

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE

FAKULTA AGROBIOLOGIE, POTRAVINOVÝCH A PŘÍRODNÍCH ZDROJŮ

Metodika pro optimalizaci výtěžnosti oocytů u dojnic s jejich následným *in vitro* oplozením

(typ výsledků „Nmet“ – Metodika)

Ing. Veronika Kinterová, Ph.D.

Ing. Jaromír Ducháček, Ph.D.

Mgr. Tereza Toralová, Ph.D.

Ing. Matúš Gašparík, Ph.D.

Ing. Nikola Marešová

Ing. Radim Cobl, Ph.D.

doc. Ing. Jiří Bezdíček, Ph.D.

Mgr. Jana Sekaninová, Ph.D.

Mgr. Martina Janků, Ph.D.

prof. Ing. Luděk Stádník, Ph.D.

prof. Mgr. Marek Petřivalský, Dr.



Fakulta agrobiologie,
potravinových a přírodních zdrojů



Univerzita Palackého
v Olomouci



MINISTERSTVO ZEMĚDĚLSTVÍ

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE

Metodika pro optimalizaci výtěžnosti oocytů u dojnic s jejich následným *in vitro* oplozením

UPLATNĚNÁ CERTIFIKOVANÁ METODIKA

Ing. Veronika Kinterová, Ph.D.

Ing. Jaromír Ducháček, Ph.D.

Mgr. Tereza Toralová, Ph.D.

Ing. Matuš Gašparík, Ph.D.

Ing. Nikola Marešová

Ing. Radim Cobl, Ph.D.

doc. Ing. Jiří Bezdíček, Ph.D.

Mgr. Jana Sekaninová, Ph.D.

Mgr. Martina Janků, Ph.D.

prof. Ing. Luděk Stádník, Ph.D.

prof. Mgr. Marek Petřivalský, Dr.



Fakulta agrobiologie,
potravinových a přírodních zdrojů



Univerzita Palackého
v Olomouci



MINISTERSTVO ZEMĚDĚLSTVÍ

Dedikace:

Uplatněná certifikovaná metodika byla zpracována v rámci řešení grantového úkolu
MZe NAZV QK22010270 (Optimalizace řízení individuální reprodukční výkonnosti
dojeného skotu)

2025

CERTIFIKOVANÁ METODIKA

Předkládaná metodika je doporučením chovatelům dojeného skotu pro optimalizaci výtěžnosti oocytů a jejich následné *in vitro* oplození.

Dedikace: Ke zpracování certifikované metodiky bylo použito výsledků výzkumných aktivit realizovaných v rámci řešení projektu **NAZV QK22010270 (*Optimalizace řízení individuální reprodukční výkonnosti dojeného skotu*)**

Kolektiv autorů:

Ing. Veronika Kinterová, Ph.D.¹

Ing. Jaromír Ducháček, Ph.D.²

Mgr. Tereza Toralová, Ph.D.¹

Ing. Matúš Gašparík, Ph.D.²

Ing. Nikola Marešová²

Ing. Radim Cobl, Ph.D.²

doc. Ing. Jiří Bezdíček, Ph.D.³

Mgr. Jana Sekaninová, Ph.D.⁴

Mgr. Martina Janků, Ph.D.⁴

prof. Ing. Luděk Stádník, Ph.D.²

prof. Mgr. Marek Petřivalský, Dr.⁴

¹⁾ Ústav živočišné fyziologie a genetiky AV ČR, v.v.i.

²⁾ Česká zemědělská univerzita v Praze; FAPPZ; Katedra chovu hospodářských zvířat

³⁾ Univerzita Palackého v Olomouci; Přírodovědecká fakulta; Katedra zoologie

⁴⁾ Univerzita Palackého v Olomouci; Přírodovědecká fakulta; Katedra biochemie

Jména oponentů a organizace pro vydání osvědčení:

1) **Odborník z daného oboru:** doc. Ing. Jiří Šichtař, Ph.D., EmbryoLab s.r.o.

2) **Pracovník státní správy:** Ing. Jan Vodička, Ph.D., Mze, Odbor živočišných komodit a ochrany zvířat, Oddělení hospodářských zvířat

Certifikováno Ministerstvem zemědělství ČR, 29.12.2025.

Číslo osvědčení: MZE-89498/2025-13141.

ISBN 978-80-213-3516-5

Abstrakt

Cílem moderních biotechnologických metod v reprodukci skotu je dosáhnout lepšího zabřezávání a získat co nejvíce geneticky kvalitních potomků. Jednou z metod, která napomáhá dosahování vyššího genetického pokroku je aspirace oocytů následovaná *in vitro* oplozením. Metoda je však realizovatelná pouze při získání kvalitních oocytů od plemení skotu. Tato metodika je určena pro biotechnologické společnosti, které aspirace oocytů, resp. jejich *in vitro* oplození realizují. Metodika je zaměřená na aspekty, které mohou z pohledu energetické bilance, tedy metabolického a oxidačního stresu ovlivňovat kvalitu získaných oocytů a jejich následné *in vitro* oplození. Spojuje tak výsledky ultrazvukem řízené aspirace oocytů, hodnocení úrovně metabolismu a oxidačního, resp. antioxidačního statusu s pokročilými metodami hodnocení kvality oocytů.

Z výsledků vyplývá, že úroveň energetické bilance měřená prostřednictvím obsahu cholesterolu a dalších látek z krve, resp. oxidační stav hodnocený i pomocí aktivity různých specifických enzymů, ovlivňuje úroveň zrání oocytů, kvalitu jejich kumulárních buněk, i schopnost dosáhnout žádaného vývojového stádia pro úspěšné *in vitro* oplození. Zjištění z této metodiky by měla napomoci k optimalizaci načasování aspirací oocytů s ohledem na aktuální stav krav. To umožňuje přesnější plánování aspirací a zefektivnění produkce kvalitních embryí. Metodika by tak měla napomoci k rozvoji této biotechnologické metody v ČR a jejímu vyššímu využití pro dosahování adekvátního genetického pokroku v populaci zejména dojeného skotu.

Klíčová slova: aspirace oocytů, reprodukce, obsah metabolitů v krvi, oxidační status, zrání oocytů, kvalita oocytů

Abstract

Modern biotechnological approaches in cattle reproduction aim to increase conception rates and maximize the production of genetically superior offspring. Among the most effective techniques contributing to accelerated genetic progress is oocyte aspiration followed by in vitro fertilization. The success of this approach, however, depends on obtaining oocytes of sufficient quality from donor cows. This methodology is designed for biotechnology companies performing oocyte aspiration and in vitro fertilization. It addresses key factors associated with the animal's energy balance—particularly metabolic and oxidative stress—that influence both the quality of retrieved oocytes and their subsequent in vitro development. The protocol combines ultrasound-guided oocyte aspiration with assessment of metabolic indicators and oxidative/antioxidative status, alongside advanced methods of oocyte quality evaluation.

The findings demonstrate that energy balance, reflected in blood cholesterol and other metabolites, as well as oxidative status, measured through the activity of specific enzymes, significantly affects oocyte maturation, cumulus cell quality, and the capacity to reach the developmental stage required for successful in vitro fertilization. By integrating these parameters, the methodology provides guidance for optimizing the timing of oocyte aspiration in relation to the physiological status of cows. This enables more precise planning, improves the efficiency of high-quality embryo production, and supports broader application of this biotechnological approach in the Czech Republic. Its adoption is expected to enhance genetic progress, particularly within dairy cattle populations.

Keywords: oocyte aspiration, reproduction, blood metabolite content, oxidative status, oocyte maturation, oocyte quality

Obsah

1. Cíl metodiky	6
2. Metody odběrů oocytů	7
Odběr <i>in vivo</i> – metoda ovum pick-up.....	7
Dárkyně oocytů.....	8
Výhody a rizika aspirací oocytů.....	9
Faktory ovlivňující úspěšnost aspirace oocytů	10
Metodika odběru oocytů	10
Příprava dárkyně před aspirací.....	11
Aspirace oocytů	11
Laboratorní hodnocení oocytů	12
Faktory ovlivňující výtěžnost a kvalitu oocytů	13
Tepelný stres a jeho vliv na výtěžnost a kvalitu oocytů	14
Metabolický stres a jeho vliv na výtěžnost a kvalitu oocytů.....	15
Oxidační stres a jeho vliv na výtěžnost a kvalitu oocytů	17
Maturace oocytů (IVM)	17
Fertilizace oocytů (IVF)	18
Kultivace embryí (IVC)	19
Výsledky produkce embryí <i>in vitro</i> (IVP)	20
3. Popis metodiky pokusu	21
Zvířata v hodnocení a jejich podmínky chovu	21
Aspirace oocytů – Ovum pick Up	21
Odběr vzorků krve pro stanovení metabolitů	22
Odběr vzorků krve pro následné biochemické analýzy	23
<i>In vitro</i> zrání a hodnocení kvality oocytů a COC	24
Imunofluorescenční barvení a barvení lipidů.....	26
Statistické vyhodnocení získaných údajů.....	29
4. Výsledky	30
5. Srovnání „novosti postupů“	44
6. Popis uplatnění metodiky	44
7. Ekonomické aspekty	45
8. Seznam použité související literatury	46
9. Seznam publikací, které předcházely metodice.....	52
10. Seznam zkratk	53

1. Cíl metodiky

Reprodukce je klíčová vlastnost jak pro chov skotu, kde hraje významnou roli pro produkci, tak v jeho šlechtění. Skutečnost, že skot je uniparní zvíře a má dlouhý generační interval (Stupka et al. 2013) je limitujícím faktorem pro rozsáhlé šíření geneticky cenných jedinců. Aplikace biotechnologií v oblasti reprodukce hospodářských zvířat přináší nové možnosti, jak zintenzivnit selekční tlak (Machatková et al. 2021), zefektivnit využití pohlavních buněk geneticky cenných jedinců a urychlit genetický zisk (Machatková et al. 2016). Do popředí šlechtitelské praxe se v zahraničí dostává odběr oocytů od živých dárkyň pomocí transvaginální aspirace neboli ovum pick-up (OPU) metody společně s produkcí embryí *in vitro* (IVP) (Viana 2022).

Tato metoda umožňuje opakovaný odběr oocytů od širokého spektra dárkyň (Galli et al. 2001), a to i bez hormonální stimulace. Jedná se o nejpružnější a nejopakovatelnější techniku produkce embryí od živých dárkyň (Galli et al. 2003). Cílem této metodiky je představit možnosti hodnocení kvality oocytů v laboratorních podmínkách. Dílčím cílem je analýza faktorů metabolického a oxidačního stresu ovlivňující zrání oocytů a jejich následnou použitelnost. Optimalizací faktorů totiž může dojít ke zvýšení počtu a zlepšení kvality aspirovaných oocytů. Tím bude dán předpoklad pro zvýšený zájem o tuto biotechnologickou metodu, která také zlepší genetický pokrok zejména v populaci dojeného skotu.

2. Metody odběrů oocytů

Oocyty lze získat jak za podmínek *in vitro*, tak za podmínek *in vivo*. 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, nebo se oocyty získávají také z jatečných vaječníků, které vyžadují maturaci *in vitro*. 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 dárkyň (Andrlíková et al. 2018).

Odběr oocytů *in vivo*, tedy od živých zvířat, je výhodný díky možnosti opakovaného odběru, případně dalšího využití dárců v reprodukci. Dříve používané chirurgické metody byly nahrazeny zejména metodami punkce folikulů pomocí laparoskopie nebo ultrazvuku (Hofírek et al. 2009). 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 četnost jejího provádění a může vést ke vzniku jizev a srůstů. Ultrazvukem naváděný odběr oocytů je méně invazivní, snižuje stres zvířete a je snadněji přizpůsobitelný pro použití na farmě než jiné metody (Gordon 2003).

Odběr *in vivo* – metoda ovum pick-up

Metoda OPU byla původně vyvinuta pro použití v lidské asistované reprodukci a léčbě neplodnosti (Qi et al. 2013). Možnost punkce a odběru nezralých vajíček z vaječníků živých dárkyň otevřela nové perspektivy v programech reprodukční biotechnologie. Samičí gamety mohou být totiž pro IVP během delšího odebírány opakovaně, což je v případě získávání oocytů *post mortem* nemožné (Bols & Stout 2018).

OPU je nepříliš invazivní a reprodukovatelná technika (Říha et al. 1999; Machatková et al. 2016; Bols & Stout 2018), kterou lze použít k odběru oocytů dárkyň s i bez hormonální stimulaci (Bols & Stout 2018). Odběr se rutinně provádí dvakrát týdně (Qi 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 (Qi et al. 2013). Goodhand et al. (1999) zjistili, že aspirace dvakrát týdně oproti aspiraci jednou týdně zdvojnásobila počet přenositelných embryí vyprodukovaných za týden. Nejlepších výsledků je dosaženo, pokud je mezi jednotlivými aspiracemi dodržen interval 3 a 4 dny nebo 2 a 5 dnů (Merton et al. 2003).

Oocyty lze od požadovaných dárkyň 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 3 až 6 měsíců.

Některá schémata aspirace zahrnují i hormonální stimulaci dárkyň (Hofírek et al. 2009). Podle Mertona et al. (2003) použití hormonální pre-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) zjistili, že synchronizací ovariální folikulární vlny u dárkyň se umožnilo aspirovat homogennější folikuly ve vztahu k velikosti a fázi vývoje, což podpořilo získání kompetentnějších oocytů. Synchronizované dárkyně vykazovaly vyšší počet embryí ($5,9 \pm 0,5$ vs. $4,5 \pm 0,4$) a vyšší míru produkce embryí (45,8 % vs. 38,5 %) než nesynchronizované dárkyně (Cavalieri et al. 2018). Také průměrný počet zabřeznutí byl vyšší u příjemkyň, které obdržely embrya ze synchronizované skupiny, ve srovnání s kontrolní skupinou. Nicméně i přes to, že hormonální pre-stimulační schémata mohou vést k vyššímu výtěžku embryí na krávu na 1 odběr OPU, výtěžek embryí na jednotku času na krávu nemusí být vyšší, protože hormonální pre-stimulaci lze provádět pouze 1x týdně (Van Wagtenonk-de Leeuw 2006).

Dárkyně oocytů

Dárkyní může být zvíře prakticky v jakémkoliv fyziologickém stavu a všech věkových kategorií, od dvouměsíčních telat po reprodukčně způsobilé jedince ve vysokém věku. 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 dárkyně je uvedený způsob získávání oocytů vhodný pro cyklující, reprodukčně problémové krávy, které nezabřezávají po inseminaci, neodpovídají na hormonální ošetření nebo neprodukují přenosuschopná embrya. Díky metodě OPU je možná také produkce embryí od neplodných krav nebo dárkyň 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, která maximalizuje genetický zisk a minimalizuje inbreeding (Van Wagtenonk-de Leeuw 2006). Při správné aplikaci metody a opakované aspiraci folikulů dochází k aktivaci folikulárního vývoje, jelikož každá

z provedených aspirací oocytů vyvolává na ováriích přirozené folikulární vlny bez toho, že by negativně ovlivnila další reprodukční schopnost dárkyně (Machatková 2006). OPU může mít také vlastní terapeutický účinek na neplodné dárkyně, zejména ty, které jsou postiženy ovariálními cystami (Galli et al. 2001).

Výhody a rizika aspirací oocytů

Metoda OPU má několik výhod, například je méně traumatizující pro zvířata a méně invazivní než jiné systémy a má vysoký stupeň opakovatelnosti (Bols et al. 1995). Galli et al. (2001) podotýkají, že odběr se provádí s minimálním stresem pro dárkyni. Výhodou metody OPU/IVF je také to, že bez jakékoliv aplikace hormonů dárkyni lze oocyty získat 2x 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).

Existují důkazy, že počet získaných blastocyst po IVM, IVF a 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 způsobena právě ztrátou kumulárních buněk v průběhu aspirace (Palma & Brem 1995).

Řada autorů (Stangl et al. 1999; Petyim et al. 2000; Shalev et al. 2001; Kelada & Ghani 2007; Fouks et al. 2019) upozorňuje, že metoda OPU byla spojena s lézemi reprodukčního traktu, jako jsou ovariální adheze a abscesy u žen, krav a ovcí. Kromě toho byl rozsah ovariálních lézí u krav pozitivně korelován s počtem OPU procedur. Léze spojené s OPU mění nejen morfolologii, 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 (Stubblings & Walton 1995). Potenciál vzniku abscesů na vaječnících může být spojen se zavlečením patogenů během odběru. Ztráty plodnosti pozorované u dárkyň nebyly spojeny se zvýšeným vyřazováním z chovu (Figueiredo et al. 2020).

Faktory ovlivňující úspěšnost aspirace oocytů

Účinnost metody je závislá na individualitě dárkyně, technickém vybavení týmu, použité metodě punkce a aspiračním schématu (Machatková 2006). Počet oocytů odebraných zvířeti během jednoho cyklu OPU závisí na řadě technických a biologických faktorů (Merton et al. 2003). Podle Qi et al. (2013) patří mezi důležité faktory, které ovlivňují úspěšnost OPU a kvalitu oocytů, také praktické zkušenosti, resp. provozní rutina operátora a individuální rozdíly dárkyň jako je věk, reprodukční fáze a individuální reakce. Podle Mertona et al. (2003) by mělo být možné při 2 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 získaných oocytů. Výtěžnost oocytů na odběr se při schématu 2x týdně bez hormonální prestimulace u jednotlivých dárkyň výrazně a opakovaně liší. Pohybuje se od 0 do 26 oocytů na odběr a od v průměru 0,5 do 15 oocytů na krávu, přičemž obvykle 20 % oocytů je nekvalitních (Hasler et al. 1995). Podle Machatkové (2006) lze při transvaginálním odběru oocytů z ovaríí živých dárkyň dosáhnout asi 60 % úspěšnosti. To znamená, že při odběru a odsátí 10-12 folikulů bude aspirováno asi šest až sedm oocytů na 1 dárkyni. Po fertilizaci těchto oocytů je průměrně získáno 1,5 embrya. Galli et al. (2001) zmiňují, že lze na jeden odběr získat v průměru 8 až 10 oocytů s průměrnou produkcí 2 přenositelných embryí. Kruip et al. (1994) získali 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 tato metoda mohla přinést více než 50 embryí.

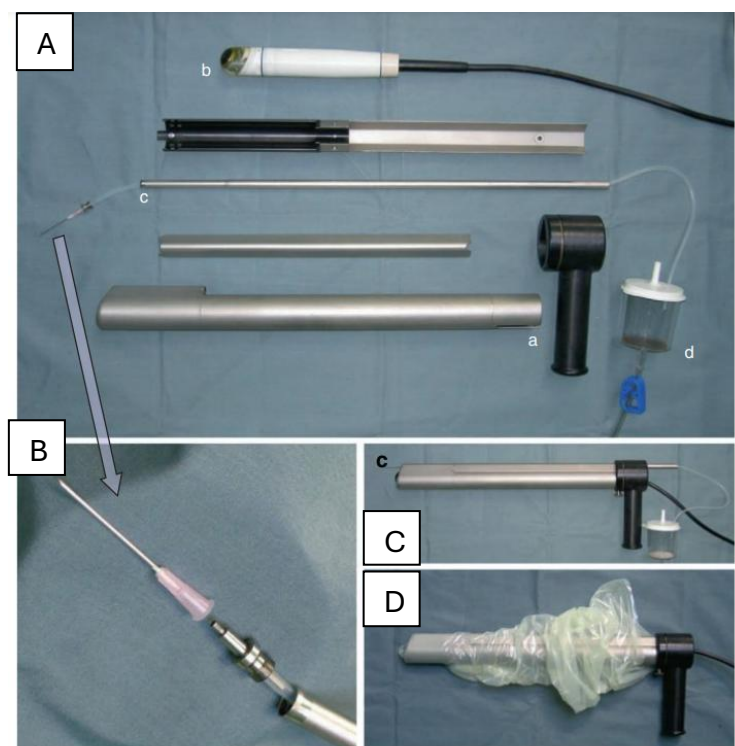
Metodika odběru oocytů

Systém OPU se skládá ze tří hlavních součástí: ultrazvukového skeneru s příslušným snímačem (sondou), aspirační pumpy a systému vedoucí jehly napojené na zkumavku pro odběr oocytů. Snímač a vodič jehly jsou běžně konstruovány jako jedna operační jednotka, aby bylo možné přesně manipulovat s jehlou uvnitř krávy a zároveň přivést snímač do těsného kontaktu s vaječníky. Jehla je spojena s vakuovou pumpou silikonovou nebo teflonovou hadičkou tak, aby byl obsah folikulů aspirován, jakmile je prostřednictvím vakuové pumpy vyvinut aspirační tlak. Folikulární tekutina a oocyty se shromažďují do sběrného zařízení umístěného mezi jehlou a pumpou. Tímto zařízením pro odběr oocytů může být běžný embryofiltr nebo jednoduchá 50 ml zkumavka (Bols & Stout 2018). Zařízení pro odběr je zobrazeno na Obrázku č. 1.

Andrlíková et al. (2018) doporučují před odběrem předem připravit desinfekční přípravek na kůži, lokální anestetikum, injekční jehly (18G) a injekční stříkačky (5 ml, 20 ml), jednorázové rektální rukavice, sonografický gel, buničitou vatou, fyziologický roztok na oplach

a provázek na fixaci oháňky. V pracovním prostoru na příručním vozíku by měla být připravena podtlaková pumpa, temperovací blok se zkumavkami o objemu 50 ml s médiem, sonografický přístroj s nástavcem pro ultrazvukovou sondu a vodič jehly, aspirační jehly a stojan s 50 ml falkony na proplach aspiračního systému.

Obrázek č. 1 Vybavení na aspiraci oocytů (Bols & Stout 2018).



A - zařízení OPU v demontovaném stavu, B - detail punkční jehly připojené k silikonové hadičce, C,D - zařízení smontované a připravené k použití.

Příprava dárkyně před aspirací

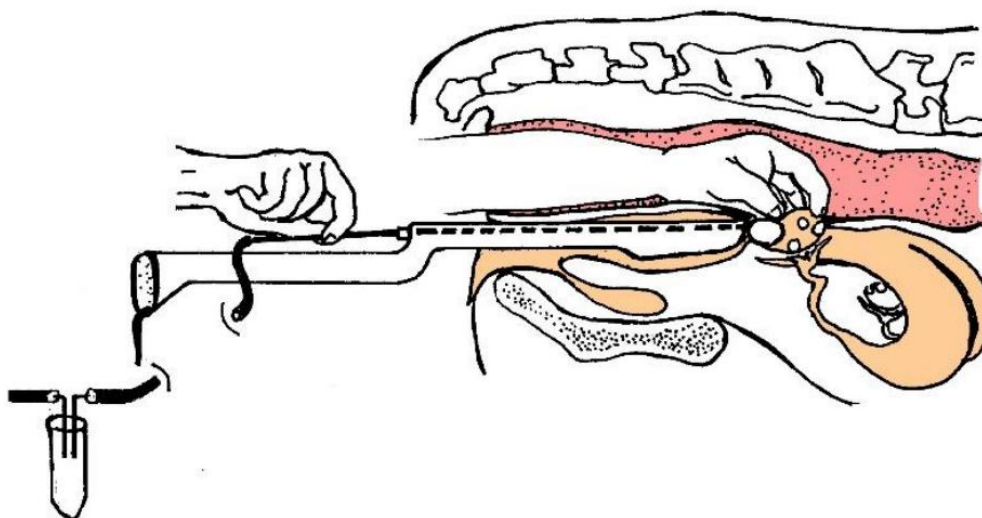
Před odběrem je nutné fixovat dárkyni ve fixačním zařízení (Galli et al. 2003; Andrlíková et al. 2018). Pro lepší provedení techniky a snížení peristaltiky střev a nepohodlí zvířat se aplikuje před odběrem epidurální anestezie (Cavalieri et al. 2018). Následně je nutné odstranit výkaly z konečníku (Cavalieri et al. 2018), ocas vyvázat tenkým provázkem a perineální oblast očistit vodou a desinfikovat (Andrlíková et al. 2018).

Aspirace oocytů

Důležitá je přesná evidence aspirovaných krav. Vyplachuje se do flakonu či odběrné nádoby s malým množstvím vyplachovacího média (Andrlíková et al. 2018). Poté je do

pochvy zaveden nástavec obsahující sondu a vodič jehly. Nástavec je fixován jednou rukou tak, aby ultrazvuková sonda mířila kranio-dorzálně vlevo nebo vpravo od děložního čípku, podle toho, z které strany vaječníků se budou oocyty odebírat. Pomocí druhé ruky *per rectum* technik fixuje vaječník a přitlačuje jej k ultrazvukové sondě (Bols & Stout 2018). Mezi aktivní plochou sondy a vaječníkem je jen poševní stěna a všechny funkční struktury přítomné na vaječníku se zobrazují na obrazovce přístroje. Do vodiče je zasunuta punkční jehla, která se přes stěnu pochvy zavádí do jednotlivých folikulů (Hofírek et al. 2009). Jakmile jehla pronikne do folikulu, aspirační pumpa je aktivována pomocí nožního pedálu, tím je vytvořen podtlak a jeho působením je folikulární tekutina s oocyty shromažďována do flakonu s médiem (Bols & Stout 2018). Během aspirace operátor postupně otáčí vaječníkem a jehlu vpichuje do jednotlivých folikulů (Hofírek et al. 2009) viz Obrázek č. 2. Andrlíková et al. (2018) doporučují aspirovat všechny folikuly větší než 3 mm. Po aspiraci je nutné flakon co nejrychleji doručit k laboratornímu zpracování pro vyhledání a zpracování oocytů (Andrlíková et al. 2018).

Obrázek č. 2 Schématické znázornění odběru oocytů metodou OPU (Andrlíková et. al 2018).



Laboratorní hodnocení oocytů

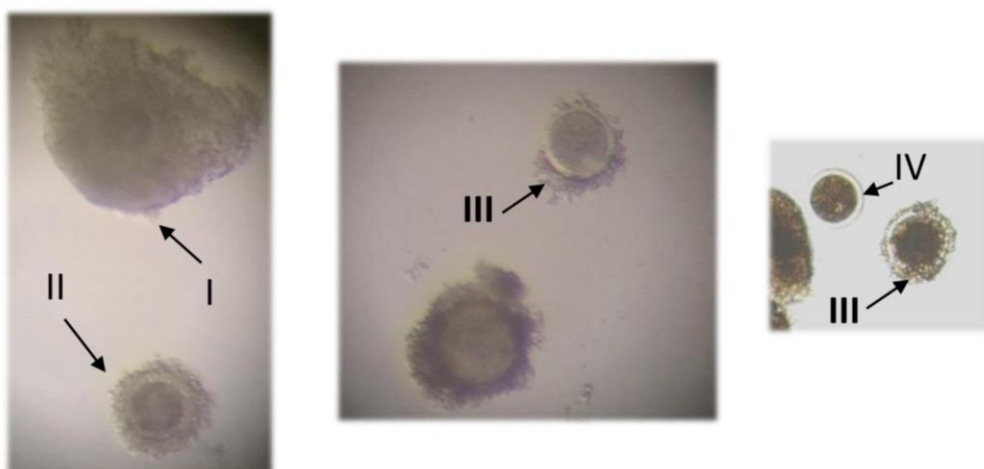
Oocyty se po odběru hodnotí a selektují na základě kumulo-oocytárních komplexů. Buňky kumulu se podílí na zrání oocyty, zajišťují jeho nutriční požadavky a zprostředkovávají i řadu důležitých signálů přicházejících z oocyty (Říha et al. 1999). Pro hodnocení oocytů se používá několik systémů, většina 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 pomocí světelného mikroskopu (Gordon

2003). Pro hodnocení kvality kumulo-oocytárních komplexů se často využívá klasifikace vycházející ze systému podle Leibfrieda & Firsta (1979), která byla dále modifikována a aplikována v různých studiích (např. Andrlíková et al. 2018) viz Tabulka č. 1 a Obrázek č. 3.

Tabulka č. 1 Klasifikace kumulo-oocytárních komplexů (Andrlíková et al. 2018, dle Leibfrieda & Firsta 1979).

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

Obrázek č. 3 Třídy kumulo-oocytárních komplexů (Andrlíková et al. 2018).



Faktory ovlivňující výtěžnost a kvalitu oocytů

Zvířata jsou ovlivňována celou řadou vnitřních a vnějších faktorů, které mohou mít významný dopad na jejich užitkovost a plodnost. Mezi vnější podmínky prostředí, které ovlivňují užitkovost, můžeme zahrnout například klimatické podmínky, roční dobu, výživu, ustájení, ošetřování, sociální hierarchii ve stádě a organizaci chovu (Louda et al. 2007). Pokud je organismus vystaven stresoru, tak centrální nervový systém na něj reaguje fyziologickou a behaviorální odezvou (Squires 2003). Změny v chování mohou zahrnovat například snížený

příjem krmiva nebo kratší dobu odpočinku (Keyserlingk et al. 2008), zatímco fyziologická reakce se projevuje aktivací stresových mechanismů, jako jsou osy sympato-adreno-medulární (SAM) a 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 (Wolfenson & Roth 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).

Tepelný stres a jeho vliv na výtěžnost a kvalitu oocytů

Podle Miętkiewska et al. (2022) je v současné době tepelný stres hlavní hrozbou pro reprodukci skotu a bylo prokázáno, že tepelný stres ovlivňuje přímo kvalitu oocytů. Poškození folikulů a v nich obsažených oocytů se zdá být hlavním faktorem v komplexním mechanismu, kterým tepelný stres narušuje plodnost. Změny vyvolané tepelným stresem se mohou později projevit jako porucha vývoje folikulů a zhoršená schopnost oocytů projít procesem zrání, fertilizací a dále se vyvíjet v embryo. Tepelný stres může přímo ovlivnit oocyt, zprostředkovat negativní účinky prostřednictvím narušeného folikulárního prostředí či zhoršenou funkcí okolních kumulárních buněk oocyty (Roth 2008).

Tepelný stres je spojen se změnami jaderných a cytoplazmatických vlastností oocytů, zahrnujících cytoplazmatické a jaderné orgány. Dochází k poškození cytoskeletu, a tím ke špatnému uspořádání chromozomů. Orgány 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 vykazovaly možnou mitochondriální dysfunkci. Zjištěna byla zvýšená exprese mitochondriálních genů, vyšší náchylnost k apoptóze a snížený obsah mitochondriální DNA (mtDNA), přičemž oocyty odebrané v létě mají 8x méně mtDNA, než oocyty odebrané v zimním období (Ferreira et al. 2016). Ahmed et al. (2017) popisují také zvětšení mitochondrií, narušení ribozomů a zvýšení množství volných ribozomů. Dochází také 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 granulózních buňkách vyšší než podíl nenasyčených mastných kyselin, což znamená snížený oxidační stav a zvýšený stres oocyty (Roth 2008).

Tepelný stres působí také na kumulární buňky. Tepelný stres prostředí (41 °C) během *in vitro* zrání bovinních oocytů vedl k významnému snížení rychlosti zrání a menší expanzi kumulárních buněk ve srovnání s normální teplotou prostředí (38,5 °C). Změny kumulárních buněk 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) dokumentovali, že tepelný stres při zvýšené teplotě prostředí (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 ze 46,4 % poruchám vývoje blastocysty (Miętkiewska et al. 2022). Vystavení oocytů zvýšené teplotě vyvolává také poškození DNA v oocytech. Působení teploty 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 (oocyt v metafázi druhého meiotického dělení) a jsou způsobilé k oplodnění (Roth 2021).

Çizmeci et al. (2022) zkoumali vliv tepelného stresu na počet a kvalitu získaných oocytů metodou OPU. OPU byla prováděna v různých ročních obdobích a byly zaznamenávány teplotní podmínky. Nejvíce oocytů bylo získáno při teplotě vzduchu < 10 °C. Dále bylo zjištěno, že rychlost vývoje blastocyst u oocytů získaných v teplém období (teplota vzduchu > 25 °C) byla nižší než v případě chladnějších období.

Metabolický stres a jeho vliv na výtěžnost a kvalitu oocytů

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 v tomto období také škodlivý dopad na reprodukční činnost dojníc (Van Hoeck et al. 2014; Nigussie 2018).

Některé výzkumy prokázaly, že NEB u metabolicky oslabených dojníc s vysokou užitkovostí ovlivňuje přímo kvalitu oocytů a embryí (Leroy et al. 2017). Metabolické poruchy spojené s 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 plemenice 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).

V krvi skotu lze sledovat celou řadu metabolitů, jako je cholesterol (tChol), triglyceridy (TAG), β -hydroxybutyrát (BHB), neesterifikované mastné kyseliny (NEFA) a další. Tyto metabolity mají vliv na kvalitu oocytů. Například 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). NEB je u krav kromě zvýšené koncentrace NEFA spojená i s hypoglykemií. Oocyty vystavené vysoké hladině NEFA a nízké hladině glukózy měly nižší rychlost rýhování a počet blastocyst byl významně nižší (De 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 BHB, NEFA, inzulinu, růstového faktoru podobného inzulinu 1 a glukózy) a kvalitou odebraných oocytů získaných aspirací. Hlavním zjištěním této studie bylo, že navzdory nárůstu BHB, NEFA a dalším metabolickým změnám, ke kterým dochází v souvislosti s otelením a na vrcholu laktace, nebyla kvalita oocytů, která byla hodnocena morfologicky, z hlediska schopnosti oplodnění a vývoje do stadia blastocysty, ovlivněna. Podle Aardema et al. (2011) mohly být hladiny volných mastných kyselin v krvi tlumeny v kumulárních buňkách, a proto byly oocyty chráněny před účinky vysoké hladiny volných mastných kyselin.

Oxidační stres a jeho vliv na výtěžnost a kvalitu oocytů

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 et al. 2014). Za fyziologických podmínek jsou ROS nezbytné pro maturaci jádra, ale nerovnováha mezi produkcí ROS a antioxidační kapacitou může vést k poškození oocytu (Roth 2018). 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 (González-Maldonado et al. 2019). Konkrétně některé formy ROS mohou difundovat a procházet buněčnými membránami a měnit většinu typů buněčných molekul, jako jsou lipidy, proteiny a nukleové kyseliny, vyvolávat změny v mitochondriích, vyčerpávat adenosintrifosfát (ATP), zvyšovat míru fragmentace DNA v jádře a spouštět apoptózu a nekrózu ve většině granulózních 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. 2020). Roth (2018) 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 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 (Cetica et al. 2001).

Maturace oocytů (IVM)

Nezávisle na tom, z jak velkých folikulů jsou oocyty izolovány, vždy jsou na úrovni jádra i cytoplazmy nezralé, proto musí být kultivovány ve zracím médiu (Machatková et al. 2009). Zrání neboli maturace oocytů je biologický proces, při kterém se primární oocyt v profázi I. meiotického dělení mění na haploidní sekundární oocyt (Hofírek et al. 2009). Při zrání *in vivo*, 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).

Odebrané oocyty jsou přenášeny do promývacího média a odtud do tzv. zracího média (Hofírek et al. 2009). Existuje několik komerčních medií využívaných pro zrání oocytů. Obvykle se jedná o média s pufovanými bikarbonáty obsahující základní fyziologický roztok s přídavkem pyruvátu, laktátu a glukózy. Médium může být 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).

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

Fertilizace oocytů (IVF)

Oplození je složitý proces, jehož výsledkem je spojení spermie a oocyty, což představuje začátek přeměny oocyty v embryo. Úspěšné 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).

Nezbytným předpokladem pro oplození *in vitro* je získání motilních spermií s neporušenou cytoplazmatickou membránou a intaktním akrozomem, které je nutno izolovat z čerstvého nebo zmrazeného 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 plemeničky však poskytují dobrou výtěžnost embryí (Galli & Lazzari 1996). Vzhledem k tomu, že počet oocytů získaných od geneticky cenných dárkyň je limitován, je možné využívat pro *in vitro* IVF sexované inseminační dávky a připravit embrya požadovaného pohlaví. Nicméně dosud provedené studie potvrzují, že sexované inseminační dávky vykazují nižší kvalitu z hlediska koncentrace, motility, funkčního stavu akrozomu a fertilizační schopnosti spermií ve srovnání s dávkami konvenčními (Machatková et al. 2019).

Oocyty jsou po maturaci přeneseny ze zracího média do speciálního oplozovacího média nejméně 30-45 minut před přidáním spermatu. Toto médium obsahuje faktory k podpoře kapacity a motility spermií (Hofírek et al. 2009). Například Gordon (2003) zmiňuje oplozovací média TALP, SOF či Fert-CDM médium. K vyvolání kapacity spermií jsou média používaná k *in vitro* fertilizaci doplňována kofeinem, vápníkovým ionoforem 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 mrazeného spermatu jsou pejety v 39 °C po dobu 10 sekund rozmrazeny a je odebráno 100 µl spermatu, které se v kónických zkumavkách tzv. podvrství pod 1 ml média stimulujícího kapacitační proces (Hofírek et 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 1996). Pomocí obou technik lze získat populaci se 70 až 90 % podílem pohyblivých spermií a s intaktními chromozomy (Machatková et al. 2009).

Po separaci spermií od ředidla a zjištění koncentrace spermatu jsou spermie přidány k oocytům 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 (1996) zmiňuje společnou inkubaci oocytů a spermatu v oplozovacím médiu po dobu 18-24 hodin při teplotě 38,5 °C a atmosféře s 5 % CO₂. Pokud jsou morfologicky kvalitní oocyty oplozeny spermii 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 embryí (IVC)

Po dozrání bovinního oocyty a oplození *in vitro*, je posledním krokem kultivace embrya do stádia blastocysty, kdy může být embryo buď přeneseno do hormonálně synchronizované příjemkyně, nebo kryokonzervováno (Gordon 2003). Kultivace embryí je proces, kdy v umělých podmínkách probíhá raný vývoj zárodku od oplozeného vajíčka – zygoty - až po blastocystu (Hofírek et al. 2009).

Pro růst zygot může být použito několik systémů. Běžně využívané systémy u skotu využívají kultivace v syntetických kultivačních médiích (Machatková et al. 2009). Embrya musí z média získávat všechny živiny, jakmile jsou zásoby z oocyty vyčerpány a také musí být chráněna před možnými toxickými vlivy (Gordon 2003).

Médium představuje definovaný roztok minerálních solí a dalších látek 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. deaktivované 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 produkované (peptidy, růstové faktory apod.) (Hofírek et al. 2009).

V *in vitro* kultivačním systému probíhá produkce blastocyst hlavně 7. den po oplození, (Galli & Lazzari 1996). Podle Machatkové et al. (2021) se embrya vyvíjejí po dobu 7–8 dnů do stádií časně až expandující blastocysty, kdy mohou být použita pro embryotransfer nebo kryokonzervaci.

Výsledky produkce embryí *in vitro* (IVP)

Pokud jde o účinnost IVP, přibližně 80-90 % nezralých bovinních oocytů projde jaderným zráním *in vitro*, přibližně 80 % projde oplozením, 30-40 % se vyvine do stadia blastocysty a přibližně 50 % přenesených embryí se uchytlí a zajistí zabřeznutí a produkci mláďete (Wrenzycki et al. 2007; Galli et al. 2014; Lonergan & Fair 2016). Vývoj IVP embryí po jejich přesunu do příjemkyně je srovnatelný s vývojem po získání embryí *in vivo*. Po přenosu kvalitních embryí lze u příjemkyně dosáhnout 50 % březosti s 10 % embryonální mortalitou (Machatková et al. 2016).

Choulostivým problémem v produkci embryí *in vitro* je výskyt abnormalit u mláďat, mezi které patří vyšší embryonální úmrtnost a přerostlé plody (Thompson et al. 1994; Galli et al. 2003). V komerčních programech, kde jsou používány chemicky definované komorné vyráběná média a podmínky jsou více kontrolované je nicméně více než 95 % březostí normálních a výskyt syndromu velkého plodu je velice nízký (Galli et al. 2003).

3. Popis metodiky pokusu

Zvířata v hodnocení a jejich podmínky chovu

Aspirace oocytů byla provedena v souladu s českou legislativou na ochranu zvířat proti týrání (zákon č. 246/1992 Sb.) a s nařízením 2010/63/EU na ochranu zvířat využívaných pro specifické účely. Získávání oocytů bylo prováděno v podmínkách jedné produkční stáje s holštýnským skotem ve středních Čechách. Do hodnocení bylo zařazeno celkem 188 zvířat, která byla na první laktaci a pravidelně měla říji (potvrzenou výskytem *corpus luteum* na vaječnících). Zvířata byla dojena dvakrát denně v rybinové dojírně o kapacitě 2 × 12 dojících stání. Dojnice byly krmeny směsnou krmnou dávkou (TMR), která složením odpovídala jejich mléčné užitkovosti a fázi mezidobí.

Aspirace oocytů – Ovum pick Up

Krávy byly ošetřeny epidurální anestezií (10 ml (tj. 200 mg prokain hydrochloridu) Procamidol, Wels, Rakousko) a následně byly očištěny rektum a vulva. Vaječníky byly vizualizovány 7 MHz konvexní sondou připojenou k ultrazvukovému skeneru MyLabOne VET (Esaote, Itálie). Jednorázová hypodermická jehla 18 G byla nasazena na zakázkově vyrobený intravaginální nástavec sondy a pomocí vakuové aspirační pumpy byl aplikován tlak -75 mm Hg (zařízení v provozních podmínkách je zobrazené na obrázku č. 4). Oocyty byly odebrány ze všech folikulů >2 mm a <20 mm přítomných na vaječníku. Zkumavka o objemu 50 ml pro odběr oocytů s kumulárním komplexem (COC) byla uchovávána při teplotě 37 °C a naplněna komerčním médiem pro odběr oocytů (OPU, Cornwall, UK). Bezprostředně po každé aspiraci byl obsah 50 ml zkumavky přefiltrován přes embryonální filtr a COC byly vyhledány pod stereomikroskopem. Odebrané oocyty byly k dalšímu hodnocení předány do laboratoře v komerčním uchovávacím a zracím médiu (BO-HEPES-IVM, Cornwall, UK) do 2 hodin po odběru vajíček.

Obrázek č. 4 Vybavení pro aspiraci oocytů (Ducháček 2025).



Odběr vzorků krve pro stanovení metabolitů

Vzorky krve byly odebrány z ocasní žíly za pomoci odběrek krve HEMOS (Vet-Shop, Česká republika) do 4ml zkumavek BD Vacutainer® pro rychlé získání séra (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) v den aspirace oocytů. Po odběru byla krev ponechána koagulovat při pokojové teplotě (přibližně 22 °C) po dobu 24 hodin bez pohybu (Menéndez et al. 2001). Následně bylo sérum přeneseno pomocí Pasteurovy pipety do 1,5 ml mikrozkušavek Eppendorf Safe Lock (Eppendorf, Hamburk, Německo). Vzorky séra byly uchovány při -18 °C až do provedení biochemické analýzy.

Biochemická analýza byla provedena v Laboratoři klinické diagnostiky velkých zvířat Veterinární univerzity Brno, Česká republika, nejdéle do 3 měsíců od odběru vzorků. Sérové vzorky byly analyzovány na koncentraci tChol, TAG, BHB a NEFA pomocí enzymové metody koncového bodu s využitím komerčních diagnostických souprav DiaSys (Diagnostic Systems, Holzheim, Německo) a automatického biochemického analyzátoru Konelab 20XT (Thermo

Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Tato metodika je popsána ve studii Štolcová et al. (2024).

Odběr vzorků krve pro následné biochemické analýzy

Od všech aspirovaných zvířat byla vždy v ranních hodinách den před aspirací odebírána krev za asistence veterinárního lékaře pro stanovení biochemických charakteristik oxidačního stresu. Odběr krve za pomoci standardních odběrek krve HEMOS (Vet-Shop, Česká republika) probíhal vždy u zvířat z ocasní žíly (*vena caudalis mediana*). Krev byla odebírána vždy do dvou zkumavek (1 odběrová zkumavka 9 ml s heparinem (VACUETTE), pro získání krevní plasmy; 1 odběrová zkumavka 8 ml (VACUETTE) s gelem, pro získání krevního séra). Tyto zkumavky byly následně transportovány při teplotě 4 °C do laboratoře Katedry chovu hospodářských zvířat ČZU v Praze.

Zkumavky s heparinem byly do cca 2 hodin po odběru centrifugovány při 2000 ot/min, 4 °C po dobu 15 minut. Po centrifugaci byla odebrána čistá plasma do 10 ml zkumavek, promíchána a alikvotně rozdělena do mikrozkušavek (1,5 ml) cca po 500 µl. Alikvoty plasmy i zbytek po centrifugaci (krevní buňky v odběrové zkumavce) byly následně zamrazeny, při -60 °C do doby převozu na Univerzitu Palackého v Olomouci.

Zkumavky s gelem byly do cca 2 hodin po odběru centrifugovány při 2000 ot/min, 4 °C po dobu 10 minut. Po centrifugaci byla odebrána čistá plasma do 2 ml zkumavek, promíchána a alikvotně rozdělena do mikrozkušavek (1,5 ml) cca po 200 µl. Alikvoty séra i zbytek po centrifugaci (krevní buňky v odběrové zkumavce) byly následně zamrazeny, při -60 °C do doby převozu na Univerzitu Palackého v Olomouci.

V laboratoři katedry biochemie, Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci, byly provedeny analýzy krve na charakteristiky oxidačního stresu. Hematologické analýzy jednotlivých parametrů oxidačního stresu byly stanovovány v séru, v plazmě, i v lyzátech z erytrocytů získaných po odebrání plazmy. Vzorky krve byly alikvotovány do menších objemů. Z jednotlivých alikvotů byly každé analýzy třikrát replikovány a další hodnocení vycházelo z průměru těchto 3 analýz.

Byly stanoveny následující parametry: koncentrace hemoglobinu (mg/ml), aktivity antioxidačních enzymů (superoxiddismutasa (SOD; AU/ml), katalasy (CAT; µkat/ml), glutathionperoxidasy (GPx; nkat/ml), glutathionreduktasy (GR; nkat/ml), dále pak množství Heat Shock Proteinu 70 (HSP70; ng/ml), peroxidace lipidů (koncentrace malondialdehydu, MDA; µmol/l), celkový antioxidační status (TAS; mmol/l) a oxidační status (TOS; µmol/l).

Měření aktivity SOD bylo založeno na schopnosti tohoto enzymu inhibovat autooxidaci pyrogallolu. Jednotka aktivity SOD byla definována jako množství enzymu, které inhibuje reakci autooxidace pyrogallolu o 50 %. CAT katalyzuje rozklad peroxidu vodíku na vodu a kyslík. Její aktivita byla stanovena upravenou spektrofotometrickou metodou podle Gótha (1991). Množství HSP70 bylo stanoveno v séru komerčním kitem založeným na sendvičové ELISA metodě (Bovine HSP70 ELISA Kit (FineTest)). Jako detekční protilátka byla využita protilátka konjugovaná s biotinem. Stanovení aktivity GPx bylo provedeno pomocí upravené spektrofotometrické metody podle Flohého & Günzlera (1984). Aktivita GPx se vztahuje na množství hemoglobinu ve vzorku (nkat/mg Hb) v případě měření v lyzátech erytrocytů, nebo na jednotku objemu (nkat/ml) či množství celkových proteinů (nkat/mg proteinu) v případě stanovení v krevní plazmě nebo séru. Stanovení lipidové peroxidace bylo založeno na reakci MDA s thiobarbiturovou kyselinou (TBA), kterou vzniká červeně zbarvený komplex MDA:TBA v poměru 1:2. Adukty MDA a TBA byly stanoveny spektrofotometricky při vlnových délkách v rozmezí 532–535 nm a kvantifikovány na základě kalibrační křivky 1,1,3,3-tetraethoxypropanu.

TAS (Total Antioxidant Status) byl stanoven pomocí spektrofotometrické metody (Erel, 2004), kdy byla monitorována charakteristická zelená barva kationradikálu ABTS. Metoda stanovení TAS byla kalibrována pomocí standardu troloxu. TOS (Total Oxidant Status) byl stanoven pomocí odlišné metody. Test byl kalibrován peroxidem vodíku a výsledky byly vyjádřeny v mikromolárních ekvivalentech peroxidu vodíku na litr ($\mu\text{mol ekviv. H}_2\text{O}_2/\text{l}$) (Erel, 2005).

***In vitro* zrání a hodnocení kvality oocytů a COC**

In vitro zrání bylo provedeno dle Benesova et al. (2017). Téměř všechny chemikálie byly zakoupeny u firmy Sigma (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) a plastik u firmy Nunclon (Nunc, Roskilde, Dánsko).

Po přivezení do laboratoře byly COC opláchnuty v maturačním médiu Modified Parker obohaceném o 20 mM pyruvát sodný, 50 U/ml penicilinu, 50 $\mu\text{g/ml}$ streptomycinu, 10 % fetální bovinní sérum a umístěny do čtyřjamkových destiček obsahujících toto maturační médium obsahující navíc sérový gonadotropin a choriový gonadotropin (P. G. 600, 15 U/ml; Intervet, Boxmeer, Nizozemsko) bez olejového/parafinového překrytí. Pro hodnocení morfologické kvality byly COC nafoceny pomocí Axiocam 208 colour (Zeiss, Německo). Následně byly COC kultivovány po dobu 24 hodin při 39 °C s 5 % CO_2 . Po uplynutí 24 hodin, které jsou

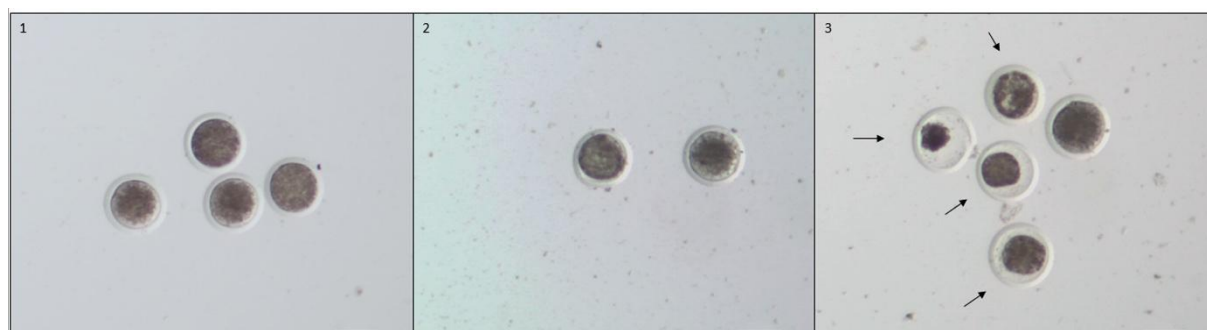
adekvátní dobou pro proběhnutí *in vitro* zrání oocytů skotu, byly COC opět foceny pomocí Axiocam 208 colour pro vyhodnocení expanze kumulárních buněk (CC). Následně byly CC z oocytů odstraněny pomocí krátké inkubace v enzymu hyaluronidasa. Oocyty bez CC byly opět nafoceny pro vyhodnocení jejich kvality a následně fixovány v 4 % paraformaldehydu po dobu 50 min.

Naše hodnocení morfologie oocytů (Tabulka č. 2 a Obrázek č. 5) bylo odvozeno podle již publikovaných studií, kde jsou oocyty rozděleny do kategorií v závislosti na morfologii jejich ooplazmy. Podobné členění můžeme nalézt například v Bilodeau-Goeseels & Panich (2002), kteří stanovili šest kategorií kvality nebo v Nagano et al. (2006), kteří rozdělili oocyty do sedmi skupin, přičemž oocyty s tmavou homogenní ooplazmou vykazovaly nejvyšší úspěšnost maturace. Co se týká množství kumulárních buněk obklopujících oocyt, je prokázáno, že vyšší úspěšnost maturace, oplození a vývoje do stádia blastocysty, vykazují oocyty obklopené vícevrstevným kumulem (Stojkovic et al. 2001). Z toho důvodu jsme hodnotili i přítomnost kumulárních buněk okolo oocytu a dle počtu vrstev CC jsme stanovili několik kvalitativních skupin (Stádník et al. 2024; Toralová et al. 2025; Tabulka č. 3 a Obrázek č. 6).

Tabulka č. 2 Morfologické hodnocení oocytů. Oocyty byly rozděleny do tří kvalitativních tříd v závislosti na jejich morfologii.

Třída	Morfologie
1	Kompaktní, homogenní až mírně granulované
2	Granulované, heterogenní
3	Fragmentované, silně granulované

Obrázek č. 5 Reprezentativní obrázky jednotlivých kvalitativních tříd odpovídající označení a popisu v tabulce č. 2 (Toralová et al. 2025).

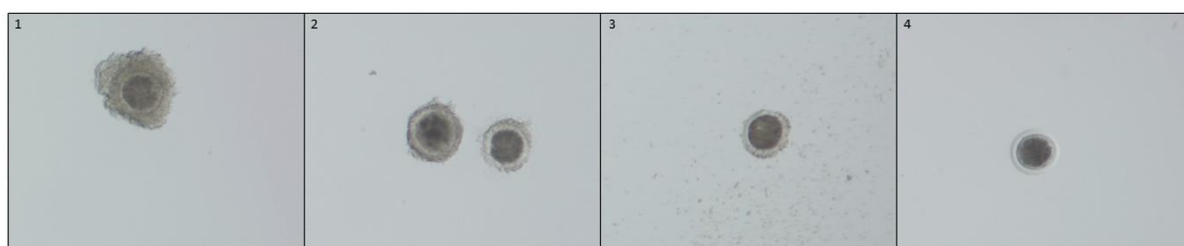


Šipky ukazují na oocyty v kvalitě příslušné kvalitativní třídy. Měřítka odpovídá velikosti 100 µm.

Tabulka č. 3 Morfologické hodnocení COC. Morfologie COC byla hodnocena v závislosti na množství vrstev kumulárních buněk, kdy byly stanoveny čtyři kvalitativní třídy.

Třída	Počet vrstev kumulárních buněk
1	Více než pět vrstev
2	2 – 5 vrstev
3	1 vrstva (také pouze částečně obklopující)
4	Bez kumulárních buněk

Obrázek č. 6 Reprezentativní obrázky COC odpovídající čtyřem kvalitativním třídám uvedeným v tabulce č. 3. (Toralová et al. 2025).



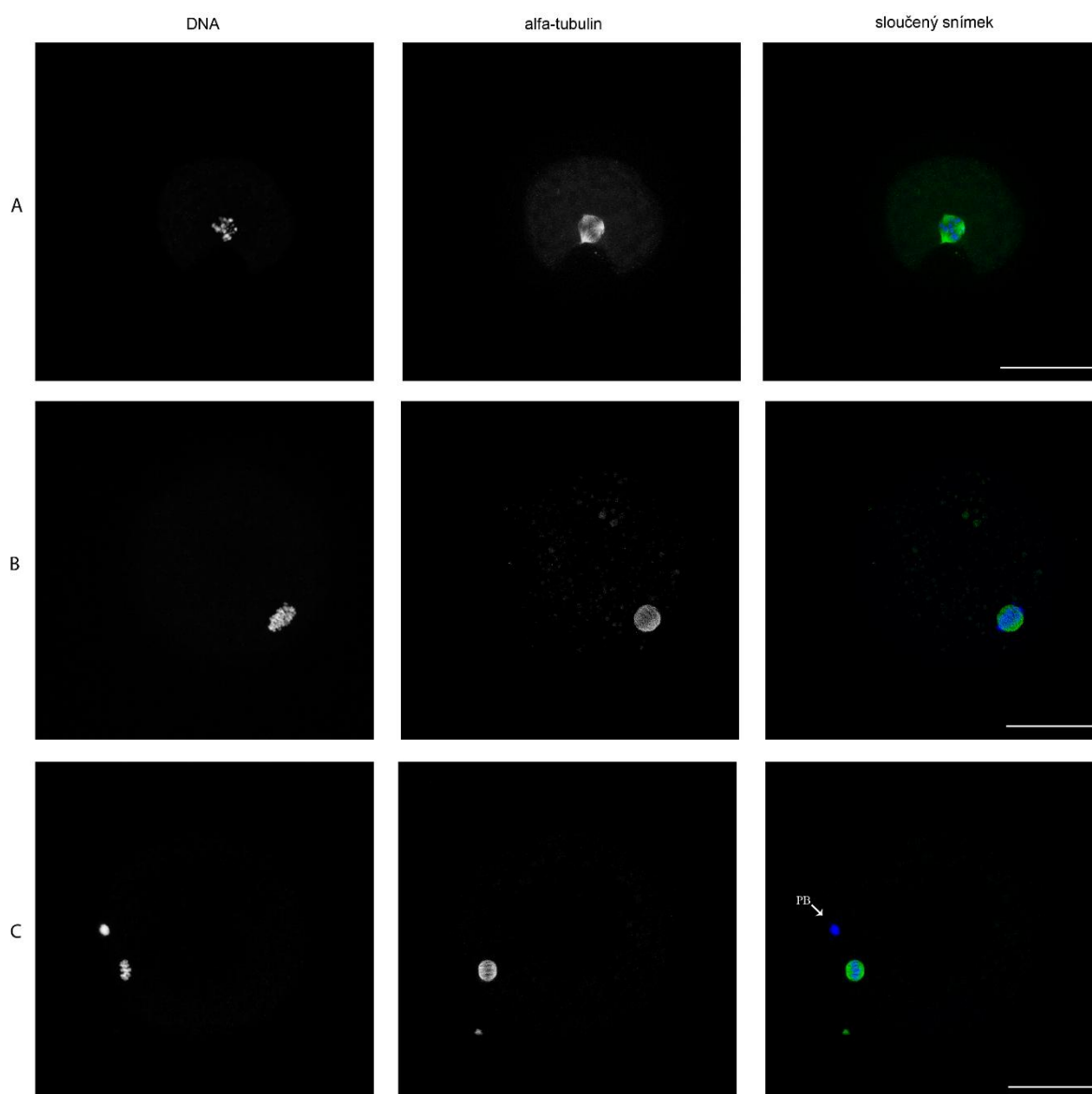
Měřítka odpovídá velikosti 200 μm

Imunofluorescenční barvení a barvení lipidů

Pro permeabilizaci membrán byly zafixované oocyty inkubovány v 0,5 % TritonX-100 po dobu 15 minut. Všechny následující kroky byly provedeny ředěním v roztoku fosfátového pufru (phosphate-buffered saline - PBS) obohaceného o BSA (bovine serum albumine) na finální koncentraci 0,3 % a saponin (SAP) na finální koncentraci 0,05 % (PBS/BSA/SAP). Oocyty byly blokovány 2 % normálním kozím sérem (Millipore Biosciences, St. Charles, MO) po dobu 1 hod a opláchnuty v PBS/BSA/SAP. Pro vizualizaci dělicího vřeténka byly následně inkubovány s myší primární protilátkou specifickou pro tubulin (T6793, Sigma-Aldrich) přes noc při 4 °C. Druhý den byly oocyty omyty v PBS/BSA/SAP a v temnu při pokojové teplotě po dobu 1 hod inkubovány se sekundární protilátkou rozpoznávající myší IgG konjugovanou s Alexa Fluor 488 (Invitrogen, Eugene, OR). Následně byly oocyty opláchnuty v PBS/BSA/SAP a pro vizualizaci lipidů byly inkubovány v roztoku Nile Red (Invitrogen) o finální koncentraci 10 $\mu\text{g/ml}$ v PBS obohaceném o BSA na výslednou koncentraci 0,4 % po dobu 40 min. Posledním krokem bylo montování vzorků na mikroskopické sklíčko, které bylo provedeno pomocí montovacího média SlowFade Diamond Antifade Mountant (Invitrogen), které obsahuje fluorescenční barvivo (DAPI) pro vizualizaci DNA. Takto připravené vzorky byly snímány pomocí konfokálního mikroskopu Leica TCS SP5 (Leica Microsystems AG, Wetzlar, Německo) a vzniklé obrázky byly zpracovány pomocí Fiji softwaru (<https://fiji.sc/>).

Pro zhodnocení úspěšnosti meiotického zrání byla pozorována přítomnost dělicího vřeténka a pólového tělíska (Obrázek č. 7). Oocyty byly rozdělené do skupin: GV oocyt (oocyt, který neopustil první blok meiotického dělení), degradovaný oocyt (fragmentovaná DNA, bez DNA nebo s morfologickými abnormalitami dělicího vřeténka; Obrázek 7A), MI oocyt (oocyt v metafázi prvního meiotického dělení; Obrázek 7B), MII oocyt (oocyt v metafázi druhého meiotického dělení; Obrázek 7C).

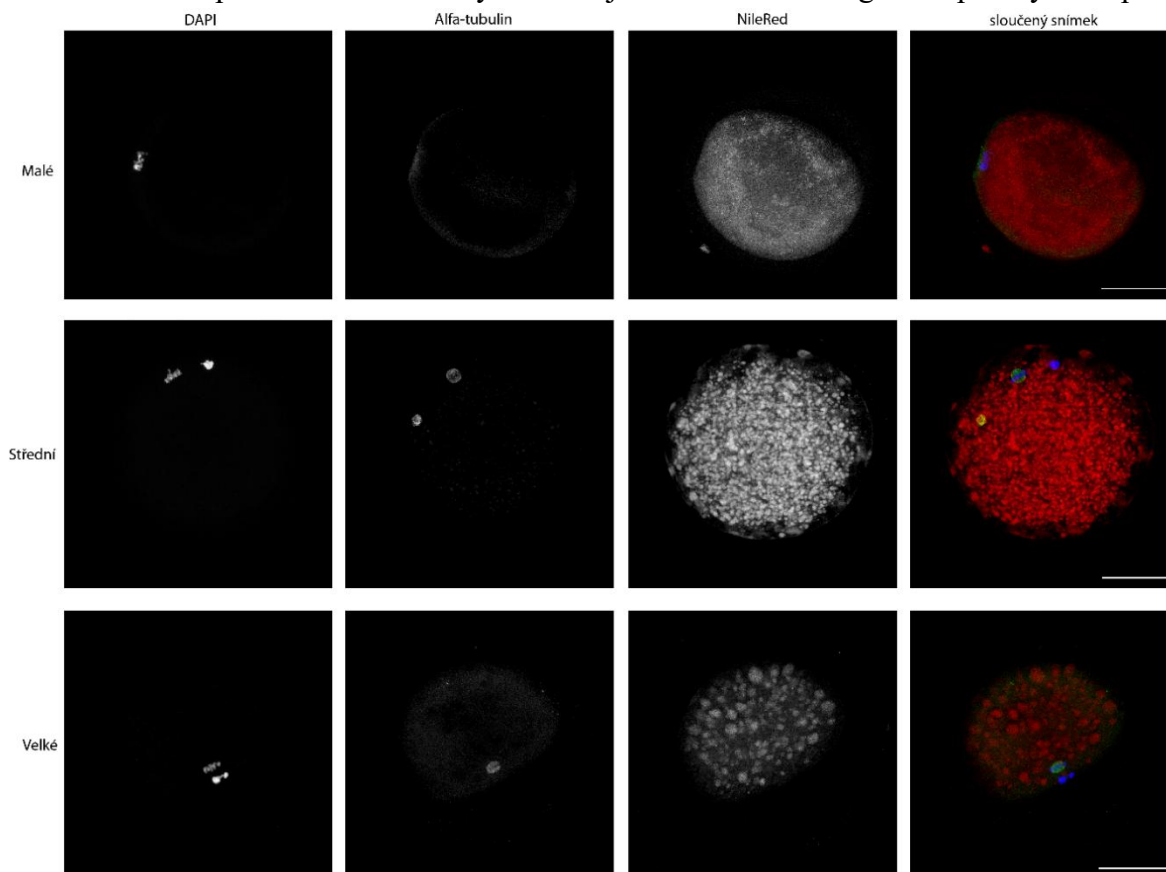
Obrázek č. 7 Určení úspěšnosti maturace oocytů (Toralová et al. 2025).



A) abnormální/nebipolární dělicí vřeténko; B) oocyt ve stádiu MI; C) oocyt ve stádiu MII, šipka směřuje k pólovému tělísku. DNA (DAPI) – modře, dělicí vřeténko (alfa-tubulin) - zeleně. Měřítka znázorňuje 50 μm .

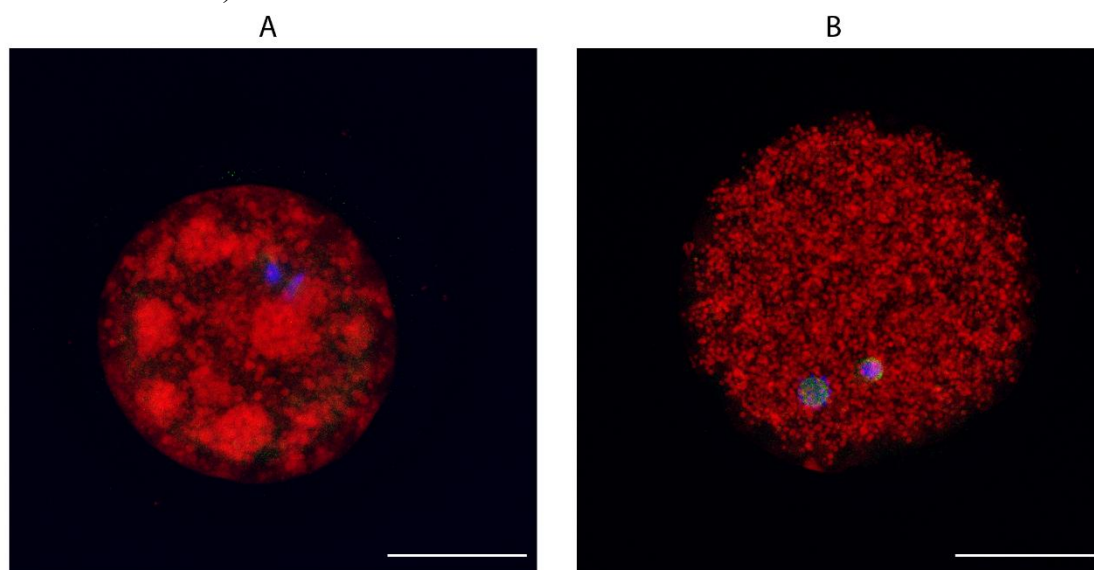
Pro měření obsahu lipidů byla stanovena relativní intenzita jejich fluorescenčního barvení (pomocí Fiji softwaru), lipidy byly hodnocené také na základě velikosti lipidových kapének (malé, střední, velké; Obrázek č. 8) a jejich lokalizace v rámci oocyty (homogenně nebo heterogenně rozptýlené v ooplazmě; Obrázek č. 9).

Obrázek č. 8 Reprezentativní snímky zobrazující velikostní kategorie lipidových kapének



Kapénky byly děleny do kategorií: malé, střední a velké. DNA (DAPI) – modře, dělicí vřeténko (alfa-tubulin) – zeleně, lipidy (NileRed) - červeně. Měřítka znázorňuje 50 μm .

Obrázek č. 9 Reprezentativní snímky znázorňující kategorie distribuce lipidových kapének (Toralová et al. 2025)



A) heterogenní; B) homogenní. DNA (DAPI) – modře, lipidy (NileRed) - červeně. Měřítko znázorňuje 50 μm .

Statistické vyhodnocení získaných údajů

Úprava provozních dat a tvorba databází byla provedena v programu MS Excel. Pro statistické vyhodnocení byl využit statistický program SAS 9.4 (SAS/STAT®; SAS Institute, Inc. Cary, NC, USA). Využity byly především procedury MEANS a CORR. Hodnoceny byly hlavně vztahy mezi sonografickým vyšetřením vaječníků, obsahem metabolitů a oxidantů stanovených z krve, resp. laboratorně hodnocenými ukazateli kvality oocytů. Pro statistické vyhodnocení byly využity následující hladiny významnosti $P < 0,05$, $P < 0,01$ a $P < 0,001$.

4. Výsledky

V tabulce č. 4 jsou uvedeny základní statistiky souboru aspirovaných krav. Průměrně bylo od každé krávy aspirováno 3,07 oocyty. Byla zde zaznamenána poměrně velká variabilita v počtu aspirovaných oocytů, která je také patrná z počtu sonograficky identifikovaných folikulů. Většina krav při aspiraci cyklovala a v mnohých případech se vyskytovala i žlutá tělíska. V další části tabulky jsou uvedeny průměrné obsahy metabolitů, jako je tChol, TAG, BHB a NEFA. I zde je patrná celkem velká variabilita svědčící o rozdílném metabolickém stavu. Zvířata zařazená do aspirace byla od 36 do 82 dnů v laktaci. Tato zvířata i po aspiraci dále přicházela do říje, která nastala v průměru za 27,25 dne po získávání oocytů. Většina z aspirovaných dojnic zabřezla průměrně za 1,78 říjových cyklů. Úspěšnost zabřezávání se pohybovala kolem 61,66 %. V rámci zrání oocytů dosáhlo MII fáze v průměru 47,25 % oocytů. Získané oocyty byly nejčastěji řazeny do kvalitativní kategorie 1 (průměrná kvalita byla 1,58 a 56,88 % dosáhlo kategorie 1), což dle tabulky 1 odpovídá poměrně velkému procentu kompaktních a homogenních oocytů.

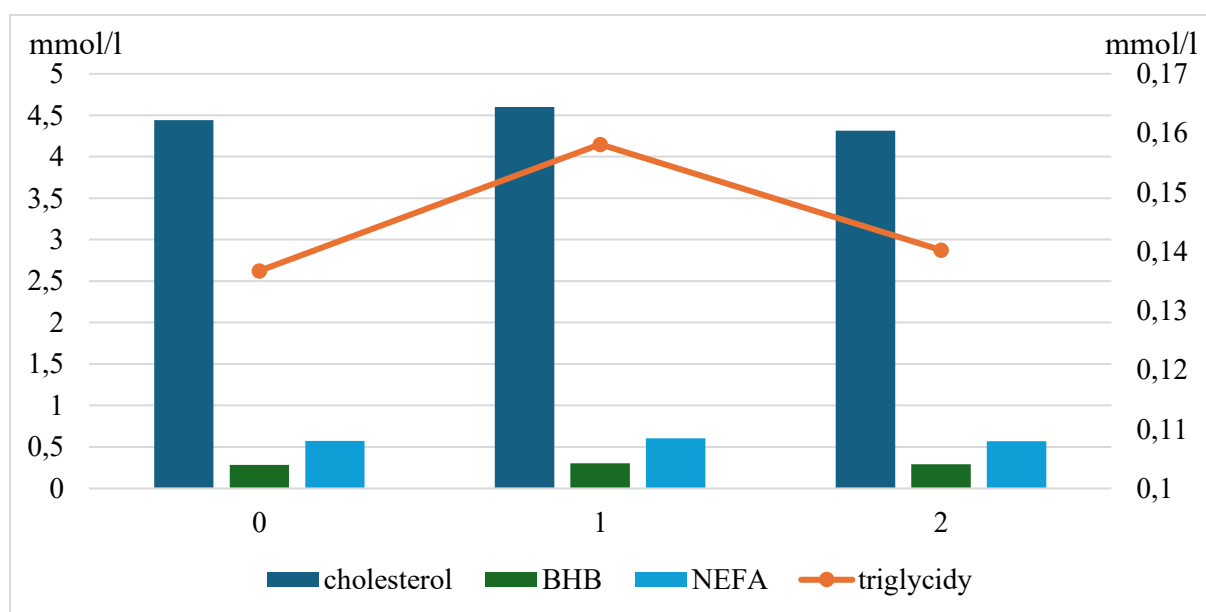
Tabulka č. 4 Základní statistiky hodnoceného souboru

Proměnná	n	$\bar{x}$	s	min.	max.	s. e.	V (%)
počet aspirovaných oocytů na krávu	180	3,07	3	0	20	0,22	97,56
počet žlutých tělísek na ovariích	187	0,89	0,71	0	3	0,05	79,50
počet folikulů celkem	174	11,60	4,71	0	31	0,36	40,57
počet folikulů do 0,5 cm velikosti	174	9,71	5,09	0	30	0,39	52,39
počet folikulů nad 0,5 cm velikosti	174	1,89	1,74	0	12	0,13	92,13
cholesterol (mmol/l)	151	4,37	0,92	2,4	7,6	0,07	20,99
triglyceridy (mmol/l)	151	0,13	0,04	0,04	0,25	0,00	32,62
BHB (mmol/l)	151	0,30	0,12	0,11	0,81	0,01	40,58
NEFA (mmol/l)	151	0,57	0,32	0,09	2,02	0,03	56,04
DIM při aspiraci	188	59,44	10,18	36	82	0,74	17,13
nádoj (kg) v den aspirace	173	30,03	4,98	18,7	43	0,38	16,59
T/P v den aspirace	173	1,12	0,69	0,53	9,7	0,05	61,69
tuk (%) v mléce v den aspirace	173	3,92	0,50	2,89	5,62	0,04	12,76
protein (%) v mléce v den aspirace	173	3,77	0,60	3,07	5,5	0,05	16,01
počet somatických buněk do aspirace	43	48,84	50,58	0	100	7,71	103,56
dny do nástupu říje po aspiraci	165	27,25	14,13	1	57	1,10	51,84
počet ovariálních cyklů od otelení do zabřeznutí	141	1,89	1,33	0	7	0,11	70,29
úspěšnost zabřezávání (%)	160	61,66	36,72	0	100	2,90	59,55
inseminační interval (dnů)	164	88,02	19,99	42	137	1,56	22,71
servis perioda (dnů)	142	118,25	47,74	57	255	4,01	40,38
interinseminanční interval (dnů)	81	40,40	21,21	11	146	2,36	52,50
inseminační index	144	1,78	1,12	1	6	0,09	62,91
zrání oocytů	107	47,25	37,89	0	100	3,66	80,19
kvalita oocytů	109	1,58	0,74	1	3	0,07	46,68
kvalita CC	153	1,89	1,06	1	4	0,09	56,17
lipid intenzity	104	64,06	20,32	11,26	100	1,99	31,72
distribuce lipidů	105	1,26	0,44	1	2	0,04	34,93
SOD (AU/ml)	143	188,47	31,87	70,06	266,37	2,66	16,91
CAT (μkat/ml)	143	23,28	4,90	11,33	41,55	0,41	21,03
GPx (nkat/ml)	143	200,47	50,94	117,52	349,37	4,26	25,41
GR (nkat/ml)	143	0,86	0,28	0,34	1,73	0,02	32,07
HSP70 (ng/ml)	142	5,19	10,58	1,80	102,78	0,89	203,81
MDA (μmol/l)	143	1,84	0,47	0,00	2,70	0,04	25,33
TAS (mmol/l)	137	3,44	0,62	2,17	5,22	0,05	18,04
TOS (μmol/l)	135	2,66	0,86	0,97	4,82	0,07	32,39

BHB: β-hydroxybutyrát; NEFA: neesterifikované mastné kyseliny; DIM: dny v mléce; T/P: poměr tuk/protein v mléce; TAS: celkový antioxidační status; TOS: celkový oxidační status; SOD: superoxiddismutasa; CAT: katalasa; GPx: glutathionperoxidasa; GR: glutathionreduktasa; HSP70: Heat Shock Protein 70; MDA: malondialdehyd – peroxidace lipidů; n: počet sledovaných zvířat; $\bar{x}$: aritmetický průměr; s: směrodatná odchylka; min.: minimální hodnota; max.: maximální hodnota; s.e.: střední chyba aritmetického průměru; V (%): koeficient variance.

V grafu č. 1 je znázorněn vývoj obsahu metabolitů měřených v krvi podle vývojového stádia aspirovaných oocytů. Při získání nezralých oocytů ve stádiu GV a degradovaných oocytů (společně označované jako skupina 0) byla naměřena nejnižší hladina TAG a zároveň vysoká hladina tChol v krvi. Naopak při získání zralých oocytů vhodných k oplození ve stádiu MII (skupina 2) byla hladina tChol v krvi dojnic nejvyšší. V případě BHB a NEFA zjištěných z krve dojnic byly rozdíly mezi stádii oocytů téměř neznamenné.

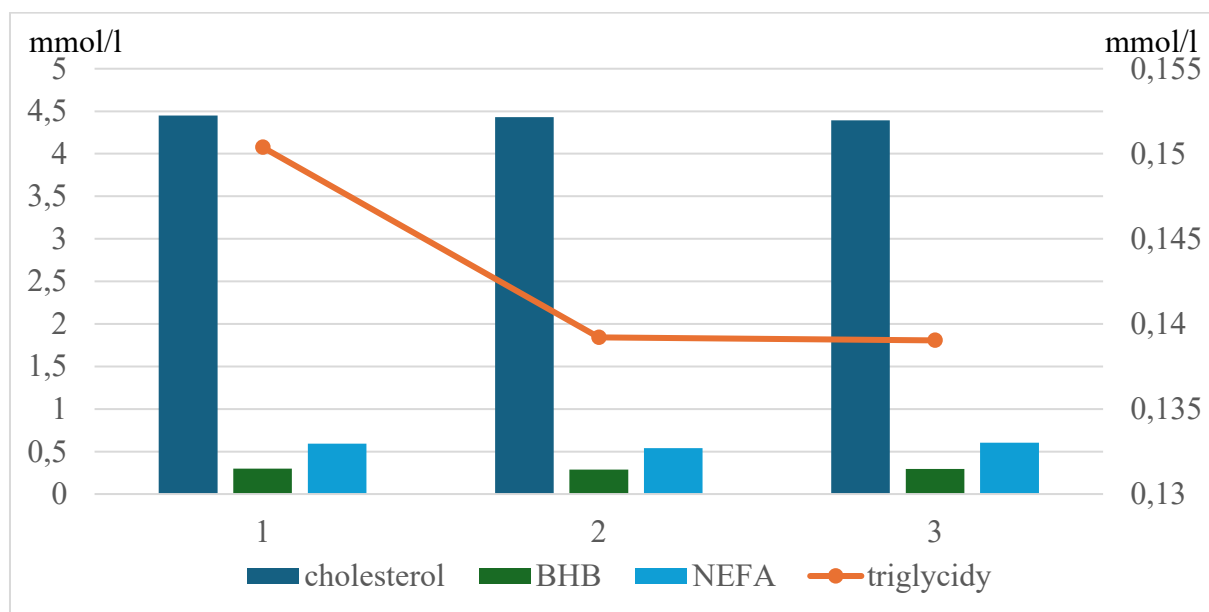
Graf č. 1 Obsah metabolitů v krvi dle stádia aspirovaných oocytů



BHB: β -hydroxybutyrát; NEFA: neesterifikované mastné kyseliny; stádium oocytů: 0=GV a degradované; 1=MI, GVBD; 2= MII.

V grafu č. 2 jsou uvedeny metabolity v kontextu ke kvalitě aspirovaných oocytů. Z grafu je zřejmé, že nejkvalitnější oocyty (1) byly získávány od zvířat s nejvyšší koncentrací TAG v krvi. Podobný trend byl pozorován i u obsahu tChol. Pouze minimální rozdíly byly pozorovány u zbylých třech metabolitů měřených z krve dojnic.

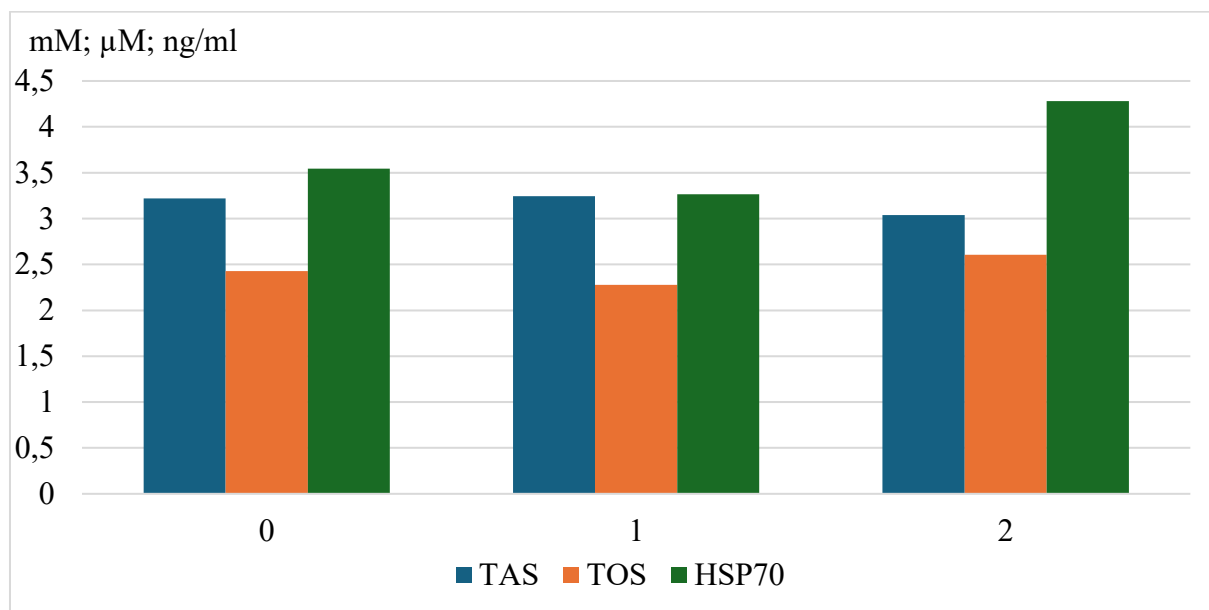
Graf č. 2 Obsah metabolitů v krvi dle kvality aspirovaných oocytů



BHB: β -hydroxybutyrát; NEFA: neesterifikované mastné kyseliny; kvalita oocytů: 1 = nejlepší.

Z grafu č. 3 vyplývá, že TAS stanovený z krve krav se příliš neliší mezi krávy s různou úspěšností zrání oocytů. V případě TOS je z grafu patrné, že nejvyšší hladina byla sledována u krav, jejichž oocyty dozrály po kultivaci v maturačním médiu do stádia MII. Nejnížší hladiny byly zaznamenány u oocytů, jejichž vývoj byl zastavený v MI fázi. Je tak zřejmé, že pro úspěšné zrání oocytů je třeba, aby hladina TOS dosahovala spíše vyšších a hladina TAS spíše nižších úrovní. Podobně je to i u HSP70 (Heat Shock Protein), kdy jeho vysoká hladina podpořila maturaci, a naopak příliš nízká hladina je spojována s degradací oocytu nebo zastavení vývoje v MI fázi.

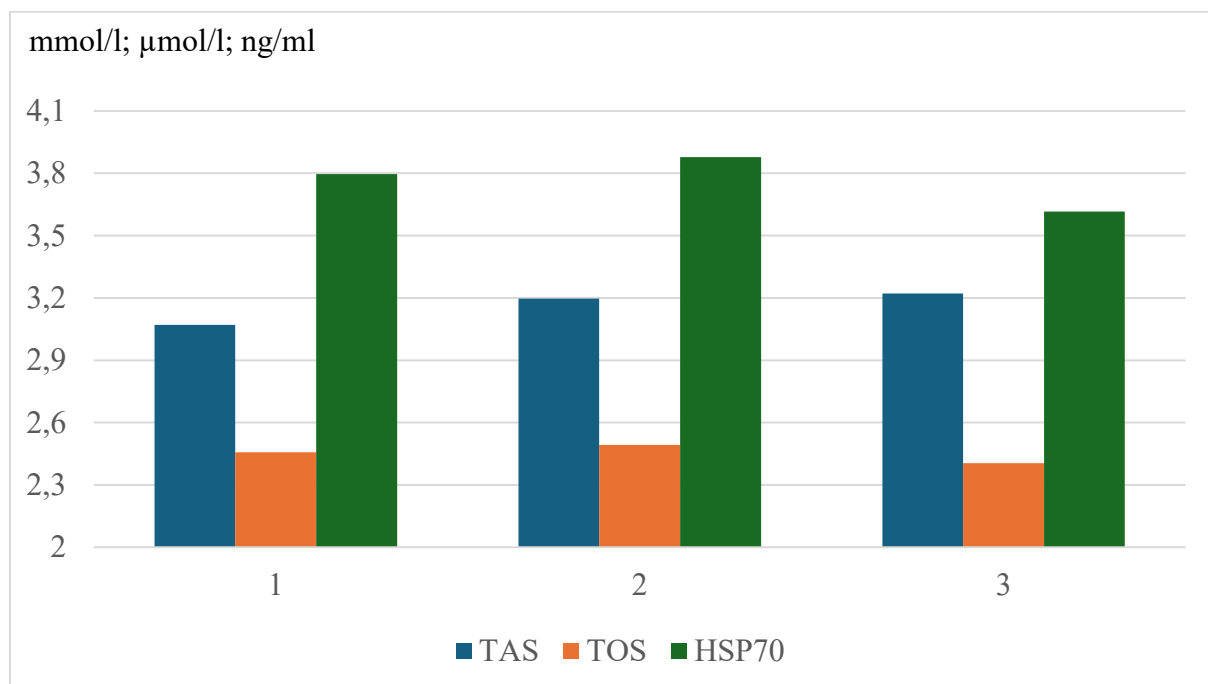
Graf č. 3 Množství oxidantů, antioxidantů a HSP70 v krvi dárkyň ve vztahu ke stádiu aspirovaných oocytů



TAS: celkový antioxidační status (mmol/l); TOS: celkový oxidační status (μmol/l); HSP70: Heat Shock Protein 70 (ng/ml); s stádium oocytů: 0=GV a degradované; 1=MI, GVBD; 2=MII.

V grafu č. 4 je vyjádřen vztah TAS, TOS a HSP 70 z krve krav ke kvalitě aspirovaných oocytů. Z výsledků těchto parametrů nejsou patrné příliš velké rozdíly. Nicméně hladina TAS se se zhoršující se kvalitou oocytů mírně zvyšuje.

Graf č. 4 Množství oxidantů, antioxidantů a HSP70 v krvi dárkyň ve vztahu ke kvalitě aspirovaných oocytů



TAS: celkový antioxidační status (mmol/l); TOS: celkový oxidační status (μmol/l); HSP70: Heat Shock Protein 70 (ng/ml); kvalita oocytů: 1 = nejlepší.

V tabulce č. 5 až č. 10 jsou znázorněny korelace parametrů a ukazatelů měřených z krve, z kontroly užítkovosti a zootechnické evidence ke kvalitativním parametrům oocytů získaných po aspiraci. V první z tabulek jsou vyjádřeny vztahy mezi výsledky sonografického vyšetření vaječníku a kvalitou oocytů. Zde byly pozorovány povětšinou pouze minimální, nebo neprůkazné korelace. Významnější vztahy lze pozorovat pouze mezi počtem folikulů (celkový, do 0,5 cm a nad 0,5 cm) a počtem aspirovaných oocytů a jejich zráním ($P < 0,05$). Mnohem zajímavěji se ukazují závislosti mezi obsahem vybraných metabolitů v krvi (tChol, TAG, BHB, NEFA) a parametry kvality oocytů. Zde byly pozorovány například vztahy mezi koncentrací TAG, resp. BHB a počtem aspirovaných oocytů ($P < 0,05$). S vyšší hodnotou tohoto metabolitu tedy stoupal počet aspirovaných oocytů. Negativní vztah byl naopak vypočten pro srovnání obsahu tChol, resp. TAG a zrání oocytů ($P < 0,05$). Podobně se pak objevili záporné korelace byly mezi koncentrací TAG, resp. BHB a kvalitou kumulárních buněk ($P < 0,05$). Tedy čím jsou kumulární buňky kvalitnější, tím je koncentrace těchto metabolitů nižší. Pozitivní vztah byl zjištěn mezi všemi metabolity a obsahem lipidů ($P < 0,05$). Nízký vztah byl pozorován mezi koncentrací TAG a velikostí kapének u oocytů ($r = -0,169$; $P < 0,05$). Zbylé korelace byly v tabulce č. 6 statisticky neprůkazné.

Tabulka č. 5 Korelace mezi sonografickými nálezy a parametry kvality aspirovaných oocytů

		počet aspirovaných oocytů	zrání oocytů	stádium oocytů	kvalita oocytů	kvalita COC	obsah lipidů	velikost kapének	distribuce lipidů
počet žlutých tělísek	r	-0,139	0,053	-0,002	-0,048	-0,093	0,058	-0,090	-0,035
	P	0,001	0,284	0,962	0,330	0,028	0,239	0,069	0,475
	n	592	417	410	421	566	407	409	408
počet folikulů celkem	r	0,485	-0,141	-0,079	0,048	0,004	0,038	-0,122	0,005
	P	<0,001	0,005	0,121	0,337	0,921	0,451	0,016	0,914
	n	569	395	389	399	544	386	388	387
počet folikulů do 0,5 cm velikosti	r	0,505	-0,157	-0,095	0,067	0,036	0,025	-0,107	-0,002
	P	<0,001	0,002	0,060	0,180	0,399	0,621	0,036	0,971
	n	569	395	389	399	544	386	388	387
počet folikulů nad 0,5 cm velikosti	r	-0,238	0,109	0,084	-0,082	-0,109	0,039	-0,008	0,018
	P	<0,001	0,030	0,098	0,102	0,011	0,439	0,872	0,724
	n	569	395	389	399	544	386	388	387

COC: kvalita kumulárních buněk; r: korelační koeficient; P: statistická průkaznost; n: počet případů.

Tabulka č. 6 Korelace mezi obsahem metabolitů v krvi a parametry kvality aspirovaných oocytů

		počet aspirovaných oocytů	zrání oocytů	stádium oocytů	kvalita oocytů	kvalita COC	obsah lipidů	velikost kapének	distribuce lipidů
cholesterol (mmol/l)	r	-0,084	-0,202	-0,070	-0,024	0,041	0,145	-0,076	0,054
	P	0,057	<0,001	0,200	0,657	0,367	0,008	0,161	0,319
	n	514	346	340	348	493	340	339	338
triglyceridy (mmol/l)	r	0,317	-0,119	0,003	-0,099	-0,153	0,124	-0,169	-0,084
	P	<0,001	0,027	0,956	0,064	0,001	0,022	0,002	0,125
	n	514	346	340	348	493	340	339	338
BHB (mmol/l)	r	0,103	-0,017	0,021	-0,010	-0,123	0,195	-0,011	0,057
	P	0,019	0,748	0,699	0,851	0,006	<0,001	0,835	0,299
	n	514	346	340	348	493	340	339	338
NEFA (mmol/l)	r	-0,034	-0,034	-0,007	0,006	-0,007	0,191	-0,078	0,100
	P	0,444	0,526	0,902	0,908	0,886	<0,001	0,154	0,067
	n	514	346	340	348	493	340	339	338

BHB: β-hydroxybutyrát; NEFA: neesterifikované mastné kyseliny; COC: kvalita kumulárních buněk; r: korelační koeficient; P: statistická průkaznost; n: počet případů.

Z tabulky č. 7 stojí za pozornost nízká korelace mezi počtem dnů v laktaci (DIM) dárkyně při aspiraci a kvalitou oocytů ($r = -0,113$; $P < 0,05$), resp. velikostí kapének a distribucí ($r = -0,155$ až $-0,156$; $P < 0,05$). Velikost nádoje, obsah tuku a poměr tuk/protein ve dni aspirace jako dílčí parametry užitečnosti kvalitu oocytů neovlivňovaly. Slabé korelace byly nicméně zjištěny u vybraných parametrů kvality oocytů v případě obsahu proteinu v mléce v den aspirace. Zajímavou provázanost zdravotního stavu k počtu aspirovaných oocytů reprezentuje závislost na počtu somatických buněk v mléce v den aspirace ($r = 0,317$; $P < 0,001$). Z toho vyplývá, že zvířata s horší kvalitou mléka v den aspirace mohou mít vyšší výtěžnost aspirovaných oocytů. To ale může být také zdůvodnitelné jinými efekty, které hrají roli v nastartování ovariální aktivity.

Ze vztahů reprodukčních ukazatelů a kvality oocytů prezentovaných v tabulce č. 8 vyplývá, že čím více bylo aspirovaných oocytů, tím více se prodloužila doba do přirozeného říjového cyklu po aspiraci ($r = 0,258$; $P < 0,001$), resp. prodloužil se inseminační interval ($r = 0,141$; $P < 0,01$). Na druhou stranu vyšší úspěšnost zabřezávání ($r = 0,253$; $P < 0,001$) a vyšší hodnota servis periody ($r = -0,122$; $P < 0,01$) byla spojena s nižším počtem aspirovaných oocytů. Trochu odlišné vztahy pak byly pozorovány v případě zrání oocytů. Krávy, které po aspiraci potřebovaly více dnů do nástupu říjového cyklu a současně lépe zabřezly, měly horší zrání oocytů ($P < 0,05$). To může souviset i s korelací mezi délkou servis periody a zráním oocytů ($r = 0,166$; $P < 0,01$), resp. stádiem oocytů ($r = 0,113$; $P < 0,001$). Ze zmiňované tabulky je třeba ještě vzpomenout na negativní vztah mezi délkou inseminačního intervalu, resp. servis periody a kvalitou kumulárních buněk ($r = -0,158$ až $-0,176$; $P < 0,001$). Tedy od krav s horším zabřezáváním byly získány oocyty s kvalitnějšími kumulárními buňkami.

Tabulka č. 7 Korelace mezi užitkovostí dojníc a parametry kvality aspirovaných oocytů

		počet aspirovaných oocytů	zrání oocytů	stádium oocytů	kvalita oocytů	kvalita COC	obsah lipidů	velikost kapének	distribuce lipidů
DIM při aspiraci	r	0,071	-0,070	0,016	-0,113	-0,052	-0,075	-0,155	-0,156
	P	0,086	0,154	0,742	0,020	0,214	0,129	0,002	0,002
	n	592	417	410	421	566	407	409	408
nádoj v den aspirace	r	-0,034	-0,018	-0,029	0,061	0,036	-0,009	0,088	0,039
	P	0,405	0,717	0,555	0,215	0,397	0,857	0,077	0,437
	n	592	417	410	421	566	407	409	408
T/P v den aspirace	r	-0,020	0,079	0,022	-0,025	-0,013	-0,031	0,053	-0,019
	P	0,632	0,106	0,659	0,606	0,763	0,532	0,282	0,702
	n	592	417	410	421	566	407	409	408
tuk v mléce v den aspirace	r	0,006	0,011	-0,017	-0,086	-0,035	0,066	-0,048	-0,073
	P	0,885	0,826	0,735	0,076	0,402	0,185	0,334	0,139
	n	592	417	410	421	566	407	409	408
protein v mléce v den aspirace	r	-0,096	0,106	0,053	0,026	-0,103	-0,037	-0,135	0,047
	P	0,020	0,030	0,282	0,595	0,014	0,451	0,006	0,340
	n	592	417	410	421	566	407	409	408
počet somatických buněk do aspirace	r	0,317	-0,013	-0,012	0,077	-0,121	0,015	0,044	-0,032
	P	<0,001	0,890	0,903	0,429	0,209	0,881	0,657	0,742
	n	115	107	106	109	109	103	106	106

DIM: dny v mléce; T/P: poměr tuk ku proteinu v mléce; COC: kvalita kumulárních buněk; r: korelační koeficient; P: statistická průkaznost; n: počet případů.

Tabulka č. 8 Korelace mezi reprodukčními ukazateli u dojnic a parametry kvality aspirovaných oocytů

		počet aspirovaných oocytů	zrání oocytů	stádium oocytů	kvalita oocytů	kvalita COC	obsah lipidů	velikost kapének	distribuce lipidů
dny do nástupu říje po aspiraci	r	0,258	-0,128	-0,016	-0,018	-0,085	0,112	0,052	0,008
	P	<0,001	0,011	0,747	0,716	0,048	0,026	0,305	0,876
	n	568	401	396	405	545	393	395	394
počet ovariálních cyklů od otelení do zabřeznutí	r	-0,040	0,067	0,036	0,045	-0,058	-0,029	0,056	0,118
	P	0,397	0,227	0,518	0,410	0,233	0,604	0,319	0,034
	n	445	329	324	333	429	321	324	323
úspěšnost zabřezávání	r	-0,253	-0,230	-0,077	0,014	0,018	-0,006	-0,113	-0,024
	P	<0,001	<0,001	0,141	0,781	0,686	0,905	0,031	0,652
	n	533	370	364	374	514	361	364	363
inseminační interval (dny)	r	0,141	0,077	0,070	-0,115	-0,158	-0,047	0,049	-0,049
	P	0,001	0,138	0,181	0,025	<0,001	0,367	0,35	0,352
	n	540	376	370	380	520	367	370	369
servis perioda (dny)	r	-0,122	0,166	0,113	-0,09	-0,176	0,005	0,056	0,046
	P	0,009	0,003	0,042	0,103	<0,001	0,925	0,321	0,415
	n	457	328	322	332	440	319	322	321
interinseminační interval (dny)	r	0,056	0,224	0,085	-0,165	-0,034	-0,001	-0,022	-0,018
	P	0,359	0,004	0,273	0,031	0,590	0,998	0,774	0,816
	n	272	168	167	172	262	167	167	167
inseminační index	r	-0,034	0,102	0,055	-0,002	-0,079	0,037	0,033	0,091
	P	0,471	0,065	0,325	0,976	0,094	0,514	0,549	0,105
	n	466	328	322	332	449	319	322	321

COC: kvalita kumulárních buněk; r: korelační koeficient; P: statistická průkaznost; n: počet případů.

Parametry oxidačního stresu (stavu) stanovené z krve projevily také průkazné korelace ke kvalitě aspirovaných oocytů. K počtu aspirovaných oocytů byly pozorovány negativní vztahy, jež byly ve většině případů statisticky průkazné ($P < 0,05 - 0,001$). Jednoduše z toho vyplývá, že čím více oxidantů, a také antioxidantů v krvi, tím je snižován počet aspirovaných oocytů. Méně jednoznačné, byť také ve většině případů statisticky průkazné ($P < 0,001$) vztahy jsou popsitelné mezi ukazateli oxidačního stresu a zráním oocytů. Negativní vztah je pozorován ke zrání oocytů u TAS, CAT a GPx. Opačné vztahy jsou pak v případě TOS, GR, HSP70 a MDA. Z tohoto vyplývá, že s nárůstem oxidantů a poklesem antioxidantů se zlepšuje zrání oocytů. Dále tabulka č. 9 prokazuje i vztahy například obsahu CAT, či GPx ke kvalitě oocytů, kvalitě kumulárních buněk a distribuci lipidů. Dokonce dosažení MII fáze (stádium oocytů) může být z výsledků korelací negativně ovlivněno obsahem GPx ($r = -0,174$; $P < 0,01$), či pozitivně zvýšeným obsahem MDA ($r = 0,138$; $P < 0,05$).

Z výsledků v tabulce č. 9 vyplývá, že vyšší antioxidační ochrana (TAS, CAT, GPx) byla průkazně spojena s vyšší kvalitou oocytů. Neprůkazně byla tato tendence také u SOD. Zvyšující se podíl oxidantů byl průkazně spojený s nižší kvalitou kumulárních buněk. Navíc se také ukazuje (být neprůkazně), že čím je vyšší stres (prezentovaný HSP70), tak tím je nižší kvalita oocytů i kumulárních buněk. Tomu také odpovídá i podíl poškozených membrán prezentovaný hodnotou MDA, kdy vyšší kvalita oocytů a kumulárních buněk je (neprůkazně) spojena s nižší MDA.

Tabulka č. 9 Korelace mezi ukazateli oxidačního stresu a parametry kvality aspirovaných oocytů

		počet aspirovaných oocytů	zrání oocytů	stádium oocytů	kvalita oocytů	kvalita COC	obsah lipidů	velikost kapének	distribuce lipidů
TAS (mM)	r	-0,227	-0,360	-0,160	0,121	-0,038	0,110	0,011	0,143
	P	<0,001	<0,001	0,006	0,039	0,428	0,062	0,847	0,015
	n	455	294	288	293	436	288	287	286
TOS (μM)	r	-0,133	0,297	0,109	-0,023	-0,132	-0,097	0,078	-0,110
	P	0,005	<0,001	0,067	0,697	0,006	0,105	0,193	0,067
	n	449	288	282	287	430	282	281	280
CAT (μkat/ml)	r	-0,038	-0,216	-0,074	0,123	-0,156	0,036	-0,084	0,166
	P	0,414	<0,001	0,197	0,031	<0,001	0,531	0,146	0,004
	n	472	308	302	307	452	302	301	300
GPx (nkat/ml)	r	-0,072	-0,348	-0,170	0,223	0,097	-0,025	0,003	0,188
	P	0,119	<0,001	0,003	<0,001	0,039	0,659	0,964	0,001
	n	472	308	302	307	452	302	301	300
GR (nkat/ml)	r	-0,279	0,261	0,091	-0,028	-0,004	-0,116	0,118	-0,079
	P	<0,001	<0,001	0,113	0,629	0,934	0,044	0,041	0,173
	n	472	308	302	307	452	302	301	300
SOD (AU/ml)	r	0,136	-0,070	-0,008	0,072	-0,056	0,035	-0,003	0,084
	P	0,003	0,224	0,884	0,210	0,236	0,545	0,958	0,148
	n	472	308	302	307	452	302	301	300
HSP70 (ng/ml)	r	-0,104	0,268	0,113	-0,022	-0,009	0,005	0,015	-0,065
	P	0,025	<0,001	0,051	0,706	0,856	0,929	0,802	0,267
	n	470	306	300	305	450	300	299	298
MDA (umol/l)	r	-0,071	0,272	0,138	-0,033	-0,053	-0,111	0,016	-0,021
	P	0,123	<0,001	0,017	0,570	0,261	0,055	0,785	0,716
	n	472	308	302	307	452	302	301	300

TAS: celkový antioxidační status; TOS: oxidační status; SOD: superoxiddismutasa; CAT: katalasa; GPx: glutathionperoxidasa; GR: glutathionreduktasa; HSP70: Heat Shock Protein 70; MDA: malondialdehyd – peroxidace lipidů; COC: kvalita kumulárních buněk; r: korelační koeficient; P: statistická průkaznost; n: počet případů.

V tabulce č. 10 jsou uvedeny vzájemné vztahy mezi ukazateli počtu aspirovaných oocytů a jejich kvalitativními parametry. Například počet aspirovaných oocytů byl slabě korelován k obsahu lipidů v oocytech ($P < 0,05$). Naopak lepší zrání oocytů (% dosažení MII fáze zrání) je pochopitelně spojené s dosažením vyššího stádia aspirovaných oocytů ($r = 0,555$; $P < 0,001$), lepší kvalitou oocytů ($r = 0,246$; $P < 0,001$) a lepší kvalitou kumulárních buněk ($r = 0,145$; $P < 0,01$). Dosahování vyššího stádia oocytů (MII) je pak korelací spojené se zvýšenou kvalitou oocytů ($r = 0,318$; $P < 0,001$), zvýšenou kvalitou kumulárních buněk ($r = 0,258$; $P < 0,001$), sníženým obsahem lipidů ($r = -0,223$; $P < 0,001$) a lehce zvýšenou distribucí lipidů ($r = 0,100$; $P < 0,05$). Zlepšená kvalita oocytů je z této tabulky podpořena zlepšenou kvalitou kumulárních buněk ($r = 0,423$; $P < 0,001$), zvýšeným obsahem lipidů ($r = 0,184$; $P < 0,001$) a sníženou distribucí lipidů ($r = -0,204$; $P < 0,001$). V podobném vztahu, jako v případě kvality oocytů, byla i kvalita kumulárních buněk k obsahu lipidů a jejich distribuci. Tedy lepší kvalita kumulárních buněk je doplněna zvýšeným obsahem lipidů a snížením hodnot distribuce.

Tabulka č. 10 Korelace mezi parametry kvality aspirovaných oocytů

		zrání oocytů	stádium oocytů	kvalita oocytů	kvalita COC	obsah lipidů	velikost kapének	distribuce lipidů
počet aspirovaných oocytů	r	-0,093	-0,045	0,092	0,014	0,114	0,033	-0,015
	P	0,058	0,360	0,060	0,745	0,021	0,504	0,762
	n	417	410	421	566	407	409	408
zrání oocytů	r		0,555	0,246	0,145	0,036	0,025	-0,087
	P		<0,001	<0,001	0,003	0,469	0,614	0,078
	n		410	415	415	407	409	408
stádium oocytů	r			0,318	0,258	-0,223	0,011	0,100
	P			<0,001	<0,001	<0,001	0,831	0,043
	n			410	410	407	409	408
kvalita oocytů	r				0,423	0,184	-0,091	-0,204
	P				<0,001	<0,001	0,065	<0,001
	n				421	407	409	408
kvalita COC	r					0,128	-0,065	-0,150
	P					0,010	0,192	0,002
	n					407	409	408
lipid intenzity	r						-0,047	-0,104
	P						0,342	0,036
	n						406	405
velikost kapének	r							0,121
	P							0,014
	n							408

COC: kvalita kumulárních buněk; r: korelační koeficient; P: statistická průkaznost; n: počet případů.

5. Srovnání „novosti postupů“

Reprodukce skotu je klíčový parametr pro dosažení rentability. Jednou z možností, jak nejenom zefektivnit reprodukci, ale také dosáhnout vyššího genetického pokroku, je využití metod aspirace oocytů a jejich následného *in vitro* oplození. Kvalita aspirovaných oocytů je ovlivněna celou řadou faktorů, což je podpořeno výsledky této metodiky. Do kontextu jsou dávány nejen reprodukční parametry, ale i obsah metabolitů a indikátorů oxidačního stresu zjistitelných z krve. Zajímavým výsledkem je, že kvalitnější oocyty z pohledu vývoje a oplození byly pozorovány u zvířat s vyšší hladinou tChol a TAG v krvi. Zároveň také nižší hladina celkového antioxidačního stavu je spojena se zlepšením kvality oocytů. Také z pohledu vhodného stádia zrání aspirovaných oocytů jsou patrné určité tendence s celkovou hladinou antioxidačního stavu. Zajímavé a použitelné závislosti byly následně popsány korelačními vztahy.

Novost této metodiky spočívá v komplexnosti hodnocení metabolického a oxidačního stavu v kombinaci s hodnocením kvality oocytů. Pro lepší pochopení problematiky bude třeba dalšího sledování. Nicméně i z těchto výsledků je patrná provázanost ukazatelů a jejich potenciální použitelnost pro optimalizace doby aspirací oocytů v podmínkách komerčních stájí dojnic.

6. Popis uplatnění metodiky

Tato certifikovaná metodika poslouží chovatelům a technikům provádějící aspirace oocytů u skotu jako návod pro optimalizaci jejich výtěžnosti v návaznosti na metabolický a oxidační stres. Jak je z výše popsanych výsledků patrné, tak počet aspirovaných oocytů a jejich kvalita je ovlivňována celou řadou faktorů. Zrání a vlastní kvalita oocytů je v určitém vztahu nejen k metabolitům, ale i k ukazatelům oxidačního stresu dojnic. To bylo potvrzeno nejen předešlým výzkumem řady autorů, ale i výsledky prezentovanými v této metodice. Zároveň jsou zřejmé i jisté vztahy mezi počtem, resp. ukazateli kvality oocytů a výsledky následné reprodukce. Následné zabřezávání není příliš ovlivněno aspiracemi, nicméně při získání kvalitnějších oocytů spíše dochází k prodloužení přirozeného reprodukčního cyklu. Tyto informace mohou mít další uplatnění pro plánování aspirací a její efektivity a tím i dosahování vyššího genetického pokroku v populaci dojeného skotu. Metodika tak může mít uplatnění v rozvoji biotechnologické metody aspirace oocytů a jejich následného *in vitro* oplozování s cílem jejího vyššího využití v podmínkách ČR.

7. Ekonomické aspekty

Metody aspirace oocytů (OPU) a následné oplození *in vitro* (IVF) jsou materiálově a finančně poměrně nákladná záležitost. OPU/IVP ve srovnání s MOET (multiple ovulation and embryo transfer) vyžaduje sofistikovanější a nákladnější laboratorní prostředí. Pro realizaci OPU je zapotřebí specifické vybavení, jehož pořizovací cena je v řádu několika stovek tisíc Kč. Také chemikálie a spotřební materiál nejen při vlastní aspiraci, ale i při hodnocení kvality oocytů tvoří nedílnou součást nákladů v řádu několika desítek až stovek Kč na jeden získaný oocyt, resp. aspirovanou krávu. Tedy OPU u jedné dojnice představuje pro chovatele náklad kolem 2000 Kč. Zároveň z takovéto dojnice jsou technici schopni získat pouze určité množství oocytů, a to různé kvality. Nicméně například ve srovnání s jinými biotechnologickými metodami nemusí být tento postup tak nákladný. Náklady na jedno embryo OPU/IVP jsou přibližně dvakrát vyšší než náklady na embrya MOET (Van Wagendonk-de Leeuw 2006). Machatková et al. (2016) při porovnání nákladů na superovulaci a OPU/IVF zjistili, 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 je tak neocenitelné při rychlém rozšiřování vzácných genů a poskytne základ pro pokročilejší technologie, jako je klonování a transgenetika (Qi et al. 2013). Jedno kvalitní vyprodukované embryo pak má cenu i několik desítek tisíc Kč. Jinou, a pokročilejší otázkou je pak aplikace těchto embryí do příjemkyň a tím i procento vlastního zabřeznutí náhradních plemenic. Vzhledem k rozsahu tématu však není zmíněná problematika v této metodice rozebírána.

Při optimalizaci procesů a načasování získávání oocytů podle metabolického a oxidačního stavu dojnic je předpoklad získání nejen vyššího počtu oocytů, ale i jejich zlepšené oplozovací schopnosti. Tím může být nejen snížen průměrný náklad na jeden kvalitní *in vivo* aspirovaný oocyt, ale i cena embryí po kvalitních plemeních. Tyto aspekty podpoří vyšší rozšíření této biotechnologické metody tak, jak je již prováděna v jiných chovatelsky rozvinutých státech světa. Uvedené předpoklady a opatření mohou v jednom chovu dojeného skotu přinést roční zisky a úspory nákladů v řádu několika set tisíc Kč.

8. Seznam použité související literatury

- Aardema H., Vos PLAM., Lolicato F., Roelen BAJ., Knijn HM., Vaandrager AB., Bernd Helms J, Gadella BM. 2011. Oleic acid prevents detrimental effects of saturated fatty acids on bovine oocyte developmental competence. *Biology of Reproduction*, 85(1):62-69.
- 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(3):203-207.
- Andrlíková M., Čierníková 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., 28 s. ISBN 978-80-7305-817-3.
- 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(7):513-523.
- Bols PEJ., Vandenheede JMM., Van Soom A., de Kruif A. 1995. Transvaginal ovum pick-up (OPU) in the cow: a new disposable needle guidance system. *Theriogenology*, 43(3):677-687.
- Bols PEJ., Stout TAE. 2018. Transvaginal ultrasound-guided oocyte retrieval (OPU: Ovum Pick-Up) in cows and mares. In *Animal Biotechnology 1: Reproductive Biotechnologies* (pp. 209-233). Cham: Springer International Publishing.
- Benesova V., Kinterova V., Kanka J., Toralova T., 2017. Potential involvement of SCF-complex in zygotic genome activation during early bovine embryo development. In *Zygotic Genome Activation: Methods and Protocols* (pp. 245-257). New York, NY: Springer New York.
- Bilodeau-Goeseels S, Panich P. 2002. Effects of oocyte quality on development and transcriptional activity in early bovine embryos. *Animal Reproduction Science*, 71(3-4):143-155.
- 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(5):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.
- Cetica PD., Pintos LN., Dalvit GC., Beconi MT. 2001. Antioxidant enzyme activity and oxidative stress in bovine oocyte in vitro maturation. *IUBMB Life*, 51(1):57-64.
- Cincović M., Hristovska T., Belić B. 2018. Niacin, metabolic stress and insulin resistance in dairy cows. In *B Group Vitamins: Current Uses and Perspectives* (pp. 107-125). IntechOpen, BoD – Books on Demand, London, UK.

- Çizmecici 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*, 50:1-7.
- De Bie J., 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. *Proceedings of the 29th Annual Meeting of the Brazilian Embryo Technology Society (SBTE); Gramado, RS, Brazil. Animal Reproduction*, 12(3):791.
- Donnay I., de Roover R., van Langendonck 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(4):283-291.
- 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(3):66-71.
- 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.
- Flohé L., Günzler WA. 1984. Assays of glutathione peroxidase. *Methods in Enzymology*, 105:114-120.
- Fouks Y., Azem F., Many A., Cohen Y., Levin I., Cohen A. 2019. Fertility outcomes in patients with tubo-ovarian abscesses after an oocyte retrieval: a longitudinal cohort analysis. *Archives of Gynecology Obstetrics*, 300(3):763-769.
- Galli C., Lazzari G. 1996. Practical aspects of IVM/IVF in cattle. *Animal Reproduction Science*, 42(1-4):371-379.
- Galli C., Crotti G., Notari C., Turini P., Duchi R., Lazzari G. 2001. Embryo production by ovum pick up from live donors. *Theriogenology*, 55(6):1341-1357.
- Galli C., Duchi R., Crotti G., Turini P., Ponderato N., Colleoni S., Lagutina I., Lazzari G. 2003. Bovine embryo technologies. *Theriogenology*, 59(2):599-616.
- 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(1):138-151.
- González-Maldonado J., Rangel-Santos R., Rodríguez-de Lara R., Ramírez-Valverde G. 2019. Situations leading to oxidative stress in dairy cattle. *Iranian Journal of Applied Animal Science*, 9(2):189-195.

- Goodhand KL., Watt RG., Staines ME., Hutchinson JSM., Broadbent PJ. 1999. In vivo oocyte recovery and in vitro embryo production from bovine donors aspirated at different frequencies or following FSH treatment. *Theriogenology*, 51(5):951-961.
- Gordon I. 2003. Laboratory production of cattle embryos. 2nd edition. *CABI Publishing*, Wallingford, UK.
- Góth L. 1991. A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range. *Clinica Chimica Acta*, 196(2-3):143-151.
- Gross J., van Dorland HA., Bruckmaier RM., Schwarz, FJ. (2011). Milk fatty acid profile related to energy balance in dairy cows. *Journal of Dairy Research*, 78(4):479-488.
- Hasler JF., Henderson WB., Hurtgen PJ., Jin ZQ., McCauley AD., Mower SA., Neely B., Shuey LS., Stokes JE., Trimmer SA. 1995. Production, freezing and transfer of bovine IVF embryos and subsequent calving results. *Theriogenology*, 43(1):141-152.
- Hofírek B., Dvořák R., Němeček L., Doležel R., Pospíšil Z. et al. 2009. Nemoci skotu. *Česká buiatrická společnost, Brno: Noviko*, 1149 p.
- Kelada E., Ghani R. 2007. Bilateral ovarian abscesses following transvaginal oocyte retrieval for IVF: a case report and review of literature. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 24(4):143-145.
- Keyserlingk MAG., Olenick D., Weary DM. 2008. Acute behavioral effects of regrouping dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 91(3):1011-1016.
- 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(4):675-684.
- Leroy JLMR., Sturmey RG., Van Hoeck V., De Bie J., McKeegan P.J., Bols PEJ. 2013. Dietary lipid supplementation on cow reproductive performance and oocyte and embryo viability: a real benefit? *Animal Reproduction*, 10(3):258-267.
- Leroy JLMR., De 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(3):497-506.
- Leibfried L., First NL. 1979. Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature in vitro. *Journal of Animal Science*, 48(1):76-86.
- Lonergan P., Fair T. 2016. Maturation of oocytes in vitro. *Annual Review of Animal Biosciences*, 4(1):255-268.
- Louda F., Bjelka M., Ježková A., Pozdíšek J., Stádník L., Bezdíček L. 2007. Zásady využívání plemenných býků v podmínkách přirozené plemenitby. *Výzkumný ústav pro chov skotu, s.r.o., Rapotín*. 43 p.

- Machatková M. 2006. Vývojové trendy v produkci geneticky cenných embryí skotu superovulací a metodou in vitro. *Veterinářství*, 56:299-301.
- Machatková M., Jeřeta M. 2009. Faktory ovlivňující efektivnost produkce embryí skotu in vitro. *Náš chov*, 69(11):24-26.
- Machatková M., Hulínská P., Hanzalová K. 2016. Současné možnosti využití reprodukčních biotechnologií v chovech skotu. *Veterinářství*, 66(7):526-529.
- Machatková M., Hulínská P., Hanzalová K., Kubíčková S., Trávníčková I. 2019. Kryokonzervace embryí skotu definovaného pohlaví produkovaných in vitro pro embryotransfer. *Veterinářství*, 69(12):872-875.
- Machatková M., Trávníčková I., Hulínská P., Hanzalová K. 2021. Inovace metod produkce embryí skotu požadovaného genomu. *Ústřední veterinární správa Státní veterinární správy, Certifikovaná metodika*, 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(3):1257-1266.
- Menéndez LG., Fernández AL., Enguix A., Ciriza C., Amador J. 2001. Effect of storage of plasma and serum on enzymatic determination of non-esterified fatty acids. *Annals of Clinical Biochemistry*, 38(3):252-255.
- Merton JS., Roos APW., Mullaart E., De 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(2):651-674.
- Miętkiewska K., Kordowitzki P., Pareek CS. 2022. Effects of heat stress on bovine oocytes and early embryonic Development—an update. *Cells*, 11(24):4073.
- Nagano M., Katagiri S., Takahashi Y. 2006. Relationship between bovine oocyte morphology and in vitro developmental potential. *Zygote*, 14(1):53-61.
- Naqvi SMK., Kumar D., Paul RK., Sejian V. 2012. Environmental stresses and livestock reproduction. In: *Environmental stress and amelioration in livestock production*. (pp. 97-128). Springer, Berlin Heidelberg.
- Nigussie T. 2018. A review on the role of energy balance on reproduction of dairy cow. *Journal of Dairy Research and Technology*, 1(3):1-9.
- Palma GA., Brem G. 1995. Effect of growth factors IGFI, TGF-alpha, EGF and PDGF on development of in vitro produced bovine blastocysts. *Theriogenology*, 1(43):291.
- Petyim S., Båge R., Forsberg M., Rodríguez-Martínez H., Larsson B. 2000. The effect of repeated follicular puncture on ovarian function in dairy heifers. *Journal of Veterinary Medicine Series A*, 47(10):627-640.

- Pryce JE., Løvendahl P. 1999. Options to reduce vulnerability to metabolic stress by genetic selection. *BSAP Occasional Publication*, 24:119-127.
- Qi M., Yao Y., Ma H., Wang J., Zhao X., Liu L., Tang X., Zhang L., Zhang S., Sun F. 2013. Transvaginal ultrasound guided ovum pick-up (OPU) in cattle. *Journal of Biomimetics Biomaterials and Tissue Engineering*, 18(2):118.
- 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(8):439.
- 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(4):3642-3654.
- Roth Z. 2021. Heat stress reduces maturation and developmental capacity in bovine oocytes. *Reproduction, Fertility and Development*, 33(2):66-75.
- 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, 167 p.
- Shalev J., Mashiach R., Fisch B., Royburt M., Bar-Hava I., Krissi H., Meizner I. 2001. Sonographic diagnosis of pelvic adhesions in patients after ovum pickup. *Journal of Ultrasound in Medicine*, 20(8):869-875.
- 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(3):361-368.
- Squires EJ. 2003. Applied animal endocrinology. 3rd edition, *CABI Publishing*, Cambridge, UK.
- Stádník L., Kinterová V., Šichtař J., Ducháček J., Gašparík M., Němcová L., Procházka R., Codl R. 2024. Comparison of selected data acquisition models using on-farm production records on qualitative parameters of oocytes in dairy cows. *Czech Journal of Animal Science*, 69(1):1-10.
- Stangl M., Kühholzer B., Besenfelder U., Brem G. 1999. Repeated endoscopic ovum pick-up in sheep. *Theriogenology*, 52(4):709-716.
- Stojkovic M., Machado SA., Stojkovic P., Zakhartchenko V., Hutzler P., Gonçalves PB., Wolf E. 2001. Mitochondrial distribution and adenosine triphosphate content of bovine oocytes before and after in vitro maturation: correlation with morphological criteria and developmental capacity after in vitro fertilization and culture. *Biology of Reproduction*, 64(3):904-909.

Stubbings RB., Walton JS. 1995. Effect of ultrasonically-guided follicle aspiration on estrous cycle and follicular dynamics in Holstein cows. *Theriogenology*, 43(4):705-712.

Stupka R, et al. 2013. Chov zvířat. Powerprint, Praha, 289 p.

Štolcová M., Bartoň L., Řehák D. 2024. Milk components as potential indicators of energy status in early lactation Holstein dairy cows from two farms. *Animal*, 18(8):101235.

Thompson JG., Gardner DK., Pugh PA., McMillan WH., Tervit HR. 1994. Lamb birth weight following transfer is affected by the culture system used for pre-elongation development of embryos. *Biology of Reproduction*, 53(6):1385-1391.

Toralová T., Ducháček J., Gašparík M., Kinterová V., Marešová N., Codl R., Stádník L. 2025. The serum levels of triacylglycerols, non-esterified fatty acids and beta-hydroxybutyrate as markers of reproductive capability of primiparous dairy cows. *Journal of Animal Science*, 103:skaf276.

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(1-2):19-29.

Van Wagendonk-de Leeuw AM. 2006. Ovum pick up and in vitro production in the bovine after use in several generations: a 2005 status. *Theriogenology*, 65(5):914-925.

Viana J. 2022. 2021 statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals. *Embryo Technology Newsletter*, 40(4):22-40.

Vieira LM., Rodrigues CA., Castro Netto A., Guerreiro BM., Silveira CRA., Moreira RJC., Sá Filho MF., Bó GA., Mapletoft RJ., Baruselli PS. 2014. Superstimulation prior to the ovum pick-up to improve in vitro embryo production in lactating and non-lactating Holstein cows. *Theriogenology*, 82(2):318-324.

Wolfenson D., Roth Z. 2019. Impact of heat stress on cow reproduction and fertility. *Animal Frontiers*, 9(1):32-38.

Wrenzycki C., Herrmann D., Niemann H. 2007. Messenger RNA in oocytes and embryos in relation to embryo viability. *Theriogenology*, 68:S77-S83.

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(1):101.

9. Seznam publikací, které předcházely metodice

Toralová T., Ducháček J., Gašparík M., Kinterová V., Marešová N., Codl R., Stádník L. 2025. The serum levels of triacylglycerols, non-esterified fatty acids and beta-hydroxybutyrate as markers of reproductive capability of primiparous dairy cows. *Journal of Animal Science*, 103:skaf276.

Marešová N., Ducháček J., Codl R., Kinterová V., Toralová T., Stádník L. 2025. Metabolický stres a jeho dopad na počet a kvalitu odebraných oocytů u dojnic. *Náš chov*, 84(2):58-60.

Stádník L., Kinterová V., Šichtař J., Ducháček J., Gašparík M., Němcová L., Procházka R., Codl R. 2024. Comparison of selected data acquisition models using on-farm production records on qualitative parameters of oocytes in dairy cows. *Czech Journal of Animal Science*, 69(1):1-10.

Sekaninová J., Janků M., Bezdíček J., Ducháček J., Petřivalský M., Luhová L., Stádník L. (2024): Biochemické analýzy krve pro stanovení oxidačního stresu skotu. *Certifikovaná metodika*. ISBN: 978-80-244-6568-5.

Vrhel M., Ducháček J., Gašparík M., Vacek M., Codl R., Pytlík J. 2024. Association between production and reproduction parameters based on parity and breed of dairy cows in the Czech Republic. *Archives Animal Breeding*, 67(2):197-205.

Bezdíček J., Nesvadbová A., Ducháček J., Sekaninová J., Stádník L., Janků M. 2024. Changes in the oxidative-biochemical status in dairy cows during the transition period affecting reproductive and health parameters. *Czech Journal of Animal Science*, 69(9):345-355.

Saro J., Ducháček J., Brožová H., Stádník L., Bláhová P., Horáková T., Hlavatý R. 2024. Discrete homogeneous and non-homogeneous markov chains enhance predictive modelling for dairy cow diseases. *Animals*, 14(17):2542.

Bezdíček J., Stádník L., Ducháček J. 2023. Vliv tepelného stresu na reprodukci skotu – z pohledu jedince a na buněčné úrovni. *Výzkum v chovu skotu*, 65(4):38-40.

Ducháček J., Stádník L., Gašparík M., Pytlík J., Codl R., Ptáček M. 2023. Indikátory negativní energetické bilance a jejich vztah k výsledkům aspirace oocytů a následným reprodukčním funkcím dojnic po otelení. *Náš chov*, 83(7):22-24.

10. Seznam zkratek

OPU - odběr oocytů od živých dárcyň pomocí transvaginální aspirace (ovum pick-up)
IVP - produkci embryí *in vitro*
IVM - *in vitro* maturace embryí
IVF - *in vitro* fertilizace embryí
IVC - *in vitro* kultivace embryí
SAM - sympato-adreno-medulární osa
HPA - hypothalamo-hypofyzární
mtDNA - mitochondriální DNA
GV fáze oocyty - oocyt, který neopustil první blok meiotického dělení
MI fáze oocyty - oocyt v metafázi prvního meiotického dělení
MII fáze oocyty - oocyt v metafázi druhého meiotického dělení
NEB - negativní energetická bilance
NEFA - neesterifikované mastné kyseliny
ROS - reaktivní formy kyslíku
ATP - adenosintrifosfát
CO₂ - oxid uhličitý
TMR - směsná krmná dávka
COC - kumulární komplex oocytů
tChol - obsah celkového cholesterolu
TAG - obsah triglyceridů
BHB - obsah β-hydroxybutyrátu
SOD - superoxiddismutasa
CAT - katalasa
GPx - glutathionperoxidasa
GR - glutathionreduktasy
HSP70 - Heat Shock Protein 70
MDA - koncentrace malondialdehydu
TAS - celkový antioxidační status
TOS - oxidační status
TBA - thiobarbiturová kyselina
H₂O₂ - peroxid vodíku
CC - kumulární buňky
PBS - fosfátový pufr (phosphate-buffered saline)
BSA - bovine serum albumine
SAP - saponin
DAPI - fluorescenční barvivo (4',6-diamidino-2-fenyindol)
DIM - dny v mléce
T/P - poměr tuk ku proteinu
MOET - multiple ovulation and embryo transfer

Název:

Metodika pro optimalizaci výtěžnosti oocytů u dojnic s jejich následným *in vitro* oplozením

Podíl autorů na tvorbě metodiky:

20 % Ing. Veronika Kinterová, Ph.D.
20 % Ing. Jaromír Ducháček, Ph.D.
15 % Mgr. Tereza Toralová, Ph.D.
10 % Ing. Matúš Gašparík, Ph.D.
5 % Ing. Nikola Marešová
5 % Ing. Radim Codl, Ph.D.
5 % doc. Ing. Jiří Bezdíček, Ph.D.
5 % Mgr. Jana Sekaninová, Ph.D.
5 % Mgr. Martina Janků, Ph.D.
5 % prof. Ing. Luděk Stádník, Ph.D.
5 % prof. Mgr. Marek Petřivalský, Dr.

Vydavatel:

Česká zemědělská univerzita v Praze

Vydal:

Katedra chovu hospodářských zvířat, FAPPZ ČZU v Praze, Kamýcká 129, 165 00 Praha – Suchbát

Místo vydání:

Praha

Forma vydání:

Metodika je vydávána pouze elektronicky

Zveřejněno na webové stránce:

<https://katedry.czu.cz/ksz/chov-skotu>

Podíl firem na tvorbě metodiky:

35 % Ústav živočišné fyziologie a genetiky AV ČR v.v.i.
45 % Česká zemědělská univerzita v Praze
20 % Univerzita Palackého v Olomouci

Podíl projektů na tvorbě metodiky:

100 % QK22010270 - Optimalizace řízení individuální reprodukční výkonnosti dojeného skotu

Pořadí vydání: 1.**Rok vydání: 2025****ISBN 978-80-213-3516-5**