



CERTIFIKOVANÁ METODIKA

Příprava bovinních embryí definovaného pohlaví v systému in vitro

**Ing. Marie Machatková, CSc.
MVDr. Pavlína Hulínská, Ph.D.
Mgr. Kateřina Hanzalová**

93
2018

UPLATNĚNÁ CERTIFIKOVANÁ METODIKA, č. 93

Příprava bovinních embryí definovaného pohlaví v systému in vitro

Autoři

Ing. Marie Machatková, CSc.

MVDr. Pavlína Hulínská, Ph.D.

Mgr. Kateřina Hanzalová

Osvědčení o uplatnění certifikované metodiky: SVS/2018/141169-G

Vydalo: Státní veterinární správa, Praha, 23.11.2018

ISBN 978-80-88233-32-9

2018

Obsah

I)	Úvod	1
II)	Cíle a vývoj metodiky	2
	2.1. Zvýšení kvality oocytů během zrání	2
	2.2 Charakteristika vlivu fertilizačního prostředí na pohlaví	3
	2.3. Optimalizace produkce embryí požadovaného genomu	3
	2.4. Ověření vývoje embryí po kryokonzervaci	3
	2.5. Ověření pohlaví přenosuschopných embryí	4
III)	Vlastní popis metodiky	4
	3.1. Příprava embryí definovaného pohlaví	4
	3.1.1. Zrání oocytů	4
	3.1.2. Separace viabilních spermií a testace býků	5
	3.1.3. Optimalizace oplození oocytů	5
	3.1.4. Kultivace raných embryí	5
	3.1.5. Kryokonzervace embryí	6
IV)	Srovnání novosti postupů	6
V)	Popis uplatnění certifikované metodiky	7
VI)	Ekonomické aspekty metodiky	8
VII)	Seznam použité literatury	8
VIII)	Seznam publikací předcházející metodice	9
IX)	Dedikace	10
X)	Jména oponentů	10
XI)	Podíl práce	10

I. Úvod

Základním předpokladem intenzivního využívání reprodukčních biotechnologií ke šlechtění hospodářských zvířat je další rozvoj současných, u skotu již rutinně používaných postupů a zavedení nových metod na vyšší technologické úrovni. Jedním z nejefektivnějších způsobů, jak využít geneticky cenné jedince k systematickému šlechtění skotu, je v chovatelsky vyspělých zemích EU intenzivně používaná metoda opakované transvaginální aspirace oocytů - ovum pick up (OPU) a následná fertilizace oocytů in vitro (OPU/IVF). Systematické získávání oocytů od vysokoužitkových krav a geneticky cenných jalovic, jejich oplození sexovanými spermii elitních býků a produkce embryí definovaného pohlaví in vitro (IVP) však stále patří mezi relativně náročné biotechnologické postupy. Hlavní předností využití sexovaných dávek k produkci geneticky cenných embryí je skutečnost, že embrya produkovaná pro přímý embryotransfer nebo kryokonzervaci splňují z více než 90 % pravděpodobností požadavky chovatele na samčí nebo samičí pohlaví. Vzhledem k tomu, že počet oocytů získaných od individuálních donorek během jedné aspirace je relativně nízký, je vysoce účelné využívat sexované sperma pro oplození a připravit embrya predikovaného pohlaví bez nutnosti je vystavovat biopsii a sexování před transferem do synchronizovaných příjemkyní nebo před kryokonzervací.

Důležitým předpokladem pro širší uplatnění sexovaných inseminačních dávek při produkci geneticky cenného potomstva je vyšší úspěšnost zabřezávání po inseminaci i efektivnější metody získávání IVP embryí (Lu and Seidel 2004; Becker et al. 2012). Zcela zásadní pro zvýšení fertilizační schopnosti spermií jsou šetrnější technologie sexování a modifikace standardně používaných postupů inseminace i IVF. Vývoj účinnějších metod sexování bovinních spermií je dlouhodobým předmětem zájmu základního výzkumu i komerčních firem, přičemž snahy, jak zlepšit technologii sexování a zvýšit fertilizační schopnost sexovaných spermií, jsou vedeny dvěma směry, postupným zdokonalováním současných metod sexování pomocí průtokové cytometrie a vývojem zcela nových technologických postupů (Seidel et al. 2012; Machatková et al. 2015). Dosud provedené studie potvrzují, že ve srovnání s dávkami konvenčními mají sexované dávky nižší kvalitu z hlediska koncentrace, motility, integrity buněčných membrán i funkčního stavu akrozomu (Calvalho et al. 2010). Současně ukazují, že dopad procesu sexování na fertilizační schopnost může být závislý na geneticky podmíněné odolnosti spermií individuálních býků k fyzikálnímu a chemickému stresu, kterému jsou spermie vystaveny během procesu sexování (Seidel and Garner 2002; Suh et al. 2005). I z tohoto důvodu není metoda fertilizace oocytů vysokoprodukčních krav sexovanými spermii elitních býků v systému in vitro po technologické stránce v ČR dosud zvládnuta a prakticky využívána.

Aby došlo ke zvýšení fertilizační schopnosti sexovaných spermií plemenných býků je nutné modifikovat technologické postupy, které jsou v současné době rutinně používané při produkci embryí geneticky cenných zvířat. Ke zlepšení efektivnosti oplození v systému in vitro významně přispívá i zvýšení kvality zralých oocytů. Vývoj účinnějších metod zrání a fertilizace

oocytů v podmínkách in vitro je nezbytný také k rozvoji dalších, technologicky náročnějších metod, včetně metod klonování a transgeneze, které vyžadují kvalitní zralé oocyty a progresivně se vyvíjející embrya definovaného genomu.

II. Cíle a vývoj metodiky

Cílem navrhované metodiky bylo zlepšit fertilizační schopnost sexovaných spermií býků a standardizovat vývoj embryí jak samčího tak i samčího pohlaví v systému in vitro. Na základě modifikací metod zrání a oplození oocytů zvýšit produkci embryí predikovaného pohlaví na úroveň, která by umožnila inovovat současné biotechnologické postupy a vyvíjet nové biotechnologie využitelné ve šlechtění skotu. Aby bylo možno zefektivnit přípravu IVP embryí definovaného pohlaví, bylo nutno provést experimenty s následujícími dílčími cíli -

- zvýšit kvalitu zralých oocytů používaných pro produkci embryí a cytoplastů
- charakterizovat vliv fertilizačního prostředí na pohlaví embryí
- optimalizovat produkci přenosuschopných embryí požadovaného genomu
- ověřit účinnosti vývoje embryí definovaného pohlaví po kryokonzervaci
- ověřit pohlaví embryí po oplození oocytů sexovanými spermii

V průběhu řešení uvedených cílů byly získány poznatky, které autoři metodiky využili k modifikaci odpovídajících metodických postupů.

2.1. Zvýšení kvality oocytů během zrání

Oocyty získané od geneticky cenných donorek v různém stádiu folikulogeneze jsou vysoce heterogenní populací z hlediska meiotické a vývojové kompetence, to je schopnosti dokončit jaderné i cytoplazmatické zrání a po oplození se vyvíjet do přenosuschopných embryonálních stádií. Relativně malá část oocytů (průměrně 25 %), které pocházejí z folikulů ≥ 6 mm, je schopna za standardních podmínek kultivace dozrát a poskytnout vyšší podíl embryí. Převážná část oocytů (průměrně 75 %), které jsou získány z folikulů ≤ 5 mm, však vykazuje relativně nízkou úroveň cytoplazmatického zrání a produkce embryí. Vývojově méně kompetentní oocyty jsou deficitní, pokud se týká některých mitochondriálních funkcí a produkce energetických zdrojů (Jeřeta et al. 2014). Přitom energetický stav zralých oocytů je významný pro úspěšný průběh oplození a nástup embryonálního vývoje. Výsledky provedených experimentů prokázaly, že aktivací mitochondrií pomocí specifického stimulans během zrání je možno zvýšit energetické zásoby u méně kompetentních bovinních oocytů a zefektivnit účinnost oplození i raného embryonálního vývoje na úroveň více kompetentních oocytů (Knitlova et al. 2017).

2.2 Charakteristika vlivu fertilizačního prostředí na pohlaví

Během následujících experimentů bylo prokázáno, že produkci přenosuschopných embryí a jejich pohlaví významně ovlivňuje kultivační prostředí, ve kterém dochází k oplození zralých oocytů, nezávisle na tom, zda spermie jsou nebo nejsou vystaveny procesu sexování. Současně bylo prokázáno, že průběh akrozomální reakce a interakce spermií s oocyty lze modifikovat kombinacemi kapacitačních stimulans a IVF systémů a tímto způsobem ovlivnit jak produkci embryí, tak i jejich pohlaví. Účinnost produkce embryí ve standardním makrosystému se zvýšila na 43,0 %, pokud byly nesexované spermie stimulovány heparinem v kombinaci s PHE mixem (penicillamin, hypotaurin a epinefrin) ve srovnání s účinností produkce embryí vyvíjejících po oplození oocytů v prostředí heparinu s kofeinem (24,7 %). Jestliže k oplození oocytů došlo v mikrosystému s heparinem a PHE mixem potom produkce embryí dosáhla až 48,0 %, včetně zvýšení prognózy jejich vývoje po embryotransferu. Zatímco při kapacitaci nesexovaných spermií heparinem s kofeinem a oplození oocytů v makrosystému byl relativní poměr samičího a samčího pohlaví u získaných embryí 67,0 % vs 33,0 %, tak při kapacitaci spermií heparinem s PHE mixem a oplození v mikrosystému byl relativní poměr pro obě pohlaví zcela opačný (33,0 % samičí vs 67,0 % samčí).

2.3. Optimalizace produkce embryí požadovaného genomu

Autoři metodiky potvrdili, že vliv technologie sexování na fertilizační schopnost spermií v podmínkách in vitro se liší u individuálních plemenů (Lu and Seidel 2004; Machatková et al. 2017). Bylo prokázáno, že současná technologie sexování spermatu metodou průtokové cytometrie ovlivňuje především funkční stav akrozomu, poněvadž u spermií některých býků vyvolá částečnou kapacitaci a morfologické změny, které je třeba brát v úvahu jak při produkci embryí in vitro tak i při inseminaci. Z uvedeného důvodu byly provedeny experimenty s cílem akcelarovat nástup akrozomální reakce u sexovaných spermií účinnější kombinací kapacitačních stimulans, heparinu, kofeinu a PHE mixu (penicillamin, hypotaurin epinefrin) a tímto způsobem synchronizovat interakci sexovaných spermií se zralými oocyty. Optimalizace podmínek oplození na základě reakce spermií na kapacitační agens u individuálních býků signifikantně zvýšila účinnost normálního oplození oocytů a vývoje raných embryí do přenosuschopných stádií blastocysty, průměrně na více než 20 %, která odpovídá průměrné účinnosti vývoje do přenosuschopných stádií u geneticky cenných embryí bez predikce pohlaví.

2.4. Ověření vývoje embryí po kryokonzervaci

Zisk přenosuschopných embryí a jejich kryotolerance jsou závislé především na meiotické a vývojové kompetenci získaných oocytů. Nedostatek vývojově kompetentních oocytů a nižší účinnost vývoje embryí po kryokonzervaci patří mezi základní problémy, které

z technologického hlediska limitují širší využití konzervovaných IVP embryí v reprodukci a šlechtění skotu. Schopnost embryí prodělat kryokonzervaci a po rozmrazení se vyvíjet do stadia hatchingu je ve většině experimentálních studií používána pro hodnocení viability rozmrazených embryí, poněvadž vysoce koreluje s prognózou úspěšného vývoje po embryotransferu. V rámci řešení byla průměrná úspěšnost vývoje po rozmrazení embryí holštýnského plemene získaných z oocytů oplozených spermii X 84,2 %, 68,4 % embryí se vyvíjelo do stadia hatchingu. Úspěšnost vývoje embryí po kryokonzervaci tak odpovídala úspěšnosti zabřezávání příjemkyní po přímém embryotransferu IVP embryí a embryí získaných výplachem superovulovaných dárkyní, které jsou průměrně dosahovány v chovech skotu.

2.5. Ověření pohlaví přenosuschopných embryí

Během řešení metodiky bylo pohlaví přenosuschopných embryí vyvíjejících se po oplození oocytů spermii X separovanými z komerčně dostupných inseminačních dávek spermatu elitních býků ověřeno metodou PCR. Relativní podíl samičího a samčího pohlaví embryí použitelných pro embryotransfer byl 83,9 % vs 16,1 % u mléčného plemene Holštýn a 96,6 % vs 3,4 % u masného plemene Aberdeen Angus.

III. Vlastní popis metodiky

3.1. Příprava embryí definovaného pohlaví

3.1.1. Zrání oocytů

Oocyty individuálních donorek jsou přeneseny do média TCM-199 s 1 % estrálního bovinního séra a selektovány na základě své morfologické kvality. Pro zrání jsou použity pouze oocyty s ukončeným růstem (130 μm), bez výraznějších defektů v cytoplazmě, obklopené intaktní zónou pellucidou a coronou radiatou a nejméně jednou vrstvou buněk kumulu. Oocyty jsou přeneseny do jamek mikroplotny (NUNCLON) obsahující 500 μl zracího média. Pro zrání se používá médium TCM-199 doplněné 0,2 mM pyruvátu sodného, 5 % ECS, gonadotropiny (P.G. 600 15 I.U./ml; Intervet) a antibiotiky (50 IU/ml penicilinu, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycinu, Sigma). Médium je nejdříve ekvilibrováno po dobu 1 hodiny, kdy je přidáno mitochondriální stimulans L-carnitin v koncentraci 2,5 mM a následně je opět ekvilibrováno po dobu 2 hodin. Oocyty zrají při teplotě 38,5°C, v atmosféře s vysokou vzdušnou vlhkostí a 5% CO₂, po dobu 24 hodin. Zralé oocyty jsou přeneseny do centrifugační zkumavky s 2 ml média a částečně denudovány (zbaveny kumulárních buněk) vortexováním při 20 Hz po dobu 45 sekund.

3.1.2. Separace viabilních spermií a testace býků

Modifikace metod separace viabilních spermií ze sexovaných inseminačních dávek a fertilizace oocytů v systému in vitro byly u skotu detailně popsány v uplatněné certifikované metodice, která byla publikována již dříve (Machatková et al. 2017).

Před přípravou embryí od geneticky cenných rodičů je fertilizační schopnost sexovaných spermií potenciálních otců testována pomocí kombinací kapacitačních agens, jako jsou heparin, kofein a PHE mix (penicillamin, hypotaurin a epinefrin). Na základě výsledků testace jsou optimalizovány podmínky fertilizace tak, aby následný zisk embryí definovaného genomu využitelných pro embryotransfer byl co nejvyšší. Pro účely testace se používají srovnatelné soubory zralých oocytů získané od běžné populace jatečných krav, v počtu minimálně 50 oocytů na jednu kombinaci, průměrně 100 oplozených oocytů na testovaného býka. Podíly normálně oplozených oocytů, to je penetrovaných jednou spermií, s prvojadry obou pohlaví nebo syngamií z celkového počtu inseminovaných oocytů se hodnotí za 18 hodin po inseminaci. Účinnost embryonálního vývoje je možno hodnotit průběžně, ve 24-hodinových intervalech, po dobu 9–10 dnů, kdy embrya opouštějí zonu pellucidu (stádium hatchingu).

3.1.3. Optimalizace oplození oocytů

Na základě fertilizační schopnosti spermií býků v testaci je fertilizační médium IVF-TALP doplněno vhodnou kombinací stimulans, při které byla dosažena nejvyšší účinnost oplození a vývoje embryí. Následně je médium ekvilibrováno v inkubátoru po dobu nejméně 2 hodin.

Částečně denudované oocyty jsou nejdříve promyty v IVF-TALP médiu a přeneseny buď **a)** do mikrosystému, do mikrokapek o objemu 50 μ l, přičemž v jedné kapce může být kokultivováno se spermiemi až 25 oocytů v poměru 8.000 spermií/oocyt. Oplození v mikrosystému probíhá po dobu 60 minut, následně je objem média navýšen na 450 μ l a kokultivace pokračuje dalších 17 hodin.

nebo **b)** do makrosystému, přímo do 500 μ l fertilizačního média obsahujícího $2,5 \times 10^5$ spermií, kde jsou oocyty kokultivovány po dobu 18 hodin.

Oplození oocytů v obou systémech probíhá při teplotě 39 °C v atmosféře vzduchu s vysokou relativní vlhkostí a 5 % CO₂.

3.1.4. Kultivace raných embryí

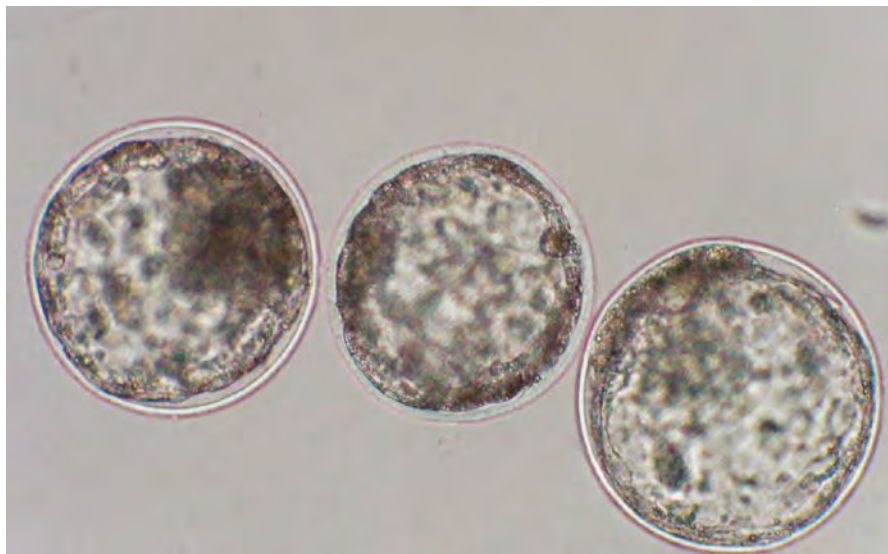
Za 20 hodin po inseminaci jsou potenciální zygoty přeneseny na buněčný monolayer stabilní linie BRL (Buffalo rat liver cells ATCC USA). Pro kultivaci je používáno kultivační medium B2 Menezo s 10 % estrálního bovinního séra stabilizované 0,2 mM Hepesem, ve kterém se embrya vyvíjejí při teplotě 39°C v atmosféře vzduchu s vysokou vzdušnou vlhkostí a 5 % CO₂ po dobu 7–8 dnů do stádií časně až vyspělé blastocysty, kdy jsou vystavena kryokonzervaci.

3.1.5. Kryokonzervace embryí

Bovinní embrya predikovaného pohlaví lze konzervovat bez ztráty vývojové schopnosti buď **a)** standardními zmrazovacími postupy nebo **b)** metodou vitrifikace.

a) Embrya jsou nejdříve ekvilibrována v pejetách ve zmrazovacím médiu TCM–199 s 10 % estrálního séra a 10 % glycerolu při laboratorní teplotě po dobu 10 minut a následně jsou vložena do komory zmrazovače vychlazené na teplotu $-7\text{ }^{\circ}\text{C}$, kde je po 10 minutách navozena krystalizace zmrazovacího média (seeding). Po další 10 minutové ekvilibraci jsou pejety s embryi zmrazeny rychlostí $-0,3\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ do teploty $-35\text{ }^{\circ}\text{C}$, při které jsou ponořeny do tekutého dusíku.

b) Embrya jsou nejdříve ekvilibrována v médiu TCM–199 s 10 % estrálního séra a 10 % glycerolu při laboratorní teplotě po dobu 7 minut. Následně jsou přenesena do vitrifikačního média TCM–199 s 20 % estrálního séra a 30 % glycerolu. V něm se embrya ekvilibrují při laboratorní teplotě po dobu 90 sekund, během kterých jsou přenesena na kryoháčky v minimálním množství média. Kryoháčky s embryi jsou přitisknuty na dobu 5 sekund na Kryoblok vychlazený ze 2/3 v tekutém dusíku, uzavřeny do dutinek a ponořeny do tekutého dusíku.



Obr. 1 - Přenosuschopná embrya samičího pohlaví po kryokonzervaci a rozmrazení; světelná mikroskopie, zvětšení 200 ×.

IV. Srovnání novosti postupů

Většina studií uvádí, že úspěšnost produkce přenosuschopných embryí a zabřezávání krav a jalovic po inseminaci sexovanými spermiiem býků dosahuje průměrně 70–80 % ve srovnání s nesexovanými spermiiem (Wheeler et al. 2006, Schenk et al 2009, Detterer and Meinecke-Tillmann 2011). Zefektivnění metod produkce embryí požadovaného pohlaví jak in

in vitro tak in vivo jsou proto základním předpokladem pro širší uplatnění sexovaných spermií elitních býků při získávání geneticky cenného potomstva v chovech skotu, jak je tomu v chovatelsky vyspělých zemích EU.

Dopady technologie sexování na fertilizační schopnost sexovaných spermií, především na funkční stav akrozomu, byly zohledněny při vývoji modifikovaných postupů přípravy embryí predikovaného pohlaví in vitro, které jsou předmětem této metodiky.

V průběhu řešení byl vyvinut efektivnější postup zrání bovinních oocytů, který je vhodný nejen pro produkci přenosuschopných embryí ale také pro přípravu kvalitních cytoplasmů. Metoda stimulace mitochondrií během zrání umožnila zvýšit energetické rezervy zralých oocytů a zlepšit jejich kvalitu před oplozením nebo enukleací. Byla zvýšena účinnost separace viabilních a oplozeníšchopných spermií ze sexovaných inseminačních dávek, optimalizovány podmínky fertilizace oocytů a zefektivněna produkce embryí predikovaného pohlaví využitelných pro přímý embryotransfer i kryokonzervaci. Pomocí kultivace v in vitro systému byla ověřena kryotolerance získaných embryí. Zvýšení efektivnosti vývoje embryí po fertilizaci oocytů sexovanými spermii je významné nejen pro produkci embryí od geneticky cenných rodičů ale také pro vývoj technologicky náročnějších metod jako jsou klonování a transgeneze. Účinnost modifikovaných postupů umožňuje začlenit „Metodu přípravu bovinních embryí definovaného pohlaví v systému in vitro“ do technologických postupů aplikovatelných v reprodukci a šlechtění skotu.

V rámci vývoje metodiky byl potvrzen specifický vliv fertilizačního prostředí na poměr samčího a samičího pohlaví u vyvíjejících se embryí, který lze účelně využít pro přípravu přenosuschopných embryí z nesexovaného spermatu plemenných býků.

V. Popis uplatnění certifikované metodiky

Metodika je určena specializovaným laboratořím, které jsou oprávněny k produkci embryí geneticky cenných zvířat in vitro, dále subjektům poskytujícím chovatelům služby v oblasti reprodukce a šlechtění skotu, včetně embryotransferu a současně i špičkovým chovatelům, kteří mají reálné předpoklady využívat nové metody reprodukčních biotechnologií pro své šlechtitelské záměry. Metodika může najít své uplatnění i u komerčních subjektů zajišťujících chovatelům služby v oblasti inseminace, poněvadž umožňuje objektivně hodnotit fertilizační schopnost sexovaných i nesexovaných spermií za standardních podmínek kapacity a oplození a prověřit kvalitu inseminačních dávek plemenných býků před jejich použitím v inseminaci.

VI. Ekonomické aspekty metodiky

VI. Ekonomické aspekty metodiky

Produkce embryí definovaného pohlaví v systému *in vitro* nevyžaduje ve srovnání se standardní produkcí embryí skotu další finanční náklady, protože umožňuje využít standardní vybavení laboratoře IVF, včetně přístrojů, syntetických médií a kultivačních plastů. Hlavním ekonomickým přínosem metody je především přínos pro chovatele skotu, poněvadž narození potomků požadovaného pohlaví přispívá k rychlejšímu dosažení očekávaného genetického zisku a snížení finančních nákladů na odchov potomků, kteří nejsou z hlediska šlechtitelských záměrů chovatele zcela žádoucí. Především v chovech mléčného skotu je transfer embryí samičího pohlaví od geneticky cenných rodičů významným chovatelským i ekonomickým přínosem. Produkce embryí definovaného genu ve specializované laboratoři na základě požadavků chovatele umožňuje efektivněji využít reprodukční potenciál geneticky cenných jedinců jak v současném procesu šlechtění, tak i pro uchování genových zdrojů. Konkrétní ekonomický přínos metodiky je závislý na využití této metody chovateli a plemenné hodnotě selektovaných rodičů.

VII. Seznam použité související literatury

BECKER, F., NEHRING, H., KANITZ, W., NURNBERG, G., RATH, D. Embryo recovery results after timed artificial insemination in normal cycling and in superovulated cattle with reduced dosages of unsorted spermatozoa and with sexed spermatozoa. In: Proceedings of the 28th Annual Meeting of A.E.T.E., Sain Malo, France, European Embryo Transfer Association, 2012:104.

CALVALHO, J., SALTORI, R., MACHADO, G., MOURAO, G., DODE, M. Quality assessment of bovine cryopreserved sperm after sexing by flow cytometry and their use in *in vitro* embryo, production. Theriogenology 2010; 74:1521–1530.

DETERER, J., MEINECKE-TILLMANN, S. Four years practical experience with sexed bull semen in North-West Germany. In: Proceedings of the 27th Annual Meeting of A.E.T.E., Chester, England, 2011:136.

LU, K.H., SEIDEL, G.E. JR. Effects of heparin and sperm concentration on cleavage and blastocyst development rates of bovine oocytes inseminated with flow cytometrically-sorted sperm. Theriogenology 2004;62:819–830.

SCHENK, J.L., CRAN, D.G., EVERETT, R.W., SEIDEL, G.E. JR. Pregnancy rates in heifers and cows with cryopreserved sexed sperm: Effect of sperm numbers per inseminate, sorting pressure and sperm storage before sorting. Theriogenology 2009;71:717–728.

SEIDEL, G.E. JR. Sexing mammalian sperm-where do we go from here? J Reprod Dev 2012;58,(5):505–509.

SEIDEL, G.E. JR., GARNER, D.L. Current status of sexing mammalian spermatozoa. Reproduction 2002; 124:733–743.

SUH, T.K., SCHENK, J.L., SEIDEL, G.E. JR. High pressure flow cytometric sorting damages sperm. Theriogenology 2005;64:1035–1048.

WHEELER, M.B., RUTLEDGE, J.J., FISHER-BROWN, A., VANETTEN, T., MALUSKY, S., BEEBE, D. Application of sexed semen technology to in vitro embryo production in cattle. Theriogenology 2006;65:219–227.

VIII. Seznam publikací, které předcházely metodice

D. KNITLOVA, P. HULINSKA, M. JESETA, K. HANZALOVA, B. KEMPISTY, M MACHATKOVA. Supplementation of L-carnitine during in vitro maturation improves embryo development from less competent bovine oocytes. Theriogenology 2017; 102:16–22. Tato studie byla financována z grantů poskytovaných MZe ČR na RO 0516 a NAZV na řešení projektu QJ1510138.

M. MACHATKOVÁ, P. HULÍNSKÁ, K. HANZALOVÁ. Metoda fertilizace oocytů sexovanými spermii plemenných býků in vitro. Certifikovaná metodika SVS/2017/142514-G, 2017, s.12. Tato studie byla financována z grantů poskytovaných MZe ČR na RO 0517 a NAZV na řešení projektu QJ1510138.

M. MACHATKOVÁ, P. HULÍNSKÁ, V. KOPECKÁ. Charakteristika funkčních parametrů sexovaných spermií elitních holštýnských býků v systému in vitro. Veterinářství 2017; 67 (10):811–814. Tato studie byla financována z grantů poskytovaných MZe ČR na RO 0516 a NAZV na řešení projektu QJ1510138.

M. MACHATKOVÁ, P. HULÍNSKÁ, K. HANZALOVÁ. Vývoj technologií sexování bovinních spermií a jejich využití ve šlechtění skotu. Veterinářství 2015; 65 (11):868–871. Tato studie vznikla za finanční podpory výzkumného záměru 0002716201 z prostředků MZe ČR, projektu QJ1510138 dotovaného NAZV a projektu LD14104 COST-CZ financovaného MŠMT ČR.

M. JESETA, D. CTVRTLÍKOVA-KNITLOVA, K. HANZALOVA, P. HULINSKA, I. MILAKOVIC, L. NEMCOVA, J. KANKA, M. MACHATKOVA. Mitochondrial patterns in bovine oocytes with

different meiotic , competence related to their in vitro maturation. *Reprod Dom Anim* 2014, 49:469–475. Tato studie byla financována z grantů poskytovaných MZe ČR na RO 0002716202 a NAZV na řešení projektu QI91A018.

IX. Dedikace

Metodika vznikla na základě poznatků získaných v rámci řešení projektu NAZV QJ1510138 a RO 0518, které jsou financovány MZe ČR.

X. Jména navržených oponentů

MVDr. Miroslava Lutzová
SVS ČR
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. - 45 %
MVDr. Pavlína Hulínská, Ph.D. - 40 %
Mgr. Kateřina Hanzalová - 15 %

VÚVeL 

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