



CERTIFIKOVANÁ METODIKA

**Inovace produkce embryí skotu
z oocytů získaných metodou ovum pick up**

**Ing. Marie Machatková, CSc.
Ing. Ivona Trávníčková
MVDr. Pavlína Hulínská, Ph.D.**

CERTIFIKOVANÁ METODIKA č. 144/2022

Inovace produkce embryí skotu z oocytů získaných metodou ovum pick up

Autoři

Ing. Marie Machatková, CSc.

Ing. Ivona Trávníčková

MVDr. Pavlína Hulínská, Ph.D.

ISBN 978-80-7672-027-5

2022

v y d á v á

OSVĚDČENÍ

SVS/2022/150583-G

o uznání metodiky v souladu s podmínkami Metodiky hodnocení výzkumných organizací a programů účelové podpory výzkumu, vývoje a inovací, schválené usnesením vlády dne 8. února 2017, číslo 107 a její samostatné přílohy č. 4 schválené usnesením vlády dne 29. listopadu 2017 č. 837.

Název metodiky: **Inovace produkce embryí skotu z oocytů získaných metodou ovum pick up**

Autoři: **M. Machatková, I. Trávníčková, P. Hulínská**

Název organizace: **Výzkumný ústav veterinárního lékařství v. v. i.**

Místo vydání: Brno

Rok vydání: 2022

Metodika byla vypracována v rámci podpory na rozvoj výzkumné organizace č. MZE-RO0522.

Jméno zástupce odborného útvaru státní správy:

MVDr. Zbyněk Semerád

Funkce zástupce odborného útvaru státní správy:

ústřední ředitel

V Praze, dne 21. 11. 2022

Dokument je podepsán elektronickým podpisem	
Podepisující:	MVDr. Zbyněk Semerád
Organizace, OJ:	Státní veterinární správa
Sériové č. cert.:	22609038
Vydavatel cert.:	PostSignum Qualified CA 4
Datum a čas:	14.12.2022 15:03:26
Důvod:	Výtěženo
Místo:	Praha

.....
Digitálně podepsal zástupce
odborného útvaru státní správy

Souhlas ředitele Odboru precizního zemědělství, výzkumu a vzdělávání MZe:

V Praze..... dne

**Mgr. Jan
Radoš**

Digitálně podepsal
Mgr. Jan Radoš
Datum: 2022.12.20
11:28:35 +01'00'

.....
Podpis/elektronický podpis ředitele
Odboru precizního zemědělství,
výzkumu a vzdělávání

Obsah

I)	Úvod	1
II)	Cíle a vývoj metodiky	2
	2.1 Optimalizace získávání oocytů	2
	2.2 Modifikace techniky aspirace oocytů	3
	2.3 Modifikace systému oplození oocytů	3
	2.4 Inovace metod OPU/IVF	4
III)	Vlastní popis metodiky	4
	3.1 Výběr donorek	4
	3.2 Aspirační protokol	5
	3.3 Aspirační zařízení	5
	3.4 Aspirace oocytů	5
	3.5 Selektce oocytů	5
	3.6 Zrání oocytů	6
	3.7 Izolace spermií	6
	3.8 Oplození oocytů	6
	3.9 Kultivace raných embryí	7
IV)	Srovnání novosti postupů	8
V)	Popis uplatnění certifikované metodiky	8
VI)	Ekonomické aspekty metodiky	9
VII)	Seznam použité související literatury	9
VIII)	Seznam publikací předcházející metodice	10
IX)	Dedikace	11
X)	Jména oponentů	11
XI)	Podíl práce	11

I. Úvod

Reprodukční biotechnologie významně zvyšují efektivitu šlechtění hospodářských zvířat a přispívají k dosažení chovatelských cílů. Dnes již rutinně využívané technologie asistované reprodukce, jako jsou umělá inseminace i vícečetná superovulace a embryotransfer (MOET), zvyšují intenzitu selekce, zkracují generační interval a zrychlují genetický progres. V posledních letech jsou rozvíjeny další, technologicky náročnější metody, které umožňují efektivněji využívat samčí i samičí materiál geneticky cenných jedinců (Sirard 2018; Kadarmideen et al 2015). Mezi tyto metody patří především genomická selekce zvířat, sexování spermatu býků, a produkce embryí in vitro (IVP) z oocytů získaných technikou ovum-pick up (OPU) a oplozených sexovanými spermii (OPU/IVF), které jsou využitelné jak pro přímý embryotransfer (OPU/IVF/ET), tak i kryokonzervaci (OPU/KET).

Na rozdíl od chovatelsky vyspělých zemí EU nenašla dosud progresivní metoda produkce potomstva od genomicky selektovaných rodičů metodou OPU/IVF/ET v České republice adekvátní uplatnění. Hlavními důvody jsou především limitovaný počet oocytů získaných jednorázovou aspirací, nižší vývojová kompetence získaných oocytů (Jeseta et al 2014; Machatkova et al 2012), ale i specifické podmínky oplození, které jsou nezbytné u sexovaných spermií (Carvalho et al 2010; Xu et al 2009). Důsledkem je nižší účinnost produkce embryí požadovaného genomu ve srovnání s produkcí embryí pro experimentální účely.

V současné době jsou pro produkci OPU/IVP embryí využívány krávy a jalovice nezávisle na stádiu jejich ovariálního cyklu, proto jsou získané výsledky značně variabilní. Aby byla metoda efektivnější, jsou donorky ve většině zemí s vyspělým chovem skotu před každou aspirací oocytů ošetřeny standardními dávkami folikostimulačních hormonů (FSH), což klade značné nároky na organismus zvířat a snižuje počet potenciálních odběrů oocytů.

Autoři metodiky prokázali, že aplikaci FSH donorkám před OPU lze eliminovat a zisk oocytů lze zvýšit alternativní metodou opakované OPU provedené po synchronizaci folikulárních vln probíhajících u skotu během folikulogeneze (Machatkova et al 2000; 2008). Meiotickou a vývojovou kompetenci získaných oocytů je možné potencovat během zrání suplementací kultivačního média specificky účinnými látkami, jako jsou epidermální růstový faktor (EFG) nebo aktivátor mitochondrií L-carnitin (Knitlova et al 2017).

Následně potvrdili, že do procesu oplození sexovanými spermii lze cíleně zasáhnout pomocí účinnějších kapacitačních stimulans jako jsou kombinace heparinu, penicillaminu, hypotaurinu a epinefrinu (PHE mixu) nebo heparinu a kofeinu, ale i modifikací podmínek interakce kapacitovaných spermií se zralými oocyty v kokultivačním systému (Travníková et al 2021).

II. Cíle a vývoj metodiky

Cílem metodiky bylo inovovat technologické postupy produkce embryí skotu od geneticky cenných jedinců na základě modifikací metody OPU/IVF. Optimalizovat přípravu donorek pro opakovanou punkci folikulů, zvýšit zisk a vývojovou kompetenci získaných oocytů a zefektivnit jejich oplození sexovanými spermiemi elitních býků na úroveň, která by umožnila využít IVP embrya jak pro šlechtění chovů (OPU/IVF/ET), tak i pro kryokonzervaci (OPU/IVF/KET) a tvorbu genových zdrojů.

V rámci uvedených záměrů autoři realizovali experimenty, ve kterých se zaměřili na následující dílčí cíle:

- ✓ Optimalizovat získávání oocytů
- ✓ Modifikovat techniku aspirace oocytů
- ✓ Modifikovat systém oplození oocytů
- ✓ Inovovat metody OPU/IVF

Výsledky provedených experimentů formulovali do následujících dílčích závěrů.

2.1 Optimalizace získávání oocytů

Základním předpokladem pro zařazení donorky do programů OPU/IVF/ET je její reprodukční zdraví, které je rozhodující pro zisk vývojově kompetentních oocytů schopných dokončit meiotické zrání, prodělat monospermické oplození a zahájit raný embryonální vývoj.

Autoři prokázali korelaci mezi stádiem folikulogeneze, funkčním stavem folikulů a vývojovým potenciálem oocytů po oplození. Úspěšnost získávání oocytů bylo možno významně ovlivnit sonografickým vyšetřením ovárií před OPU a využitím definovaného stádia první nebo druhé folikulární vlny během spontánního nebo synchronizovaného ovariačního cyklu.

Potvrdili relativně vysoký vývojový potenciál oocytů aspirovaných z ovariačního cortexu, ve stádiu růstu/stagnace ve srovnání se stádiem dominance/regrese folikulární vlny, kdy selekce dominantního folikulu (DF) vyvolá atresii všech podřízených folikulů a sníží vývojovou schopnost těchto oocytů.

Nejvyšší vývojový potenciál v první folikulární vlně vykazovaly oocyty ze středně velkých folikulů o velikosti 5-9 mm získané 3. den po říji/ovulaci, kdy se až 50 % z oplozených oocytů se vyvíjelo do stádia blastocysty. Pro odběr vývojově kompetentních oocytů bylo možno využít i středně velké folikuly z druhé folikulární vlny vznikající na ováriích 14 - 16 estrálního cyklu.

Zjistili, že nezávisle na stádiu ovariačního cyklu lze folikulogenezi u donorek stimulovat pomocí opakovaných punkcí všech folikulů nacházejících se na ováriích, a to v intervalech 48 - 72 hodin.

2.2 Modifikace techniky aspirace oocytů

Mezi faktory, které významně ovlivňují zisk a kvalitu oocytů, patří vedle funkčního stavu a lokalizace folikulů, také technika punkce folikulů a aspirace oocytů. Výběr aspiračního zařízení a jeho technických parametrů byl rozhodující pro získání požadovaného počtu morfologicky kvalitních a vývojově kompetentních oocytů.

Autoři zjistili, že zvýšení průtoku aspiračního média (z 20 ml na 40/ml/min) sice zvýšilo průměrný podíl použitelných oocytů (54,9% vs 69,1%), současně však snížilo podíl morfologicky kvalitních oocytů (62,3% vs 30,6%).

Prokázali, že aspirační zařízení, které eliminovalo kolísání hodnot vakua během aspirace, signifikantně zvýšilo podíl morfologicky kvalitních oocytů (61,2% vs 42,4%) a snížilo podíl poškozených oocytů (38,8% vs 57,6%).

Modifikace aspiračního zařízení, použitého setu i techniky odběru umožnila kontinuální punkci folikulů a aspiraci oocytů za konstantního průtoku 20 ml aspiračního média/min.

Modifikace pohybu aspirační jehly spočívající v lehce kmitavém pohybu zvýšila průměrný podíl oocytů použitelných pro IVF na 57,1 % z celkového počtu punktovaných folikulů (recovery rate).

Modifikovaná technika odběru umožnila dosáhnout vyšší zisk vývojově kompetentních oocytů ve srovnání se standardní technikou punkce jednotlivých sonograficky viditelných folikulů a aspirací oocytů pomocí komerčně dostupných setů.

2.3 Modifikace systému oplození oocytů

Předpokladem pro úspěšnou fertilizaci oocytů v systému *in vitro* je dostatek motilních spermií s intaktním akrozomem, které je třeba izolovat z komerčních inseminačních dávek. Autoři zjistili, že u sexovaných spermií je motilita i viabilita snížena a nástup akrozomální reakce je akcelerován v podmínkách *in vitro* ve srovnání s nesexovanými spermiemi shodných býků.

Bylo potvrzeno, že reakce sexovaných spermií na kapacitační agens a kultivační systém, které jsou rozhodující pro účinnost penetrace zralých oocytů, tvorbu zygot a vývoj raných embryí, je odlišná než je tomu u nesexovaných spermií.

Bylo prokázáno, že průběh interakce gamet a účinnost oplození oocytů se významně liší u sexovaných spermií, pokud jsou stimulovány různými kapacitačními agens a interagují s oocyty v odlišném kokultivačním prostředí.

Na základě kinetiky a účinnosti oplození byla modifikována metoda IVF v mikrosystému pro limitovaný počet oocytů získaných jednorázovou aspirací od individuálních dárkyní a sexované spermie elitních býků.

2.4 Inovace metod OPU/IVF

Inovace metod OPU/IVF je založena na poznatcích, že vývojová kompetence oocytů a produkce embryí po OPU/IVF je, vedle reprodukčního zdraví donorky, závislá především na funkčním stavu folikulů a úrovni atresie oocytů v době jejich odběru.

Metoda OPU spočívající v kontinuální punkci neatretických folikulů a aspiraci vývojově kompetentnějších oocytů pomocí modifikovaného zařízení a aspiračního setu umožnila získat 8 - 21 oocytů/OPU, z nich průměrně 7 bylo použitelných pro IVF.

Pro získání požadovaného počtu embryí bylo nutné aspirovat oocyty opakovaně podle adekvátního aspiračního schematu. Nejefektivnější pro odběr oocytů od cyklujících dárkyní byl protokol založený na vícečetné synchronizaci říje/ovulace a nástupu první folikulární vlny, kdy bylo možno připravit až 2 embrya na jednu OPU/IVF.

Modifikace metody oplození zralých oocytů sexovanými spermii v mikrosystému významně zvýšila produkci embryí využitelných pro ET nebo kryokonzervaci ve srovnání s makrosystémem. Relativní podíl oocytů vyvíjejících se do požadovaných embryonálních stádií byl závislý na zvolené kombinaci rodičů a dosáhl průměrně 20,5 % přenosuschopných embryí.

Bylo ověřeno, že transvaginální aspirace oocytů po dobu 2-3 měsíců v intervalu 10 dnů stimuluje folikulogenezi a neovlivňuje negativně další reprodukční schopnost donorky včetně její odezvy na superovulaci. Základním předpokladem úspěšnosti u vysokoužitkových krav byl pravidelný estrální cyklus a účinná prevence tvorby cyst.

Navržené technologické postupy byly ověřeny v podmínkách chovatelské praxe. Po transferu kryokonzervovaných OPU/IVF embryí do synchronizovaných příjemkyní byla získána 59,4% gravidita, která odpovídá průměrnému podílu březích příjemkyní po ET embryí získaných superovulací.

III. Vlastní popis metodiky

3.1 Výběr donorek

Pro OPU jsou většinou využívány cyklující krávy, v laktaci i mimo ni a krávy v 1. trimestru březosti. Metodu lze použít také u časně postpubertálních jalovic a krav bez odezvy na superovulační ošetření. Folikulární vývoj acyklických zvířat je vhodné stimulovat pomocí 2-3 předběžných aspirací. Vylučují se pouze zvířata s opakovanou tvorbou cyst nebo ta, od kterých nebyly během testačních aspirací získány použitelné oocyty.

3.2 Aspirační protokol

U cyklujících donorek je nejefektivnější punktovat sonograficky dobře viditelné folikuly (≥ 5 mm, ve stádiu růstu/stagnace první folikulární vlny, vždy 3. den po říji/ovulaci, a aspirovat oocyty v pravidelných intervalech 10-ti dnů. V tomto případě je třeba aplikovat 2ml Oestrophanu vždy 4. den po provedené aspiraci a 1 ml Pregnylu (1.500 m.j.) v den nástupu říje (protokol I).

Za předpokladu adekvátní výživy a ošetřování donorek lze aplikovat OPU v intervalu dvakrát týdně buď po spontánní nebo prostaglandiny synchronizované říji. Vždy 3. den po říji inhibovat další průběh estrálního cyklu ablací DF, vyvolat opakovaný nástup folikulárních vln pomocí punkce všech folikulů ≥ 5 mm a aspirovat oocyty v intervalech 3 a 4 dnů (protokol II).

U donorek v 1. trimestru březosti lze využívat fyziologické folikulární vlny, které vznikají na ováriích donorek spontánně v době mezi 60. - 90. dnem. Oocyty lze aspirovat v intervalu 5 dnů, poněvadž během gravidity nedochází k selekci DF (protokol III).

3.3 Aspirační zařízení

Modifikované aspirační zařízení je tvořeno ochrannou nerezovou trubicí s procházející silikonovou hadičkou, která je spojena s aspirační zkumavkou a opatřena jednorázovou injekční jehlou typu 19 G1. Vakuum ve zkumavce je vytvářeno pomocí ručně ovládané pumpy s kontrolním manometrem umožňující dosáhnout konstantního průtoku aspiračního média v rozmezí 15 - 20 ml/min.

Oocyty jsou aspirovány do Tyrodova modifikovaného média s albuminem, laktátem a pyruvátem doplněného 10 i.u. heparinu/ml média, které bylo před použitím ekvilibrováno po dobu 24 hodin při 39 °C v atmosféře vzduchu s 5 % CO₂.

3.4 Aspirace oocytů

Před zákrokem je nutné potvrdit stádium folikulogeneze u donorky sonografickým vyšetřením a následně aplikovat 5 ml 2% prokainu epidurálně a 5ml uterus relaxans intravenózně do podocasní žíly. Každé z ovárií je fixováno přes vaginální stěnu tak, aby penetrující jehla pronikla až do ovariálního cortexu. Folikuly ≥ 5 mm jsou palpovány a punktovány kontinuálním pohybem ovária proti jehle směrem dorzoventrálním, vždy z apikální části ovária do ekvatoriální roviny. Účinnost aspirace folikulární tekutiny s oocyty je vhodné potvrdit následným sonografickým vyšetřením ovárií donorky.

3.5 Selekce oocytů

Získané oocyty jsou nejdříve zachyceny na síťce z uhelony a následně spláchnuty médiem PBS Dulbecco do Petriho misky. Pro izolaci oocytů je použito médium E-199 s 10 % estrálního bovinního séra (ECS) stabilizované Hepesem. Oocyty použitelné pro IVF jsou selektovány pomocí stereomikroskopu při zvětšení 50 x, zatímco oocyty s neukončeným růstem, výraznými defekty cytoplazmy nebo prosté kumulárních buněk jsou eliminovány.

Morfologicky kvalitní oocyty jsou vloženy do mikrozkrumavek s 2 ml zracího média bez hormonů ekvilibrovaném v atmosféře 5 % CO₂ při teplotě 38,5 °C po dobu 24 hodin. Do IVF laboratoře jsou transportovány co nejdříve v termoboxu s konstantní teplotou 38,5 °C.

3.6 Zrání oocytů

V laboratoři jsou oocyty přeneseny do mikroplošny (NUNCLON) s 500 µl zracího média/jamku. Zrání probíhá v médiu TCM-199 doplněném 5 % ECS, 0,2 mM pyruvátem sodným, antibiotiky (50 i.u./ml penicilinu, 50 µg/ml streptomycinu) a hormony (FSH/LH; P.G. 600; 15 i.u./ml; EGF (50 ng/ml). Zrací médium je nejdříve ekvilibrováno po dobu 1 hodiny, kdy je přidáno mitochondriální stimulans L-carnitin v koncentraci 2,5 mM a znovu ekvilibrováno po dobu nejméně 2 hodin. Oocyty zrají při teplotě 38,5 °C, v atmosféře s vysokou vzdušnou vlhkostí a 5 % CO₂ po dobu 24 hodin.

3.7 Izolace spermií

Zatímco u nesexovaných inseminačních dávek lze izolovat motilní spermie pomocí standardních metod swip up nebo na gradientu Percollu, u sexovaných inseminačních dávek je nezbytné použít pro separaci motilních spermií s intaktním akrozomem pouze modifikovanou metodu gradientu Percollu. Modifikace techniky separace motilních spermií ze sexovaných inseminačních dávek elitních býků byly autory detailně popsány v dřívějších certifikovaných metodikách (Machatková et al 2009a; Machatková et al 2013; Machatková et al 2017).

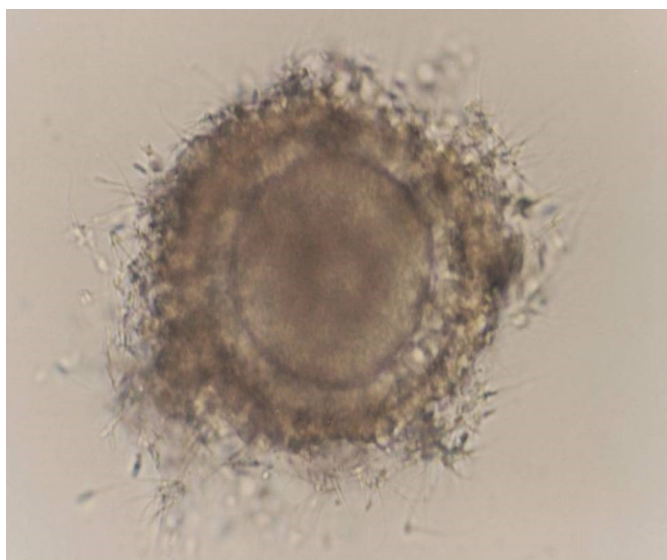
3.8 Oplození oocytů

Aby získal IVP embryí byl co nejvyšší, je zcela zásadní testovat před prvním OPU fertilizační schopnost sexovaných spermií býka na populaci oocytů jatečných krav a během opakovaných OPU modifikovat podmínky jak kapacity, tak i oplození průběžně, na základě účinnosti vývoje embryí produkovaných od konkrétních rodičů.

Metody testace fertilizační schopnosti nesexovaných i sexovaných spermií plemenných býků v *in vitro* systému a kokultivační systémy vhodné pro oplození zralých oocytů byly již také publikovány (Machatková et al 2009b; Machatková et al 2017; Machatková et al 2021).

3.9 Kultivace raných embryí

Za 20 hodin po oplození jsou potenciální zygoty zbaveny kumulárních buněk pomocí mikropipety a přeneseny na buněčný monolayer stabilní linie BRL (Buffalo rat liver cells, ATCC, USA). Pro kultivaci je používáno medium B2 Menezo s 10 % ECS stabilizované 0,2 mM Hepesem. Embrya se vyvíjejí při teplotě 38,5 °C v atmosféře vzduchu s 5 % CO₂ po dobu 7-8 dnů do stádií časně až expandující blastocysty, kdy mohou být využity jak pro přímý ET, tak i kryokonzervaci.



Obr.1 - Oocyt po OPU/IVF (nativní, zvětšení 200 ×)



Obr.2 - Jalovička narozená po aplikaci metod OPU/IVF/ET

IV. Srovnání novosti postupů

Přestože metody OPU/IVF/ET jsou v současné době intenzivně využívány v oblasti reprodukce a šlechtění skotu, jejich účinnost je stále relativně nízká. Jedním z důvodů je skutečnost, že pro produkci OPU/IVF embryí je k dispozici limitovaný počet oocytů s vysoce heterogenní meiotickou a vývojovou kompetencí, které jsou získávány od donorek nezávisle na stádiu folikulogeneze. Převážná většina oocytů je tak aspirována v době, kdy má nízkou schopnost dokončit jaderné i cytoplazmatické zrání a po oplození se vyvíjet do přenosuschopných embryonálních stádií. Aby byla zvýšena účinnost metody, je folikulogeneze donorek před OPU často stimulována pomocí gonádotropních hormonů, což zvyšuje náročnost metody z hlediska technologie, času i nákladů.

Navržené metodické postupy se liší od dosud běžně používaných postupů tím, že oocyty jsou získávány od donorek ve stádiu vrcholného folikulárního růstu a nízké míry atresie, pomocí modifikovaného aspiračního zařízení a techniky kontinuální punkce folikulů, což zvyšuje kvalitu získaných oocytů a produkci embryí.

Aspirace oocytů v definovaných stádiích folikulogeneze, bez nutnosti superovulace dárkyní, přispívá k efektivnějšímu využití reprodukčního potenciálu vysokoužitkových krav, poněvadž zvyšuje zisk použitelných oocytů i produkci viabilních a kryotolerantních embryí pro přímý embryotransfer nebo kryokonzervaci.

Ve srovnání se současnými postupy autoři vypracovali technologii, která umožňuje dosáhnout srovnatelné účinnosti a je méně náročná z hlediska metodologie, času i finančních nákladů. Navíc metoda OPU je aplikovatelná přímo u chovatele, a to na stání, bez nutnosti fixace zvířat v kleci nebo jejich transportu do specializovaných center asistované reprodukce, jak je standardní postup v chovatelsky vyspělých zemích.

V. Popis uplatnění certifikované metodiky

Transvaginální aspirace oocytů od vysokoužitkových krav a geneticky cenných jalovic, zrání a oplození oocytů jak nesexovanými, tak i sexovanými spermii elitních býků a embryotransfer nebo kryokonzervace embryí patří mezi technologie intenzivně využívané v chovatelsky vyspělých státech EU jak pro šlechtění, tak i pro tvorbu genových zdrojů. Aplikace metod OPU/IVF/ET a jejich další rozvoj odpovídá současným požadavkům chovatelů i strategickým cílům chovatelských svazů.

Autoři metodiky vyvinuli z hlediska technologie, času i nákladů efektivnější postupy, které jsou aplikovatelné v podmínkách chovatelské praxe.

Inovované metody OPU/IVF jsou určeny specializovaným laboratořím, které jsou oprávněny k produkci a přenosu IVP embryí od geneticky cenných zvířat, subjektům poskytujícím chovatelům služby v oblasti reprodukce a šlechtění skotu a současně i špičkovým

chovatelům s reálnými předpoklady využívat metody reprodukčních biotechnologií pro své šlechtitelské záměry.

VI. Ekonomické aspekty metodiky

Inovovaná metoda OPU/IVF zahrnující efektivnější odběr, zrání a oplození oocytů přispívá ke zvýšení produkce vývojově kompetentních a kryotolerantních embryí pro embryotransfer nebo kryokonzervaci. Ve srovnání se standardními technologickými postupy inovované postupy významně snižují finanční náklady na přípravu donorek, vlastní realizaci metody OPU, produkovaná embrya a ET, ale také náklady na porod a odchov potomstva požadovaného genomu, včetně pohlaví. Především v chovech dojeného skotu je transfer embryí samičího pohlaví od genomicky selektovaných rodičů nejen chovatelským, ale i ekonomickým přínosem.

Konkrétní ekonomický přínos aplikace metod OPU/IVF/ET pro chovatele je závislý na plemenné hodnotě rodičů embryí, úrovni reprodukce a strategii šlechtění realizovanou v konkrétním chovu.

Zvýšení zisku kvalitních oocytů a embryí je přínosem pro tvorbu a uchování genetických rezerv jak u hospodářských zvířat (HZ), tak i ohrožených nebo společensky využívaných živočišných druhů. Inovované metody jsou využitelné také v oblasti humánní asistované reprodukce.

Dostatečné zdroje kvalitních cytoplasm i embryí HZ jsou základním předpokladem pro další vývoj reprodukčních biotechnologií jako jsou klonování nebo transgeneze.

VII. Seznam použité související literatury

CARVALHO, J. O., SARTORI, R., MACHADO, G. M., MOURAO, G. B., DODE, M. A. Quality assessment of bovine cryopreserved sperm after sexing by flow cytometry and their use in in vitro embryo production. *Theriogenology* 2010;74:1521-1530.

JESETA, M., CTVRTLIKOVÁ-KNITLOVÁ, D., HANZALOVÁ, K., HULINSKÁ, P., MILAKOVIC, I., NEMCOVÁ, L., KANKA, J., MACHATKOVÁ, M. Mitochondrial patterns in bovine oocytes with different meiotic, competence related to their in vitro maturation. *Reprod Dom Anim* 2014;49:469–475.

KADARMIDEEN, N., MAZZONI, G., WATANABE, Y., SRTOBECH, L., BARUSELLI, P., MEIRELLES, F., CALLESEN, H., HYTTEL, P., FERRAZ, J., NOGUEIRA, M. Genomic selection of in vitro produced and somatic cell nuclear transfer embryos for rapid genetic improvement in cattle production. *Anim Reprod* 2015;12(3):389–396.

KNITLOVA, D., HULINSKA, P., JESETA, M., HANZALOVA, K., KEMPISTY, B., MACHATKOVA, M. Supplementation of L-carnitine during in vitro maturation improves embryo development from less competent bovine oocytes. *Theriogenology* 2017;102:16–22.

MACHATKOVA, M., JESETA, M., HULINSKA, P., KNITLOVA, D., NEMCOVA, L., KANKA, J. Characteristics of bovine oocytes with different meiotic competence in terms of their mitochondrial status and expression of nuclear-encoded factors. *Reprod Dom Anim* 2012, 47(5):806–814.

MACHATKOVA M., HULINSKA P., RECKOVA Z., HANZALOVA K., SPANIHELOVA J. POSPISIL R. In vitro production of embryos from high performance cows and the development of frozen-thawed embryos after transfer: a field study. *Vet Med-Czech*, 2008, 53: 358-364.

MACHATKOVA, M., JOKESOVA, E., HORKY, F., KREPELOVA, A. Utilization of the growth phase of the first follicular wave for bovine oocyte collection improves blastocyst production. *Theriogenology* 2000;54(4):543–550.

SIRARD, M. A. Review: 40 years of bovine IVF in the new genomic selection context. *Reproduction* 2018;156:1–7.

TRAVNICKOVA, I., HULINSKA, P., KUBICKOVA, S., HANZALOVA, K., KEMPISTY, B., NEMCOVA, L., MACHATKOVA, M. Production of sexed bovine embryos in vitro can be improved by selection of sperm treatment and co-culture system. *Reprod Dom Anim* 2021;56:864–871.

XU J., CHAUBAL S., DU F. Optimizing IVF with sexed sperm in cattle. *Theriogenology* 2009;71:39-47.

VIII. Seznam publikací předcházející metodice

M. MACHATKOVÁ, I. TRAVNÍČKOVÁ, P. HULÍNSKÁ, K. HANZALOVÁ. Inovace metod produkce embryí skotu požadovaného genomu. Certifikovaná metodika SVS/2021/116652-G, 2021, s.10, ISBN 978-80-7672-011-4.

M. MACHATKOVÁ, P. HULÍNSKÁ, K. HANZALOVÁ. Příprava bovinních embryí definovaného pohlaví v systému in vitro. Certifikovaná metodika SVS/2018/141169-G, 2018, s. 10, ISBN 978-80-88233-32-9.

M. MACHATKOVÁ, P. HULÍNSKÁ, K. HANZALOVÁ. Metoda fertilizace oocytů sexovanými spermii plemenných býků in vitro. Certifikovaná metodika SVS/2017/142514-G, 2017, s. 12, ISBN 978-80-86895-12-3.

M. MACHATKOVÁ, M. JEŠETA, D. KNITLOVÁ, K. HANZALOVÁ. Diferencované zrání bovinních oocytů využitelných pro reprodukční biotechnologie. Certifikovaná metodika SVS/2013/054311-G, 2013, s. 9, ISBN 978-80-86895-32-1.

M. MACHATKOVÁ, P. HULÍNSKÁ, M. JEŠETA, K. HANZALOVÁ, Z. REČKOVÁ. Příprava kryotolerantních embryí skotu in vitro. Certifikovaná metodika SVS 19/2009, 2009a, s. 11, ISBN 80-86895-10-6.

M. MACHATKOVÁ, M. JEŠETA, P. HULÍNSKÁ, Z. REČKOVÁ, K. HANZALOVÁ. Predikce fertility býků in vitro pomocí penetračního testu. Certifikovaná metodika SVS 18/2009b, 2009, s. 8, ISBN 80-86895-09-2.

IX. Dedikace

Metodika vznikla na základě poznatků získaných v rámci řešení projektu MZE-RO 0522-VZ014, který je součástí DKRVO.

X. Jména oponentů

MVDr. Miroslava Lutzová
Ústřední veterinární správa
SVS
Slezská 100/7
120 56 Praha 2

Prof. Ing. Ladislav Máchal, DrSc.
Mendelova univerzita v Brně
Agronomická fakulta
Zemědělská 1665/1
613 00 Brno

XI. Podíl práce

Ing. Marie Machatková, CSc. - 50 %
Ing. Ivona Trávníčková - 25 %
MVDr. Pavlína Hulínská, Ph.D. - 25 %



Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i.
Hudcova 296/70
621 00 Brno
Czech Republic
Tel.: +420 5 3333 1111; www.vri.cz; e-mail: vri@vri.cz