

A thick black L-shaped frame surrounds the text. It starts at the top left, goes right, then down, then right again, and finally down to the bottom right corner.

LABORATORNÍ PRODUKCE EMBRYÍ Z POHLEDU CHOVATELE

Doc. Ing. Jiří Šichtař, Ph.D.

EmbryoLab s.r.o.

Způsoby produkce embryí skotu

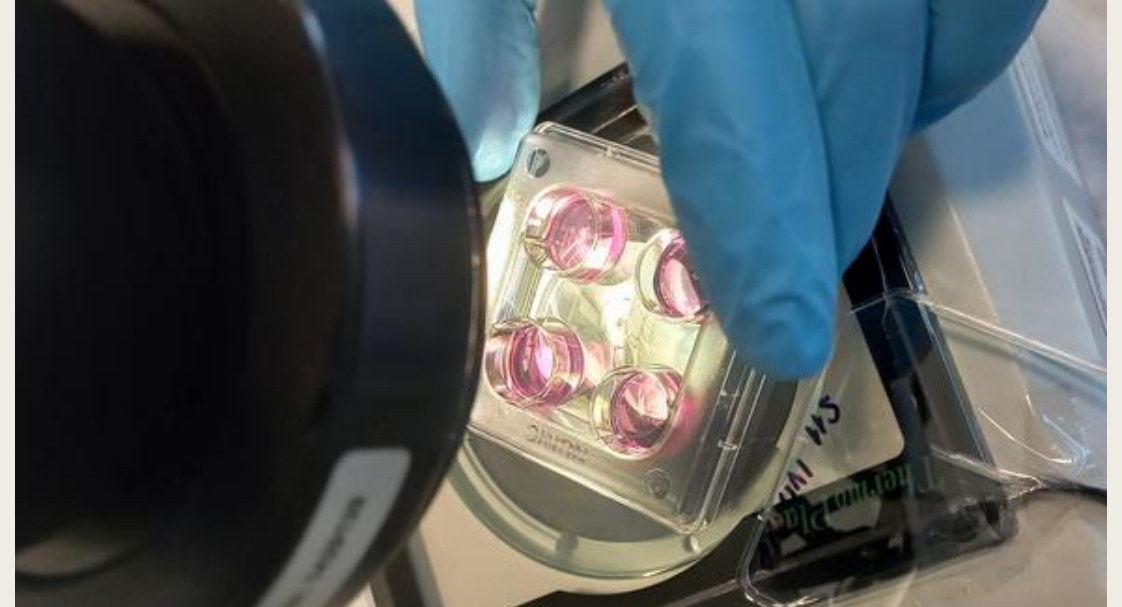
■ In vivo

- *Embryotransfer*



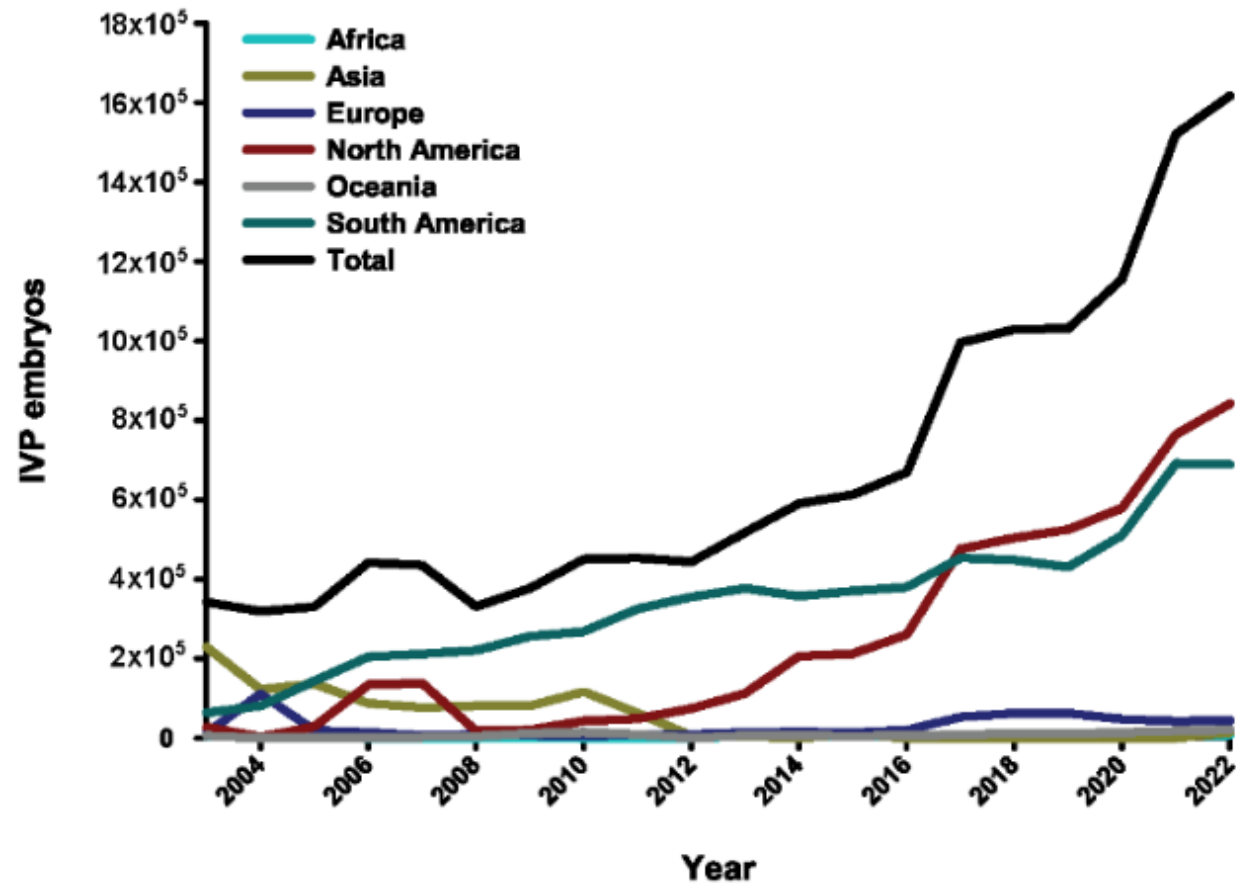
■ In vitro

- *Laboratorní produkce embryí (IVPE)*



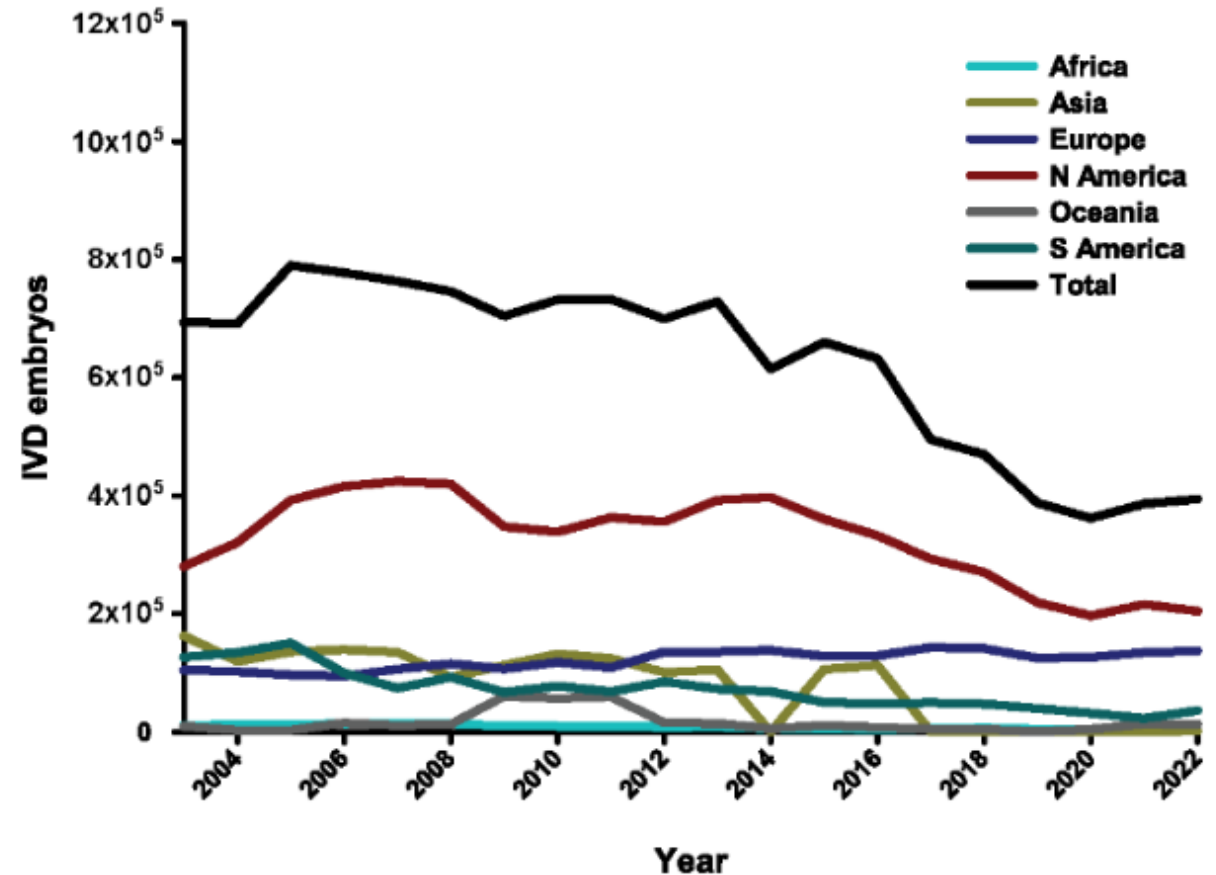
Celosvětová produkce embryí skotu

A



Embrya z laboratoře

B



Embrya z embryotransferu

Proč začít přemýšlet nad IVPE?

PŘEKONÁNÍ PROBLÉMŮ
PŘI REPRODUKCI
(PORODU)

ZACHOVÁNÍ
HODNOTNÉHO
GENOTYPU

ZKRÁCENÍ
GENERAČNÍHO
INTERVALU

ŠIROKÁ PESTROST
DÁRKYŇ NEBO DÁRCŮ

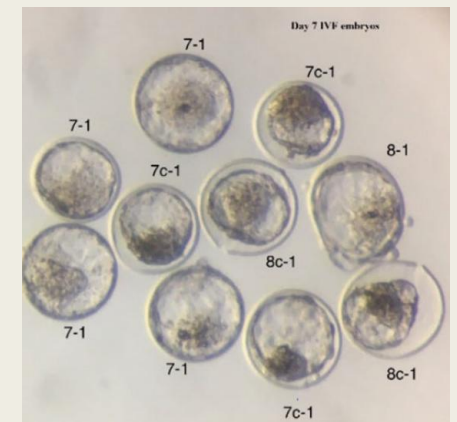
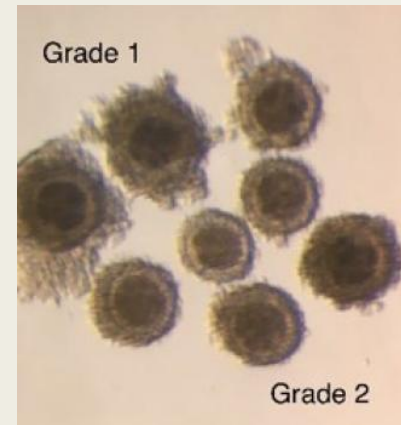
SNÍŽENÍ NÁKLADŮ NA
SEMENO

MENŠÍ HORMONÁLNÍ
ZÁTĚŽ (?)

!!! RYCHLEJŠÍ A EFEKTIVNĚJŠÍ DOSAŽENÍ ŠLECHTITELSKÉHO CÍLE!!!!

Jak získáme embrya „z laboratoře“?

- časově, finančně a technicky náročná procedura
- zahrnuje několik na sebe navazujících kroků
 - *Každý je stejně důležitý!!!!*
- výběr dárkyně
- sběr oocytů (OPU)
- **in vitro zrání (IVM)**
- **in vitro fertilizace (IVF)**
- **in vitro kultivace embryí (IVC)**
- přenos nebo kryokonzervace



Od jakých plemenic můžu získávat vajíčka?

■ Jalovice

- *Prepubertální (spíše laparoskopicky)*
- *Lepší v pubertě – přirozená hormonální stimulace oocytů (říjové cykly)*
- *Březí*

■ Krávy

- *Již od cca 20. dne p.p.*
- *Anestrické*
- *Acyklické*
- *Cyklující*
- *Březí (1. trimestr – nebo dokud dosáhneme na vaječníky)*

■ Oproti tomu klasický ET

- *Cyklující plemenice od cca 12-13. měsíců*

Na co myslet při výběru dárkyně?

- velmi důležitý výchozí bod
 - *ne každá samice je vhodná dárkyně*
- nutno věnovat dostatečnou pozornost výběru
 - *musí být zohledněno několik aspektů, které se posuzují jako celek*



- zdravotní stav
- věk
- velikost
- temperament
- reprodukční stav (jalovice, kráva po porodu, březí, acyklická, anestrická,...)
- reprodukční výkonnost (zabřezávání, porody)



Zázemí pro provádění OPU

■ Fixace

- *Trefujeme se jehlou do několikamilimetrových folikulů*
- *Prakticky neznatelný pohyb dárkyně pohne i vaječníkem*
- *Bez fixační klece to opravdu nejde*

■ Oocyty jsou velmi vnímavé na teplotní šok

- *Zásadní je zachování cca 37 °C po celou dobu manipulace*
- *Okolní teplotní podmínky alespoň >15 °C*

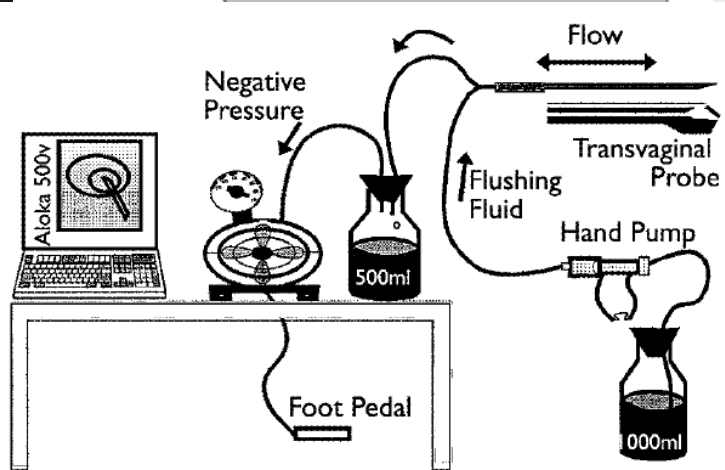
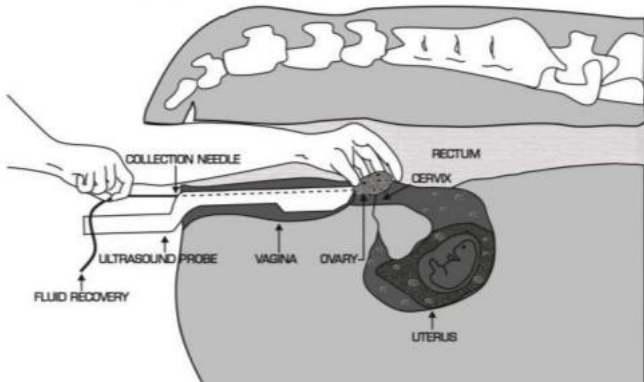
■ Čistota „laboratoře“ v terénních podmínkách

- *Nekuřácké, neprašné, čisté a vyhřáté prostředí*



Ovum Pick Up

- Ultrazvukový přístroj + aspirační aparatura
- Vakuová pumpa
- Termoblok

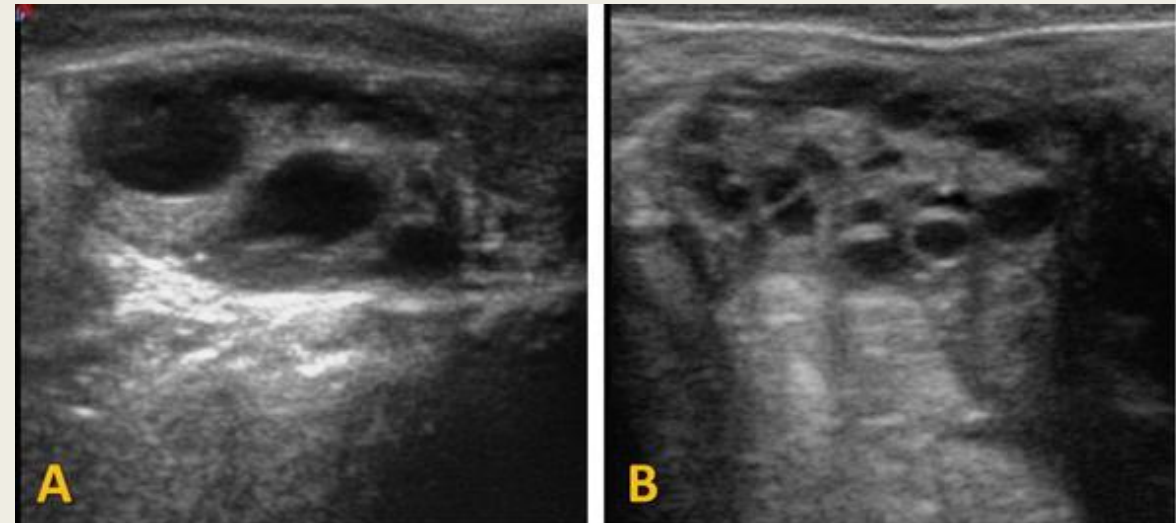


Terénní laboratoř



Kolik se získá vajíček? Záleží na dárkyni...

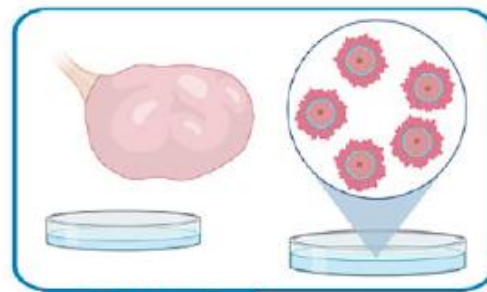
- Vajíčka se aspirují z folikulů o velikosti 2 – 8 mm
- Záleží na předchozí přípravě
 - *Různá schémata hormonální stimulace folikulárního růstu*
- Široký rozsah – vajíčka získáme ze 30-80 % folikulů přítomných na vaječniku
- Průměrně 50-60 %
 - *10 folikulů = 5 vajíček*



Jak často se dají získávat oocyty z jedné dárkyně?

- Většinou **1 x týdně** (někdy i 2 x – v rozmezí 3-4 dní)
- **1 x 14 dní** („lehká“ **stimulace s FSH**)
 - *Přesto se dá získat více embryí z 1 x týdně protokolu (!více návštěv, více fertilizačních a inkubačních cyklů...cena?)*
- Cca **1 za měsíc**
 - *Klasická hormonální stimulace jako při ET*
 - *Větší výtěžnost vajíček vs. méně časté využití plemenice*
- **Jatečný materiál** – jednorázově 20 – 30 oocytů

Laboratorní práce



Day -1

***In vitro* Maturation**

Collect ovaries, prepare, and mature oocytes

Steps
1-5



Day 0 or 1

***In vitro* Culture Preparation**

Prepare media dishes and hypoxia chamber

Step 9

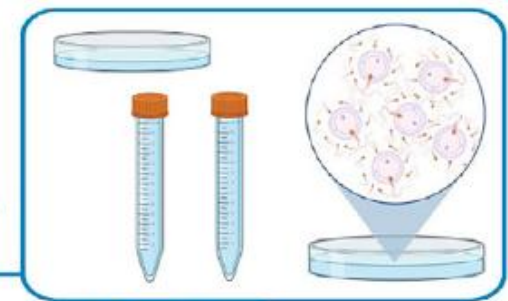


Day 2

Blastocyst Assessment

Record embryo cleavage

Step 11



Day 0

***In vitro* Fertilization**

Prepare and fertilize

Steps
6-8

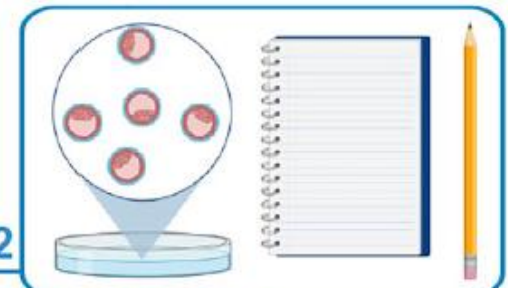


Day 1

***In vitro* Culture**

Denude and culture presumptive zygotes

Step 10

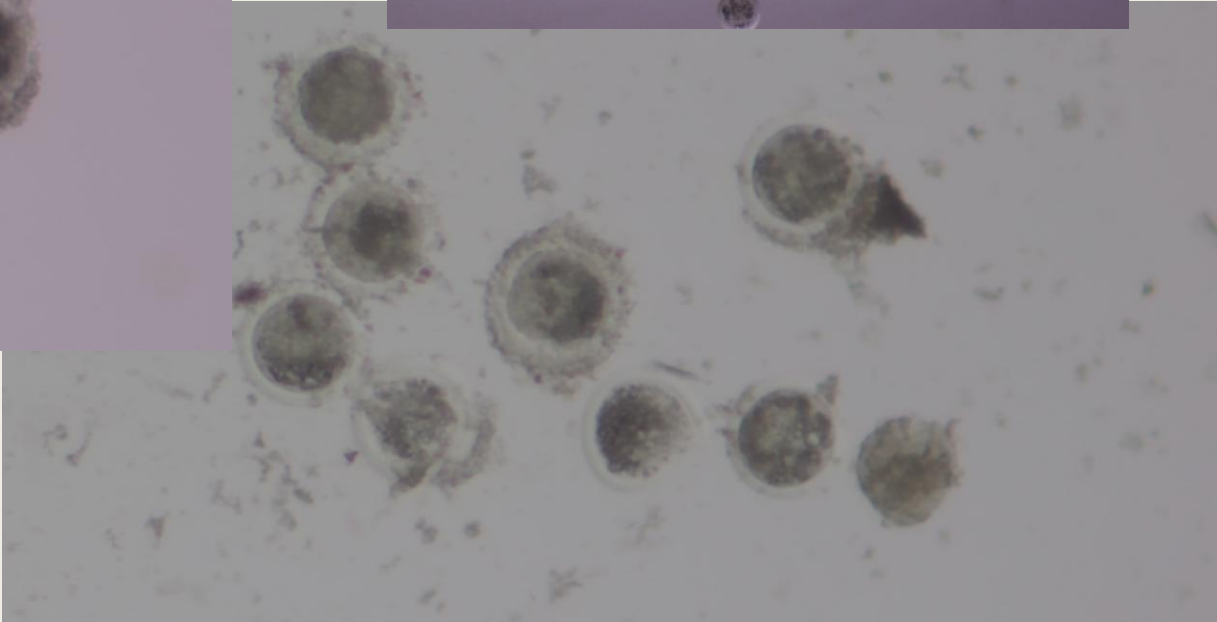
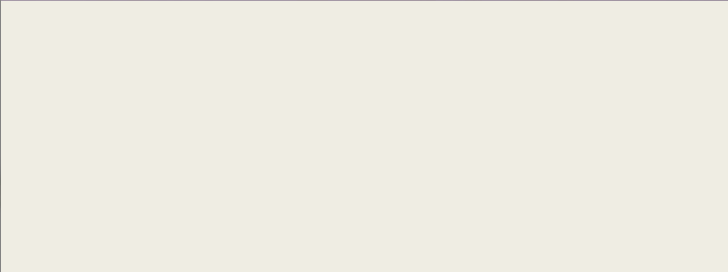
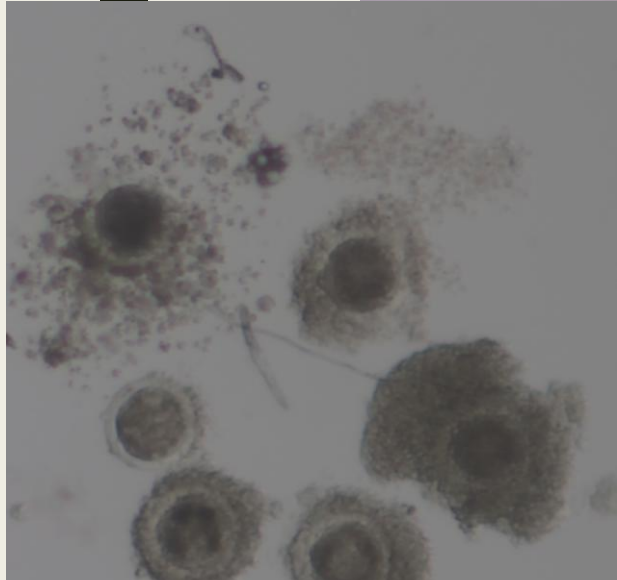
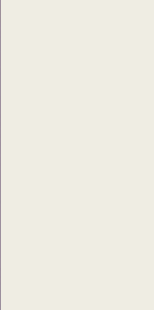
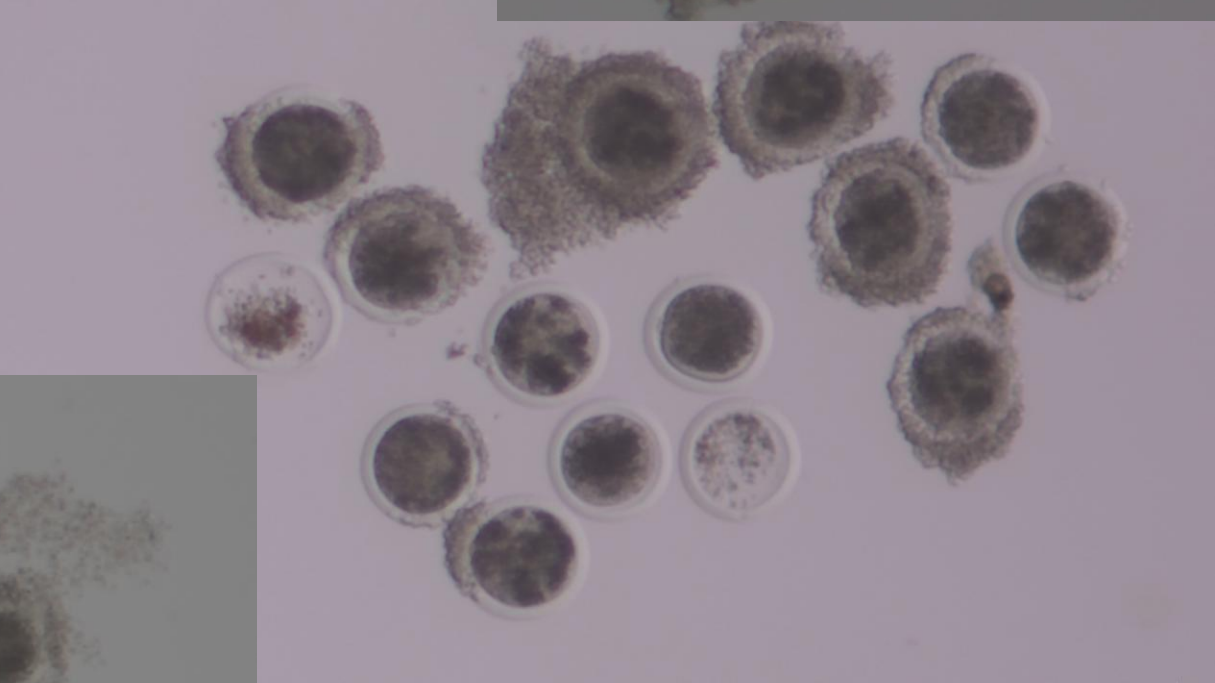
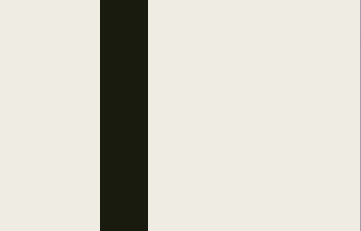
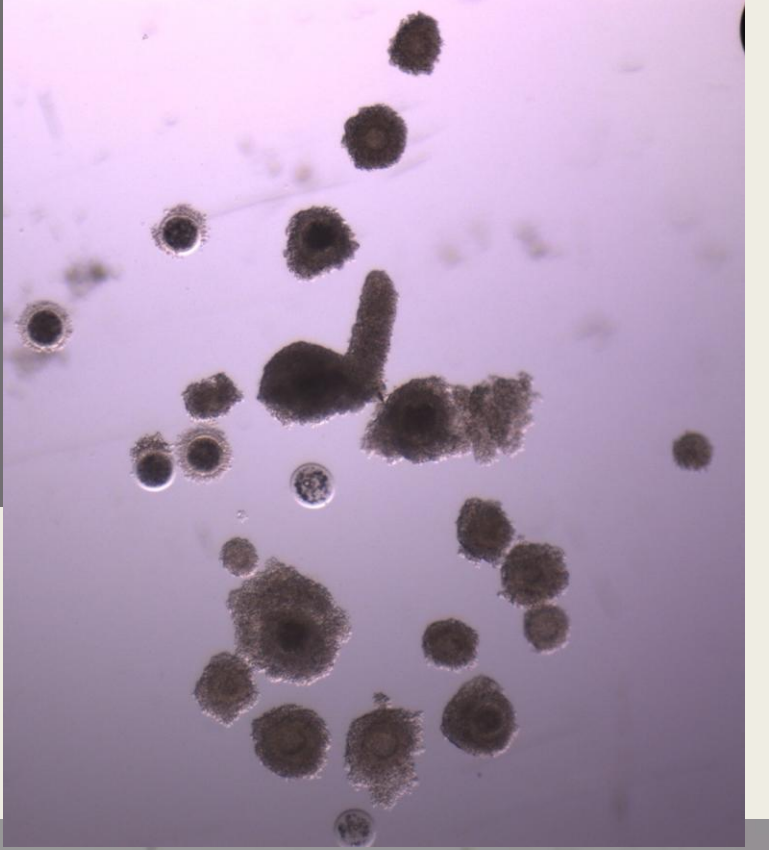
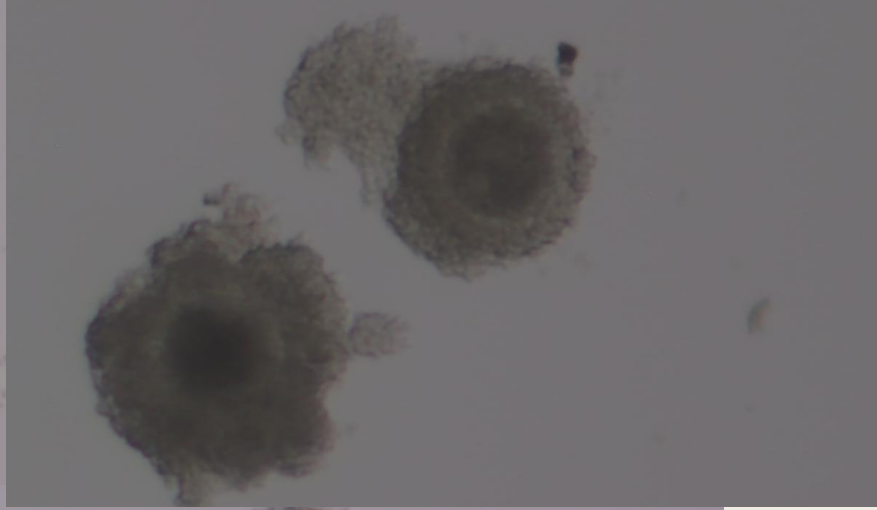
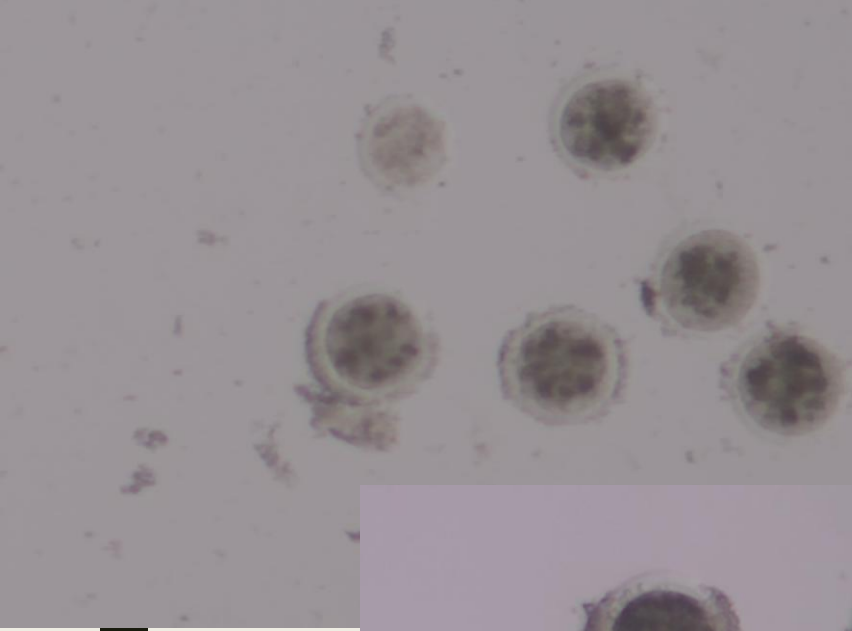


Day 7 & 8

Blastocyst Assessment

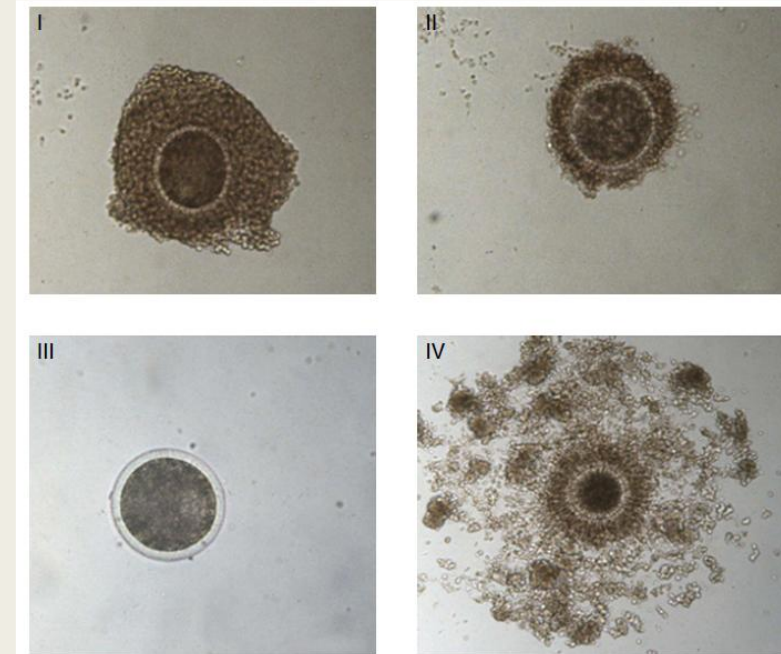
Record embryo blastulation

Step 12



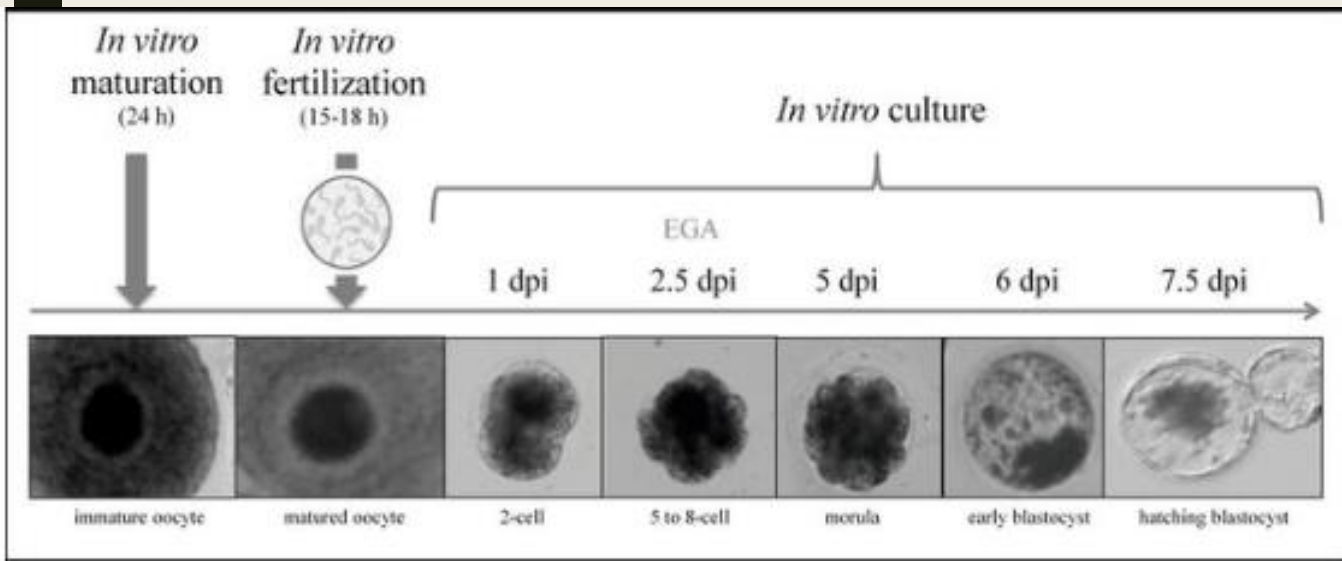
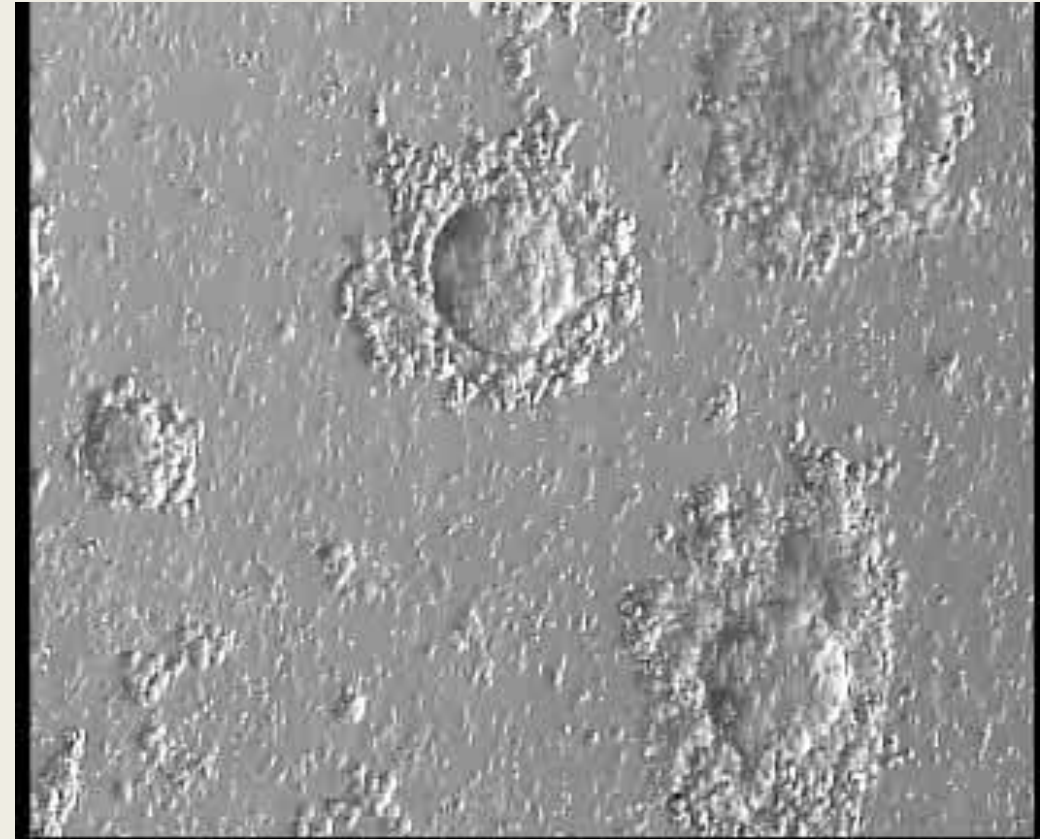
Co se děje s oocyty v laboratoři

- aspirované oocyty neschopné oplození
- nutno nechat dozrát do MII fáze
- převoz do laboratoře
 - *snaha simulovat in vivo podmínky*
- In vitro zrání oocytů
 - *Ne všechny oocyty jsou vhodné*
 - *Kontroluje se kvalita*
 - *Cca 24 hodin při 38 °C v 5% CO₂*



Oplození a následná kultivace embryí

- K dostání semeno býků vhodných k IVP
 - „Výhoda“: každý oocyt může být oplozen jiným býkem
- Spermie + oocyty na 24 h při 38 °C do CO₂
- Kultivace embryí
 - 7 dní, 38 °C, 90 % N₂, 5 % CO₂



Výtěžnost

■ OPU

- 20-90 %
- Cca 50 %

■ Zrání do M II

- 60-80 %

■ Vývoj embrya

- 60-80 %

■ Do blastocysty

- 40-50 %

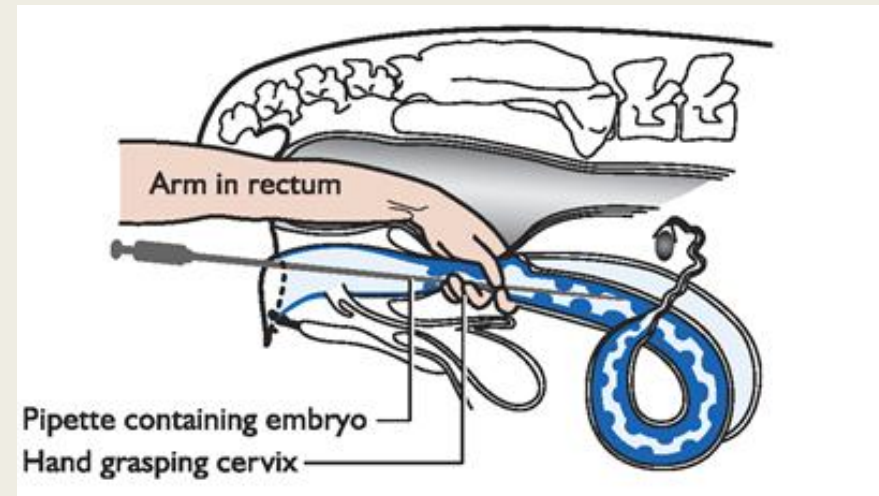
Donor Group/Quantity of Oocytes	OPUs	Total Oocytes per OPU	IVC Oocytes per OPU	Grade 1 and 2 Oocytes/ Total Oocytes	Cleavage Rates	Embryos per Donor	Embryos/IVC Oocytes	Embryos/ Grade 1 and 2 Oocytes
> 20 oocytes per OPU	517	34.1	29.3	35%	78%	7.7	26%	64%
<10mo Heifers	65	34.3	28.0	33%	69%	4.8	17%	42%
>10mo Heifers	77	29.4	26.2	41%	76%	7.0	27%	57%
Lactating Cows	117	32.1	27.5	30%	77%	6.7	24%	70%
Dry Cows	258	36.4	31.3	37%	81%	9.1	29%	68%
> 10-20 oocytes per OPU	1192	17.0	14.5	35%	78%	4.1	28%	69%
<10mo Heifers	157	16.5	14.3	34%	74%	3.2	22%	56%
>10mo Heifers	385	16.2	14.2	39%	81%	4.6	32%	71%
Lactating Cows	257	17.3	14.7	27%	77%	3.5	24%	77%
Dry Cows	393	17.9	14.9	37%	79%	4.5	30%	68%
<10 oocytes per OPU	1524	8.2	6.3	31%	78%	1.7	27%	67%
<10mo Heifers	177	8.2	6.5	30%	76%	1.5	23%	59%
>10mo Heifers	710	7.9	6.2	34%	80%	1.9	30%	71%
Lactating Cows	371	8.0	6.3	23%	74%	1.5	23%	77%
Dry Cows	266	9.0	6.5	35%	79%	1.7	26%	55%
TOTAL	3233	15.6	13.0	34%	78%	3.6	27%	67%
<10mo Heifers	399	15.7	13.1	33%	73%	2.7	21%	52%
>10mo Heifers	1172	12.0	10.2	37%	80%	3.1	30%	69%
Lactating Cows	745	15.0	12.5	27%	76%	3.0	24%	74%
Dry Cows	917	20.5	17.1	36%	80%	5.0	29%	66%

Výběr příjemkyně embryí

- Přenáší se do příjemkyň 7. den po říji!
 - *Nutno odsledovat říji (pedometry + vizuální detekce)*
- Lepší připravit více příjemkyň
- Kráva nebo jalovice?
 - *Jalovice lepší zabřezávání X použitý býk a snadnost telení*
 - *Krávy jistější volba, druhá třetí laktace...?*
- Zdravotní stav
 - *Ideálně: zdravá v průběhu předchozího půl roku*
- BCS
 - *2,5 – 3,5 (pokud mimo, pak se zabřezávání snižuje)*
- Pravidelné říjové cykly, vyšetření ultrazvukem (vaječníky ale i děloha!)

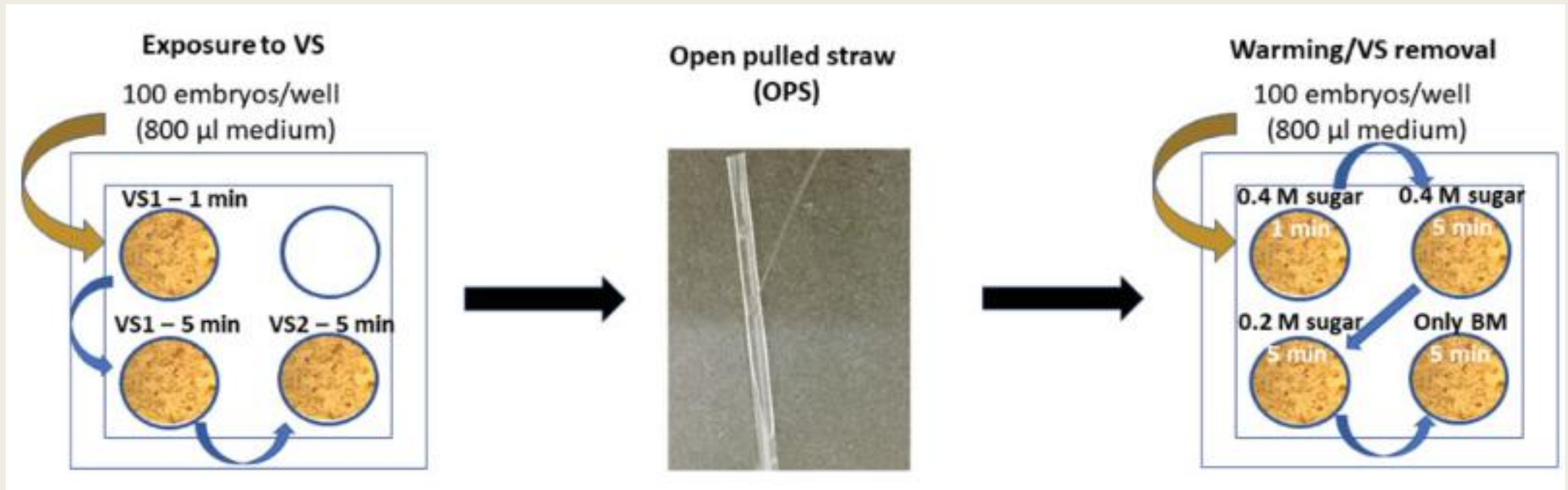
Přenos embryí

- Nechirurgický, atraumatický přenos embrya do děložního rohu s detekovaným CL
- U in vitro embryí důležitá zejména: **přesnost, šetrnost, rychlost**
- U konzervovaných embryí to platí dvojnásob
- Kvalita embryí NE vždy přímo koresponduje s úspěšností zabřezávání
- Přenos čerstvých a konzervovaných embryí stejné kvality cca – 10% zabřezlých



Kryokonzervace = vitrifikace

- Existuje několik možných postupů a metod **vitrifikace**
- Oproti pomalému mražení několikanásobné vystavení vysokým koncentracím kryoprotektantu (netvoří se led. krystaly, ale sklu podobná struktura)
 - *Nutnost promytí po rozmražení (limitující prvek?)*



Výhody in vitro produkce embryí

- **Krátký interval mezi jednotlivými odběry (oocytů)**
 - *Oocyty lze získávat až do konce prvního trimestru březosti*
- **Hormonální (ne)stimulace**
 - *možnost volby pro chovatele s menším či větším počtem dárkyň*
- **Mladé jalovice**
 - *Alespoň 10 měsíců*
 - *Nicméně horší výsledky*
- **Březí dárkyně**
- **Široké využití spermatu TOP býků**
 - *Teoreticky lze oplodnit každý oocyt jednou ID (nebo její částí)*
 - *Nebo lze využít různé ID na několik skupin oocytů*

Nezapomínejme na obchodování embryí!

- Kde se v ČR berou geneticky špičková embrya obohacující chovy dojeného nebo masného skotu?
 - *NAKUPUJÍ SE!!!!*
- Mezi chovateli v ČR je obchodování s embryi poměrně **podceňované**
- Ale proč??? „Genetiku“ na to máme!
- Chybí centrální databanka embryí?
- Chybí služba, která by zajistila vše od „A do Z“?
- Ať už se jedná o embrya získaná pomocí výplachu dělohy nebo vyrobená v laboratoři, vždy má smysl přemýšlet o **ekonomickém profitu z prodeje!**

Jsou in vitro a in vivo embrya jiná?

- ANO

- *Exprese genů, abnormality chromozomů, přežitelnost mražení, ultrastrukturální změny, metabolismus embryí, morfologie*

- V zásadě je na vině rozdíl mezi **inkubačními podmínkami**

- *Dynamický vývoj ve vejcovodu vs. Statické podmínky v inkubátoru*

- Z toho důvodu se neustále věnuje velké úsilí **optimalizaci** inkubačních podmínek

- I přes výše uvedené je to využívaná a nezastupitelná biotechnologie ve šlechtění

„Půlení“ embryí

- USA 1982-2006: 2664 telat z půlených embryí
- Průměrně 100 za rok
- 15000-20000 ročně klasickým ET
- 1988 půlených embryí = 50,2% březost
 - 100,4 % pro „embryo“

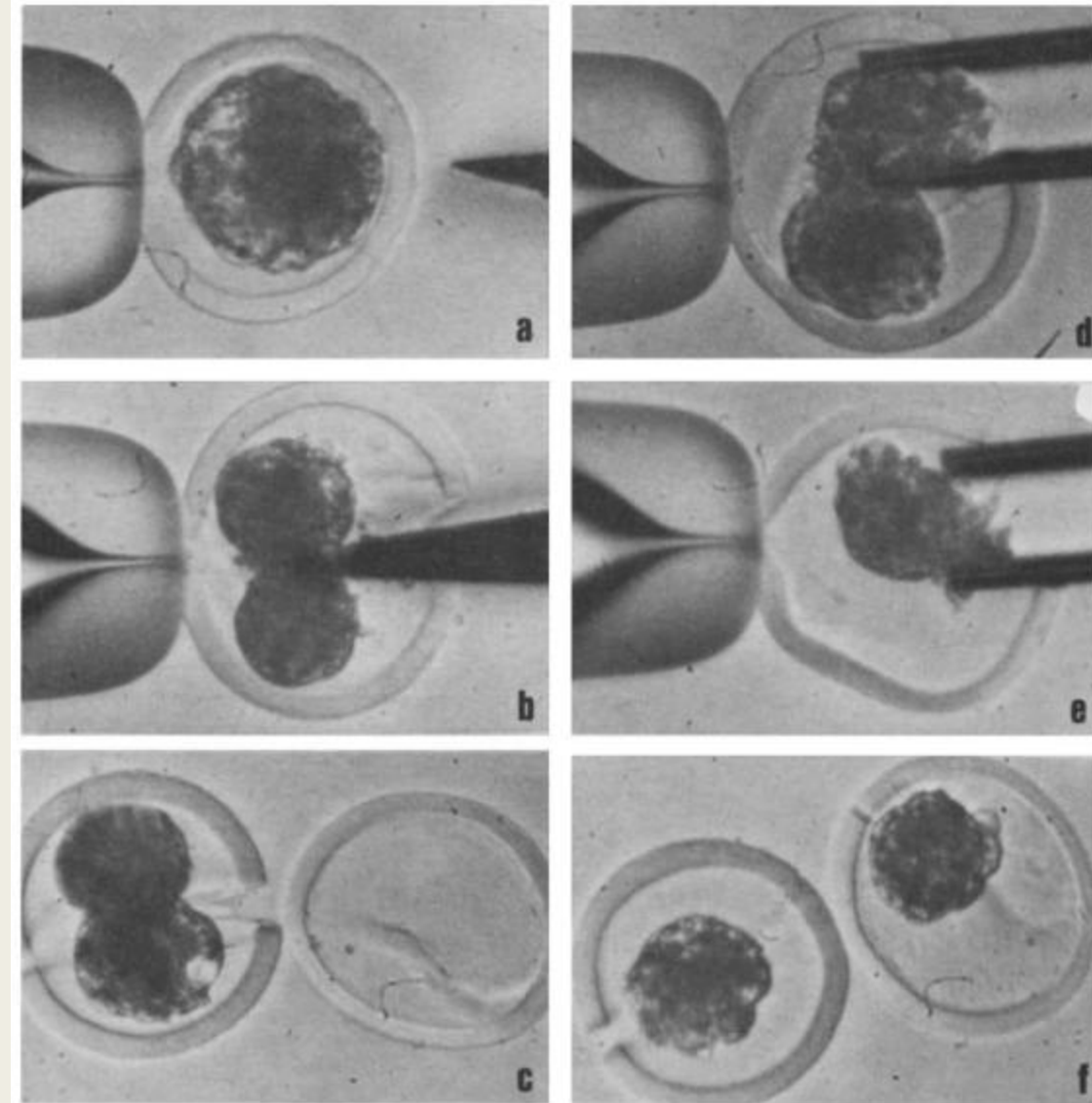
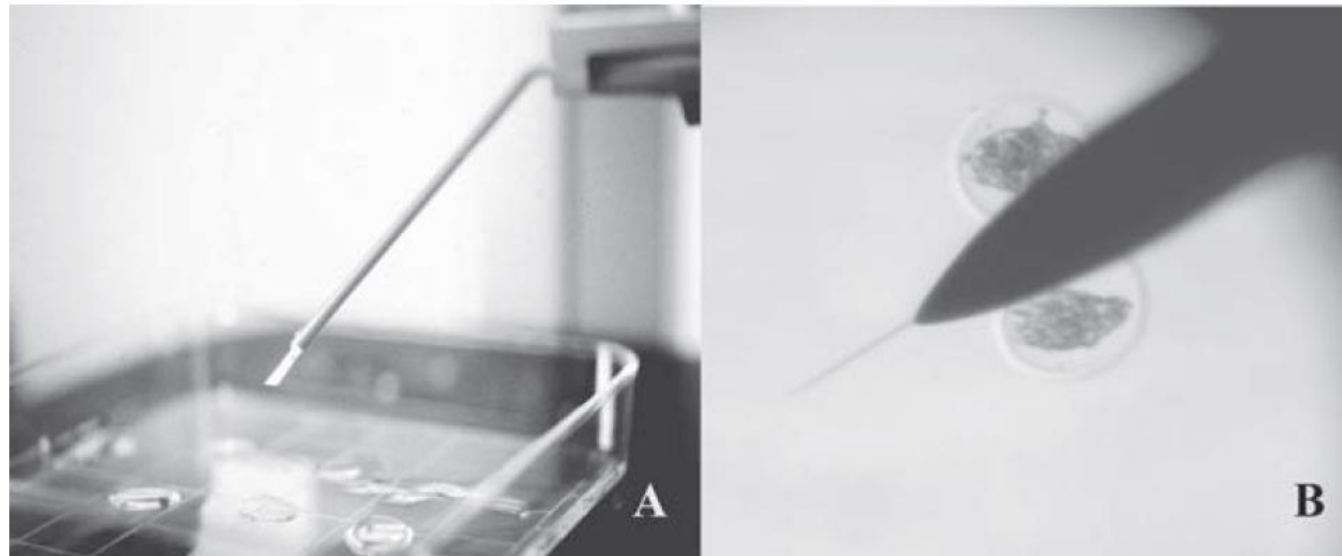
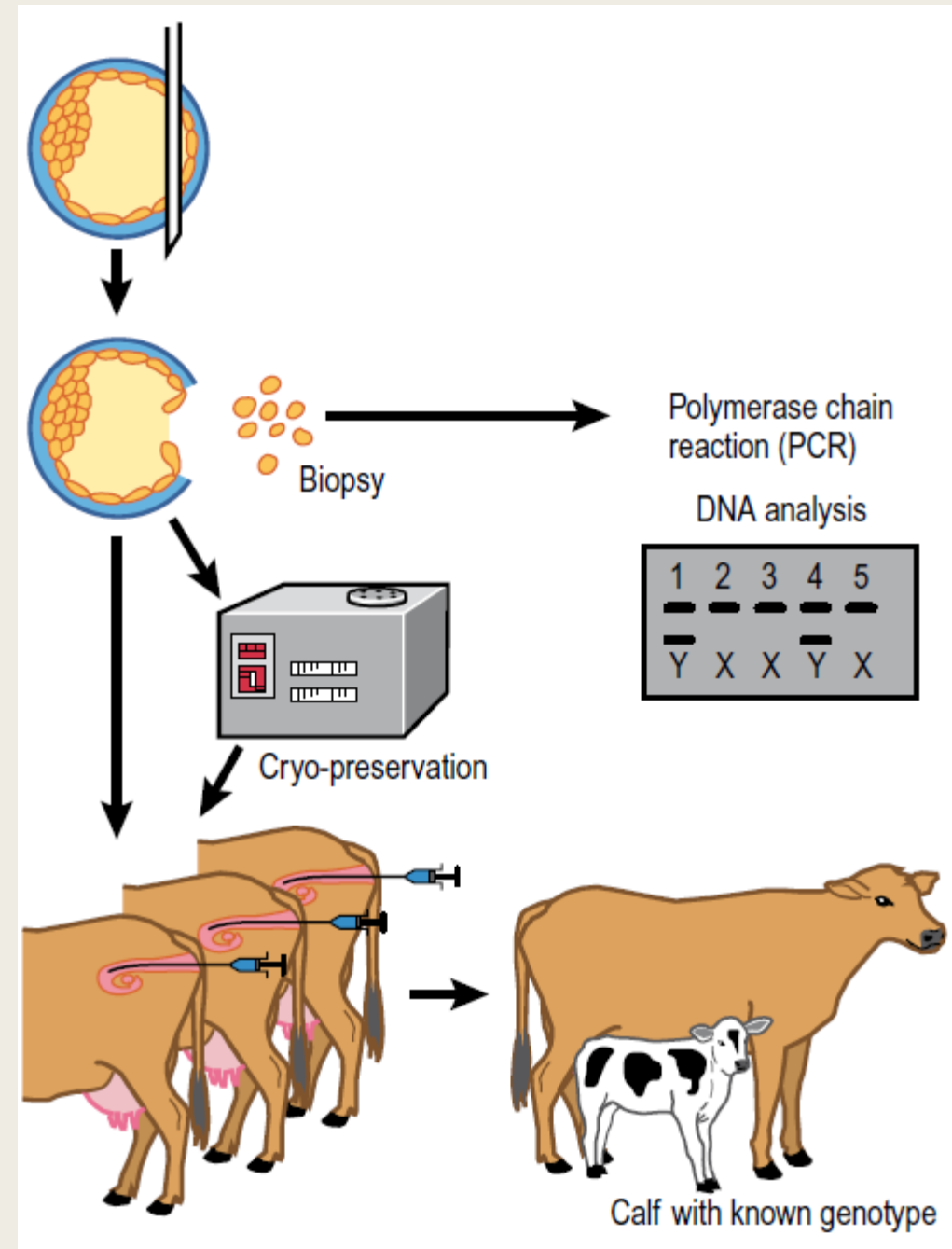


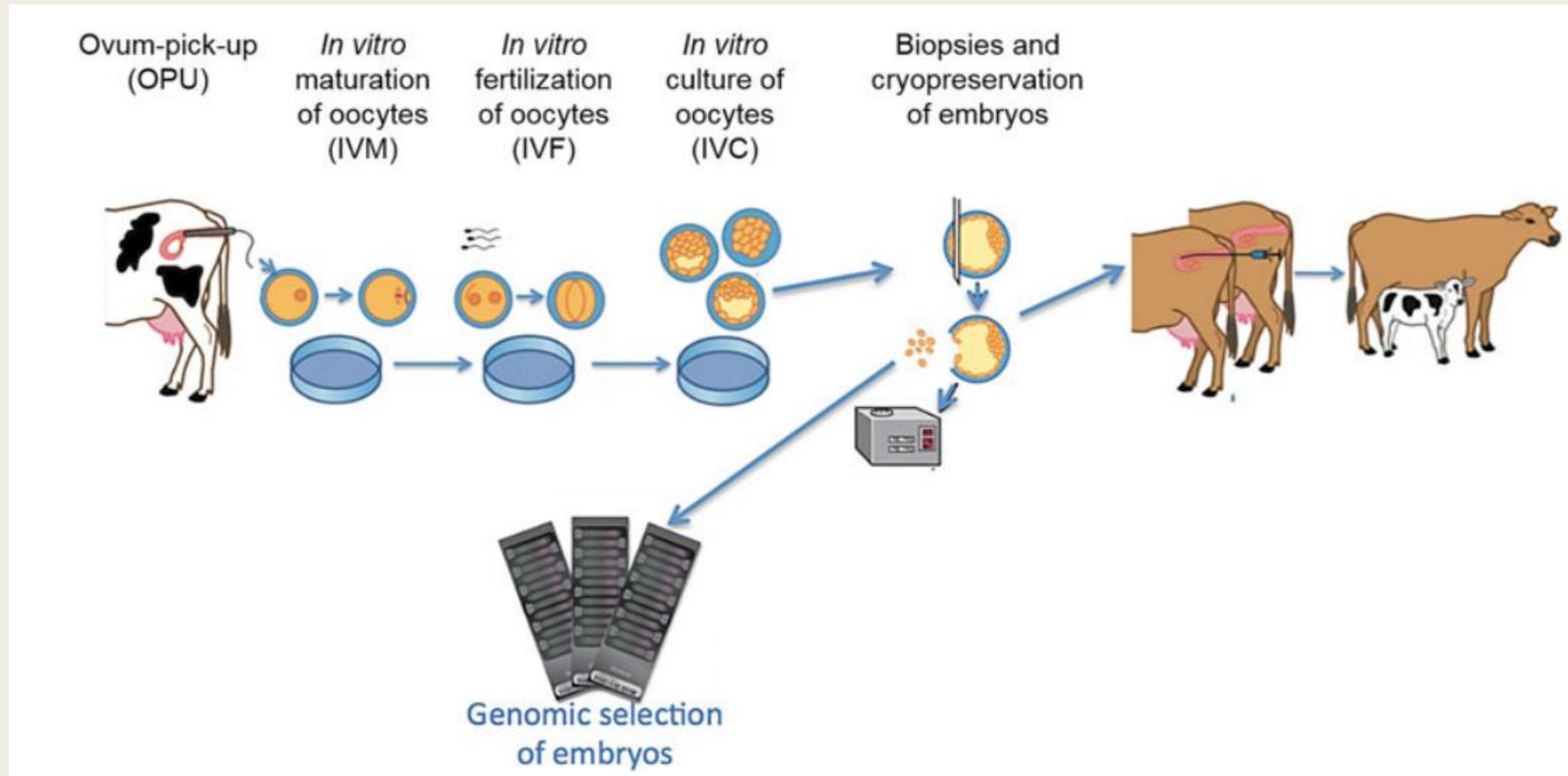
Figure 8.14. (A) Steel microsurgical blade attached to micromanipulator for bisection of embryos held in microdrops of embryo holding medium on the bottom of a Petri dish. (B) Demi embryos after bisection viewed from below with an inverted microscope through the bottom of a Petri dish. Note scratch from blade on the bottom of the Petri dish.

Určování pohlaví embryí

- V počátcích slibná a vítaná technologie
- Problém ale v přesunu embryí z laboratoře na farmu
- V dnešní době spíše použití sexovaného ejakulátu



Genotypizace IVP embryí...budoucnost?



Děkuji za pozornost!

