



## CERTIFIKOVANÁ METODIKA

---

**Metoda fertilizace oocytů sexovanými  
spermiemi plemenných býků in vitro**

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

UPLATNĚNÁ CERTIFIKOVANÁ METODIKA č. 79/2017

**Metoda fertilizace oocytů sexovanými spermii plemenných býků in vitro**

**Autoři**

Ing. Marie Machatková, CSc.  
MVDr. Pavlína Hulínská, Ph.D.  
Mgr. Kateřina Hanzalová  
*Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i., Brno*

**Oponenti**

MVDr. Jan Bažant  
*Ústřední správa SVS ČR, Praha*

Prof. Ing. Ladislav Máchal, DrSc.  
*Mendelova univerzita v Brně*

Certifikovaná metodika byla vypracována v rámci projektu Ministerstva zemědělství ČR NAZV KUS, číslo grantu QJ1510138 a podpory na rozvoj výzkumné organizace č. RO 0516

ISBN 978-80-86895-12-3

2017

## Obsah

I)	Úvod	1
II)	Cíle metodiky a její vývoj	2
III)	Vlastní popis metodiky	5
	Hodnocení funkčních parametrů sexovaných spermií	5
	<i>Koncentrace</i>	5
	<i>Motilita</i>	5
	<i>Viabilita</i>	5
	<i>Integrita akrozomu</i>	6
	<i>Fertilizační schopnost</i>	6
	Metoda separace motilních spermií ze sexovaného spermatu	7
	Metoda fertilizace sexovanými spermiiemi v mikrosystému	7
IV)	Srovnání novosti postupů	8
V)	Popis uplatnění certifikované metodiky	8
VI)	Ekonomické aspekty	9
VII)	Seznam použité literatury	9
VIII)	Seznam publikací předcházející metodice	11
IX)	Dedikace	11
X)	Jména oponentů	12
XI)	Podíl práce	12

## I. Úvod

Reprodukční biotechnologie významně zvyšují efektivitu šlechtitelské práce a urychlují dosažení chovatelských záměrů. Využitím progresivních technologických postupů v chovu skotu, včetně produkce geneticky cenných in vitro embryí (IVP), lze relativně rychle získat potomstvo požadovaného genotypu. Pokud jsou pro oplození oocytů in vitro (IVF) použity sexované spermie, je možno selekční tlak ve stádě ještě zintenzivnit produkcí jedinců požadovaného pohlaví. Rozdělení spermatu elitních býků na subpopulace spermií X a Y pomocí průtokové cytometrie a laserových sorterů je vysoce progresivní metodou umožňující získat více než 90 % spermií nesoucích predikované pohlavní chromozomy (Khamlor et al. 2014).

Na druhé straně je však použití technologie sexování spermatu pro získání potomků predikovaného pohlaví spojeno s určitou mírou negativního dopadu na spermie. Vlastní proces sexování působí na spermie jako stresový faktor, který může způsobit poškození jejich buněčných membrán a DNA vlivem excitace fluorescence, nepřiměřeného tlaku nebo relativně vysoké rychlosti při průchodu spermií kapilárami sorterů (Seidel and Garner 2002, Suh et al. 2005). Bylo také doloženo, že při sexování může docházet k indukci oxidativního stresu v mitochondriích i DNA spermií, což se projevuje zvýšením fragmentačního indexu DNA průměrně o 10 % (Balao da Silva et al. 2016). Podezření na vznik bodových mutací vyvolaných během sortování vlivem barvení DNA spermií bisbenzimidem Hoechst 33342 a UV záření se však neprokázalo. Potvrdily to výsledky IVF oocytů a vývoje IVP embryí stejně jako genetická analýza získaných embryí (Underwood et al. 2010, Pozzi et al. 2014).

Ve srovnání s nesexovanými spermiemi mají sexované spermie nižší oplozovací schopnost, jak po inseminaci (Schenk et al. 2009, Del Olmo et al. 2013), tak i po IVF (Lu and Seidel 2004, Jo et al. 2014). Jako možná příčina snížení plodnosti po inseminaci sexovaným spermatem je uváděna snížená viabilita, motilita a integrita akrozomu spermií. Rozsáhlá terénní studie potvrdila desetiprocentní pokles NRR (non return rate) u holštýnských krav po inseminaci sexovaným spermatem ve srovnání se spermatem nesexovaným. Naproti tomu podíl samičího pohlaví dosáhl 85,5 % na rozdíl od 47,3 % jaloviček narozených po inseminaci konvenčními inseminačními dávkami (Detterer and Meinecke-Tillmann 2011).

Obecně se předpokládá, že další z příčin snížení plodnosti po inseminaci sexovanými dávkami může být i snížení počtu spermií v inseminačních dávkách z  $15\text{--}20 \times 10^6$  průměrně na  $5 \times 10^6$ . Sexování spermií snížilo také relativní podíl transferuschopných embryí vypláchnutých po superovulaci donorek (Kaimio et al. 2010). Většinou se uvádí, že zisk přenosuschopných embryí při použití sexovaných inseminačních dávek dosahuje průměrně 80% produkce embryí z dávek nesexovaných (Wheeler et al. 2006). Podobné závěry potvrdila i studie, ve které byla metodou transvaginální aspirace oocytů a IVF (OPU/IVF) připravována embrya predikovaného pohlaví od geneticky cenných dárkyní (Gamarra et al. 2014). Rozdíly mezi fertilizační schopností spermií X a Y v podmínkách in vitro nebyly nalezeny. Naproti tomu významné rozdíly byly zjištěny v podílu IVP embryí u individuálních býků.

Z uvedeného je patrné, že ve srovnání s dávkami konvenčními, mají sexované inseminační dávky z hlediska koncentrace, motility, integrity buněčných membrán a stavu

akrozomu nižší kvalitu spermií. Výsledky naší předcházející studie potvrdily, že dopad procesu sortování spermií na funkční stav jejich akrozomu a fertilizační schopnost se liší u testovaných plemenů. Lze předpokládat, že je závislý na geneticky podmíněné odolnosti spermií individuálních býků k fyzikálnímu a chemickému stresu, kterému jsou spermie vystaveny během relativně dlouhodobé manipulace před kryokonzervací sexovaného spermatu.

Změny ve funkčním stavu sexovaných spermií je proto třeba zohlednit především při modifikaci postupů rutinně používaných při IVF a produkci geneticky cenných embryí skotu v systému in vitro. Metoda fertilizace oocytů donorek spermiemi elitních býků, které ve svém genomu nesou buď chromozom X nebo Y není u nás v současné době po technologické stránce zvládnuta a prakticky vůbec využívána.

## II. Cíle metodiky a její vývoj

Vliv sexovaných spermií na získání geneticky cenných embryí požadovaného pohlaví lze do určité míry kompenzovat modifikací metod separace spermií z inseminačních dávek a optimalizací podmínek oplození oocytů in vitro.

Cílem navrhované metodiky bylo vypracovat systém hodnocení kvality sexovaných inseminačních dávek, zvýšit účinnost separace motilních a viabilních spermií s intaktním akrozomem ze sexovaného spermatu a modifikovat podmínky kapacitace spermií a fertilizace zralých bovinních oocytů, aby pravděpodobnost získání potenciálních zygot a raných embryí skotu byla co nejvyšší. Finálním cílem metodiky bylo zefektivnit účinnost oplození bovinních oocytů sexovanými spermiemi elitních plemenných býků.

Aby bylo možné vypracovat certifikovanou metodiku, bylo třeba realizovat experimenty s komerčně dostupnými inseminačními dávkami býků, které jsou českými chovateli využívány ke šlechtění holštýnského skotu. V rámci těchto experimentů, ve kterých byla srovnávána fertilizační schopnost spermií sexovaných v Kanadě a Francii a nesexovaných spermií shodných býků, byly stanoveny odpovídající dílčí cíle a získány následující poznatky:

- ✓ Charakterizovat parametry spermií v sexovaných a nesexovaných dávkách
- ✓ Modifikovat metodu separace motilních spermií ze sexovaného spermatu
- ✓ Charakterizovat odezvu sexovaných spermií na kapacitační stimulans
- ✓ Standardizovat metodu fertilizace sexovanými spermiemi v mikrosystému
- ✓ Predikovat oplozovací schopnost sexovaných spermií individuálních býků

## **2.1. Charakteristika funkčních parametrů sexovaných vs nesexovaných spermií**

Celkový počet spermií v sexovaných inseminačních dávkách byl signifikantně nižší, průměrně o 70 %, ve srovnání s nesexovanými dávkami. Ve srovnání s nesexovanými spermiemi byl u sexovaných spermií zjištěn pokles motility, průměrně o 11,7 %, viability průměrně o 8,7 % a podílu spermií s intaktním akrozomem, průměrně o 19,2 %. Na rozdíl od motility a viability spermií byl relativní pokles podílu sexovaných spermií s intaktním akrozomem a vzestup podílu spermií s reagujícím akrozomem u individuálních býků vysoce variabilní. Intaktnost akrozomu byla proto vybrána jako rozhodující parametr pro hodnocení kvality spermií v sexovaných inseminačních dávkách býků, který byl doplněn o ukazatele motility a viability spermií.

## **2.2. Modifikace metody separace motilních spermií ze sexovaného spermatu**

Dostatečný počet pohyblivých spermií v inseminační dávce a účinné metody jejich separace jsou základním předpokladem pro úspěšnou přípravu IVP embryí, neboť umožňují získat ze sexované dávky potřebný počet motilních spermií pro oplození oocytů. Vzhledem k vysoce viskózním médiím, ve kterých je sexované sperma kryokonzervováno a nižší intenzitě pohybu, nelze pro separaci sexovaných spermií využít standardní techniky používané pro izolaci nesexovaných spermií, jako jsou technika swim up nebo centrifugace na 45% a 90% gradientu Percollu. Proto bylo nutné modifikovat techniku centrifugace na hustotním gradientu z hlediska koncentrace Percollu, celkové výšky sloupců, času a intenzity centrifugace (x g). Z nesexovaných inseminačních dávek s celkovým počtem  $14 \times 10^6$  spermií bylo po separaci standardními postupy získáno průměrně  $3,5 \times 10^6$  motilních spermií, ze sexovaných dávek s celkovým počtem  $3,5 \times 10^6$  spermií bylo modifikovaným postupem izolováno průměrně  $0,57 \times 10^6$  motilních spermií. Modifikací standardní metody izolace spermií na hustotním gradientu bylo u sexovaných dávek dosaženo srovnatelné relativní výtěžnosti motilních spermií, průměrně 19,8 %, která odpovídala výtěžnosti dosažené u nesexovaných dávek testovaných býků (20,4 %).

## **2.3. Charakteristika odezvy sexovaných spermií na kapacitační stimulans**

Reakce spermií na kapacitační stimulans a průběh jejich akrozomální reakce je rozhodující pro úspěšnou interakci kapacitovaných spermií se zralými oocyty, penetraci oocytů a tvorbu potenciálních zygot a raných embryí. Jestliže u nesexovaných spermií převážné většiny býků lze nástup akrozomální reakce v podmínkách in vitro stimulovat podobně jako in vivo, to je přítomností heparinu, u sexovaných spermií je nezbytné doplnit heparin o další kapacitační agens jako je kofein nebo PHE mix (penicillamin, hypotaurin a epinefrin). Pro nastartování raného embryonálního vývoje je zcela zásadní akcelarovat nástup akrozomální reakce kombinací nejméně dvou kapacitačních stimulans, kterou je nutno testovat na oocytech jatečných krav. Pro produkci embryí požadovaného pohlaví je třeba následně zvolit kombinaci, která vede k nejúčinnější penetraci oocytů a monospermii.

#### **2.4. Standardizace metody fertilizace sexovanými spermii v mikrosystému**

Výsledky fertilizace a raného embryonálního vývoje ukázaly, že kultivační makrosystém, používaný rutinně pro fertilizaci oocytů geneticky cenných donorek nesexovanými spermii, není vhodný pro oplození oocytů spermii sexovanými. Bylo potvrzeno, že spermie, které prošly procesem sexování nejsou schopny v podmínkách in vitro překonat bariéru expandovaného cumulus oophorus, který obklopuje zralý oocyt a dosáhnout odpovídajícího kontaktu s oocyty. Modifikace fertilizačního makrosystému a standardizace mikrosystému umožnila zintenzivnit interakci sexovaných spermií s oocyty, především redukcí počtu kumulárních buněk (částečnou denudací) u COC (kumulus-oocyt komplexů) a snížením objemu fertilizačního média z 500  $\mu$ l na 50  $\mu$ l. Účinnost penetrace oocytů sexovanými spermii testovaných býků se v mikrosystému zvýšila z původních 4,1 % průměrně na 55,0 % při 51,3% monospermii.

#### **2.5. Predikce oplozovací schopnosti sexovaných spermií**

V rámci experimentů bylo potvrzeno, že parametr hodnocení stavu akrozomu lze využít k prognóze fertilizační schopnosti sexovaných spermií u individuálních býků, poněvadž významně ovlivňuje účinnost penetrace, tvorby zygot a vývoje raných embryí. Se snižujícím se podílem motilních spermií s intaktním akrozomem a zvyšujícím se podílem spermií s reagujícím akrozomem, které byly izolovaných z inseminační dávky, se snižoval podíl penetrovaných oocytů a celková účinnost fertilizace oocytů. U býků, u kterých zůstal průměrný podíl spermií s intaktním akrozomem po sexování vyšší než 80 %, byla průměrná účinnost penetrace oocytů vyšší než 60 % a průměrná účinnost fertilizace oocytů vyšší než 55 %. Naproti tomu u býků, u kterých klesl podíl spermií s intaktním akrozomem po sexování na hodnotu nižší než 70 %, byla průměrná účinnost penetrace nižší než 50 % a průměrná účinnost fertilizace nižší než 45 %. Bylo také zjištěno, že zatímco všechny oocyty penetrované sexovanými spermii jsou oplozené jedinou spermii a pokračují v raném embryonálním vývoji, u oocytů penetrovaných nesexovanými spermii tomu tak není, poněvadž část oocytů (5–10 %) je oplozena více než jednou spermii a raný vývoj ukončí.

### III. Vlastní popis metodiky

#### 3.1. Hodnocení funkčních parametrů sexovaných spermií

##### 3.1.1. Koncentrace

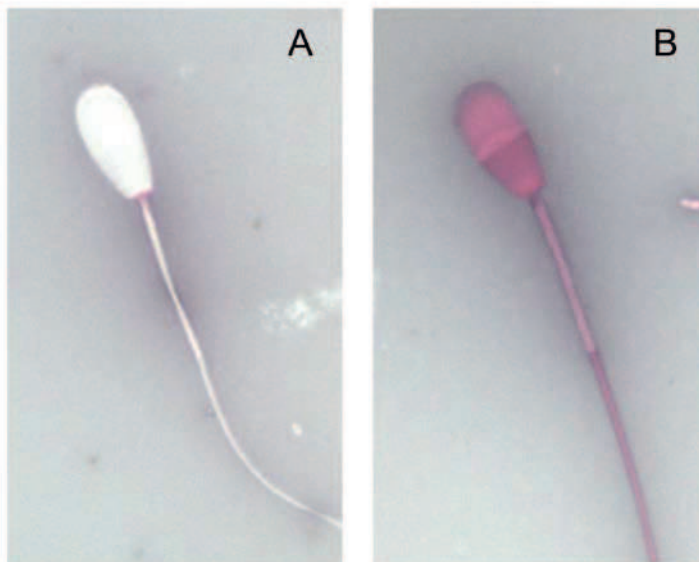
Pejeta vyjmutá z tekutého dusíku je rozmrazena ponořením do vodní lázně o teplotě 35°C po dobu 50 sekund. Před stanovením koncentrace jsou spermie v odebraném vzorku naředěny a znehybněny v hypotonickém prostředí. Pro vlastní stanovení počtu spermií je použita Bürkerova komůrka. Koncentrace je vyjádřena jako počet spermií v jednom ml buněčné suspenze.

##### 3.1.2. Motilita

Bezprostředně po rozmrazení pejety je subjektivně stanovena motilita spermií, kdy je pohyb spermií vyšetřen na mikroskopickém sklíčku ve světelném mikroskopu s fázovým kontrastem. Motilita je vyjádřena jako procentuální podíl pohyblivých spermií.

##### 3.1.3. Viabilita

Pro vyšetření viability je nutno použít barvení eosinem/nigrosinem, které neinterferuje s intenzivní fluorescencí DNA přetrvávající u sexovaných spermií. Před zhotovením nátěru a vyšetřením viability je odebraný vzorek spermií nabarven pomocí 1% eosinu a 10% nigrosinu v pufovaném fyziologickém roztoku. Preparát je hodnocen ve světelném mikroskopu při zvětšení 400 ×. Z každého vzorku je hodnoceno 2 × 200 spermií. Jsou rozlišeny dvě kategorie, živé (bezbarvé) a mrtvé (červeně zbarvené) spermie (obr. 1).

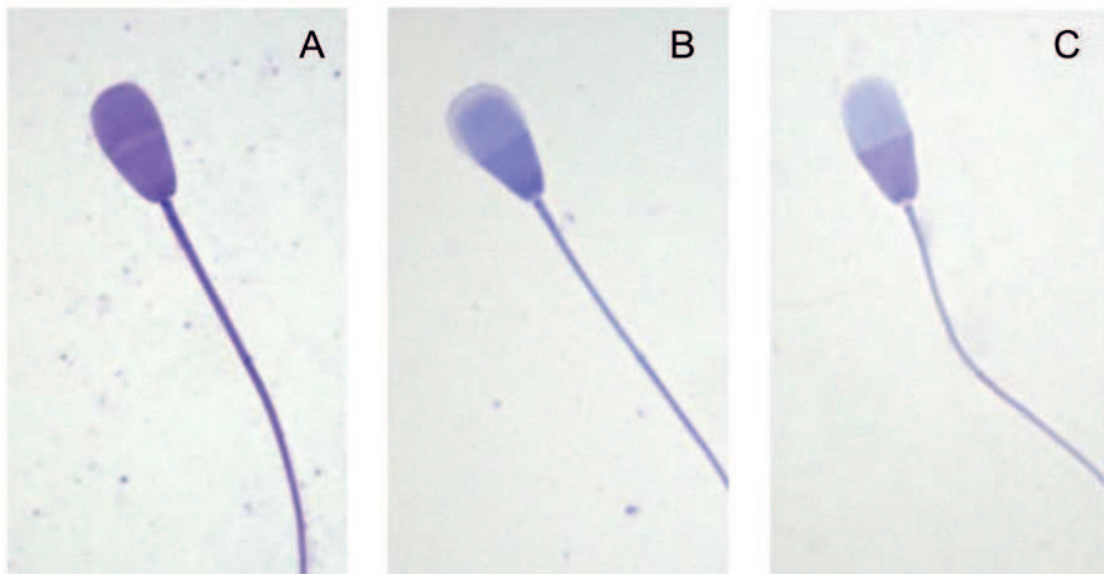


Obr. 1 - Bovinní spermie po rozmrazení, barveno eosin/nigrosin, světelná mikroskopie, zvětšení 1.000 ×. **(A)** živá spermie, **(B)** mrtvá spermie



#### 3.1.4. Integrita akrozomu

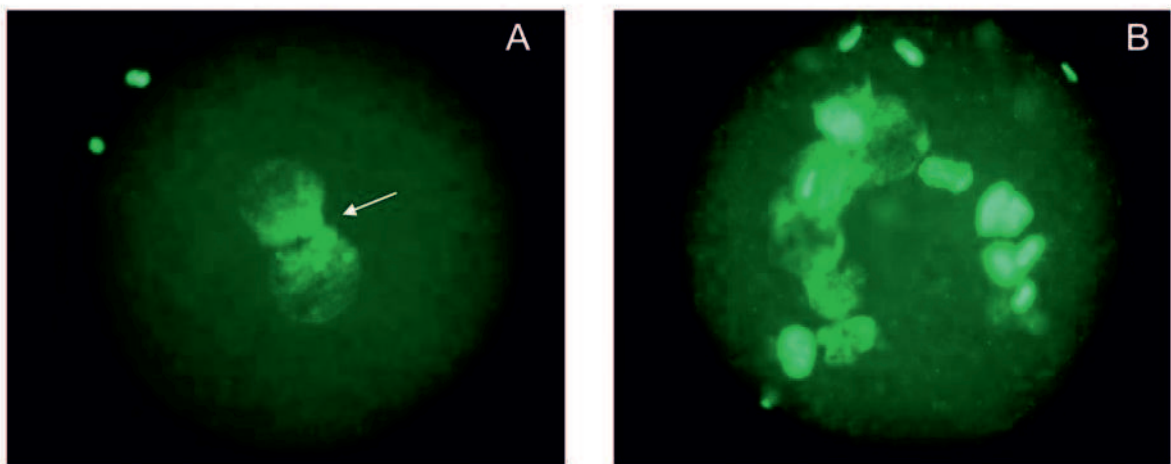
Před hodnocením integrity akrozomu spermií je připraven nátěr na podložní sklo, který je fixován v roztoku 35% formalínu. Následně jsou spermie obarveny roztokem 5% anilínové modři po dobu 10 sekund a poté 0,5% roztokem krystalové violeti po dobu 15 sekund (barvení dle Farellyho). Po osušení preparátu je morfologický stav akrozomu hodnocen ve světelném mikroskopu při zvětšení 1 000 × a použití imerze. Z každého vzorku je hodnoceno 2 × 200 spermií. Na základě morfologického hodnocení jsou rozlišeny tři kategorie spermií, spermie s intaktním akrozomem, spermie s reagujícím akrozomem a spermie bez akrozomu (obr. 2).



Obr. 2 - Bovinní spermie po rozmrazení, barveno dle Farellyho, světelná mikroskopie, zvětšení 1.000 ×. **(A)** spermie s intaktním akrozomem, **(B)** spermie s reagujícím akrozomem, **(C)** spermie bez akrozomu

#### 3.1.5. Fertilizační schopnost

Fertilizační schopnost spermií se hodnotí za 18 hodin po oplození oocytů. Potenciální zygoty jsou fixovány po dobu 60 min v 3,7% paraformaldehydu při 4°C, barveny roztokem Sytoxgreen se specifickou vazbou na DNA a vyšetřeny fluorescenční mikroskopií. Účinnost oplození se vyjadřuje jako a) relativní podíl oocytů penetrovaných nejméně jednou spermíí b) jako celková účinnost normální fertilizace, to je podíl oocytů s jedním formovaným samčím a samičím prvojádrem nebo syngamií obou prvojader z celkového počtu inseminovaných oocytů (obr. 3).



Obr. 3 - Bovinní oocyty za 18 h po oplození, barveno SytoxGreen, fluorescenční mikroskopie, zvětšení 200 ×. **(A)** normálně oplozený oocyt s jedním samičím a jedním samčím prvojádrům v syngamii (šipka) a dvěma pólovými tělísky, **(B)** abnormálně oplozený oocyt s jedním samičím a více samčími prvojádry v různém stádiu formování (polyspermie).

### 3.2. Metoda separace motilních spermií ze sexovaného spermatu

Sexované sperma je po rozmrazení opatrně navrstveno na povrch hustotního gradientu Percollu. Gradient je připraven v centrifugační zkumavce tak, že pod 40% Percoll je podvrstven 80% Percoll rozmíchaný v Tyrodově separačním médiu doplněném o albumin, laktát a pyruvát (Sperm-TALP). Následuje centrifugace spermatu po dobu 17 minut při 440 × g. Po odstředění je supernatant obsahující semennou plazmu, kryoprotektivum a nepohyblivé spermie odsát a sediment se spermii, které aktivně prošly přes separační kolonu, je znovu propláchnut centrifugací v separačním médiu Sperm-TALP po dobu 4 minut při 350 × g. Ke druhému proplachu spermií je již použito Tyrodovo fertilizační médium (IVF-TALP) s přídatkem heparinu a buď kofeinu nebo PHE-mixu, ve kterém je pelet resuspendován a znovu centrifugován po dobu 4 minut při 350 × g. Po odstranění supernatantu je v sedimentu obsahujícím pouze spermie s progresivním pohybem vpřed stanovena výsledná koncentrace spermií.

### 3.3. Metoda fertilizace sexovanými spermii v mikrosystému

Pro oplození jsou použity oocyty získané totální disekcí korové vrstvy ovárií jatečných krav post mortem, které zrají v médiu TCM-199 doplněným 0,2 mM pyruvát, 15 IU/ml P.G.600 a 5 % bovinního estrálního séra. Oocyty jsou kultivovány v 500 μl zracího média, v jamkách mikroploten NUNC, v atmosféře vzduchu s 5 % CO<sub>2</sub> a vysokou relativní vlhkostí po dobu 24 hodin. Zralé oocyty jsou přeneseny do centrifugační zkumavky s 2 ml zracího média a částečně zbaveny kumulárních buněk vortexováním při 20 Hz po dobu 45 sec. Následně jsou promyty ve fertilizačním médiu a přeneseny do jamek mikroplotny obsahujících mikrokapky fertilizačního média IVF-TALP. V každé z kapek může být kokultivováno se spermii až 25 oocytů, a to v poměru 8.000 spermií/oocyt. Vlastní

fertilizace probíhá nejdříve v mikrokapkách, následně je objem média v jamce navýšen na 450  $\mu$ l. Potenciální zygoty jsou přeneseny do jamek mikroploten obsahujících 500  $\mu$ l kultivačního média Menezo B2 s 10 % bovinního estrálního séra a kultivovány v inkubátoru s řízenou atmosférou CO<sub>2</sub> do požadovaných embryonálních stádií.

#### **IV. Srovnání novosti postupů**

Z předkládané metodiky je zřejmé, že fertilizace oocytů sexovanými spermiiem byků vyžaduje ve srovnání se standardními postupy oplození oocytů in vitro specifické metodické přístupy, které jsou rozhodující pro úspěšnou produkci přenosuschopných embryí skotu požadovaného pohlaví. Metoda přípravy IVP embryí predikovaného pohlaví nebyla do současné doby v ČR žádnou z laboratoří asistované reprodukce rozpracována a po technologické stránce zvládnuta tak, aby mohla být prakticky začleněna do biotechnologií využívaných u nás v procesu šlechtění. Na rozdíl od technologie inseminace plemenic sexovaným spermatem elitních byků, která je dlouhodobě rozvíjena komerčními firmami a prakticky využívány chovateli v zemědělsky vyspělých zemích, v posledních letech i v ČR, je metoda produkce embryí predikovaného pohlaví v systému in vitro relativně málo efektivní. Zvýšení účinnosti fertilizace oocytů sexovanými spermiiem byků je jedním ze základních předpokladů jak zefektivnit přípravu embryí požadovaného pohlaví in vitro a využít ji u geneticky cenných rodičů, tak jak je tomu v chovatelsky vyspělých zemích.

#### **V. Popis uplatnění certifikované metodiky**

Modifikovaný postup fertilizace oocytů sexovanými spermiiem byků in vitro je určen především subjektům využívajícím reprodukční biotechnologie v chovech hospodářských zvířat. V průběhu dalšího rozvoje těchto metod v reprodukci a šlechtění skotu se metodika může stát účinným nástrojem pro zefektivnění produkce embryí požadovaného pohlaví využitelných jak pro přímý embryotransfer, tak i pro kryokonzervaci a uchování genových zdrojů.

Kromě toho metodika může najít své uplatnění i u komerčních subjektů zajišťujících chovatelům služby v oblasti inseminace, poněvadž systém fertilizace bovinních oocytů v podmínkách in vitro umožňuje objektivně hodnotit fertilizační schopnost sexovaných spermiiem za standardních podmínek kapacity a oplození a prověřit kvalitu inseminačních dávek plemenných byků před jejich použitím v inseminaci.

## VI. Ekonomické aspekty

Zavedení fertilizace sexovanými spermii býků do produkce embryí in vitro nevyžaduje ve srovnání se standardní metodou fertilizace bovinních oocytů další finanční náklady, protože metoda umožňuje využívat současné vybavení IVF laboratoře, jako jsou přístroje, kultivační plasty i média. Navíc zavedení fertilizace v mikrosystému umožňuje snížit spotřebu sexovaných spermií a relativně drahých fertilizačních médií i možnost úspěšně fertilizovat nízký počet oocytů, které lze průměrně získat od individuálních donorek po opakovaných transvaginálních aspiracích (OPU).

Hlavním ekonomickým přínosem produkce embryí požadovaného pohlaví je především přínos pro chovatele, který spočívá v efektivnějším uplatnění šlechtitelských strategií, rychlejším dosažení genetického zisku a snížení vynaložených finančních prostředků. Především v chovech mléčného skotu je produkce a transfer embryí a narození jedince samičího pohlaví od geneticky cenných rodičů z chovatelského i ekonomického hlediska zcela zásadní. Získání potomstva požadovaného pohlaví minimalizuje ztráty vzniklé produkcí embryí, embryotransferem, narozením a odchovem jedinců nežádoucího pohlaví a v důsledku toho snižuje celkové náklady na odchov potomstva, které odpovídá chovatelským záměrům. Významným chovatelským i ekonomickým přínosem předkládané metodiky je efektivnější využití reprodukčního potenciálu geneticky cenných jedinců cestou racionálnějšího využití jejich gamet, a to jak v současném procesu šlechtění skotu, tak i pro uchování genových zdrojů. Konkrétní ekonomický přínos metodiky bude záviset na využití metody IVP embryí predikovaného pohlaví chovateli skotu a plemenné hodnotě selektovaných rodičů. Zvýšení nákladů, které pro chovatele představuje nákup dražších sexovaných inseminačních dávek, je proto nevýznamné.

## VII. Seznam použité související literatury

BALAO DA SILVA, C. M., ORTEGA-FERRUSOLA, C., MORRELL, J. M., RODRIGUEZ MARTINEZ, H., PENA, F. J. Flow cytometric chromosomal sex sorting of stallion spermatozoa induces oxidative stress on mitochondria and genomic DNA. *Reprod Domest Anim* 2016;51:18–25.

DEL OLMO, D., PARRILLA, I., GIL, M.A., MASIDE, C., TARANTINI, T., ANGEL, M.A., ROCA, J., MARTINEZ, E.A., VAZQUEZ, J.M. Handling of boar spermatozoa during and after flow cytometric sex-sorting process to improve their in vitro fertilizing ability. *Theriogenology* 2013;80:350–356.

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.

GAMARRA, G., LACAZE, S., PONSART, C., MOUNEYSES, M., MARQUANT LE GUIENNE, B. In vitro embryo production from oocytes fertilized with unsorted or X-sorted sperm and issued from subfertile high genetic merit cows following FSH stimulation. In: Proceedings of the 30th Annual Meeting of A.E.T.E., Dresden, Germany, 2014:106.

JO, H.T., BANG, J.I., KIM, S.S., CHOI, B.H., JIN, J.I., KIM, H.L., JUNG, I. S., SUH, T.K., GHANEM, N., WANG, Z., KONG, I.K. Production of female bovine embryos with sex-sorted sperm using intracytoplasmic sperm injection: efficiency and in vitro developmental competence. *Theriogenology* 2014;81:675–682.

KAIMIO, I., LINDEBERG, H., VAHTIALA, S., VARTIA, K., MIKKOLA, M., LIDAUER, P., PEIPPO, J., HANNILA, M.L. Influence of sex sorted semen on embryo production in dairy cattle. In: Proceedings of the 26th Annual Meeting of A.E.T.E., Kuopio, Finland, 2010:174.

KHAMLOR, T., PONGPIACHAN, P., SANGSRITAVONG, S., CHOKESAJJAWATEE, N. Determination of sperm sex ratio in bovine semen using multiplex real-time polymerase chain reaction. *Asian-Australas J Anim Sci* 2014;27:1411–1416.

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.

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

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.

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

POZZI, A., PREVITALI, C., LUKAJ, A., GALLI, A., BONGIONI, G., PUGLISI, R. High-resolution melt analysis does not reveal mutagenic risk in sexed sperm and in vitro-derived bovine embryos. *Anim Genet* 2014;45:473–478.

UNDERWOOD, S.L., BATHGATE, R., PEREIRA, D.C., CASTRO, A., THOMSON, P.C., MAXWELL, W.M., EVANS, G. Embryo production after in vitro fertilization with frozen-thawed, sex-sorted, re-frozen-thawed bull sperm. *Theriogenology* 2010;73:97–102.

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**

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 QJ 1510138 dotovaného NAZV a projektu LD14104 COST-CZ financovaného MŠMT ČR.*

M. MACHATKOVÁ, M. JEŠETA, D. KNITLOVÁ, K. HANZALOVÁ. Penetrační test - spolehlivá a rychlá metoda predikce fertility u býků. *Veterinářství* 2011; 61 (9):504–508. *Tato studie byla financována z prostředků určených na řešení projektů NAZV QI 91A018 a 0002716202 MZ ČR projektu GAČR 523/08/H064.*

### **IX. Dedikace**

Metodika vznikla na základě poznatků získaných v průběhu řešení projektu NAZV QJ1510138 a podpory na rozvoj výzkumné organizace RO 0516, které jsou financovány MZe ČR.

## **X. Jména navržených oponentů**

MVDr. Jan Bažant  
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. - 35 %  
MVDr. Pavlína Hulínská, Ph.D. - 45 %  
Mgr. Kateřina Hanzalová - 20 %

VÚVeL 

Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i.  
Hudcova 296/70  
621 00 Brno  
Czech Republic

Tel.: +420 5 3333 1111; [www.vri.cz](http://www.vri.cz); e-mail: [vri@vri.cz](mailto:vri@vri.cz)