodukci ROS, což vede k oxidačnímu stresu u dojnic. Celkově se účinek tepelného stresu neomezuje pouze na léto, ale přenáší se i do podzimu (Roth 2021).

I metabolické zdraví krávy ovlivňuje plodnost (Leroy et al. 2017). S výskytem negativní energetické bilance (NEB) souvisí endokrinní a metabolické důsledky na organismus (Leroy et al. 2008). Endokrinní a metabolické změny při NEB jsou iniciovány nízkou hladinou inzulínu, vysokou spotřebou glukózy, sníženou aktivitou růstového faktoru podobnému inzulinu 1 (IGF-1) a vysokou aktivitou růstového hormonu, což vede k silné odezvě neesterifikovaných mastných kyselin (NEFA). NEFA jsou oxidovány v játrech pro získání energie, což vede ke ketóze a nakonec k rozvoji steatózy jater v důsledku akumulace triglyceridů. Jako predispoziční faktor pro rozsáhlou mobilizaci tělesných tukových zásob ve formě NEFA je stanoveno vyšší předporodní skóre tělesné kondice (BCS). Mobilizace tuku a metabolismus bílkovin vedou k vyčerpání nejpotřebnějších mastných kyselin a aminokyselin pro reprodukci a tělesnou kondici (Sammad et al. 2022). Toto snížení energie vede ke zvýšené mobilizaci tuků a následné tvorbě lipidových peroxidů a reaktivních forem kyslíku (ROS) (Elshahawy & Abdullaziz 2017).

Celkově dochází pod vlivem NEB a disproporčního energetického metabolismu u krav ke ztučnění jater, ketóze, subakutní a akutní acidóze bachoru. Objevují se poruchy ve využitelnosti minerálních látek vedoucí k mléčné horečce a subklinické hypokalcémii. Narušená je také imunitní funkce a objevují se onemocnění jako je zadržená placenta, metritida a mastitida (Esposito et al. 2014). Dochází také ke změně biochemického profilu ovariálních folikulů, oocytů, vyvíjejícího se embrya, žlutého tělíska a dělohy, což v konečném důsledku vede k nízkému počtu zabřeznutí. Pod vlivem metabolického stresu dochází i k endokrinním změnám na ose hypofýza-hypotalamus-vaječníky (Sammad et al. 2022).

3.5.2 Vliv stresu na kvalitu oocytů

Tepelný stres

Poškození folikulů a v nich obsažených oocytů se zdá být hlavním faktorem v komplexním mechanismu, kterým tepelný stres narušuje plodnost (Roth 2008). Bylo prokázáno, že tepelný stres ovlivňuje kvalitu oocytů (Miętkiewska et al. 2022). Změny vyvolané tepelným stresem se mohou později projevit jako porucha vývoje folikulů a zhoršená schopnost oocytů projít zraním, fertilizací a dále se vyvíjet v embryo. Je několik možných buněčných a molekulárních mechanismů, kterými tepelný stres narušuje vývojovou kompetenci oocytů (Roth 2021). Tepelný stres může přímo ovlivnit oocyt, zprostředkovat negativní účinky prostřednictvím narušeného folikulárního prostředí či zhoršenou funkcí okolních kumulárních buněk oocytu (Roth 2008).

Tepelný stres je spojen se změnami jaderných a cytoplazmatických vlastností oocytů, zahrnujících cytoplazmatické a jaderné organely. Dochází k poškození cytoskeletu, a tím ke špatnému uspořádání chromozomů. Organely jako Golgiho aparát a endoplazmatické retikulum se fragmentují a rozpadají. Také se snižuje počet a integrita mitochondrií (Naqvi et al. 2012). Oocyty odebrané v létě vykazovali možnou mitochondriální dysfunkci. Zjištěna byla zvýšená exprese mitochondriálních genů, vyšší náchylnost k apoptóze a snížený obsah mtDNA, přičemž oocyty odebrané v létě měli osmkrát méně mtDNA, než oocyty odebrané v zimním období (Ferreira et al. 2016). Ahmed et al. (2017) popisuje také zvětšení mitochondrií, narušení ribozomů a množství volných ribozomů. Také dochází ke změnám v morfologii membrán, agregaci membránových proteinů a zvýšení tekutosti membrán (Naqvi et al. 2012). V létě je podíl nasycených mastných kyselin v oocytech a granulózových buňkách vyšší než podíl nenasycených mastných kyselin, což znamená snížený oxidační stav oocytu (Roth 2008).

Tepelný stres působí také na kumulární buňky. Tepelný stres (41 °C) během in vitro zrání bovinních oocytů vedl k významnému snížení rychlosti zrání a menší expanzi kumulárních buněk ve srovnání s normální teplotou (38,5 °C). Změny v kumulárních buňkách při tepelném stresu zahrnovaly marginaci jaderného chromatinu, kondenzaci a karyolýzu, tvorbu jaderných a buněčných membránových skvrn a přítomnost membránově vázaných vezikul uzavírajících buněčné fragmenty podobné apoptóze (Ahmed et al. 2017). Campen et al. (2018) dokumentoval, že tepelný stres při zvýšené teplotě (41,0 °C nebo 42,0 °C) snížil také gap junction komunikaci mezi kumulárními buňkami a oocyty.

Tepelný stres také poškozuje jaderné a cytoplazmatické zrání, dochází ke změnám v expresi jaderných i mitochondriálních transkriptů a indukci apoptózy (Roth 2021). Bylo prokázáno, že změny na úrovni transkriptomu způsobené tepelným stresem odpovídají 46,4 % poruchám vývoje blastocysty (Miętkiewska et al. 2022). Vystavení oocytů zvýšené teplotě vyvolává také poškození DNA v oocytech. Vystavení oocytů vysoké teplotě (41,8 °C) po dobu 12 hodin snižuje jejich schopnost dokončit jaderné zrání a vývoj po oplodnění (Naqvi et al. 2012). Studie in vitro poskytly důkazy o tepelně indukovaných změnách v jaderném zrání, které se projevují zhoršenou obnovou meiózy a sníženým podílem oocytů, které se vyvinou do stadia MII a jsou způsobilé k oplodnění (Roth 2021).

Ve studii Payton et al. (2018) byly oocyty maturovány při teplotě 38,5 °C po dobu 24 h nebo 41,0 °C po dobu prvních 12 hodin zrání in vitro a poté při 38,5 °C. Vystavení teplotě 41,0 °C během prvních 12 hodin zrání vedlo ke snížení vývoje blastocyst o 46,3 %. Kultivace při 41,0 °C po dobu prvních 6 h in vitro maturace zvýšila hladiny mitochondriálních ROS a snížila hladiny cytoplazmatických ROS ve srovnání s nestresovanými zvířaty. Podíl embryí rýhujících se do stádia 8 až 16 buněk byl ve skupině vystavené tepelnému stresu nižší než u nestresovaných zvířat (Payton et al. 2018). V práci Paes et al. (2016) byly kumulo-oocytární komplexy kultivovány při teplotě 38,5 nebo 42 °C po dobu 12 hodin. Tepelně stresované oocyty měly výrazně nižší míru zrání (MII) než kontrolní skupina. Tepelný stres v této studii neměl žádný vliv na expresi HSP70 v oocytech. Došlo ale ke zvýšení tvorby ROS a také ke snížení hladiny glutathionu, silného antioxidantu bovinního COC (Paes et al. 2016).

Cizmeci et al. 2022 zkoumal vliv tepelného stresu na počet a kvalitu získaných oocytů metodou ovum pick-up. OPU byla prováděna v různých ročních obdobích a byly zaznamenávány teplotní podmínky. Rozdělení do skupin podle okolní teploty bylo provedeno na < 10 °C (skupina 1), 10-25 °C (skupina 2) a > 25 °C (skupina 3). Byly aspirovány všechny

antrální folikuly o průměru 2-8 mm. Po provedení 69 OPU v náhodných dnech cyklu bylo zjištěno, že počet oocytů na jednu OPU je 8,72 ve skupině 1; 6,32 ve skupině 2 a 6,85 ve skupině 3. Počet životaschopných oocytů na OPU byl 6,83 ve skupině 1; 4,64 ve skupině 2 a 4,65 ve skupině 3. Z těchto čísel je zřejmé, že nejvíce oocytů bylo získáno ve skupině 1 při teplotě < 10 °C. Oocyty kvality A, B, C byly zahrnuty do procesu IVP. Bylo zjištěno, že rychlost vývoje blastocyst u oocytů získaných v teplém období (> 25 °C; skupina 3) byla nižší než u ostatních skupin Cizmeci et al. (2022).

Metabolický stres

Metabolismus matky může přímo ovlivňovat kvalitu oocytů a embryí. Některé výzkumy prokázaly, že negativní energetická bilance u metabolicky oslabených dojnic s vysokou užitkovostí ovlivňuje kvalitu oocytů a embryí (Leroy et al. 2017). Metabolické poruchy spojené s negativní energetickou bilancí (NEB) v časném poporodním období jsou spojeny s ovariální dysfunkcí. Změny v růstu ovariálních folikulů v období NEB mohou ovlivnit kvalitu oocytů. Kromě toho může narušený metabolismus matky změnit endokrinní a biochemické složení folikulární tekutiny a tím mikroprostředí oocytu. Zrající oocyt je velmi citlivý na jakékoli narušení svého prostředí a modely zrání in vitro odhalily, že některé z těchto metabolických změn snižují vývojovou kompetenci oocytu (Leroy et al. 2013).

Protože mnoho možných metabolických faktorů může přímo ovlivňovat kvalitu oocytů, byly použity systematické in vitro přístupy ke zkoumání vlivu zrání oocytů při zvýšených koncentracích NEFA. Blastocysty pocházející z oocytů vystavených působení NEFA vykazovaly nižší počet buněk, zvýšený index apoptotických buněk, známky glukózové intolerance, citlivost na oxidační stres a mitochondriální dysfunkci. Přenos embryí odvozených z poškozených oocytů ukázal narušený vývoj embrya (Leroy et al. 2017). Negativní energetická bilance je u krav kromě zvýšené koncentrace NEFA spojená i s hypoglykémií. Oocyty vystavené vysoké hladině NEFA a nízké hladině glukózy měly nižší rychlost rýhování a počet blastocyst byl významně nižší (Bie et al. 2015). Studie Van Hoeck et al. (2014) došla k závěru, že zrání oocytů při zvýšených koncentracích NEFA vedlo k blastocystám s významně nižším počtem buněk, zvýšeným poměrem apoptotických buněk a změněným množstvím mRNA. Blastocysty navíc vykazovaly sníženou spotřebu kyslíku, pyruvátu a glukózy, zvýšenou spotřebu laktátu a vyšší metabolismus aminokyselin. Tyto údaje naznačují, že vystavení zrajících oocytů zvýšeným koncentracím NEFA má negativní dopad na plodnost nejen prostřednictvím snížení vývojové kapacity oocytů, ale i zhoršenou kvalitou, životaschopností a metabolismem raných embryí (Van Hoeck et al. 2014). In vivo studie Matoba et al. (2012) zkoumala vztah mezi metabolickými parametry (hladina neesterifikovaných mastných kyselin, betahydroxybutyrátu, inzulínu, růstového faktoru podobnému inzulinu 1 a glukózy) a kvalitou odebraných oocytů získaných aspirací. Hlavním zjištěním této studie je, že navzdory nárůstu neesterifikovaných mastných kyselin, betahydroxybutyrátu a dalším metabolickým změnám, ke kterým dochází v souvislosti s otelením a na vrcholu laktace v týdnech po porodu, nebyla kvalita oocytů, která byla hodnocena morfologicky, z hlediska schopnosti oplodnění a vývoje do stadia blastocysty, ovlivněna (Matoba et al. 2012). Podle Aardema et al. (2013) mohly být hladiny volných mastných kyselin v krvi tlumeny v kumulárních buňkách, a proto byly oocyty chráněny před účinky vysoké hladiny volných mastných kyselin (Aardema et al. 2013).

Kromě významu negativní energetické bilance (NEB), s kterou souvisí následné endokrinní a metabolické důsledky se pozornost věnuje i vlivu jednotlivých diet. Diety bohaté na škrob mohou zlepšit energetický stav, a tím i aktivitu vaječníků v časném poporodním období, ale kvalita oocytů a embryí může takovou inzulinogenní dietou utrpět. Doplnění tuku má podobný dvojí účinek s příznivou stimulací produkce ovariálních steroidů, ale oocyty a embrya vykazují změněný energetický metabolismus a nadměrnou akumulaci lipidů. Dieta s vysokým obsahem bílkovin zvyšuje koncentraci amoniaku a močoviny v krvi, což vede ke změně intrafolikulárního, oviduktálního a děložního prostředí. Oocyty a embrya jsou na tyto změny mikroprostředí velmi citlivé, což může vést k narušení zrání, oplodnění nebo předčasnému rýhování (Leroy et al. 2008).

Oxidační stres

Reaktivní formy kyslíku (ROS) vznikají při metabolismu kyslíku jako vedlejší produkty buněčného dýchání a jsou neustále produkovány ve všech aerobních organismech. Oxidační stres vzniká jako důsledek nerovnováhy mezi produkcí ROS a dostupnou antioxidační ochranou proti nim (Belhadj Slimen 2014). Za fyziologických podmínek jsou ROS nezbytné pro maturaci jádra, ale nerovnováha mezi produkcí ROS a antioxidační kapacitou může vést k poškození oocytu (Roth 2017). Situace jako jsou infekce, metabolické poruchy a tepelný stres, způsobují u skotu oxidační stres tím, že snižují koncentraci antioxidantů v těle nebo zvyšují endogenní produkci volných radikálů (Gonzalez et al. 2019). Zhai et al. (2022) zmiňuje, že k akumulaci reaktivních forem kyslíku (ROS) u myší dochází i pod vlivem psychologického stresu. Konkrétně ROS můžou difundovat a procházet buněčnými membránami a měnit většinu typů buněčných molekul, jako jsou lipidy, bílkoviny a nukleové kyseliny, vyvolávat změny v mitochondriích, vyčerpávat ATP, zvyšovat míru fragmentace DNA v jádře a spouštět apoptózu a nekrózu ve většině granulózových buněk, oocytech a dokonce i v raných embryích. Zvýšené množství ROS v mikroprostředí vaječníku, vejcovodu a dělohy navíc vede ke změnám hladin antioxidačních enzymů, které jsou důležité pro ochranu oocytů a raného vývoje embrya (Zhai et al. 2022). Roth (2017) zmiňuje, že nerovnováha mezi produkcí ROS a antioxidační kapacitou může vést k poškození DNA a apoptóze oocytu. Podle Rakha et al. (2022) je akumulace velkého množství reaktivních forem kyslíku (ROS) v oocytech jedním z klíčových prvků negativně ovlivňující kvalitu oocytů během in vitro maturace. Prostředí in vitro obvykle zvyšuje produkci ROS, což je považováno za hlavní příčinu poškození buněk (Cecica et al. 2001).

4 Metodika

4.1 Charakteristika podniku

Vybrané parametry byly sledovány u dojnic holštýnského skotu ve středisku živočišné výroby Ruda v okrese Rakovník. Toto středisko náleží Statkům České zemědělské univerzity v Praze. Statky ČZU vznikly v roce 1960 a zabezpečují činnost univerzity v praktických podmínkách. Celý podnik obhospodařuje téměř 2 700 ha půdy a v živočišné výrobě chová celkem 1 485 kusů zvířat, z toho kolem 750 dojnic.

Středisko živočišné výroby Ruda se specializuje na chov holštýnského skotu. Nachází se v obci Ruda u Nového Strašecí v nadmořské výšce 412 metrů v suché, mírně teplé bramborářské oblasti. Hlavní stáj má kapacitu pro 440 dojnic a je rozdělena na 4 sektory. Dojnice jsou ustájeny volně s lehacími boxy podestlanými separátem z kejdy. Krmnou směs dostávají dojnice 2x denně po ranním a večerním dojení na krmný stůl se žlabovou zábranou a v průběhu dne je krmení přihrnováno. Složení krmného dávky je upravováno na základě denní dojivosti. Dojení probíhá dvakrát denně v intervalu 12 hodin v rybinové dojírně s kapacitou 2×12 míst. Dle kontroly užitkovosti za rok 2022/23 dosahovaly dojnice průměrně užitkovosti 10 050 kg mléka s průměrně 4,10 % tuku a 3,5 % bílkovin (viz Tabulka 4)

Tabulka 4: Kontrola užitkovosti farma Ruda za rok 2022/23

Kategorie	Mléko [kg]	Tuk [%]	Tuk [kg]	Bílkoviny [%]	Bílkoviny [kg]
1. laktace	8 565	4,06	348	3,52	301
2. laktace	10 499	4,12	432	3,51	369
3. a další laktace	11 201	4,12	461	3,49	391
Celkem	10 050	4,10	412	3,50	352

4.2 Soubor hodnocených zvířat

Data o dojnicích (číslo krávy, pořadí laktace, DIM, datum otelení) byla zjišťována ze zootechnické dokumentace. Do sledování bylo vybráno celkem 143 prvotelek v první třetině laktace. Data o mléku byla dostupná z každého dojení v laktaci díky “in-line real-time" analyzátoru (Afifarm verze Afilab with software Afifarm 4.1; Afimilk; Afikim; Izrael), a taktéž z kontroly užitkovosti provedené před a po aspiraci oocytů (viz Tabulka 5 a Tabulka 6).

Dojnice před aspirací oocytů byly průměrně ve 44,59 DMI a dosahovaly průměrného nádoje 29,39 l mléka denně s průměrným obsahem mléčných složek 3,76 % tuku a 3,23 % bílkovin. Sledován byl také počet somatických buněk v mléce a obsah močoviny. Počet somatických buněk dosahoval průměrně 100,56 tisíc buněk v 1 ml mléka a obsah močoviny byl průměrně 21,83 mg/100 ml.

Tabulka 5: Sledovaná data z kontroly užitkovosti před OPU

Proměnná	n	$\bar{x}$	s	Minimum	Maximum	s.e.	V [%]
DIM	143	44,59	8,01	31,00	62,00	0,67	17,96
Nádoj [l]	143	29,39	5,31	16,10	39,67	0,44	18,05
Tuk [%]	143	3,76	0,29	3,02	4,61	0,02	7,79
Tuk [kg]	143	1,10	0,17	0,68	1,58	0,01	15,81
Protein [%]	143	3,23	0,24	2,70	3,71	0,02	7,48
Protein [kg]	143	0,94	0,14	0,50	1,27	0,01	14,90
Poměr TB	143	1,17	0,09	0,96	1,44	0,01	7,43
PSB	143	100,56	85,31	46,00	452,00	7,13	84,84
Močovina	143	21,83	4,27	13,80	32,50	0,36	19,54

DIM = počet dní v laktaci v době kontroly užitkovosti; Nádoj = průměrný denní nádoj; Poměr TB = poměr tuku a bílkovin v mléce; PSB = počet somatických buněk; močovina = obsah močoviny v mléce; n = počet případů; $\bar{x}$ = aritmetický průměr; s = standardní odchylka; s. e. = standardní chyba aritmetického průměru; V [%] = variační koeficient

Dojnice po aspiraci oocytů byly průměrně ve 72,75 DMI a dosahovaly průměrného nádoje 29,34 l mléka denně s průměrným obsahem mléčných složek 4,02 % tuku a 3,34 % bílkovin. Počet somatických buněk dosahoval průměrně 79,15 tisíc buněk v 1 ml mléka a obsah močoviny byl průměrně 19,72 mg/100 ml.

Tabulka 6: Sledovaná data z kontroly užitkovosti po OPU

Proměnná	N	$\bar{x}$	s	Minimum	Maximum	s.e.	V [%]
DIM	143,00	72,75	8,21	59,00	92,00	0,69	11,29
Nádoj	143,00	29,34	6,28	6,00	42,20	0,53	21,41
Tuk [%]	143,00	4,02	0,33	3,49	4,61	0,03	8,31
Tuk [kg]	143,00	1,17	0,22	0,26	1,51	0,02	18,77
Protein [%]	143,00	3,34	0,28	2,79	3,75	0,02	8,29
Protein [kg]	143,00	0,97	0,19	0,21	1,30	0,02	19,14
Poměr TP	143,00	1,21	0,08	1,02	1,42	0,01	6,80
PSB	143,00	79,15	55,56	42,00	239,00	4,65	70,19
Močovina	143,00	19,72	6,39	8,30	35,00	0,53	32,41

DIM = počet dní v laktaci v době kontroly užitkovosti; Nádoj = průměrný denní nádoj; Poměr TB = poměr tuku a bílkovin v mléce; PSB = počet somatických buněk; močovina = obsah močoviny v mléce; n = počet případů; $\bar{x}$ = aritmetický průměr; s = standardní odchylka; s. e. = standardní chyba aritmetického průměru; V [%] = variační koeficient

4.3 Odběr oocytů - ovum pick-up

První odběr oocytů byl u dárkyň proveden v průměru v 58,4 dnů v laktaci (DIM) s minimem 42 DIM a maximem 77 DIM. Pokud nebyl detekován žádný problém, tak zpravidla dojnice podstoupily druhý odběr o týden později. Z původního souboru prvotelek některé nepodstoupily obě aspirace kvůli různým důvodům (zdravotní, zootechnické, úhyn). Celkem

proběhlo 7 odběrových dní v různých částech roku (listopad 2021, duben 2022, květen 2022, říjen 2022, duben 2023) s celkovým počtem 260 odběrů.

Před odběrem byly dárkyně fixovány ve fixačním zařízení a následně jim byla aplikována epidurální anestezie (4 ml 2% lidokainu, Fatro, Itálie). Následovalo odstranění výkalů z konečníku a po očištění perineální oblasti byl do pochvy zaveden speciálně vyrobený držák intravaginální sondy a vodič jehly, na kterém byla nasazena jednorázová podkožní jehla 18 G. Vaječníky byly vizualizovány konvexní sondou 7 MHz připojenou k ultrazvukovému skeneru MyLabOne VET (Esaote, Itálie). Před odběrem byl zapsán ultrasonografický nález na obou vaječnících (viz Tabulka 7). Punkční jehla byla přes stěnu pochvy vedena do jednotlivých folikulů a pomocí vakuové aspirační pumpy byl aplikován tlak -75 mm Hg. Folikulární tekutina s oocyty byla shromažďována do zkumavky o objemu 50 ml, v níž bylo 10 ml komerčního média pro získávání oocytů (OPU, Cornwall, UK). Po dokončení aspirace byla hadička napojená na jehlu ještě tímto médiem vypláchnuta, díky čemuž se dostaly všechny oocyty do zkumavky. Tato zkumavka byla udržována při teplotě 38 °C pomocí výhřevného stojanu.

Ihned po každé aspiraci byl obsah 50 ml zkumavky přefiltrován přes embryofiltr a kumulo-oocytární komplexy byly vyhledány pod stereomikroskopem. Získané oocyty byly do 2 hodin po odběru vajíček přeneseny do laboratoře ÚŽFG AV ČR (Ústav živočišné fyziologie a genetiky akademie věd České republiky, Liběchov) při teplotě přibližně 30 °C v komerčním udržovacím médiu (BO-IVM, Cornwall, UK).

Tabulka 7: Ultrasonografický nález na vaječnicích

Proměnná	n	$\bar{x}$	S	Minimum	Maximum	s.e.	V [%]
Folikuly celkem	260	13,23	5,60	3	31	0,35	42,36
Folikuly < 0,5 cm	260	11,48	6,25	0	30	0,39	54,45
Folikuly > 0,5 cm	260	1,74	1,84	0	12	0,11	105,54
Počet CL	260	0,75	0,61	0	2	0,04	82,12

n = počet případů; $\bar{x}$ = aritmetický průměr; s = standardní odchylka; s. e. = standardní chyba aritmetického průměru; V [%] = variační koeficient

4.4 Hodnocení kvality oocytů

Pokud není uvedeno jinak, chemikálie byly zakoupeny od firmy Sigma (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) a plast od firmy Nunclon (Nunc, Roskilde, Dánsko). Bovinní kumulo-oocytární komplexy (COC) získané aspirací OPU byly transportovány v zahřátém udržovacím médiu. Po transportu byly COC důkladně promyty a podrobeny in vitro maturaci v modifikovaném Parkerově médiu (MPM) doplněném o 20 mM pyruvátu sodného, 50 U/ml penicilinu, 50 µg/ml streptomycinu, 10 % fetálního bovinního séra (FBS), sérovým gonadotropinem a choriovým gonadotropinem (P. G. 600, 15 U/ml; Intervet, Boxmeer, Holland) bez parafínového překrytí ve čtyřjamkových miskách ve zvlhčované atmosféře po dobu 24 h při 39 °C s 5 % CO_2. Po 24 h byly oocyty denudovány jemným pipetováním a fixovány. Pro stanovení expanze kumulárních buněk a vyhodnocení kvality byly COC nebo denudované oocyty snímány Axiocam 208 color (Zeiss) před dozráním a po něm. Kumulo-oocytární komplexy byly

klasifikovány podle vzhledu kumulárních buněk (viz Tabulka 8) a byla vyhodnocena jejich expanze, která byla klasifikována jako binární parametr ano = 100 / ne = 0. Následně byly klasifikovány i denudované oocyty a rozděleny do 3 kategorií na základě struktury jejich ooplazmy (viz Tabulka 9). Posuzována byla také míra zrání, kdy bylo hodnoceno procento oocytů ze všech odebraných, u kterých během in vitro maturace došlo k prodělání MII fáze. Ve vztahu k jednotlivým dojnicím byla posuzována také schopnost oplození, konkrétně podíl dojnic, od kterých alespoň jeden odebraný oocyt dosáhl při in vitro maturaci MII fáze.

Tabulka 8: klasifikace kumulo-oocytárního komplexu

Třída	Počet vrstev kumulárních buněk
1	Více než 5 vrstev
2	2 – 5 vrstvy
3	1 vrstva (také pouze částečné obklopené)
4	Žádné kumulární buňky

Tabulka 9: klasifikace oocytu

	Třída	Morfologie oocytu
Kvalita ↓	**1**	Kompaktní, homogenní, mírně granulovaný
	2	Granulovaný, heterogenní
	3	Fragmentovaný, silně granulovaný

4.5 Odběr a vyšetření krve

Vlastní odběr krve proběhl vždy u zvířat z ocasní žíly (*v. caudalis mediana*) za pomocí standardních odběrek krve HEMOS 2. Od každého zvířete byla krev odebrána do odběrové zkumavky cca 8-10 ml s gelem, pro získání séra. Odběr probíhal pravidelně týden před první aspirací oocytů a následně v den aspirace oocytů. Po odběru byly zkumavky ponechány po dobu cca 2 hodin v lednici ke sražení. Poté byly zkumavky centrifugovány při 2 000 otáčkách/min, 4 °C po dobu 10 minut. Po centrifugaci bylo odebráno čisté sérum do 2 ml mikrozkumavek (eppendorf), promícháno a rozalikvotováno do mikrozkumavek (1,5 nebo 0,5 ml) cca po 200 µl. Samotná biochemická analýza krve byla zpracována službou, kterou realizovala Veterinární univerzita Brno s cílem vyhodnotit obsah vybraných metabolitů (cholesterol, triacylglycerol, betahydroxybutyrát, neesterifikované mastné kyseliny) v krvi dojnic.

4.6 Sledování metabolického stresu

Metabolický stres byl sledoval na základě poměru bílkovin a tuku v mléce a na základě hodnot vybraných parametrů (cholesterol, triacylglycerol, betahydroxybutyrát, neesterifikované mastné kyseliny) dostupných z výsledků biochemického vyšetření krve. Obsah tuku a bílkovin byl zaznamenán z každého dojení pomocí programu Afifarm (v4.1,

Afikim, Izrael). Následně byl vypočten poměr tuku a bílkovin. Sledován byl konkrétně poměr T/B mezi 25 a 35 DIM, minimum T/B do 1. odběru, maximum T/B do 1. odběru, rozptyl T/B do 1. odběru, průměrný poměr T/B do 1. odběru a T/B v den odběru oocytů.

4.7 Statistické vyhodnocení

Pro statistické vyhodnocení výsledků byl použit program SAS 9.4 (SAS ® 9.4, 2013). Pro stanovení základních parametrů souborů byla využita procedura MEANS. Frekvence sledovaných parametrů byly stanoveny za pomoci procedury FREQ. Pro stanovení vzájemných korelací byla využita procedura CORR. Pro vyhodnocení bylo uvažováno, že všechny proměnné mají normální rozdělení. Pro vlastní vyhodnocení efektů byla použita procedura GLM, s následným detailním vyhodnocením pomocí Tukey-Kramerova testu. Modelová rovnice vždy obsahovala efekt metabolického stavu, efekt pořadí odběru a lineární regresi na DIM při odběru.

Modelové rovnice měly následující tvar:

$$y_{ijk} = \mu + MET_i + PORAD_j + b \times (DIM) + e_{ijk}$$

kde:

- y_{ijk} = závislé proměnné (počet oocytů, kvalita oocytů, kvalita kumulo-oocytárního komplexu, expanze kumulo-oocytárního komplexu, míra zraní, pravděpodobnost dosažení MII fáze);
- μ = průměrná hodnota závislé proměnné;
- MET_i = fixní efekt metabolického stavu podle jednoho z parametrů, kde:
    - Cholesterol (i = < 4,07, n = 100; i = 4,07-5,14 , n = 36; i = > 5,14 , n = 64);
    - Triacylglycerol (i = < 0,10, n = 70; i = 0,10-0,13, n = 95; i = > 0,13, n = 95);
    - Betahydroxybutyrát (i = < 0,23, n = 95; i = 0,23-0,34 , n = 91; i = > 0,34, n = 74);
    - Neesterifikované mastné kyseliny (i = < 0,41, n = 89; i = 0,41-0,76, n = 97; i = > 0,76, n = 74);
    - Průměr T/B do 1. odběru (i = < 1,06, n = 99; i = 1,06-1,20, n = 88; i = > 1,20, n = 73);
    - T/B v den odběru (i = < 1,04, n = 77; i = 1,04-1,22, n = 112; i = > 1,22, n = 69);
- $PORAD_i$ = fixní efekt pořadí odběru (i = 1 – listopad 2021, n = 11; i = 2 – duben 2022, n = 14; i = 3 – květen 2022, n = 15; i = 4 – říjen 2022, n = 38; i = 5 – říjen 2022, n = 65; i = 6 – duben 2023, n = 71; i = 7 – duben 2023, n = 46);
- b × (DIM) = lineární regrese na dny v laktaci při aspiraci oocytů;
- e_{ijk} = náhodná chyba.

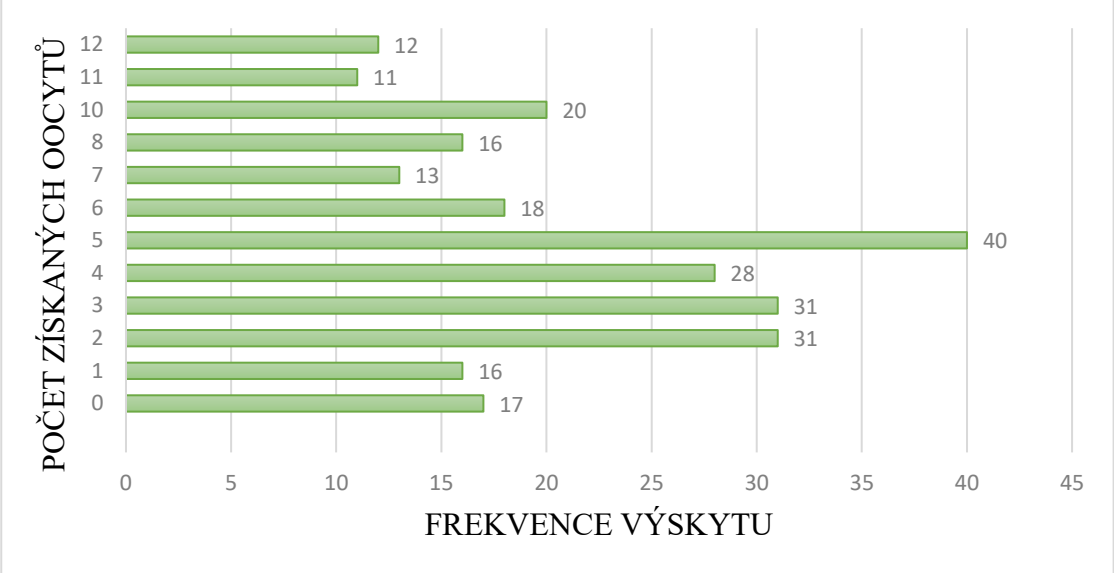
Pro stanovení průkaznosti byly využity následující úrovně: $P < 0,05$; $P < 0,01$; $P < 0,001$.

5 Výsledky

5.1 Základní statistiky odběru a hodnocení kvality oocytů

Celkem bylo za odběrová období v roce 2021, 2022 a 2023 získáno 253 oocytů s průměrným ziskem 5,04 oocytů na dojnici s minimálním počtem 0 a maximálním 12. Frekvence získaného počtu oocytů je graficky znázorněna v Grafu 1.

Graf 1: Frekvence získaného počtu oocytů



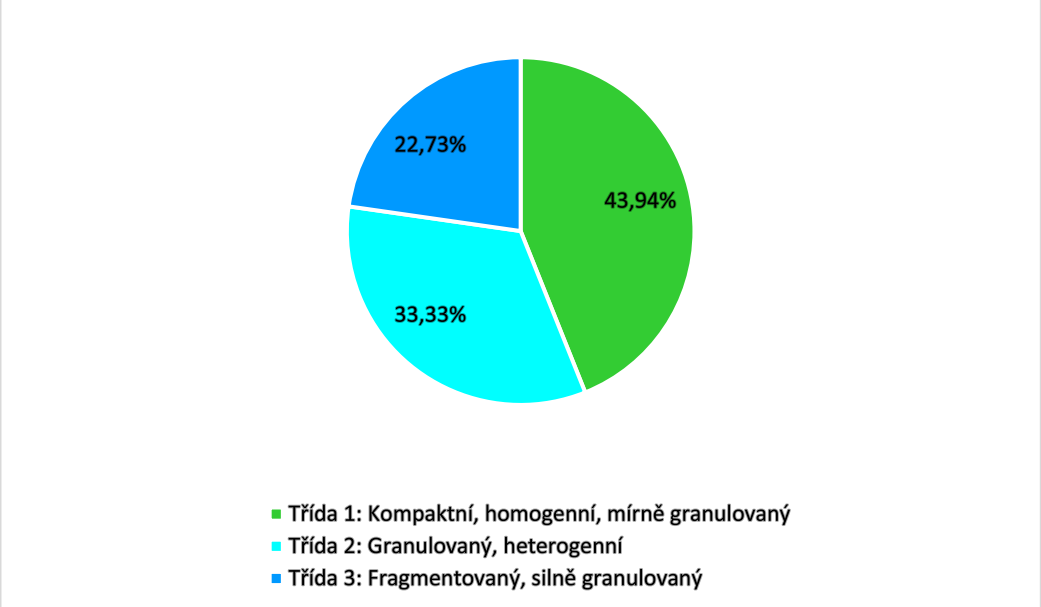
Data o kvalitě byla vyhodnocena u 140 oocytů, jelikož některá data z laboratoře UŽFG AV ČR z roku 2023 nebyla ještě zpracována. Stádium odebraných oocytů bylo následující: 13 oocytů bylo ve stádium zárodečného váčku; 21 oocytů ve stádiu metafáze I, rozpadu zárodečného váčku; 79 oocytů ve stádiu metafáze II a 18 degradovaných oocytů. Kvalita oocytů posuzovaná viz Tabulka 9 byla následující: 1 - 58; 2 - 44; 3 – 30; s průměrnou kvalitou 1,79; procentuální rozdělení je graficky znázorněno viz Graf 2. Kvalita kumulo-oocytárního komplexu na základě klasifikace dle Tabulky 8 byla v průměru 2,48, přičemž 29 COC mělo více než pět vrstev kumulárních buněk a 32 nemělo žádné kumulární buňky. K expanzi COC došlo u 35 hodnocených oocytů a u 66 k expanzi nedošlo. Míra zrání (% dosažení metafáze II) byla průměrně 59,19 % s vysokou schopností oplození (92,19 %). Parametry kvality posuzovaných oocytů byly shrnuty v Tabulce 10.

Tabulka 10: Parametry kvality posuzovaných oocytů

Proměnná	n	$\bar{x}$	S	Min.	Max.	s.e.	V [%]
Počet oocytů	140	4,08	2,95	0	12	0,25	72,22
Oplození schopné	128	92,19	26,94	0	100	2,38	29,23
Míra zrání	128	59,19	29,88	0	100	2,64	50,49
Stádia oocytů	128	1,77	0,82	0	3	0,07	45,98
Kvalita oocytů	132	1,79	0,79	1	3	0,07	44,27
Kvalita COC	132	2,48	1,09	1	4	0,09	43,77
Expanze COC	101	34,65	47,82	0	100	4,76	138,01

Oplození schopné = pravděpodobnost dosažení metafáze II (%) u alespoň 1 oocytu; Míra zrání = % dosažení metafáze II; Stádia oocytů: 0 = zárodečný váček, 1 = metafáze I, rozpad zárodečného váčku, 2 = metafáze II, 3 = degradovaný; Kvalita oocytů = hodnocena na stupnici 1 - 3 (klasifikace viz Tabulka 9); Kvalita COC = kvalita kumulo-oocytárního komplexu (klasifikace viz Tabulka 8);Expanze COC = expanze komplexu kumulo-oocytárního komplexu byla vyhodnocena jako binární parametr ano = 100/ne = 0; n = počet případů; $\bar{x}$ = aritmetický průměr; s = standardní odchylka; Min. = minimum; Max. = maximum; s. e. = standardní chyba aritmetického průměru; V [%] = variační koeficient

Graf 2: Kvalita oocytů dle tříd



5.2 Základní statistiky parametrů metabolického stresu

Základní hodnoty poměru tuku a bílkovin (T/P) vypočítané na základě dat z dojení jsou dostupné v Tabulce 11 Průměr T/B do 1. odběru oocytů a T/B v den odběru oocytů byly následně využity pro vyhodnocení modelové rovnice a dojnice byly pro tento účel rozděleny do tří skupin dle zjištěných hodnot.

Tabulka 11: Sledované hodnoty poměru tuku a bílkovin

Proměnná	n	$\bar{x}$	s	min.	max.	s.e.	V (%)
T/B 25-35 DIM	260	1,10	0,15	0,88	1,63	0,01	13,75
Minimum T/B do 1. odběru	260	0,91	0,18	0,21	1,30	0,01	19,27
Maximum T/B do 1. odběru	260	1,40	0,26	1,08	2,21	0,02	18,34
Rozptyl T/B do 1. odběru	260	0,49	0,28	0,12	1,50	0,02	57,25
Průměr T/B do 1. odběru	260	0,14	1,55	0,91	1,55	0,01	12,21
T/B v den odběru	258	1,13	0,18	0,77	1,81	0,01	15,53

n = počet případů; $\bar{x}$ = aritmetický průměr; s = standardní odchylka; min = minimum; max = maximum; s. e. = standardní chyba aritmetického průměru; V [%] = variační koeficient; T/B= poměr tuku a bílkovin v mléce; T/B 25-35 DIM = poměr tuku a bílkovin v mléce 25. – 35. den v mléce

Základní statistika hodnot dostupných z biochemického vyšetření krve jako je obsah cholesterolu, triacylglycerolu, betahydroxybutyrátu a neesterifikovaných mastných kyselin jsou dostupné v Tabulce 12.

Tabulka 12: Sledované hodnoty z vyšetření krve

Proměnná	n	$\bar{x}$	s	min.	max.	s.e.	V (%)
Cholesterol	260	4,61	1,07	2,9	8,5	0,07	23,25
Triacylglycerol	260	0,11	0,03	0,04	0,25	0,00	26,07
Betahydroxybutyrát	260	0,28	0,12	0,11	0,74	0,01	40,82
Neesterifikované MK	260	0,59	0,35	0,14	2,02	0,02	59,62

n = počet případů; $\bar{x}$ = aritmetický průměr; s = standardní odchylka; min = minimum; max = maximum; s. e. = standardní chyba aritmetického průměru; V [%] = variační koeficient; Neesterifikované MK = neesterifikované mastné kyseliny

5.3 Korelační analýza

V Tabulce 13 jsou vyhodnoceny korelace pro hodnoty cholesterolu, triacylglycerolu, betahydroxybutyrátu, neesterifikovaných mastných kyselin, průměrného poměru T/B do 1. odběru oocytů a poměru T/B v den odběru oocytů ve vztahu k počtu získaných oocytů a ukazatelům kvality oocytů.

Byla zjištěna slabá korelace mezi hladinou cholesterolu v krvi a počtem získaných oocytů ($r = 0,17$; $P < 0,01$). Slabá korelace byla také zjištěna mezi hladinou triacylglycerolu v krvi a mezi počtem získaných oocytů ($r = 0,15$; $P < 0,05$), naopak slabé záporné korelace byly zjištěny u hladiny triacylglycerolu v krvi a kvalitou kumulo-oocytárního komplexu ($r = -0,19$; $P < 0,05$) a taktéž mírou zrání oocytů ($r = -0,25$; $P < 0,01$). U hladiny betahydroxybutyrátu v krvi a počtem

získaných oocytů byla zjištěna slabá negativní korelace (r = -0,15; P < 0,05). Mezi průměrným poměrem tuku a bílkovin v mléce v den odběru a expanzí kumulo-oocytárního komplexu existuje slabá korelace (r = 0,20; P < 0,05). Mezi dalšími parametry nebyly zjištěny statisticky významné korelace.

Tabulka 13: Hodnoty korelací mezi vybranými parametry

		Počet oocytů	Kvalita oocytů	Kvalita COC	Expanze COC	Míra zrání	Oplození schopné
Cholesterol	r	0,17	-0,08	-0,02	0,01	-0,17	-0,06
	P	**0,006**	0,388	0,844	0,917	0,052	0,525
	n	253	132	132	101	128	128
Triacylglycerol	r	0,15	0,03	-0,19	0,13	-0,25	0,12
	P	**0,017**	0,718	**0,027**	0,210	**0,004**	0,175
	n	253	132	132	101	128	128
BHB	r	-0,15	0	-0,13	-0,07	-0,03	-0,02
	P	**0,021**	0,996	0,140	0,471	0,777	0,817
	n	253	132	132	101	128	128
NEMK	r	-0,12	-0,02	-0,14	-0,01	-0,13	0,01
	P	0,067	0,813	0,108	0,888	0,152	0,887
	n	253	132	132	101	128	128
Průměr T/B do 1. odběru	r	-0,02	-0,16	-0,09	0,11	0,08	0,09
	P	0,760	0,062	0,304	0,269	0,356	0,309
	n	253	132	132	101	128	128
T/B v den odběru	r	-0,08	-0,07	-0,04	0,20	-0,06	-0,05
	P	0,229	0,394	0,633	**0,045**	0,502	0,561
	n	251	132	132	101	128	128

Kvalita oocytů = hodnocena na stupnici 1 - 3 (klasifikace viz Tabulka 9); Kvalita COC = kvalita kumulo-oocytárního komplexu (klasifikace viz Tabulka 8);Expanze COC = expanze kumulo-oocytárního komplexu byla vyhodnocena jako binární parametr ano = 100/ne = 0; Míra zrání = % dosažení metafáze II; Oplození schopné = pravděpodobnost dosažení metafáze II (%) u alespoň 1 oocytu; BHB = betahydroxybutyrát; NEMK = neesterifikované mastné kyseliny; T/B= poměr tuku a bílkovin v mléce; r = korelační koeficient; P = průkaznost korelace; n = počet případů

5.4 Vyhodnocení modelové rovnice

5.4.1 Cholesterol

Tabulka 14 shrnuje vyhodnocení modelové rovnice ve které byl metabolický stav reprezentován hladinou cholesterolu. Posuzován byl vliv cholesterolu, pořadí odběrového období a dnů v mléku (DIM) při aspiraci oocytů na kvalitu oocytů, kvalitu kumulo-oocytárního komplexu, expanzi kumulo-oocytárního komplexu, míru zrání a schopnost oplození. Modelová rovnice byla statisticky průkazná pro počet získaných oocytů (r^2 = 0,232; P < 0,001) a v rámci modelové rovnice byl k počtu oocytů průkazný efekt cholesterolu (P < 0,01) a k pořadí odběru (P < 0,001). Modelová rovnice byla statisticky průkazná pro expanzi kumulo-oocytárního komplexu (r^2 = 0,156; P = 0,023) a v rámci modelové rovnice byl k expanzi COC průkazný efekt cholesterolu (P < 0,05). Modelová rovnice byla průkazná také k míře zrání (r^2 = 0,253; P = < 0,001), kde průkazný byl efekt cholesterolu (P < 0,01) a efekt pořadí odběru oocytů (P < 0,01). Pro další hodnocené proměnné byla modelová rovnice statisticky neprůkazná.

Tabulka 14: Hodnocení modelové rovnice - cholesterol

	Model		**Cholesterol**		**Pořadí odběru**		**DIM v den odběru**	
	r^2	**P**	**F**	**P**	**F**	**P**	**F**	**P**
Počet oocytů	0,232	**< 0,001**	5,53	**0,005**	8,75	**< 0,001**	0,06	0,808
Kvalita oocytů	0,021	0,907	0,2	0,823	0,33	0,858	0,36	0,551
Kvalita COC	0,032	0,762	1,61	0,204	0,5	0,735	0,15	0,698
Expanze COC	0,156	**0,023**	3,74	**0,028**	0,71	0,585	3,8	0,054
Míra zrání	0,235	**< 0,001**	6,63	**0,002**	5,1	**0,001**	0,81	0,370
Oplození schopné	0,017	0,954	0,4	0,668	0,44	0,778	0,01	0,930

Kvalita oocytů = hodnocena na stupnici 1 - 3 (klasifikace viz Tabulka 9); Kvalita COC = kvalita kumulo-oocytárního komplexu (klasifikace viz Tabulka 8); Expanze COC = expanze kumulo-oocytárního komplexu byla vyhodnocena jako binární parametr ano = 100/ne = 0; Míra zrání = % dosažení metafáze II; Oplození schopné = pravděpodobnost dosažení metafáze II (%) u alespoň 1 oocytu; DIM v den odběru = dny v laktaci v den odběru; r^2 = koeficient determinace; P = hladina významnosti; F = F rozdělení

Tabulka 15 prezentuje detailní vyhodnocení pro efekt cholesterolu. Mezi počtem oocytů získaných od první skupiny (< 4,07) a třetí skupiny (> 5,14) byl zjištěn statisticky průkazný rozdíl (P < 0,01), kdy u třetí skupiny byl celkově odebrán nejvyšší počet oocytů. Rovněž existovala tendence, že oocyty dojnic ve třetí skupině (> 5,14) dosahovaly nejlepší kvality. Naopak u kvality expanze COC můžeme u této skupiny vidět tendenci k horším výsledkům. U expanze COC byl zjištěn statisticky průkazný rozdíl (P < 0,05) mezi hodnotami v dojnic v první skupině (< 4,07) a ve skupině druhé (4,07-5,14). Mezi těmito skupinami byl zjištěn statisticky průkazný rozdíl (P < 0,01) i v míře zrání získaných oocytů.

Tabulka 15: Hodnocení vlivu cholesterolu na parametry kvality oocytu

Efekt	Skupina	Počet oocytů	Kvalita oocytů	Kvalita COC	Expanze COC	Míra zrání	Oplození schopné
		LSM ± SELSM	LSM ± SELSM	LSM ± SELSM	LSM ± SELSM	LSM ± SELSM	LSM ± SELSM
Cholesterol	< 4,07	3,53 ± 0,355^{B}	1,81 ± 0,143	2,48 ± 0,196	20,04 ± 9,514^{C}	65,05 ± 4,833^{B}	96,46 ± 4,940
	4,07-5,14	4,46 ± 0,369	1,74 ± 0,155	2,13 ± 0,212	47,27 ± 9,856^{C}	46,87 ± 5,189^{B}	96,26 ± 5,304
	> 5,14	5,30 ± 0,411^{B}	1,64 ± 0,224	2,64 ± 0,307	19,41 ± 14,724	69,20 ± 7,502	87,26 ± 7,668

Kvalita oocytů = hodnocena na stupnici 1 - 3 (klasifikace viz Tabulka 9); Kvalita COC = kvalita kumulo-oocytární komplexu (klasifikace viz Tabulka 8); Expanze COC = expanze kumulo-oocytární komplexu byla vyhodnocena jako binární parametr ano = 100/ne = 0; Míra zrání = % dosažení metafáze II; Oplození schopné = pravděpodobnost dosažení metafáze II (%) u alespoň 1 oocytu; LSM = průměry nejmenších čtverců; SELSM = standardní chyba průměrů nejmenších čtverců; různá písmena ve sloupcích značí statistickou průkaznost (A = P < 0,001; B = < 0,01; C = P < 0,05)

5.4.2 Triacylglycerol

Tabulka 16 shrnuje vyhodnocení modelové rovnice ve které byl metabolický stav reprezentován hladinou triacylglycerolu. Posuzován byl vliv triacylglycerolu, pořadí odběrového období a dnů v mléce (DIM) při aspiraci oocytů na kvalitu oocytů, kvalitu kumulo-oocytárního komplexu, expanzi kumulo-oocytárního komplexu, míru zrání a schopnost oplození. Modelová rovnice byla statisticky průkazná pro počet získaných oocytů (r^2 = 0,208; P < 0,001) a v rámci modelové rovnice byl k počtu oocytů průkazný efekt pořadí odběru (P < 0,001). Modelová rovnice byla statisticky průkazná také pro míru zrání (r^2 = 0,152; P = 0,005) nicméně pro další hodnocené proměnné byla modelová rovnice statisticky neprůkazná.

Tabulka 16: Hodnocení modelové rovnice - triacylglycerol

	Model		Triacylglycerol		Pořadí odběru		DIM v den odběru	
	r^2	P	F	P	F	P	F	P
Počet oocytů	0,208	**< 0,001**	1,63	0,198	8,66	**< 0,001**	0,01	0,908
Kvalita oocytů	0,020	0,924	0,09	0,911	0,27	0,898	0,51	0,478
Kvalita COC	0,019	0,941	0,69	0,504	0,53	0,716	0,05	0,826
Expanze COC	0,108	0,141	1,04	0,357	0,56	0,693	1,81	0,693
Míra zrání	0,152	**0,005**	0,07	0,931	2,36	0,057	0,21	0,650
Oplození schopné	0,040	0,667	1,82	0,167	1,11	0,357	0,05	0,832

Kvalita oocytů = hodnocena na stupnici 1 - 3 (klasifikace viz Tabulka 9); Kvalita COC = kvalita kumulo-oocytárního komplexu (klasifikace viz Tabulka 8); Expanze COC = expanze kumulo-oocytárního komplexu byla vyhodnocena jako binární parametr ano = 100/ne = 0; Míra zrání = % dosažení metafáze II; Oplození schopné = pravděpodobnost dosažení metafáze II (%) u alespoň 1 oocytu; DIM v den

odběru = dny v laktaci v den odběru; r^2 = koeficient determinace; P = hladina významnosti; F = F rozdělení

Tabulka 17 prezentuje detailní vyhodnocení pro efekt triacylglycerolu. U tohoto metabolitu byla tendence k poměrně vyrovnaným výsledkům mezi jednotlivými skupinami ve vztahu k počtu získaných oocytů, jejich kvality, kvality COC a míry zrání. U první skupiny (< 0,10) byl zjištěn jistý trend, kdy oocyty od těchto dojnic vykazovaly menší schopnost expanze COC a oplození oproti ostatním skupinám.

Tabulka 17: Hodnocení vlivu triacylglycerolu na parametry kvality oocytu

Efekt	Skupina	Počet oocytů	Kvalita oocytů	Kvalita COC	Expanze COC	Míra zrání	Oplození schopné
		LSM ± SELSM	LSM ± SELSM	LSM ± SELSM	LSM ± SELSM	LSM ± SELSM	LSM ± SELSM
Triacylglycerol	< 0,10	4,11 ± 0,420	1,68 ± 0,199	2,71 ± 0,274	13,99 ± 13,328	61,024 ± 7,228	81,70 ± 6,934
	0,10-0,13	4,01 ± 0,390	1,78 ± 0,140	2,35 ± 0,193	36,24 ± 9,479	59,335 ± 4,981	96,34 ± 4,779
	> 0,13	4,88 ± 0,367	1,74 ± 0,181	2,27 ± 0,249	32,84 ± 12,049	62,093 ± 6,385	100,22 ± 6,126

Kvalita oocytů = hodnocena na stupnici 1 - 3 (klasifikace viz Tabulka 9); Kvalita COC = kvalita kumulo-oocytární komplexu (klasifikace viz Tabulka 8); Expanze COC = expanze kumulo-oocytární komplexu byla vyhodnocena jako binární parametr ano = 100/ne = 0; Míra zrání = % dosažení metafáze II; Oplození schopné = pravděpodobnost dosažení metafáze II (%) u alespoň 1 oocytu; LSM = průměry nejmenších čtverců; SELSM = standardní chyba průměrů nejmenších čtverců

5.4.3 Betahydroxybutyrát

Tabulka 18 shrnuje vyhodnocení modelové rovnice ve které byl metabolický stav reprezentován hladinou betahydroxybutyrátu. Posuzován byl vliv betahydroxybutyrátu, pořadí odběrového období a dnů v mléce (DIM) při aspiraci oocytů na kvalitu oocytů, kvalitu kumulo-oocytárního komplexu, expanzi kumulo-oocytárního komplexu, míru zrání a schopnost oplození. Modelová rovnice byla statisticky průkazná pro počet získaných oocytů (r^2 = 0,232; P < 0,001) a v rámci modelové rovnice byl k počtu oocytů průkazný efekt betahydroxybutyrátu (P < 0,001) a k pořadí odběru (P < 0,001). Modelová rovnice byla statisticky průkazná pro míru zrání (r^2 = 0,151; P = 0,006) a v rámci modelové rovnice byl k míře zrání průkazný efekt pořadí odběru (P < 0,01). Pro další hodnocené proměnné a efekty byla modelová rovnice statisticky neprůkazná.

Tabulka 18: Hodnocení modelové rovnice - betahydroxybutyrát

	Model		Betahydroxybutyrát		Pořadí odběru		DIM v den odběru	
	r^2	P	F	P	F	P	F	P
Počet oocytů	0,308	< **0,001**	19,78	< **0,001**	12,99	< **0,001**	0,13	0,721
Kvalita oocytů	0,019	0,929	0,06	0,941	0,43	0,786	0,44	0,507
Kvalita COC	0,016	0,956	0,57	0,569	0,4	0,810	0,05	0,820
Expanze COC	0,096	0,213	0,37	0,693	1,05	0,385	2,15	0,146
Míra zrání	0,151	**0,006**	0,01	0,994	5,01	**0,001**	0,31	0,580
Oplození schopné	0,039	0,679	1,77	0,175	1,1	0,360	0	0,962

Kvalita oocytů = hodnocena na stupnici 1 - 3 (klasifikace viz Tabulka 9); Kvalita COC = kvalita kumulo-oocytárního komplexu (klasifikace viz Tabulka 8); Expanze COC = expanze kumulo-oocytárního komplexu byla vyhodnocena jako binární parametr ano = 100/ne = 0; Míra zrání = % dosažení metafáze II; Oplození schopné = pravděpodobnost dosažení metafáze II (%) u alespoň 1 oocytu; DIM v den odběru = dny v laktaci v den odběru; r^2 = koeficient determinace; P = hladina významnosti; F = F rozdělení

Tabulka 19 prezentuje detailní vyhodnocení pro efekt betahydroxybutyrátu. Mezi počtem oocytů získaných od první skupiny (< 0,23) a druhé skupiny (0,23-0,34) byl zjištěn statisticky průkazný rozdíl (P < 0,001), kdy u první skupiny byl celkově odebrán nejvyšší počet oocytů. U dalších parametrů byla tendence k poměrně vyrovnaným výsledkům mezi jednotlivými skupinami ve vztahu ke kvalitě oocytů, kvality COC a míry zrání. U třetí skupiny (> 0,34) byl zjištěn jistý trend, kdy oocyty od těchto dojnic vykazovaly menší schopnost expanze COC a oplození oproti ostatním skupinám.

Tabulka 19: Hodnocení vlivu betahydroxybutyrátu na parametry kvality oocytu

Efekt	Skupina	Počet oocytů	Kvalita oocytů	Kvalita COC	Expanze COC	Míra zrání	Oplození schopné
		LSM ± SELSM	LSM ± SELSM	LSM ± SELSM	LSM ± SELSM	LSM ± SELSM	LSM ± SELSM
BHB	< 0,23	5,46 ± 0,382^{A}	1,70 ± 0,177	2,35 ± 0,244	32,04 ± 11,945	61,30 ± 6,719	102,61 ± 6,445
	0,23-0,34	2,88 ± 0,355^{A}	1,70 ± 0,166	2,22 ± 0,228	36,68 ± 10,905	60,63 ± 6,078	101,21 ± 5,830
	> 0,34	4,90 ± 0,345	1,78 ± 0,160	2,60 ± 0,220	21,28 ± 11,595	60,57 ± 6,359	83,62 ± 6,099

BHB = betahydroxybutyrát; Kvalita oocytů = hodnocena na stupnici 1 - 3 (klasifikace viz Tabulka 9); Kvalita COC = kvalita kumulo-oocytární komplexu (klasifikace viz Tabulka 8); Expanze COC = expanze kumulo-oocytární komplexu byla vyhodnocena jako binární parametr ano = 100/ne = 0; Míra zrání = % dosažení metafáze II; Oplození schopné = pravděpodobnost dosažení metafáze II (%) u alespoň 1 oocytu; LSM = průměry nejmenších čtverců; SELSM = standardní chyba průměrů nejmenších čtverců; různá písmena ve sloupcích značí statistickou průkaznost (A = P < 0,001; B = < 0,01; C = P < 0,05)

5.4.4 Neesterifikované mastné kyseliny

Tabulka 20 shrnuje vyhodnocení modelové rovnice, ve které byl metabolický stav reprezentován hladinou neesterifikovaných mastných kyselin. Posuzován byl vliv neesterifikovaných mastných kyselin, pořadí odběrového období a dnů v mléce (DIM) při aspiraci oocytů na kvalitu oocytů, kvalitu kumulo-oocytárního komplexu, expanzi kumulo-oocytárního komplexu, míru zrání a schopnost oplození. Modelová rovnice byla statisticky průkazná pro počet získaných oocytů (r^2 = 0,205; P < 0,001) a v rámci modelové rovnice byl k počtu oocytů průkazný efekt pořadí odběru (P < 0,001). Modelová rovnice byla statisticky průkazná pro míru zrání (r^2 = 0,191; P = 0,001) a v rámci modelové rovnice byl k mí)ře zrání průkazný efekt pořadí odběru (P < 0,01). Pro další hodnocené proměnné a efekty byla modelová rovnice statisticky neprůkazná.

Tabulka 20: Hodnocení modelové rovnice - neesterifikované mastné kyseliny

	Model		**NEMK**		**Pořadí odběru**		**DIM v den odběru**	
	r^2	**P**	**F**	**P**	**F**	**P**	**F**	**P**
Počet oocytů	0,205	< **0,001**	1,09	0,339	10,4	< **0,001**	0,20	0,658
Kvalita oocytů	0,022	0,900	0,24	0,790	0,34	0,850	0,37	0,543
Kvalita COC	0,027	0,842	1,25	0,291	0,28	0,891	0,02	0,885
Expanze COC	0,099	0,192	0,55	0,581	1,65	0,169	2,51	0,116
Míra zrání	0,191	**0,001**	2,97	0,055	4,41	**0,002**	0,23	0,633
Oplození schopné	0,018	0,950	0,44	0,647	0,44	0,781	0,05	0,829

NEMK = neesterifikované mastné kyseliny; Kvalita oocytů = hodnocena na stupnici 1 - 3 (klasifikace viz Tabulka 9); Kvalita COC = kvalita kumulo-oocytárního komplexu (klasifikace viz Tabulka 8); Expanze COC = expanze kumulo-oocytárního komplexu byla vyhodnocena jako binární parametr ano = 100/ne = 0; Míra zrání = % dosažení metafáze II; Oplození schopné = pravděpodobnost dosažení metafáze II (%) u alespoň 1 oocytu; DIM v den odběru = dny v laktaci v den odběru; r^2 = koeficient determinace; P = hladina významnosti; F = F rozdělení

Tabulka 21 poskytuje detailní vyhodnocení pro efekt neesterifikovaných mastných kyselin. U tohoto metabolitu byla tendence k poměrně vyrovnaným výsledkům mezi jednotlivými skupinami ve vztahu k počtu získaných oocytů, jejich kvality, kvality COC a schopnosti oplození. U třetí skupiny (< 0,76) byl zjištěn jistý trend, kdy oocyty od těchto dojnic vykazovaly větší schopnost expanze COC oproti ostatním skupinám. Z hlediska míry zrání byla zjištěná tendence k vyššímu procentu dosažení MII fáze u první skupiny (< 0,41) vůči ostatním skupinám.

Tabulka 21: Hodnocení vlivu neesterifikovaných MK na parametry kvality oocytu

Efekt	Skupina	Počet oocytů	Kvalita oocytů	Kvalita COC	Expanze COC	Míra zrání	Oplození schopné
		LSM ± SELSM	LSM ± SELSM	LSM ± SELSM	LSM ± SELSM	LSM ± SELSM	LSM ± SELSM
NEMK	< 0,41	4,04 ± 0,377	1,83 ± 0,159	2,70 ± 0,217	22,18 ± 10,601	70,47 ± 5,748	94,44 ± 5,710
	0,41-0,76	4,71 ± 0,367	1,73 ± 0,140	2,37 ± 0,192	24,32 ± 9,240	55,68 ± 4,849	97,04 ± 4,817
	> 0,76	4,37 ± 0,393	1,67 ± 0,178	2,28 ± 0,244	38,99 ± 11,569	59,25 ± 6,288	89,20 ± 6,247

NEMK = neesterifikované mastné kyseliny; Kvalita oocytů = hodnocena na stupnici 1 - 3 (klasifikace viz Tabulka 9); Kvalita COC = kvalita kumulo-oocytární komplexu (klasifikace viz Tabulka 8); Expanze COC = expanze kumulo-oocytární komplexu byla vyhodnocena jako binární parametr ano = 100/ne = 0; Míra zrání = % dosažení metafáze II; Oplození schopné = pravděpodobnost dosažení metafáze II (%) u alespoň 1 oocytu; LSM = průměry nejmenších čtverců; SELSM = standardní chyba průměrů nejmenších čtverců

5.4.5 Průměrný poměr tuku a bílkovin do 1. aspirace

Tabulka 22 shrnuje vyhodnocení modelové rovnice ve které byl metabolický stav reprezentován průměrným poměrem tuku a bílkovin v mléce do 1. odběru. Posuzován byl vliv průměrného poměru T/B do 1. odběru, pořadí odběrového období a dnů v mléce (DIM) při aspiraci oocytů na kvalitu oocytů, kvalitu kumulo-oocytárního komplexu, expanzi kumulo-oocytárního komplexu, míru zrání a schopnost oplození. Modelová rovnice byla statisticky průkazná pro počet získaných oocytů (r^2 = 0,234; P < 0,001) a v rámci modelové rovnice byl k počtu oocytů průkazný efekt průměrného poměru T/B do prvního odběru (P < 0,01) pořadí odběru (P < 0,001). Modelová rovnice byla statisticky průkazná pro míru zrání (r^2 = 0,160; P = 0,003) a v rámci modelové rovnice byl k míře zrání průkazný efekt pořadí odběru (P < 0,01). Pro další hodnocené proměnné a efekty byla modelová rovnice statisticky neprůkazná.

Tabulka 22: Hodnocení modelové rovnice – průměrný T/B do 1. odběru

	Model		T/B průměrný		Pořadí odběru		DIM v den odběru	
	r^2	P	F	P	F	P	F	P
Počet oocytů	0,234	< **0,001**	5,85	**0,003**	10,64	< **0,001**	0,01	0,924
Kvalita oocytů	0,041	0,626	1,45	0,238	0,46	0,761	0,49	0,486
Kvalita COC	0,015	0,964	0,5	0,608	0,2	0,939	0,08	0,778
Expanze COC	0,132	0,061	2,33	0,103	1,46	0,221	2,72	0,102
Míra zrání	0,160	**0,003**	0,68	0,510	4,27	**0,003**	0,21	0,651
Oplození schopné	0,012	0,982	0,12	0,891	0,31	0,872	0,04	0,835

T/B průměrný = průměrný poměr tuku a bílkovin v mléce do 1. odběru; Kvalita oocytů = hodnocena na stupnici 1 - 3 (klasifikace viz Tabulka 9); Kvalita COC = kvalita kumulo-oocytárního komplexu (klasifikace viz Tabulka 8); Expanze COC = expanze kumulo-oocytárního komplexu byla vyhodnocena

jako binární parametr ano = 100/ne = 0; Míra zrání = % dosažení metafáze II; Oplození schopné = pravděpodobnost dosažení metafáze II (%) u alespoň 1 oocytu; DIM v den odběru = dny v laktaci v den odběru; r^2 = koeficient determinace; P = hladina významnosti; F = F rozdělení

Tabulka 23 poskytuje detailní vyhodnocení pro efekt průměrného poměru tuku a bílkovin do 1. odběru. Mezi počtem oocytů získaných od první skupiny (< 1,06) a třetí skupiny (> 1,20) byl zjištěn statisticky průkazný rozdíl (P < 0,05), rovněž byl zjištěn statisticky průkazný rozdíl (P < 0,01), v počtu oocytů mezi druhou skupinou (1,06-1,20) a třetí skupinou (> 1,20). Tendenci k lepším parametrům kvality oocytů, kvality a expanze COC měly dojnice ve třetí skupině (> 1,20).

Tabulka 23: Hodnocení vlivu průměrného T/B do 1. odběru na parametry kvality oocytu

Efekt	Skupina	Počet oocytů	Kvalita oocytů	Kvalita COC	Expanze COC	Míra zrání	Oplození schopné
		LSM ± SELSM	LSM ± SELSM	LSM ± SELSM	LSM ± SELSM	LSM ± SELSM	LSM ± SELSM
Průměrný T/B do 1. odběru	< 1,06	4,60 ± 0,332^{C}	1,84 ± 0,109	2,51 ± 0,152	22,08 ± 7,491	59,22 ± 3,936	92,85 ± 3,849
	1,06-1,20	5,06 ± 0,383^{B}	1,71 ± 0,171	2,39 ± 0,238	21,56 ± 11,092	66,84 ± 6,077	92,85 ± 5,942
	> 1,20	3,46 ± 0,377^{C,B}	1,55 ± 0,149	2,28 ± 0,208	45,44 ± 9,654	59,41 ± 5,282	95,59 ± 5,164

T/B = poměr tuku a bílkovin v mléce; Kvalita oocytů = hodnocena na stupnici 1 - 3 (klasifikace viz Tabulka 9); Kvalita COC = kvalita kumulo-oocytární komplexu (klasifikace viz Tabulka 8); Expanze COC = expanze kumulo-oocytární komplexu byla vyhodnocena jako binární parametr ano = 100/ne = 0; Míra zrání = % dosažení metafáze II; Oplození schopné = pravděpodobnost dosažení metafáze II (%) u alespoň 1 oocytu; LSM = průměry nejmenších čtverců; SELSM = standardní chyba průměrů nejmenších čtverců; různá písmena ve sloupcích značí statistickou průkaznost (A = P < 0,001; B = < 0,01; C = P < 0,05)

5.4.6 Poměr tuku a bílkovin v den aspirace

Tabulka 24 shrnuje vyhodnocení modelové rovnice ve které byl metabolický stav reprezentován poměrem tuku a bílkovin v mléce v den odběru. Posuzován byl vliv poměru tuku a bílkovin v mléce v den odběru, pořadí odběrového období a dnů v mléce (DIM) při aspiraci oocytů na kvalitu oocytů, kvalitu kumulo-oocytárního komplexu, expanzi kumulo-oocytárního komplexu, míru zrání a schopnost oplození. Modelová rovnice byla statisticky průkazná pro počet získaných oocytů (r^2 = 0,206; P < 0,001) a v rámci modelové rovnice byl k počtu oocytů průkazný efekt pořadí odběru (P < 0,001). Modelová rovnice byla statisticky průkazná pro míru zrání (r^2 = 0,175; P = 0,001) a v rámci modelové rovnice byl k míře zrání průkazný efekt pořadí odběru (P < 0,01). Pro další hodnocené proměnné a efekty byla modelová rovnice statisticky neprůkazná.

Tabulka 24: Hodnocení modelové rovnice – poměr T/B v den odběru

	Model		T/B v den odběru		Pořadí odběru		DIM v den odběru	
	r^2	P	F	P	F	P	F	P
Počet oocytů	0,206	< **0,001**	1,28	0,28	9,54	< **0,001**	0,30	0,582
Kvalita oocytů	0,025	0,865	0,42	0,656	0,56	0,691	0,19	0,662
Kvalita COC	0,009	0,993	0,08	0,920	0,23	0,923	0,14	0,706
Expanze COC	0,124	0,081	1,9	0,156	0,83	0,510	2,06	0,155
Míra zrání	0,175	**0,001**	1,78	0,174	5,34	**0,001**	0,28	0,600
Oplození schopné	0,022	0,908	0,72	0,491	0,24	0,913	0,09	0,762

T/B v den odběru = průměrný poměr tuku a bílkovin v mléce v den odběru; Kvalita oocytů = hodnocena na stupnici 1 - 3 (klasifikace viz Tabulka 9); Kvalita COC = kvalita kumulo-oocytárního komplexu (klasifikace viz Tabulka 8); Expanze COC = expanze kumulo-oocytárního komplexu byla vyhodnocena jako binární parametr ano = 100/ne = 0; Míra zrání = % dosažení metafáze II; Oplození schopné = pravděpodobnost dosažení metafáze II (%) u alespoň 1 oocytu; DIM v den odběru = dny v laktaci v den odběru; r^2 = koeficient determinace; P = hladina významnosti; F = F rozdělení

Tabulka 25 poskytuje detailní vyhodnocení pro efekt poměru tuku a bílkovin v den odběru oocytů. Pro tento efekt byla tendence k poměrně vyrovnaným výsledkům mezi jednotlivými skupinami ve vztahu k počtu získaných oocytů, jejich kvality a kvality COC. U expanze COC byl zaznamenán jistý trend, kdy nejlepších hodnot dosahovala třetí skupina (> 1,22) a nejhorší první skupina (< 1,04). U první skupiny byly ale zjištěny tendence k nejlepší míře zrání a schopnosti oplození.

Tabulka 25: Hodnocení vlivu poměru T/B v den odběru na parametry kvality oocytu

Efekt	Skupina	Počet oocytů	Kvalita oocytů	Kvalita COC	Expanze COC	Míra zrání	Oplození schopné
		LSM ± SELSM	LSM ± SELSM	LSM ± SELSM	LSM ± SELSM	LSM ± SELSM	LSM ± SELSM
T/B v den odběru	< 1,04	4,68 ± 0,364	1,78 ± 0,142	2,46 ± 0,196	18,16 ± 9,293	66,84 ± 5,005	98,01 ± 4,913
	1,04-1,22	4,02 ± 0,336	1,76 ± 0,131	2,37 ± 0,182	29,43 ± 8,483	59,26 ± 4,640	91,48 ± 4,555
	> 1,22	4,59 ± 0,411	1,61 ± 0,161	2,46 ± 0,224	46,09 ± 11,115	52,73 ± 5,609	89,52 ± 5,506

T/B = poměr tuku a bílkovin v mléce; Kvalita oocytů = hodnocena na stupnici 1 - 3 (klasifikace viz Tabulka 9); Kvalita COC = kvalita kumulo-oocytární komplexu (klasifikace viz Tabulka 8); Expanze COC = expanze kumulo-oocytární komplexu byla vyhodnocena jako binární parametr ano = 100/ne = 0; Míra zrání = % dosažení metafáze II; Oplození schopné = pravděpodobnost dosažení metafáze II (%) u alespoň 1 oocytu; LSM = průměry nejmenších čtverců; SELSM = standardní chyba průměrů nejmenších čtverců

6 Diskuze

V této diplomové práci byl zkoumán efekt stresu, který byl reprezentován konkrétně metabolickým stresem, na počet a kvalitu oocytů získaných metodou ovum pick-up u prvotelek na počátku laktace. Metabolický stres je spojován s peripartálním období a stavem negativní energetické bilance (NEB) (Cincović et al. 2018) a má na organismus endokrinní a metabolické důsledky (Leroy et al. 2008). Metabolický stav byl v této práci sledován na základě hodnot cholesterolu, triacylglycerolu, betahydroxybutyrátu a neesterifikovaných mastných kyselin dostupných z výsledků biochemického vyšetření krve a na základě poměru tuku a bílkovin v mléce před aspirací oocytů a v den aspirace. Změny v koncentracích metabolitů v séru se následně mohou projevit i ve změně složení folikulární tekutiny a tím ovlivnit vývoj oocytů (Leroy et al. 2004).

Výsledky výzkumu neprokázaly negativní vztah mezi zvýšenou hladinou cholesterolu v krvi a počtem získaných oocytů a jejich kvalitou. Naopak byla zjištěna slabá pozitivní korelace mezi hladinou cholesterolu a počtem získaných oocytů. Tento vztah byl následně prokázán i v detailním vyhodnocením efektu cholesterolu, kde bylo u dojnic s hladinou cholesterolu vyšší než 5,14 odebráno nejvíce oocytů (5,30 ± 0,411) s prokazatelným rozdílem mezi touto a první skupinou s hladinou cholesterolu nižší než 4,07. U triacylglycerolu byla prokázána slabá pozitivní korelace mezi jeho hladinou a počtem získaných oocytů, ale zároveň byly prokázány slabé negativní korelace mezi některými parametry kvality, konkrétně kvalitou kumulo-oocytárního komplexu a mírou zrání, což značí že při zvýšené hladině triacylglycerolu dosahují oocyty nižší kvality se sníženým procentem dosažení MII fáze. Detailní vyhodnocení pro efekt triacylglycerolu ovšem ukázalo tendence k poměrně vyrovnaným výsledkům mezi jednotlivými skupinami dojnic. Závěry studie Rodriguez et al. (2014) zjistily, že u krav plemene Carora v poporodním období zřejmě existuje pozitivní vztah mezi hodnotou plazmatického cholesterolu, jaterního triacylglycerolu a kvalitou oocytů. Kurykin et al. (2011) zjistil trend, že vyšší hladinu cholesterolu mají krávy na dalších laktacích oproti prvotelkám a dojnice na dalších laktacích měly také tendenci k nižšímu počtu odebraných oocytů spolu s nižší kvalitou. Studie Aardema et al. (2013), která použila lačnící jalovice jako model zvířat s vysokým obsahem volných mastných kyselin v krvi ukázala, že při vysokých hladinách volných mastných kyselin v krvi se zvýšily hladiny těchto kyselin i ve folikulární tekutině a došlo i ke zvýšenému obsahu triacylglycerolů v kumulárních buňkách, ale obsah triacylglycerolů v oocytech se nezvýšil. Tato zjištění naznačují, že účinky zvýšené hladiny volných mastných kyselin v krvi byly tlumeny v kumulárních buňkách, a proto byly oocyty chráněny před účinky vysoké hladiny volných mastných kyselin (Aardema et al. 2013). S těmito výsledky se neshodují závěry studie Furukawa et al. (2021), které ukázaly pozitivní korelaci mezi hladinou volných mastných kyselin a hodnot triacylglycerolu v oocytech. Hromadění triacylglycerolu v oocytech v poporodním období může mít dle této studie nepříznivé lipotoxické účinky na kvalitu oocytů a tyto negativní účinky mohou převážit nad příznivými účinky zvýšeného ukládání energie v oocytech (Furukawa et al. 2021).

U metabolitu betahydroxybutyrátu byla prokázána slabá negativní korelace mezi jeho hladinou a počtem odebraných oocytů, což značí, že při vyšší hladině betahydroxybutyrátu je počet získaných oocytů nižší. U skupiny s hladinou betahydroxybutyrátu < 0,23 byla zjištěna

tendence k nejvyššímu počtu získaných oocytů (5,46 ± 0,382) s prokazatelným rozdílem mezi touto a druhou skupinou (0,23-0,34). U třetí skupiny (> 0,34) byl pozorován trend zhoršené expanze kumulo-oocytárního komplexu a nižší schopnosti oplození u oocytů. Studie Serbetci et al. (2024) porovnávala počet získaných oocytů metodou OPU a jejich kvalitu mezi skupinami dojnic v různém zdravotním a metabolickém stavu. Skupina dojnic pod vlivem metabolického stresu byla charakterizována hladinou betahydroxybutyrátu 1,2 až 2,9 mmoL/L pátý a osmý týden po otelení. Metabolický stav dárkyně neměl vliv na počet odebraných oocytů během OPU ani na míru výtěžnosti. Také nebyla negativně ovlivněna kvalita oocytů, kdy téměř 40 % odebraných oocytů bylo v nejlepší třídě s celkově srovnatelnými výsledky se skupinou zdravých dojnic (Serbetci et al. 2024). Při in vitro maturaci se zvýšenou koncentrací betahydroxybutyrátu v médiu neovlivnil rychlost zrání oocytů, ale způsobil snížení frekvence oplodněných oocytů, které se vyvinuly do stadia blastocysty, v závislosti na koncentraci (Sarentonglaga et al. 2013). Leroy et al. (2006) také uvádí, že vysoké koncentrace betahydroxybutyrátu a nižší koncentrace glukózy v maturačním médiu zhoršují kompetenci vývoje oocytů po dozrání.

Mezi hladinou neesterifikovaných mastných kyselin a počtem získaných oocytů a jejich kvality nebyly zjištěny žádné statisticky průkazné korelace ani rozdíly. Ve vyhodnocení efektu neesterifikovaných mastných kyselin byl u třetí skupiny dojnic (< 0,76) zjištěn jistý trend, kdy oocyty od těchto dojnic vykazovaly větší schopnost expanze kumulo-oocytárního komplexu oproti ostatním skupinám. Z hlediska míry zrání byla zjištěná tendence k vyššímu procentu dosažení MII fáze u první skupiny (< 0,41) vůči ostatním skupinám. Studie Matoba et al. (2012) zkoumala vztah mezi metabolickými parametry (hladina neesterifikovaných mastných kyselin, betahydroxybutyrátu, inzulínu, růstového faktoru podobnému inzulinu 1 a glukózy) a kvalitou oocytů získaných metodou OPU. Hlavním zjištěním této studie je, že navzdory nárůstu neesterifikovaných mastných kyselin, betahydroxybutyrátu a dalším metabolickým změnám, ke kterým dochází v souvislosti s otelením a na vrcholu laktace v týdnech po porodu, nebyla kvalita oocytů, která byla hodnocena morfologicky, z hlediska schopnosti oplodnění a vývoje do stadia blastocysty, ovlivněna (Matoba et al. 2012). Modely zrání in vitro ale odhalily, že negativní energetická bilance spojená se zvýšenou koncentrací neesterifikovaných mastných kyselin a sníženou koncentrací glukózy jsou toxické pro oocyt, což vede ke sníženému zrání oocytu i ke snížené vývojové kompetenci embrya (Leroy et al. 2008). Aardema et al. (2013) ale uvádí, že zvýšené koncentrace volných mastných kyselin ve folikulární tekutině vedly k masivnímu zvýšení hladiny neutrálních lipidů v kumulárních buňkách, zatímco hladina lipidů v oocytech nebyla téměř ovlivněna. Tato akumulace lipidů v kumulárních buňkách může chránit oocyt před lipotoxickými účinky vyvolanými zvýšenou hladinou mastných kyselin v podmínkách in vivo (Aardema et al. 2013).

U poměru tuku a bílkovin v mléce nebyla kromě slabé pozitivní korelace mezi poměrem T/B v den aspirace a expanzí kumulo-oocytárního komplexu zjištěna žádná prokazatelná korelace. U detailního vyhodnocení tohoto efektu byly ovšem zjištěny prokazatelné rozdíly mezi jednotlivými skupinami. U průměrného poměru T/B do první aspirace oocytů byl zjištěn prokazatelný rozdíl mezi počtem oocytů od první skupiny (< 1,06), od které bylo získáno 4,60 ± 0,332 oocytů a třetí skupiny (> 1,20) se ziskem 3,46 ± 0,377 oocytů. Rovněž byl zjištěn prokazatelný rozdíl mezi ziskem oocytů od druhé skupiny (1,06-1,20) se ziskem 5,06 ± 0,383 oocytů a mezi počtem získaných oocytů od třetí skupiny. Tyto výsledky značí, že při vyšším

poměru tuku a bílkovin v mléce pod vlivem metabolického stresu může být od dojnic odebráno nižší množství oocytů. U parametrů kvality byla tendence k poměrně vyrovnaným výsledkům mezi skupinami, ale u expanze kumulo-oocytárního komplexu jsme mohly pozorovat trend k lepším výsledkům u dojnic s vyšším poměrem T/B ve třetí skupině. Přestože poměr tuku a bílkovin v mléce byl již prokázán jako ukazatel metabolického stavu krav, kdy u dojnic s poměrem tuku a bílkovinám vyšším než 1,5 bylo navíc zjištěno vyšší riziko ketózy, mastitid, dalších onemocnění a také vykazovaly špatnou reprodukční výkonnost (Heuer et al. 1999), tak nebyla dohledána studie, která tento poměr porovnává s počtem odebraných oocytů či jejich kvalitou.

Výsledky některých studií in vitro, které zkoumaly efekt různých hladin metabolitů při in vitro maturaci oocytů na jejich kvalitu, došly k závěrům, že změny ve hladinách metabolitů mají na další vývoj oocytů negativní efekt. To se ovšem neshoduje s výsledky některých studií in vivo, kde byly oocyty získány metodou ovum pick-up od dárkyň a následně byla porovnávána jejich kvalita či vývojová kompetence s hladinou metabolitů. Tyto studie došly k závěru, že oocyty nebyly negativně ovlivněny. Výsledky této diplomové práce neprokázaly u většiny hodnocených metabolitů negativní vztah mezi jejich zvýšenou hladinou a počtem získaných oocytů a jejich kvalitou. Negativní korelace byly zjištěny u hladiny triacylglycerolu, kde byly prokázány slabé negativní korelace mezi některými parametry kvality, a také u hladiny betahydroxybutyrátu na počet odebraných oocytů. Výsledky detailního vyhodnocení vlivu poměru tuku a bílkovin v mléce značí, že při vyšším poměru tuku a bílkovin v mléce pod vlivem metabolického stresu může být od dojnic odebráno nižší množství oocytů. Výsledky celkově mohou naznačovat, že v modelu in vivo mohly být kumulární buňky účinnou obranou proti změněným hodnotám metabolitů v krvi dojnic, a to i přes to, že studie prokázaly, že pod vlivem těchto změn docházelo k ovlivnění složení folikulární tekutiny. Na základě různých výsledků pro jednotlivé indikátory stresu nelze celkově hypotézu diplomové práce potvrdit.

7 Závěr

Cílem této diplomové práce bylo detekovat vztah mezi vybranými indikátory stresu a množstvím a kvalitou oocytů získaných metodou ovum pick-up u dojnic. Hypotézou práce byl předpoklad, že vyšší hladiny indikátorů stresu v krvi, respektive v mléce dojnic působí negativně na výtěžnost a kvalitu jejich aspirovaných oocytů. Konkrétně byl efekt stresu ve výzkumné části reprezentován metabolickým stresem. Efekty jednotlivých indikátorů stresu byly hodnoceny jednotlivě ke vztahu k počtu oocytů získaných metodou ovum pick-up a k parametrům hodnotícím jejich kvalitu.

Negativní vztah mezi počtem získaných oocytů byl prokázán korelační analýzou u metabolitu betahydroxybutyrátu ($r = -0,15$; $P < 0,05$) a detailní vyhodnocení u efektu průměrného poměru tuku a bílkovin do první aspirace oocytů značí, že při vyšším poměru tuku a bílkovin v mléce pod vlivem metabolického stresu může být od dojnic odebráno nižší množství oocytů, kdy byl zjištěn prokazatelný rozdíl mezi počtem oocytů od první skupiny (< 1,06) od které bylo získáno 4,60 ± 0,332 oocytů a třetí skupiny (> 1,20) se ziskem 3,46 ± 0,377 oocytů. Rovněž byl zjištěn prokazatelný rozdíl mezi ziskem oocytů od druhé skupiny (1,06-1,20) se ziskem 5,06 ± 0,383 oocytů a mezi počtem získaných oocytů od třetí skupiny. U parametrů kvality byl negativní vztah prokázán korelační analýzou u hladiny triacylglycerolu a kvalitou kumulo-oocytárního komplexu ($r = -0,19$; $P < 0,05$) a mírou zrání ($r = -0,25$; $P < 0,01$), což značí že při zvýšené hladině triacylglycerolu dosahují oocyty nižší kvality se sníženým procentem dosažení MII fáze. U některých metabolitů stresu byly ale zjištěny i pozitivní vztahy mezi jejich hladinou a počtem získaných oocytů. Korelační analýzou byl tento vztah prokázán u cholesterolu ($r = 0,17$; $P < 0,01$) a triacylglycerolu ($r = 0,15$; $P < 0,05$). Detailním vyhodnocením efektu cholesterolu bylo zjištěno, že u třetí skupiny dojnic (> 5,14) bylo odebráno nejvíce oocytů (5,30 ± 0,411) s prokazatelným rozdílem mezi touto a první skupinou (< 4,07).

Na základě různých výsledků pro jednotlivé indikátory stresu nelze celkově hypotézu diplomové práce potvrdit. Pro celkové posouzení vlivu stresu na výtěžnost a kvalitu oocytů by bylo nutné vyhodnotit vliv různých typů stresorů. Pro komplexní posouzení vlivu metabolického stresu by bylo vhodné využít širší spektrum zvířat v různém pořadí a fázi laktace.

8 Literatura

Aardema H, Lolicato F, van de Lest CHA, Brouwers JF, Vaandrager AB, van Tol HTA, Roelen BAJ, Vos PLAM, Helms JB, Gadella BM. 2013. Bovine Cumulus Cells Protect Maturing Oocytes from Increased Fatty Acid Levels by Massive Intracellular Lipid Storage. Biology of Reproduction **88**:164-164.

Ahmed JA, Nashiruddullah N, Dutta D, Biswas RK, Borah P. 2017. Cumulus cell expansion and ultrastructural changes in *in vitro* matured bovine oocytes under heat stress. Iranian Journal of Veterinary Research **18**:203-207.

Andrlíková M, Čierniková Z, Kos V, Lopatářová M, Marková B, Stařecká V, Vránová L, Čech S. 2018. Praktický manuál in vitro produkce embryí u skotu. Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Brno.

Belhadj Slimen I, Najar T, Ghram A, Dabbebi H, Ben Mrad M, Abdrabbah M. 2014. Reactive oxygen species, heat stress and oxidative-induced mitochondrial damage. A review. International Journal of Hyperthermia **30**:513-523.

Berry DP, Wall E, Pryce JE. 2014. Genetics and genomics of reproductive performance in dairy and beef cattle. Animal **8**:105-121

Bie JD, Marei, WF, Desmet KL, Andries S, Sturmey RG, Bols PE, Leroy JL. 2015. The effects of hypo- and hyperglycemia during lipolysis-like conditions on bovine oocyte maturation, subsequent embryo developmental and glucose metabolism. Animal reproduction **12:**791-791.

Bols PEJ, Stout TAE. 2018. Transvaginal Ultrasound-Guided Oocyte Retrieval (OPU: Ovum Pick-Up) in Cows and Mares. Pages 209-267 in Niemann H, Wrenzycki CH, editors. Animal biotechnology 1. Springer, Německo

Boni R. 2012. Ovum pick-up in cattle: a 25 year retrospective analysis. Animal Reproduction **9**:362-369.

Bourguet C, Deiss V, Boissy A, Andanson S, Terlouw EMC. 2011. Effects of feed deprivation on behavioral reactivity and physiological status in Holstein cattle1. Journal of Animal Science **89**:3272-3285.

Bouška J, et al. 2006. Chov dojeného skotu. Profi Press, Praha

Britt JH. 2008. Oocyte development in cattle: physiological and genetic aspects. Revista Brasileira de Zootecnia **37**:110-115.

Brouček J. 2013. Ochrana hospodářských zvířat (skot, koně a prasata). Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, České Budějovice.

Burdych V, V., Všetečka, J., Divoký, L., Brychta, J., Stejskalová, E., Kvapilík, J. 2004. Reprodukce ve stádech skotu. Chovservis, Hradec Králové.

Burdych V, V., Všetečka, J., Divoký, L., Brychta, J., Stejskalová, E., Kvapilík, J. 2004. Reprodukce ve stádech skotu. Chovservis, Hradec Králové.

Burych V, Kocmánek J. 2021. Reprodukce skotu. Družstvo pro kontrolu užitkovosti v ČR, Hradištko.

Campen KA, Abbott CR, Rispoli LA, Payton RR, Saxton AM, Edwards JL. 2018. Heat stress impairs gap junction communication and cumulus function of bovine oocytes. Journal of Reproduction and Development **64**:385-392.

Cavalieri FLB, Morotti F, Seneda MM, Colombo AHB, Andreazzi MA, Emanuelli IP, Rigolon LP. 2018. Improvement of bovine in vitro embryo production by ovarian follicular wave synchronization prior to ovum pick-up. Theriogenology **117**:57-60.

Cincović M, Hristovska T, Belić B. 2018. Niacin, Metabolic Stress and Insulin Resistance in Dairy Cows. B Group Vitamins - Current Uses and Perspectives.DOI: 10.5772/intechopen.77268.

Çizmeci SÜ, Dinç DA, Yesilkaya OF, Çiftçi MF, Takcı A, Bucak MN. 2022. Effects of Heat-Stress on Oocyte Number and Quality and In Vitro Embryo Production in Holstein Heifers. Acta Scientiae Veterinariae **50**:1870.

Dobson H, Esslemont RJ. 2002. Stress and Its Effects on Fertility of the Dairy Cow. Advances in Dairy Technology **14**: 193

Doležal O, Bílek M, Dolejš J. 2004. Zásady welfare a nové standardy EU v chovu skotu. Výzkumný ústav živočišné výroby, v.v.i, Praha Uhříněves.

Doležal O, Staněk S. 2015. Chov dojeného skotu - technologie, technika, management. Profi Press s.r.o., Praha.

Doležal O. 2010. Metody eliminace tepelného stresu – významná chovatelská rezerva. Praha.

Donnay I, DeRoover R, Van Langendonckt A, Auquier P, Bombaerts P, Kinnar, T, Schuurbiers N, Dive M, Massip A, Dessy F. 1996. In vitro production of bovine embryos from oocytes collected by ultrasound-guided recovery in live cows: preliminary results. Annales de Médecine Vétérinaire **140**:283–291.

Elshahawy II, Abdullaziz IA. 2017. Hemato-Biochemical Profiling in Relation to Metabolic Disorders in Transition Dairy Cows. Alexandria Journal of Veterinary Sciences **55**:25-33.

Esposito G, Irons PC, Webb EC, Chapwanya A. 2014. Interactions between negative energy balance, metabolic diseases, uterine health and immune response in transition dairy cows. Animal Reproduction Science **144**:60-71.

Eyestone WH, Leibfried-Rutledge L, Northey DL, Gillman BG, First NL. 1987. Culture of bovine one and two-cel1 bovine embryos to the blastocyst stage in the ovine oviduct. Theriogenology **28**:1-7.

Farooq U, Samad HA, Shehzad F, Qayyum A. 2010. Physiological responses of cattle to heat stress. World Applied Sciences Journal **8**:38-43.

Ferreira RM, Chiaratti MR, Macabelli CH, Rodrigues CA, Ferraz ML, Watanabe YF, Smith LC, Meirelles FV, Baruselli PS. 2016. The Infertility of Repeat-Breeder Cows During Summer Is Associated with Decreased Mitochondrial DNA and Increased Expression of Mitochondrial and Apoptotic Genes in Oocytes. Biology of Reproduction **94**:1-7

Figueiredo CC, Bisinotto DZ, Brandão GVR, Umaña Sedó S, Bisinotto RS. 2020. Impact of assisted reproduction techniques on subsequent reproductive performance of dairy heifers and lactating cows. Theriogenology **158**:97-104.

Fink G. 2009. Stress: Definition and History. Pages 549-555 in Encyclopedia of Neuroscience. Elsevier.

Fisher AD, Crowe MA, Prendiville DJ, Enright WJ. 1997. Indoor space allowance: effects on growth, behaviour, adrenal and immune responses of finishing beef heifers. Animal Science **64**:53-62.

Fry RC, Simpson TL, Squires TJ. 1998. Ultrasonically guided transvaginal oocyte recovery from calves treated with or without GnRH. Theriogenology **49**:1077–1082.

Furukawa E, Chen Z, Ueshiba H, Wu Y, Chiba H, Yanagawa Y, Katagiri S, Nagano M, Hui S-P. 2021. Postpartum cows showed high oocyte triacylglycerols concurrently with high plasma free fatty acids. Theriogenology **176**:174-182.

Galli C, Crotti G, Notari C, Turini P, Duchi R, Lazzari G. 2001. Embryo production by ovum pick up from live donors. Theriogenology **55**:1341-1357.

Galli C, Duchi R, Colleoni S, Lagutina I, Lazzari G. 2014. Ovum pick up, intracytoplasmic sperm injection and somatic cell nuclear transfer in cattle, buffalo and horses: from the research laboratory to clinical practice. Theriogenology **81**:138– 151.

Galli C, Duchi R, Crotti G, Turini P, Ponderato N, Colleoni S, Lagutina I, Lazzari G. 2003. Bovine embryo technologies. Theriogenology **59**:599-616

Gardner DK, Lane M, Spitzer A, Batt PA. 1994. Enhanced rates of cleavage and development for sheep zygotes cultured to the blastocyst stage in vitro in the absente of serum and somatic cells-amino acids, vitamins, and cuhuring embryos in groups stimulate development. Biology of Reproduction **50**:390-400.

Gonzalez J, Rangel-Santos R, Rodríguez De Lara R, Ramirez G. 2019. Situations Leading to Oxidative Stress in Dairy Cattle. Iranian Journal of Applied Animal Science **9**:189-195

Goodhand KL, Watt RG, Staines ME, Hutchinson JSM, Broadbent PJ. 1999. Theriogenology **51**:951–961.

Gordon I. 2003. Laboratory Production of Cattle Embryos, 2nd edition. CABI Publishing, Wallingford.

Grelet C, et al. 2022. Identification of chronic stress biomarkers in dairy cows. Animal **16**:10-17

Gross J, van Dorland HA, Bruckmaier RM, Schwarz FJ. 2011. Performance and metabolic profile of dairy cows during a lactational and deliberately induced negative energy balance with subsequent realimentation. Journal of Dairy Science **94**:1820-1830.

Herbut P, Angrecka S, Godyń D, Hoffmann G. 2019. The Physiological and Productivity Effects of Heat Stress in Cattle – A Review. Annals of Animal Science **19**:579-593.

Heuer C, Schukken YH, Dobbelaar P. 1999. Postpartum Body Condition Score and Results from the First Test Day Milk as Predictors of Disease, Fertility, Yield, and Culling in Commercial Dairy Herds. Journal of Dairy Science **82**:295-304.

Hofírek B, et al. 2009. Nemoci skotu. Česká buiatrická společnost, Brno.

Chen Y, Arsenault R, Napper S, Griebel P. 2015. Models and Methods to Investigate Acute Stress Responses in Cattle. Animals **5**:1268-1295.

Chmelíková E, Kheilová K, Hackerová L, Havlíková T. 2023. Účinek tepelného stresu na reprodukci a produkci mléka skotu. Náš chov **8**:18-21.

Chrousos GP. 2009. Stress and disorders of the stress system. Nature Reviews Endocrinology **5**:374-381.

IETS – international embryo technology society. 2015. 2014 statistics of embryo collection and transfer in domestic farm animals. Available from https://www.iets.org/Portals/0/Documents/Public/Committees/DRC/December2015.pd f (accessed April 2022)

IETS – international embryo technology society. 2020. 2020 statistics of embryo collection and transfer in domestic farm animals. Available from https://www.iets.org/Portals/0/Documents/Public/Committees/DRC/IETS_Data_Retri eval_Report_2020.pdf (accessed April 2022)

Illek J, Kudrna V. 2014. Poruchy metabolismu dojnic ve vztahu k výživě. Krmivářství **6**:13-17

Islam MZ, Khandakar MMH, Rashid MH-ur, Siddiki MSR. 2020. Stress Response Pathways in Dairy Cattle: A Brief Review. International Science Review **1**:49-53.

Jelínek P, Koudela K. 2003. Fyziologie hospodářských zvířat. Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, V Brně.

Keyserlingk MAG, Olenick D, Weary DM. 2008. Acute Behavioral Effects of Regrouping Dairy Cows. Journal of Dairy Science **91**:1011-1016.

Knížková I, Kunc P. 2010. Využití technologie evaporačního ochlazování s řídicími jednotkami k eliminaci tepelného stresu u skotu. Výzkumný ústav živočišné výroby, v.v.i, Praha Uhříněves.

Krishnan G, Bagath M, Pragna P, Vidya MK, Aleena J, Archana PR, Sejian V, Bhatta R. 2017. Mitigation of the Heat Stress Impact in Livestock Reproduction. TheriogenologyDOI: 10.5772/intechopen.69091.

Kruip AM, Boni R, Wurth YA, Roelofsen MWM, Pieterse MC. 1994. Potential use of ovum pick-up for embryo production and breeding in cattle. Theriogenology **42:**675- 684.

Kurykin J, Waldmann A, Tiirats T, Kaart T, Jaakma Ü. 2011. Morphological Quality of Oocytes and Blood Plasma Metabolites in Repeat Breeding and Early Lactation Dairy Cows. Reproduction in Domestic Animals **46**:253-260.

Kvapilík J, Bucek P, Kučera J. 2019. Ročenka 2018 chov skotu v České republice. Českomoravská společnost chovatelů, a.s., Praha.

Lazzari G, Galli C.1993. Salvage of valuable germplasm of sterile cattle by in vitro technologies. Réunion Association Europeenne de Transfert Embryonnaite, Lyon.

Leroy JLMR, Bie J, Jordaens L, Desmet K, Smits A, Marei WFA, Bols PEJ, Hoeck VV. 2017. Negative energy balance and metabolic stress in relation to oocyte and embryo quality: an update on possible pathways reducing fertility in dairy cows. Animal Reproduction **14**:497-506.

Leroy JLMR, Sturmey RG, Van Hoeck V, De Bie J, McKeegan PJ, Bols PEJ. 2013. Dietary lipid supplementation on cow reproductive performance and oocyte and embryo viability: a real benefit?. Animal Reproduction **10**:258-267

Leroy JLMR, Van Soom A, Opsomer G, Goovaerts IGF, Bols PEJ. 2008. Reduced Fertility in High-yielding Dairy Cows: Are the Oocyte and Embryo in Danger? Part II, Mechanisms Linking Nutrition and Reduced Oocyte and Embryo Quality in High-yielding Dairy Cows. Reproduction in Domestic Animals **43**:623-632.

Leroy JLMR, Vanholder T, Delanghe JR, Opsomer G, Van Soom A, Bols PEJ, Dewulf J, de Kruif A. 2004. Metabolic changes in follicular fluid of the dominant follicle in high-yielding dairy cows early post partum. Theriogenology **62**:1131-1143.

Leroy JLMR, Vanholder T, Opsomer G, Van Soom A, de Kruif A. 2006. The In Vitro Development of Bovine Oocytes after Maturation in Glucose and β -Hydroxybutyrate Concentrations Associated with Negative Energy Balance in Dairy Cows. Reproduction in Domestic Animals **41**:119-123.

Lonergan P, Fair T. 2016. Maturation of oocytes in vitro. Annual Review of Animal Biosciences **4**:255–268.

Lopes FF, Lima RS, Risolia PH, Ispada J, Assumpção ME, Visintin JA. 2012. Heat stress induced alteration in bovine oocytes: functional and cellular aspects. Animal reproduction ***9*:**395-403.

Louda F, Bjelka M, Ježková A, Pozdíšek J, Stádník L, Bezdíček L. 2017. Zásady využívání plemenných býků v podmínkách přirozené plemenitby. Výzkumný ústav pro chov skotu, s.r.o, Rapotín.

Louda F, Vaněk D, Ježková A, Stádník L, Bjelka M, Bezdíček J, Pozdíšek J. 2008. Uplatnění biologických zásad při řízení reprodukce plemenic. Výzkumný ústav pro chov skotu s.r.o., Rapotín

Lucy MC. 2019. Stress, strain, and pregnancy outcome in postpartum cows. Animal Reproduction **16**:455-464.

Machatková M, Hulínská P, Hanzalová K, Kubíčková S, Trávníčková I. 2019. Kryokonzervace embryí skotu definovaného pohlaví produkovaných in vitro pro embryotransfer. Veterinářství 69:872-875.

Machatková M, Hulínská P, Hanzalová K. 2016. Současné možnosti využití reprodukčních biotechnologiích v chovech skotu. Veterinářství **66**:526-529

Machatková M, Hulínská P, Hanzalová K. 2018. Příprava bovinních embryí definovaného pohlaví v systému in vitro. Státní veterinární správa, Praha.

Machatková M, Ješeta M. 2009. Faktory ovlivňující efektivnost produkce embryí skotu in vitro. Náš chov **11**:24-26.

Machatková M, Trávníčková I, Hulínská P, Hanzalová K. 2021. Inovace metod produkce embryí skotu požadovaného genomu. Ústřední veterinární správa Státní veterinární správy, Praha.

Machatková M. 2006. Vývojové trendy v produkci geneticky cenných embryí skotu superovulací a metodou in vitro. Veterinářství **56**:299-301.

Marvan F, Hampl A, Hložánková E, Kresan J, Massanyi L, Vernerová E. 1992. Morfologie hospodářských zvířat. Česká zemědělská univerzita, Praha.

Matoba S, O'Hara L, Carter F, Kelly AK, Fair T, Rizos D, Lonergan P. 2012. The association between metabolic parameters and oocyte quality early and late postpartum in Holstein dairy cows. Journal of Dairy Science **95**:1257-1266.

Meiyu Q, et al. 2013. Transvaginal Ultrasound-guided Ovum Pick-up (OPU) in Cattle. Journal of Biomimetics, Biomaterials and Biomedical Engineering **18**:1-3.

Merton JS, Roos APW, Mullaart E, Ruigh L, Kaal L, Vos PLAM, Dieleman SJ. 2003. Factors affecting oocyte quality and quality in commercial application of embryo technologies in cattle breeding industry. Theriogenology **59:**651-674

Miętkiewska K, Kordowitzki P, Pareek CS. 2022. Effects of Heat Stress on Bovine Oocytes and Early Embryonic Development—An Update. Cells **11**:4073

Moberg GP. 2000. Biological response to stress: implications for animal welfare. Pages 1-21 in The biology of animal stress: basic principles and implications for animal welfare. CABI Publishing, UK.

Morgan KN, Tromborg CT. 2007. Sources of stress in captivity. Applied Animal Behaviour Science **102**:262-302.

Mormède P, et al. 2007. Exploration of the hypothalamic–pituitary–adrenal function as a tool to evaluate animal welfare. Physiology & Behavior **92**:317-339.

Naqvi SMK, Kumar D, Paul RK, Sejian V. 2012. Environmental Stresses and Livestock Reproduction. Pages 97-128 in Environmental Stress and Amelioration in Livestock Production. Springer, Berlin.

Nigussie T. 2018. A Review on the Role of Energy Balance on Reproduction of Dairy Cow. Journal of Dairy Research and Technology **1**:1-9.

Paes VM et al. 2016. Effect of heat stress on the survival and development of in vitro cultured bovine preantral follicles and on in vitro maturation of cumulus–oocyte complex. Theriogenology **86**:994-1003.

Palma GA, Brem G. 1995. Effect of growth factors IGFI, TGF-alpha, EGF and PDGF on development of in vitro produced bovine blastocysts. Theriogenology **43**:291.

Payton RR, Rispoli LA, Saxton, AM, Edwards, JL. 2011. Impact of Heat Stress Exposure during Meiotic Maturation on Oocyte, Surrounding Cumulus Cell, and Embryo RNA Populations. J. Reprod. Dev. **57**: 481–491.

Pryce JE, Løvendahl P. 1999. Options to reduce vulnerability to metabolic stress by genetic selection. BSAP Occasional Publication **24**:119-127.

Rakha SI, Elmetwally MA, El-Sheikh Ali H, Balboula A, Mahmoud AM, Zaabel SM. 2022. Importance of Antioxidant Supplementation during In Vitro Maturation of Mammalian Oocytes. Veterinary Sciences **9**:439.

Rodriguez L, Rosendo O, Parraga C, Oropeza A. 2014. Correlations among oocyte quality, hepatic triacylglycerols, and some blood metabolites in Carora breed cows during early postpartum. TURKISH JOURNAL OF VETERINARY AND ANIMAL SCIENCES **38**:425-432.

Rokyta R, et al. 2015. Fyziologie a patologická fyziologie pro klinickou praxi. Grada Publishing, Praha.

Rosenkrans CF, First NL. 1994. Effect of free amino acids and vitamins on cleavage and developmental rate of bovine zygotes in vitro. Journal of Animal Science **72:** 434- 437

Roth Z. 2008. Heat Stress, the Follicle, and Its Enclosed Oocyte: Mechanisms and Potential Strategies to Improve Fertility in Dairy Cows. Reproduction in Domestic Animals **43**:238-244.

Roth Z. 2018. Symposium review: Reduction in oocyte developmental competence by stress is associated with alterations in mitochondrial function. Journal of Dairy Science **101**:3642-3654.

Roth Z. 2021. Heat stress reduces maturation and developmental capacity in bovine oocytes. Reproduction, Fertility and Development **33**:66-75.

Rushen J, Boissy A, Terlouw EM, de Passillé AM. 1999. Opioid peptides and behavioral and physiological responses of dairy cows to social isolation in unfamiliar surroundings. Journal of Animal Science **77**: 2918-24.

Rushen J. 2017. Housing and the welfare of dairy cattle. Achieving sustainable production of milk Volume **3**:53-80.

Říha J, Machatková M, Petelíková J, Jakubec V, Pytloun J, Šereda L, Pavlok A. 1999. Biotechnologie v chovu a šlechtění hospodářských zvířat. Výzkumný ústav pro chov skotu s.r.o., Rapotín.

Sammad A, Khan MZ, Abbas Z, Hu L, Ullah Q, Wang Y, Zhu H, Wang Y. 2022. Major Nutritional Metabolic Alterations Influencing the Reproductive System of Postpartum Dairy Cows. Metabolites **12**:1-8

Sanbuissho A, Threlfall WR. 1989. The effects of estrous cow serum on the in vitro maturation and fertilization of the bovine follicular oocyte. Theriogenology **31**:693- 699

Sarentoglaga B, Ogata K, Taguchi Y, Kato Y, Nagao Y. 2013. The Developmental Potential of Oocytes is Impaired in Cattle with Liver Abnormalities. Journal of Reproduction and Development **59**:168-173.

Serbetci I, González-Grajales LA, Herrera C, Ibanescu I, Tekin M, Melean M, Magata F, Malama E, Bollwein H, Scarlet D. 2024. Impact of negative energy balance and postpartum diseases during the transition period on oocyte quality and embryonic development in dairy cows. Frontiers in Veterinary Science **10**:1328700

Skládanka J, et al. 2014. Chov strakatého skotu. Mendelova univerzita v Brně, Brno.

Song Y, Wang Z, Zhao C, Bai Y, Xia C, Xu C. 2021. Effect of negative energy balance on plasma metabolites, minerals, hormones, cytokines and ovarian follicular growth rate in Holstein dairy cows. Journal of Veterinary Research **65**:361-368.

Squires EJ. 2003. Applied animal endocrinology. CABI Publishing, Cambridge.

Stubbings RB, Walton JS. 1995. Effect of ultrasonically-guided follicle aspiration on estrous cycle and follicular dynamics in Holstein cows. Theriogenology **43**:705-12.

Stupka R, et al. 2013. Chov zvířat. Powerprint, Praha.

Šárová R, Valníčková B, Moravcsíková Á, Staněk S, Bartošová J. 2020. Základy etologie dojeného skotu pro chovatele. Výzkumný ústav živočišné výroby, v.v.i., Praha Uhříněves.

Takahashi T, Mori A, Oda H, Murayama I, Kouno M, Sako T. 2021. Comparison of cholesterol levels among lipoprotein fractions separated by anion-exchange high-performance liquid chromatography in periparturient Holstein–Friesian dairy cows. Journal of Veterinary Medical Science **83**:260-266.

Talebi A, von Keyserlingk MAG, Telezhenko E, Weary DM. 2014. Reduced stocking density mitigates the negative effects of regrouping in dairy cattle. Journal of Dairy Science **97**:1358-1363.

Tomenendalova J, Klímová Z, Kašpar A, Klema T. 2018. Vybrané kapitoly obecné fyziologie a patofyziologie v obrázcích a schématech. Veterinární a farmaceutická univerzita. Brno.

Trojan S. 2003. Lékařská fyziologie. Grada Publishing a.s.

Tucker CB, Jensen MB, de Passillé AM, Hänninen L, Rushen J. 2021. Invited review: Lying time and the welfare of dairy cows. Journal of Dairy Science **104**:20-46.

Urban F, et al. 1997. Chov dojeného skotu. Apros, Praha.

Van Hoeck V, Bols PEJ, Binelli M, Leroy JLMR. 2014. Reduced oocyte and embryo quality in response to elevated non-esterified fatty acid concentrations: A possible pathway to subfertility? Animal Reproduction Science **149**:19-29.

Vieira L, Rodrigues C, Netto AC, Guerreiro B, Silveira C, Moreira R, Filho M, Bo G, Mapletoft R, Baruselli P. 2014. Superstimulation prior to the ovum pick-up to improve in vitro embryo production in lactating and non-lactating Holstein cows. Theriogenology **82:**318–324

Wagtendonk-de Leeuw AM. 2006. Ovum Pick Up and In Vitro Production in the bovine after use in several generations: A 2005 status. Theriogenology **65**:914-925.

Wolfenson D, Lew BJ, Thatcher WW, Graber Y, Meidan R. 1997. Seasonal and acute heat stress effects on steroid production by dominant follicles in cows. Animal Reproduction Science **47**:9-19.

Wolfenson D, Roth Z. 2019. Impact of heat stress on cow reproduction and fertility. Animal Frontiers **9**:32-38.

Wrenzycki CH. 2018. In Vitro Production of (Farm) Animal Embryos. Pages 269-304 in Niemann H, Wrenzycki CH, editors. Animal biotechnology 1. Springer, Německo

Zhai Q-Y, Wang J-J, Tian Y, Liu X, Song Z. 2020. Review of psychological stress on oocyte and early embryonic development in female mice. Reproductive Biology and Endocrinology **18**:101